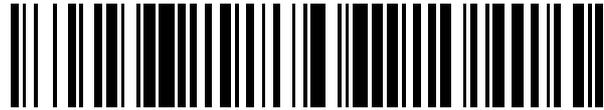


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 968**

51 Int. Cl.:

G02B 21/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2006 E 06838184 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1955102**

54 Título: **Procedimientos y aparatos para la formación confocal de imágenes**

30 Prioridad:

23.11.2005 US 286309

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

17.06.2013

73 Titular/es:

**ILLUMINA, INC. (100.0%)
9885 TOWNE CENTRE DRIVE
SAN DIEGO, CALIFORNIA 92121, US**

72 Inventor/es:

**KOTSEROGLOU, THEOFILOS;
WANG, MARK;
TRIENER, ALEXANDER;
CHE, DIPING y
KAIN, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 407 968 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

Procedimientos y aparatos para la formación confocal de imágenes

5 Antecedentes

La presente invención se refiere de manera general al sector de formación de imágenes ópticas. De manera específica, la presente invención se refiere a sistemas de formación de imágenes para su utilización en la detección de microconjuntos de muestras.

10 Los microscopios ópticos proporcionan una potente herramienta para investigar muestras con resolución submicrónica. Por ejemplo, en biología y medicina, se utilizan etiquetas moleculares apropiadas, tales como etiquetas fluorescentes e inmunofluorescentes, para marcar moléculas individuales y se detectan señales exclusivas procedentes de las etiquetas por el microscopio óptico para identificar su presencia. La detección con resolución submicrónica permite, no solamente la determinación de la presencia de moléculas marcadas, sino también su localización en las células o tejidos y alrededor de los mismos.

20 Dos objetivos en conflicto de los sistemas de inspección mediante microscopía óptica se refieren a conseguir formación de imágenes de alta velocidad y de alta resolución. De manera típica, la resolución de un microscopio óptico es inversamente proporcional a la velocidad de formación de imágenes. Por esta razón, se consigue frecuentemente una mayor resolución con el sacrificio de una tasa de inspección más baja. Una técnica para acomodar el conflicto antes mencionado consiste en escoger selectivamente la resolución del sistema de acuerdo con características específicas de la muestra que está siendo observada u otras condiciones del experimento. De este modo, se puede utilizar una resolución más baja para conseguir velocidades más altas mientras se busca un área de interés en una muestra y a continuación, una vez se ha encontrado una localización de interés, la formación de imágenes puede ser llevada a cabo con una resolución más elevada a pesar del coste de incrementar el tiempo de adquisición de la imagen.

30 Se han realizado avances significativos en la capacidad de los microscopios para investigar muestras en tres dimensiones. La aparición de los microscopios confocales y mejoras conseguidas mediante la tecnología relacionada con los mismos, permiten la detección de un punto individual en el espacio tridimensional en alta resolución rechazando al mismo tiempo señales no deseadas procedentes del volumen que rodea dicho punto. La microscopía confocal de exploración se puede llevar a cabo para desplazar de manera efectiva el punto de detección mediante la muestra, y recoger una señal de cada punto para reconstruir una imagen tridimensional precisa de la muestra.

35 La tecnología desarrollada para microscopía óptica ha sido ampliada también a otros campos de la detección de imágenes. Por ejemplo, la tecnología ha sido utilizada para obtener imágenes de microconjuntos de muestras que contienen miles de muestras moleculares acopladas a la superficie de un sustrato. La formación de imagen de la superficie de los microconjuntos de muestras después de exposición a una muestra biológica de interés permite la evaluación simultánea de miles de moléculas objetivos, proporcionando de esta manera grandes cantidades de información con respecto a la muestra. Por ejemplo, se pueden utilizar los microconjuntos de muestras para determinar el número y tipo de genes que son expresados en condiciones específicas que, a su vez, proporcionan una visión holística de la respuesta biológica al estado. Además, se pueden evaluar similitudes y diferencias entre la constitución genética de individuos utilizando microconjuntos de muestras tales que la base genética para trazos específicos puede ser determinada. Se puede utilizar información con respecto a las respuestas de expresión de genes y constitución genética de individuos para objetivos de diagnóstico y de pronóstico, por ejemplo, para determinar la susceptibilidad a cierta enfermedad o la respuesta a un medicamento específico.

50 Si bien la detección por microconjuntos de muestra se ha beneficiado de avances en la microscopía óptica, hay una serie de áreas que no se han enfocado adecuadamente con respecto a la formación de imágenes de microconjuntos de muestras. En particular, se han conseguido avances dirigidos a aumentar la resolución de las imágenes y a la eficiencia de la captación en microscopía óptica al mejorar la detección confocal tridimensional y alterar los niveles de ampliación. No obstante, la detección típica de microconjuntos de muestra es llevada a cabo solamente en dos dimensiones y para un nivel de ampliación fijo. Además, muchos de los avances en microscopía óptica de alta resolución han favorecido mejoras en la resolución con respecto a la velocidad de escaneado. Estos avances son favorables para la formación de imagen de muestras pequeñas, del orden de una o unas pocas células biológicas; no obstante, los avances no han beneficiado necesariamente el escaneado de alta resolución de muestras sustancialmente más grandes, tales como los microconjuntos de muestras.

60 El documento WO 99/47963 A1 da a conocer un sistema de formación de imágenes por microscopía confocal en el que se utiliza o bien un detector de línea o una máscara de ranura combinada con un conjunto detector bidimensional.

65 El documento EP 1 586 931 A2 da a conocer un microscopio confocal de ranura que comprende un dispositivo detector lineal monodimensional sobre el que se dirige una imagen mediante una máscara de ranura.

El documento WO 02/075292 A2 da a conocer un aparato de espectroscopia en el que se forma una imagen de una parte de una muestra sobre un dispositivo detector bidimensional. Ciertas áreas de la parte de la muestra son seleccionadas para el proceso adicional desplazando una máscara de ranura en una dirección y combinando las señales de todos los dispositivos detectores entre la ranura y una cierta dimensión perpendicular a la ranura.

Por lo tanto, existe la necesidad de dispositivos y procedimientos de escaneado que permiten formar imágenes de microconjuntos de muestras y otros sustratos bidimensionales en alta resolución y elevada velocidad. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también otras ventajas.

BREVE DESCRIPCIÓN

La presente invención da a conocer un nuevo enfoque para formación de imágenes y análisis de microconjuntos de muestras para satisfacer las necesidades indicadas. La técnica puede ser utilizada con un amplio rango de tecnologías de microconjuntos de muestras, incluyendo conjuntos constituidos por microcuentas, fotolitografía, técnicas de impresión, electroquímica, y otros. La técnica se basa en escaneado confocal de línea del microconjunto de muestras para formar una imagen de lugares individuales sobre un sustrato. Las líneas escaneadas pueden comprender más de una longitud de onda de luz, tal como un par de longitudes de onda complementarias para la lectura de diferentes colores en un retro-haz, resultando de la excitación por longitudes de onda combinada de láseres, dirigidos confocalmente hacia líneas sucesivas en lugares sobre el microconjunto de muestras. La utilización de escaneado de línea confocal mejora notablemente la velocidad de formación de imagen del microconjunto de muestras, reduciendo al mismo tiempo significativamente el potencial de interferencia como resultado de excitación no deseada de lugares adyacentes en el conjunto.

La invención da a conocer un aparato para la formación de imágenes. El aparato para formación de imágenes puede comprender (a) una fuente de radiación dispuesta para enviar radiación de excitación a, como mínimo, una parte de una región de muestra; (b) un conjunto detector rectangular que tiene elementos que convierten la energía de los botones contactados en una respuesta eléctrica, encontrándose dichos elementos en una disposición bidimensional, ortogonal, en la que una primera dimensión es más larga que una segunda dimensión; (c) óptica de formación de imágenes dispuesta para dirigir una imagen rectangular de la parte del conjunto detector rectangular; y (d) un dispositivo de escaneado configurado para escanear la zona de la muestra en una dimensión de eje de escaneado, de manera que la parte de la región de la muestra que forma una imagen rectangular en el conjunto detector rectangular es cambiada, de manera que la más corta de dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular y la más corta de las dos dimensiones rectangulares para la imagen se encuentran en la dimensión del eje de escaneado, y de manera que la más corta de las dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular es suficientemente corta para conseguir la confocalidad en un eje único del conjunto detector rectangular, de manera que el eje único es el más corto de las dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular.

La invención da a conocer, además, un procedimiento para la obtención de una imagen de una muestra. El procedimiento puede comprender las etapas de (a) establecer contacto de, como mínimo, una primera parte de una muestra con radiación de excitación bajo condiciones en las que se emana radiación desde la primera parte; (b) dirigir la radiación emanada desde la primera parte para formar una imagen rectangular de la primera parte en un conjunto detector rectangular que tiene elementos que convierten la energía de los fotones contactados en una respuesta eléctrica, encontrándose dichos elementos en una disposición bidimensional, ortogonal, en la que una primera dimensión es más larga que una segunda dimensión y; (c) escanear la parte de la muestra en la dimensión de eje de exploración, repitiendo de esta manera las etapas (a) y (b) para formar una imagen rectangular de una segunda parte de la muestra en el conjunto detector rectangular, de manera que la más corta de dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular y la más corta de dos dimensiones rectangulares para las imágenes se encuentran en la dimensión del eje de escaneado, y de manera que la más corta de dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular es suficientemente corta para conseguir confocalidad en un eje único del conjunto detector rectangular, de manera que el eje único es el más corto de las dos dimensiones rectangulares del conjunto detector rectangular.

Un procedimiento para la configuración de un escáner para conseguir confocalidad en un eje único puede incluir las etapas de (a) disponer un aparato que tenga (i) una fuente de radiación dispuesta para enviar radiación de excitación, como mínimo, a una parte de una región de muestra; (ii) un conjunto detector rectangular; (iii) óptica de formación de imágenes dispuesta para dirigir una imagen rectangular de la parte del conjunto detector rectangular; y (iv) un dispositivo de escaneado configurado para escanear la parte de la muestra en una dimensión de eje de exploración, de manera que la parte de la parte de muestras forma una imagen rectangular en el conjunto detector rectangular es cambiada, de manera que la más corta de las dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular y la más corta de las dos dimensiones rectangulares para la imagen se encuentran en la dimensión del eje de escaneado y; (b) posicionar el conjunto detector rectangular o la óptica de formación de imagen para restringir la más corta de las dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular, de manera que sea suficientemente corta para conseguir confocalidad en un eje único del conjunto detector rectangular, de manera que el eje único es el más corto de las dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular.

Los procedimientos pueden ser llevados a cabo utilizando el aparato descrito en mayor detalle más adelante. No obstante, se comprenderá que las etapas de procedimiento indicadas más adelante como ejemplo con respecto a un aparato particular pueden ser llevadas a cabo también utilizando un aparato alternativo.

5 De acuerdo con algunos ejemplos, un procedimiento para la formación de imágenes de un microconjunto de muestras biológicas comprende la generación de una serie de haces de radiación desde correspondientes láseres. Los haces de radiación son convertidos a continuación en líneas de radiación, siendo las líneas mayores en anchura que en altura. Las líneas de radiación son combinadas a continuación en una línea de radiación singular. Una parte
10 de un microconjunto de muestras es radiada a continuación con la línea de radiación combinada única. La radiación desde el microconjunto de muestras que resulta de la irradiación de dicha parte, es devuelta confocalmente a un detector, tal como un conjunto detector. A continuación, se forman imágenes de puntos determinados en la parte del microconjunto de muestras basándose en la radiación recibida por el detector. En una realización alternativa, las dos
15 líneas de radiación pueden ser combinadas de manera que las dos líneas son casi colineales y la parte del microconjunto es irradiada con las líneas casi colineales de radiación. Las dos líneas están típicamente separadas en una distancia equivalente a la anchura de cada línea a efectos de minimizar el cruzamiento entre canales. En realizaciones específicas, se pueden formar imágenes de los lugares individuales en la parte del microconjunto de muestras basándose en la radiación recibida por dos detectores, uno para cada una de las dos líneas linealmente
20 colineales.

Los ejemplos pueden utilizar diferentes dispositivos ópticos para generar las líneas de radiación y para irradiar confocalmente el microconjunto de muestras, por ejemplo, se puede utilizar una óptica generadora de líneas para
25 convertir un haz de radiación de cada láser en una línea. Se incluyen entre las ópticas generadoras de líneas, a título de ejemplo, sin que ello sea limitativo, una lente esférica, tal como una lente Powell, una lente cilíndrica o un elemento de difracción. Entonces, se pueden prever dispositivos ópticos para enfocar la línea en la parte del microconjunto de muestras y para devolver radiación provocada por fluorescencia en lugares del microconjunto de muestras hacia el detector.

En una realización alternativa, se pueden combinar, en primer lugar, líneas de radiación procedentes de láseres
30 individuales, y luego el haz combinado puede ser convertido en una línea de radiación única. Este haz único, igual que antes, puede ser dirigido hacia una parte del microconjunto de muestras. Tal como se ha indicado anteriormente, el haz combinado puede ser configurado para formar una línea de radiación única o puede ser configurado de manera que las dos líneas son casi colineales, y una parte del microconjunto es irradiado con las líneas de radiación casi colineales.

En las diferentes realizaciones, el microconjunto de muestras puede ser avanzado lentamente en la dirección deseada para irradiar sucesivamente líneas en los lugares del microconjunto a efectos de formación de imágenes. Las propias líneas pueden ser continuas, o en ciertas realizaciones, pueden ser discontinuas pero irradian
40 simultáneamente múltiples lugares a lo largo de la línea del microconjunto.

DIBUJOS

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención quedarán evidentes por la lectura de la
45 siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos adjuntos en los que iguales características representan iguales partes en todos los dibujos, en los que:

La figura 1 es una vista esquemática de un sistema de escaneado de microconjuntos para escaneado de línea confocal de un microconjunto de muestras, de acuerdo con aspectos de la presente técnica;

50 La figura 2 es una vista en perspectiva esquemática de la parte de un microconjunto que muestra una forma a título de ejemplo en la que una línea de radiación es dirigida hacia partes del microconjunto en las que están situados lugares de los que se deben formar imágenes;

La figura 3 es una representación esquemática más detallada de una parte de un microconjunto que está iluminado por una línea de radiación confocal para obtener imagen de los lugares del microconjunto de acuerdo con la
55 presente técnica;

La figura 4 es una vista en perspectiva esquemática de una línea de radiación combinada dirigida hacia una superficie de un microconjunto para irradiar confocalmente lugares sobre el conjunto, y para devolver confocalmente
60 radiación a un detector, de acuerdo con aspectos de la presente técnica;

La figura 5 es una vista en perspectiva esquemática similar que muestra una serie de haces dirigidos confocalmente de radiación a lo largo de una línea para irradiar de manera similar lugares de un microconjunto de acuerdo con la
65 presente técnica;

La figura 6 es una vista lateral esquemática de una técnica para convertir la salida de un láser en una línea de

radiación para escanear por línea confocal un microconjunto;

La figura 7 es una vista similar, en planta de la conversión de la salida de un láser en una línea de radiación a utilizar en la presente técnica de escaneado por línea confocal;

5 La figura 8 es una representación gráfica de un perfil de intensidad para una línea de radiación producida por los dispositivos de las figuras 6 y 7;

10 La figura 9 es una representación esquemática de una primera configuración a título de ejemplo para un conjunto modular utilizado en la conversión de un láser a una línea de radiación para escaneado de línea confocal, de acuerdo con una realización de la invención;

15 La figura 10 es una disposición alternativa para conversión de una salida de láser en una línea de radiación, de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 11 es otra realización alternativa para convertir una salida de láser en una línea de radiación, de acuerdo con una realización de la invención;

20 La figura 12 es otra configuración alternativa para convertir una salida de láser para alinear una radiación;

La figura 13 es una vista en sección de un módulo generador de línea a título de ejemplo, adecuado para su utilización de acuerdo con una realización de la invención;

25 La figura 14 es una vista esquemática de un sistema de escaneado que incluye dos haces de láser, cuya salida es combinada para escaneado por línea confocal de un microconjunto;

La figura 15 es una vista esquemática de un conjunto alternativo para escaneado por línea confocal de múltiple longitud de onda, de un microconjunto de muestras;

30 La figura 16 es una representación esquemática opto-mecánica de una implementación prevista en la actualidad para escaneado de línea confocal de multi-longitudes de onda de un microconjunto de muestras;

35 La figura 17 es una vista esquemática de una serie de lugares individuales sobre un microconjunto de muestras biológicas mostrando la forma en la que el escaneado de línea confocal de la presente invención mejora la exactitud al reducir el cruzamiento potencial, particularmente en ciertos tipos de disposición de los lugares sobre el microconjunto de muestras con respecto a las líneas de radiación utilizadas en la formación de imágenes;

40 Las figuras 18 a 21 muestran esquemáticamente vistas de generadores de línea de radiación a título de ejemplo que se pueden utilizar de manera adecuada en la invención;

Las figuras 22 y 23 son vistas esquemáticas de generadores de línea en un sistema de formación de imágenes de fluorescencia, adecuado para su utilización en la invención;

45 Las figuras 24 (a) – (c) son diagramas que muestran la proyección de un punto de láser sobre una cámara de escaneado por líneas e implementaciones binarias y TDI de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención;

La figura 25 es una vista esquemática de un sistema de escaneado de imágenes que está configurado para llevar a cabo formación de imágenes por fluorescencia multiespectral, de acuerdo con realizaciones de la invención;

50 La figura 26 es un diagrama de bloques de un sensor de formación de imágenes por escaneado de línea a utilizar con el sistema mostrado en la figura 25;

55 La figura 27 es una vista esquemática de otro sistema de escaneado de imagen que está configurado para llevar a cabo formación de imagen por fluorescencia multi-espectral;

La figura 28 es un diagrama de bloques de un sensor de formación de imágenes por escaneado de líneas, a título de ejemplo, a utilizar con el sistema mostrado en la figura 27;

60 La figura 29 es un diagrama de bloques de un detector de imágenes por escaneado de líneas; y

Las figuras 30 (a) – (b) son diagramas de bloque de otros detectores de formación de imágenes de exploración de líneas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

65 La presente invención da a conocer un sistema y arquitectura de escaneado de imágenes que tiene tiempos de

escaneado rápidos, manteniendo al mismo tiempo una elevada resolución y calidad de la imagen. Estas y otras ventajas resultan de la configuración de un detector para conseguir confocalidad en el eje de escaneado al restringir la dimensión según el eje de escaneado del conjunto detector. Tal como se indica más adelante de forma detallada, un aparato según la invención puede ser configurado para conseguir confocalidad en un solo eje de un conjunto detector, de manera que la confocalidad solamente tiene lugar en aquella dimensión.

El conjunto detector tiene dimensiones rectangulares, de manera que la dimensión más corta del detector tiene lugar en la dimensión del eje de escaneado. Un dispositivo óptico de formación de imágenes está situado para dirigir una imagen rectangular de una parte de muestra al conjunto detector, de manera que la dimensión más corta de la imagen es también la dimensión en el eje de escaneado. De esta manera, el conjunto detector forma una ranura virtual. Una configuración de ranura virtual proporciona varias ventajas con respecto a la utilización de una ranura típica situada delante de un detector. Por ejemplo, la configuración de un conjunto detector como ranura virtual reduce el número de elementos del conjunto no utilizados en comparación con una configuración en la que un conjunto detector, que tiene dimensiones estándar, es utilizado con una ranura. La reducción del número de elementos no utilizados aumenta la eficiencia de la captación de datos y reduce el tiempo de proceso de la imagen. Además, el utilizar una ranura virtual permite, tanto al detector como a la ranura, que se encuentren en el plano focal de las lentes de proyección eliminando cualquier compromiso de foco de posición o la exigencia de una lente de reenvío entre la ranura y el detector.

Un conjunto detector configurado de manera que tenga una ranura virtual, es particularmente útil cuando se utiliza en un aparato para la formación de imágenes que está configurado, además, para dirigir una línea de radiación a una muestra. La línea de radiación puede tener dimensiones rectangulares, en la que la dimensión más corta es suficientemente corta para conseguir confocalidad en un solo eje correspondiente a la dimensión más corta del conjunto detector. De esta manera, la confocalidad puede ser conseguida para excitación, detección o ambos. Un instrumento puede ser configurado para limitar el error de excitación en el eje confocal, de manera que, predominantemente, la totalidad de la radiación de excitación está contenida dentro de un punto comparable con la resolución del instrumento.

Un aparato que incluye un conjunto detector que forma una ranura virtual puede estar configurada para obtener una imagen de la muestra con alta resolución, por ejemplo, en el rango comprendido entre pocas micras hasta valores submicrónicos. En realizaciones específicas, se puede obtener una imagen con una resolución Rayleigh entre 0,2 y 10 micras. Además, la proporción de la dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para el conjunto detector rectangular y el producto de la resolución Rayleigh del dispositivo óptico de formación de imágenes multiplicado por la ampliación del conjunto óptico de formación de imagen se puede utilizar para determinar el tamaño y dimensiones de la ranura virtual para conseguir confocalidad en un eje único. En caso deseado, la proporción de la dimensión más corta de las tres dimensiones rectangulares para una línea de radiación con respecto a la resolución Rayleigh del dispositivo óptico de formación de imagen se puede seleccionar para conseguir confocalidad en un eje único.

De acuerdo con ello, un aparato para la formación de imágenes, según la invención, puede ser configurado para que tenga resolución, según la longitud de la línea perpendicular al eje de escaneado que se corresponde con el sistema de resolución. Por ejemplo, en el dispositivo CCD se pueden utilizar 4000 elementos CCD según la longitud de una línea de radiación de 2mm (eje horizontal) resultando en una resolución de 0,5 μ m píxel en una muestra. El número de elementos CCD "n" de la dirección perpendicular a la línea de radiación (eje vertical) se puede escoger para recoger sustancialmente la totalidad de radiación emitida reduciendo al mismo tiempo la cantidad de radiación de fondo no deseada.

Un aparato de formación de imágenes, según la invención, puede ser configurado además de manera que todos los elementos de píxeles en el eje vertical serán recogidos en una "cubeta" común y leídos como un valor individual. Las ventajas del enfoque binario en comparación con un diseño de Integración de Retraso de Tiempo (TDI) son que la velocidad de lectura puede ser reducida en un factor de "n", el sistema tiene confocalidad en un eje, y la tolerancia de la temporización de sincronización de la lectura con el movimiento en la etapa y se puede reducir. Se comprenderá que un diseño TDI puede ser configurado de manera que tenga una ranura virtual limitando el número de píxeles verticales. Una ventaja adicional con respecto a los diseños de sistema en los que n=1 son que la eficiencia de la recogida del sistema se puede incrementar, y la sensibilidad a pequeños desplazamientos de alineación óptica se puede disminuir.

Haciendo referencia nuevamente a los dibujos y haciendo referencia en primer lugar a la figura 1, el sistema de formación de imágenes 10 se ha mostrado esquemáticamente incluyendo un escáner 12, en el que se puede insertar una muestra o microconjunto de muestras 14 a efectos de formación de imagen. Tal como se describe de manera más completa más adelante, el microconjunto 14 incluye un sustrato o soporte en el que se forma un conjunto de lugares. Cada lugar incluye un fragmento molecular acoplado, tal como un gen o un fragmento de gen, que puede llevar acoplada al mismo una molécula, que puede ser una molécula complementaria en el caso de sondas de ADN o ARN de una muestra específica. En las presentes realizaciones, muchos miles de dichos lugares pueden ser dispuestos en alineaciones o en un dibujo de rejilla en partes o segmentos del microconjunto. El microconjunto en si mismo puede estar formado por varias tecnologías incluyendo, igual que en la presente

realización, microcuentas. Otros microconjuntos que pueden ser sometidos a formación de imagen de acuerdo con las presentes técnicas pueden incluir microconjuntos formados por fotolitografía y otros procesos conocidos o desarrollados en esta técnica.

5 El escáner 12 incluirá elementos ópticos, descritos en mayor detalle a continuación, para escaneado de línea confocal de los lugares del microconjunto 14. En la realización mostrada, el escáner es un dispositivo de sobremesa que tiene una bandeja de muestras 16 en la que se puede disponer el microconjunto o una serie de microconjuntos. La bandeja puede ser configurada para hacer avanzar al microconjunto 14 hacia dentro de la posición de escaneado, y a continuación desplazar lentamente el microconjunto, tal como se describe más adelante, para
10 permitir la radiación de líneas sucesivas del microconjunto, y devolver radiación o retro-haces provocados por fluorescencia de lugares individuales. Los retro-haces están enfocados sobre un detector para formación de imágenes y analizar los lugares, que también se describe más adelante. En realizaciones específicas, se pueden enfocar múltiples retro-haces a múltiples diferentes detectores. Por ejemplo, un retro-haz de una primera longitud de onda puede ser enfocado a un primer detector, y un retro-haz de un segundo retro-haz puede ser enfocado a un
15 segundo detector, tal como se indica más adelante de manera más detallada.

Las señales de control para el funcionamiento del escáner 12 se originan de un controlador o estación de trabajo 18. La estación de trabajo 18 comprende también software para recibir las señales de formación de imágenes del escáner 12. El software de formación de imágenes de la estación de trabajo 18 estará incorporado de manera típica
20 en un ordenador de tipo general o específico de la aplicación 20 que, asimismo, controla y recibe señales de componentes de interfaz 22 que incluirán de manera típica un monitor 24 y dispositivos de entrada 26. El software de formación de imágenes que puede funcionar en la estación de trabajo 18 proporcionará preferentemente un interfaz intuitivo para cargar e inicializar el escáner, para llevar a cabo escaneados de imagen sobre microconjuntos y para archivar los datos. Durante el proceso de escaneado, el sistema 10 crea archivos individuales para diferentes longitudes de onda de radiación utilizadas para la formación de imágenes del microconjunto, a las que se pueden hacer referencia como canales rojo y verde. Estos pueden ser dispuestos en un archivo consolidado. Entonces, los datos y las imágenes asociadas pueden ser archivados en un formato conveniente, tal como un formato convencional TIFF o cualquier otro formato de datos o protocolo de imagen adecuado. La estación de trabajo 18 puede estar acoplada a otros componentes de la red, incluyendo software de proceso en el sentido de avance, y
25 específico de la aplicación, para análisis de alto nivel y de datos, tal como mediante una red indicada de manera general o del numeral de referencia 28 en la figura 1.

Tal como se ha observado en lo anterior, el microconjunto 14 incluirá una serie de lugares dispuestos en partes o regiones de un sustrato, por ejemplo, tal como se ha indicado de manera general en la figura 2. Tal como se ha
35 mostrado en la figura 2, el microconjunto 14 puede incluir un soporte o sustrato 30 que puede ser de vidrio, plástico, o semiconductor, o cualquier otro soporte conveniente, tal como los descritos en otros lugares de esta descripción. Sobre este soporte 30 se disponen una o varias áreas 32, en las que se formarán lugares individuales, dotado cada uno de ellos típicamente con una correspondiente molécula-sonda utilizada para la comprobación de una muestra. En la presente realización, el área de muestras 32 es escaneada para la formación de imagen por una línea de radiación, indicada en general por el numeral 34 en la figura 2. La línea de radiación es formada por radiación de excitación dirigida confocalmente a lo largo de la línea 34 para irradiar una serie de lugares simultáneamente, tal como se ha indicado de manera general por las fechas 36 de la figura 2. Los lugares individuales en los que las moléculas objetivo (por ejemplo, fragmentos genéticos) se habrán unido, cobran fluorescencia debido a la presencia de colorantes indicativos de interacción de una diana con el lugar, devolviendo radiación, tal como se ha indicado por las líneas 38 en la figura 2. Tal como se describe más adelante, esta radiación devuelta o retro-haz, será dirigida confocalmente hacia un detector de formación de imagen en el que se realizará una imagen de la línea para proceso y análisis adicional. Para permitir la formación de imagen sucesiva de los lugares, la totalidad del microconjunto puede ser desplazada lentamente, tal como se ha indicado de manera general por el numeral de referencia 40. La línea 34, a lo largo de la cual son irradiados los mencionados lugares, avanzará de manera general a lo largo de localizaciones paralelas sucesivas sobre el microconjunto, al ser desplazado éste.
40
45
50

Una parte, a título de ejemplo, de un microconjunto del que se forma imagen, de acuerdo con dicho escaneado de línea confocal, se muestra en la figura 3. También, en este caso, el numeral de referencia 14 se refiere al microconjunto, mientras que el numeral de referencia 32 se refiere a una de las áreas de muestra en las que los lugares individuales 42 están dispuestos. En la realización que se ha mostrado, los lugares están dispuestos en un modelo general hexagonal. La exploración por línea 34 avanza por líneas sucesivas 44 de los lugares 42. Tal como se describe más adelante de forma más detallada, si bien se puede utilizar el presente enfoque de escaneado de línea confocal con diferentes disposiciones o modelos de rejilla de lugares del microconjunto, una forma hexagonal es particularmente útil con el escaneado de línea confocal en tanto que proporciona una probabilidad reducida de interferencias debido a la colocación y separación entre los lugares o bordes de los lugares. El condensación hexagonal designado de manera general con el numeral de referencia 46 en la figura 3 se cree que proporciona un grado óptimo de exactitud debido a dicha reducción de la interferencia, completado con una densidad de condensación superior de los lugares.
55
60

65 Tal como se ha descrito más adelante y se ha mostrado también en la figura 3, al avanzar el microconjunto 14, tal como se ha indicado por el numeral de referencia 40, la línea de radiación confocal 34 irradia una serie de lugares

situados a lo largo de la línea. La línea es más ancha que alta en la dirección mostrada en la figura 3. Por lo tanto, la línea puede irradiar sitios adyacentes en una línea o alineación de lugares sin irradiar lugares en líneas adyacentes. No obstante, en la presente realización, la línea de radiación 34 es suficientemente delgada al nivel de los lugares o de suficiente altura vertical en la disposición mostrada en la figura 3, para permitir iluminar menos del área total ocupada por los mencionados sitios. En una realización prevista actualmente, la línea de radiación 34 es, por ejemplo, de 2 mm de longitud (dimensión horizontal) y menos de 3 mm de altura (dimensión vertical). Por lo tanto, el software proporcionado para la formación de imagen que se ha mencionado anteriormente, puede utilizar técnicas tales como formación de imágenes con retraso de tiempo en la que la lectura del detector que se describe más adelante es desplazada con el movimiento de la muestra para proporcionar representaciones más precisas de los sitios individuales en cada fila o línea.

A efectos explicativos, se han indicado como ejemplos varias realizaciones de la invención con respecto al desplazamiento de un microconjunto por delante de la línea de radiación. Se comprenderá que se pueden utilizar también realizaciones en las que la línea de radiaciones desplazada, además de desplazar el microconjunto o de forma alternativa al mismo. Por lo tanto, el escaneado de línea se puede llevar a cabo por desplazamiento relativo de una línea de radiación y/o microconjunto, uno con respecto al otro. Una parte de la muestra citada por la línea de radiación puede formar una imagen rectangular sobre el conjunto detector (descrito más adelante).

La figura 4 es una representación esquemática adicional del presente enfoque de escaneado de línea confocal para formación de imagen del microconjunto 14. Tal como se ha indicado anteriormente, el microconjunto es radiado a lo largo de una línea 34 al desplazar lentamente el soporte 30, tal como se ha indicado por el numeral de referencia 40. Tal como se ha mostrado en la figura 4, la línea 34 es formada por radiación desde una fuente 48 dirigida hacia la óptica direccional, y desde allí a la óptica de enfoque 52. Tal como se ha descrito más adelante de manera más completa, la fuente de radiación 48 será un haz con una sección transversal lineal o una línea de radiación, incluyendo una serie de longitudes de onda de luz utilizadas para provocar fluorescencia en longitudes de onda correspondientemente distintas de la muestra, dependiendo de los colorantes específicos utilizados. La óptica de enfoque 52 dirigirá confocalmente la línea de radiación hacia el sustrato 30 para irradiar los lugares, tal como se ha descrito anteriormente a lo largo de la línea 34. Se debe observar, que los lugares pueden estar dispuestos en la superficie del sustrato 30 o ligeramente por debajo de la superficie (por ejemplo, por debajo de una película o capa protectora). La irradiación confocal a lo largo de la línea 34 enfocará esencialmente la radiación hacia los propios lugares en cualquier nivel que se encuentren en el microconjunto.

La trayectoria de excitación 54, en la presente realización, es coplanaria con una trayectoria de retro-haz 56 para radiación de vuelta desde la muestra por fluorescencia de los colorantes asociados con moléculas acopladas a las sondas en lugares individuales del microconjunto. La radiación de vuelta es enfocada nuevamente por la óptica de enfoque 58, de manera que impacta en un detector 60 para crear señales de formación de imagen utilizadas para reconstruir una imagen del microconjunto y de lugares individuales en el microconjunto. Se describen realizaciones específicas para crear el haz de radiación, dirigir el haz al microconjunto y para detectar radiación de vuelta con mayor detalle más adelante.

Se debe observar que, tal como se ha mostrado de manera general en la figura 5, la línea de radiación utilizada para la formación de imagen de forma simultánea de los lugares, de acuerdo con la presente realización, puede ser una línea continua o discontinua. La figura 5 representa esquemáticamente una línea discontinua constituida por una serie de haces de luz dirigidos de forma confocal que, no obstante, irradian una serie de puntos a lo largo de una línea 34. En la realización mostrada en la figura 5, se crean haces discontinuos 62 a partir de fuentes de radiación separadas pero adyacentes 48. Estos haces, igual que antes, son dirigidos confocalmente hacia el microconjunto e irradian puntos adyacentes 64 a lo largo del microconjunto en una línea 34. Igual que con el escaneado de línea confocal continua descrito anteriormente, el microconjunto será avanzado de manera típica, lentamente, tal como se ha indicado por la flecha 40 para irradiar líneas sucesivas a lo largo del microconjunto, y de esta manera alineaciones o líneas sucesivas de lugares.

De manera típica, la invención es utilizada para excitar y detectar una línea simultáneamente. En algunas realizaciones, se puede utilizar el escaneado de puntos confocal de la línea, de manera que el sistema óptico dirige un punto de excitación a través de una muestra por escaneado del haz de excitación a través de una lente objetivo. El sistema de detección forma la imagen de la emisión desde el punto excitado en el detector sin "desescanear" el retro-haz. Esto ocurre dado que el retro-haz es recogido por la lente del objetivo y es dividido fuera de la trayectoria óptica del haz de excitación antes de volver a través del dispositivo de escaneado. Por lo tanto, el retro-haz aparecerá en el detector en diferentes puntos dependiendo del ángulo de campo del punto de excitación original en la lente objetivo. La imagen del punto de excitación, en el detector, aparecerá en forma de una línea al ser escaneado el punto de excitación sobre la muestra. La arquitectura utilizada es útil, por ejemplo, si el dispositivo de escaneado no puede, por alguna razón, aceptar el retro-haz de la muestra. Como ejemplo, se pueden citar medios de escaneado holográficos y acústico-ópticos que son capaces de escanear un haz a muy alta velocidad pero que utilizan la difracción para crear el escaneado. Por lo tanto, las propiedades de escaneado son una función de la longitud de onda. El retro-haz en fluorescencia se encuentra a una longitud de onda distinta con respecto al haz de excitación.

Las figuras 6 y 7 muestran una linealización a título de ejemplo de un haz de láser de entrada para escaneado de línea confocal de un microconjunto, de acuerdo con la realización prevista. La figura 6 representa lo que se puede considerar una vista en alzado de la conversión o linealización del haz de entrada, mientras que la figura 7 se puede considerar que muestra una vista en planta, si bien estas orientaciones son comprensiblemente intercambiables, dependiendo de la orientación de la línea y del microconjunto a escanear, tal como se describe más adelante. Tal como se muestra en la figura 6, un haz de entrada 66 de un láser (no mostrado) adoptará típicamente la forma de un haz de Gaus circular 66. Una lente esférica 68, tal como una lente Powell convierte el haz de entrada en una línea 70 de radiación, que es dirigida hacia una lente objetivo 72. Tal como se ha mostrado en la vista en planta de la figura 7, la lente esférica 68 produce de manera efectiva una línea de radiación de forma general plana que es convertida adicionalmente en un haz concentrado confocalmente 74 por la lente objetivo 72.

Tal como se ha mostrado en la figura 8, el dispositivo mostrado en las figuras 6 y 7 produce una región lineal de radiación que puede ser utilizada para irradiar simultáneamente una serie de lugares en el microconjunto. La figura 8 es una representación gráfica de la iluminación simulada a lo largo de una línea de radiación producida por una lente esférica, tal como se ha descrito con referencia a las figuras 6 y 7. La iluminación relativa del haz está indicada por un eje vertical 76 mientras que la coordenada de la imagen en milímetros está representada por el eje horizontal 78. En la realización mostrada, la intensidad de iluminación aumenta rápidamente cerca de un borde de la lente esférica, tal como se ha indicado por el numeral de referencia 80, y desciende rápidamente cerca de un borde opuesto, tal como se ha indicado con el numeral de referencia 82. Entre los bordes, un segmento útil de radiación 84 tiene un nivel de iluminación relativa sustancialmente constante. En una realización presente, la anchura útil 86 de la línea de radiación es utilizada para irradiar líneas de hileras de lugares en el microconjunto de manera simultánea. La simulación mostrada en la figura 8, por ejemplo, proporciona una longitud de exploración útil 86 de aproximadamente 1024 mm, si bien una serie de factores, incluyendo la óptica involucrada, puede proporcionar otras longitudes de línea de radiación útiles.

Tal como se apreciará por los técnicos en la materia para la formación de imagen en una serie de longitudes de onda, un sistema de formación de imágenes por fluorescencia de escaneado de línea confocal, de acuerdo con la técnica presente, proporcionará líneas de longitudes de onda múltiples con la anchura limitada de difracción y distribución uniforme según la longitud para irradiar lugares de la muestra y, por lo tanto, excitar múltiples colorantes fluorescentes. El enfoque generador de línea de las figuras 6, 7 y 8 proporciona un mecanismo a título de ejemplo para dicha linealización de irradiación de luz de múltiples longitudes de onda. La disposición de múltiples longitudes de onda en la línea de radiación, se describirá en mayor detalle a continuación. Efectivamente, la disposición mostrada en las figuras 6, 7 y 8 forma un haz de entrada colimado en una dimensión y mantiene el haz colimado en dimensión perpendicular. El haz es enfocado a continuación por la lente objetivo 72 a una línea de difracción limitada en un plano focal de la lente.

Basándose en la deformación de la lente esférica, es preferible un haz de entrada Gausiano puro colimado con un diámetro de haz definido para generar una línea de distribución uniforme. Una técnica que se prevé en la actualidad para una distribución gausiana casi pura, es la utilización de una fibra de modalidad única o cable de fibras para proporcionar entrada a la lente esférica.

Se pueden prever varias disposiciones para la utilización de dicha fibra de modalidad única o cable de fibra. La figura 9 muestra una primera realización a título de ejemplo en la que una fuente de radiación lineal 88 incluye un láser 90 acoplado a una fibra de modalidad única 92 y con intermedio de la misma a un módulo generador de línea 94. La lente objetivo situada más abajo de la lente esférica se ha omitido de la ilustración de la figura 9. El perfil de línea generado no es solamente sensible al perfil del haz de entrada, sino también sensible al diámetro del haz de entrada, características de colimación y centrado del haz con respecto a la lente esférica. Es decir, la lente esférica puede ser diseñada para un diámetro definido de haz de entrada y el conjunto, particularmente los componentes de un módulo generador de línea 94, está alineado para conseguir el comportamiento deseado.

En la realización mostrada, el generador de línea 94 comprende varios componentes ópticos que están pre-alineados en un conjunto modularizado para facilitar, tanto su control de calidad como el condensación en el escáner. En particular, el módulo generador de línea 94 puede incluir un colimador 96 que colima el haz de entrada de la fibra de modalidad única 92 y dirige el haz colimado a una lente esférica 100. Un filtro de línea láser 98 puede ser utilizado también, especialmente para aplicaciones de formación de imágenes fluorescentes, para reducir el ruido de fondo. La ilustración de la figura 9 puede proporcionar en pre-acoplamiento o terminación de la fibra de modalidad única 92 por ambos extremos, es decir, en el láser 90 y en el módulo 94 generador de línea.

De manera alternativa, la fuente de radiación lineal 88 puede proporcionar el acoplamiento de un par de elementos de fibra óptica, tal como se ha mostrado de manera general en la figura 10. En la realización de la figura 10, el elemento de fibra 92 es pre-acoplado al láser 90 mientras un segundo elemento de fibra 102 es pre-acoplado al módulo generador de línea 94. Las dos fibras son conectadas a continuación en un punto intermedio, tal como se ha indicado de manera general con el numeral de referencia 104.

En otra configuración alternativa, mostrada en la figura 11, un único elemento de fibra 102 puede ser utilizado también pudiendo ser pre-ensamblado con el módulo generador de línea 94. En esta realización, no obstante, el

láser 90 proporciona entrada al elemento de fibra 92 por acoplamiento activo, tal como se ha indicado con el numeral de referencia 106.

En otra configuración alternativa, mostrada de manera general en la figura 12, un elemento de fibra 102 puede ser también pre-ensamblado con el láser 90. En vez de proporcionar un colimador en el módulo generador de línea 94, tal como se ha descrito anteriormente, un expansor de haz validable 108 puede ser utilizado para proporcionar entrada a un módulo modificado 110 que incluye, igual que antes, una lente esférica. La realización de la figura 12 puede requerir que el diámetro del haz de entrada corresponda con un diámetro deseado en virtud del expansor de haz radiable 108.

Un módulo generador de línea 94 a título de ejemplo, se ha mostrado de manera general en la figura 13. Tal como se ha indicado anteriormente y tal como se ha mostrado en la implementación física de la figura 13, el módulo 94 puede recibir un haz de entrada designado de manera general con el numeral de referencia 112, mediante una fibra de modalidad única 92. Una línea de radiación de salida 114 es emitida por el módulo. En la realización mostrada, un conector de fibra óptica 116 sirve para unir la fibra de modalidad única 92 a la de la entrada del módulo 94. Desde allí, el haz se propaga a través del colimador 96, filtro de línea láser 98 (en caso de que exista) y lente esférica 100. También, en este caso, la modularización de los componentes ópticos utilizados para convertir la salida del láser a una línea de radiación, está favorecida al facilitar el ensamblaje del sistema en general, la alineación de la óptica y el servicio y sustitución posteriores de los componentes ópticos, si fuera necesario.

Tal como se ha indicado anteriormente, en ciertas realizaciones previstas, la fuente de radiación es un láser. Otras fuentes de radiación utilizables pueden incluir, por ejemplo, una lámpara, tal como una lámpara de arco, una lámpara de alógeno de cuarzo, y diodos emisores de luz. Cualquiera de una variedad de otras fuentes de radiación puede ser utilizada, según deseo, para explicar una muestra en una longitud de onda particular. Según deseo para una aplicación particular, la fuente de radiación puede generar radiación en varias longitudes de onda, incluyendo, por ejemplo, una longitud de onda en los rangos UV, VIS o IR. Por ejemplo, un aparato, según la invención, puede incluir un láser que genera luz a 405 nm, 488 nm, 532 nm o 633 nm.

Además, tal como se indica a continuación, el sistema puede incluir más de una fuente de radiación. Las fuentes de radiación múltiples pueden ser láseres, cada uno de ellos capaz de generar radiación a diferentes longitudes de onda. La utilización de múltiples fuentes de radiación que generan radiación a diferentes longitudes de onda puede ser útil, por ejemplo, en aplicaciones en las que una muestra incluye uno o más fluoróforos que producen diferentes señales de emisión cuando son excitados a diferentes longitudes de onda. Se pueden recoger simultáneamente diferentes señales de emisión, por ejemplo, utilizando múltiples brazos de detección, tal como se ha indicado más adelante de forma detallada. De manera alternativa o adicionalmente, se pueden recoger, secuencialmente, diferentes señales de emisión, permitiendo la excitación secuencial en diferentes longitudes de onda.

Tal como se ha indicado anteriormente, ciertas realizaciones de la invención pueden incluir, además, un expansor dispuesto para recibir radiación de excitación procedente de una fuente de radiación y enviar un haz expandido de radiación a un generador de línea. En realizaciones específicas, el diámetro del haz de excitación generado por la fuente de radiación tiene, aproximadamente, 1 mm de diámetro. Un primer expansor es capaz de expandir el diámetro del haz. Por ejemplo, de acuerdo con una realización, el expansor expande el haz de excitación a un diámetro de 4 mm. Otros expansores de haz utilizables pueden llevar el diámetro del haz de radiación, como mínimo, a 0,5 mm, 1 mm, 2 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm aproximadamente o más.

Tal como se ha explicado anteriormente, un generador de línea utilizable en la invención puede incluir un elemento difractivo configurado para generar una línea de difracción limitada con distribución de intensidad uniforme. Por ejemplo, se puede utilizar un conjunto de microlentes cilíndrico y un condensador. El conjunto de microlentes cilíndrico puede estar configurado para enfocar radiación de excitación sobre el plano focal frontal del condensador para generar una línea de difracción limitada con distribución uniforme de intensidad. Otro ejemplo de generador de línea es un difusor monodimensional que tiene uniformidad angular y un condensador, en el que el difusor monodimensional está situado en el plano focal frontal del condensador para generar una línea de difracción limitada con distribución uniforme de intensidad. En caso deseado, el generador de línea puede incluir además una lente refractiva esférica para generar una línea de difracción limitada con distribución uniforme de intensidad. Una lente retroactiva esférica a título de ejemplo es una lente Powell.

En una realización específica, el generador de línea puede estar configurado para recibir un haz de excitación de entrada con un diámetro de 4 mm para obtener un ángulo de apertura de 6 grados. Otras configuraciones útiles incluyen, sin que sea limitativa, aquellas que reciben una verificación de entrada con un diámetro, como máximo, de 0,1 a 50 mm. Un generador de línea puede obtener un ángulo de apertura de, como mínimo 0,1 grados a como máximo 80 grados de amplitud completa. El diámetro del haz y el ángulo de apertura se pueden seleccionar para conseguir la forma deseada para la línea de radiación. De modo general, la amplitud de la línea de radiación depende del diámetro del haz, de manera que un diámetro de haz más grande proporciona una línea de radiación más ancha en la dimensión vertical y la longitud de la línea de radiación depende del ángulo de apertura, de manera que un ángulo de apertura mayor proporciona una línea de radiación más larga en dimensión horizontal. Típicamente, la línea debe parecer que se origine en la pupila del objetivo, no obstante, ello no es una exigencia.

5 Tal como se ha indicado anteriormente, cualquiera de una serie de elementos ópticos capaces de generar una línea puede ser situado en la trayectoria óptica entre una fuente de radiación y una zona de muestra a irradiar. Por ejemplo, una lámpara de arco enfocada en una ranura y colimada a continuación puede ser utilizada para generar una línea. Otro ejemplo es un láser de diodo emisor de borde que tiene un haz anamórfico que genera una línea cuando se enfoca. Se comprenderá que una fuente de radiación utilizada para irradiar una zona de muestra puede ser capaz, por sí misma, de generar una línea. De este modo, una fuente de radiación utilizable en la invención puede incluir un generador de línea.

10 Cualquiera de una serie de procedimientos y aparatos que incluyen, sin que estén limitados a los ejemplos indicados, se puede utilizar para dirigir una línea de radiación a una zona de muestra. Las dimensiones de la línea de radiación pueden ser seleccionadas para conseguir confocalidad en un eje único de un conjunto detector rectangular. De manera más específica, la dimensión vertical de la línea de radiación puede ser suficientemente corta para conseguir confocalidad en la dimensión vertical del conjunto detector rectangular.

15 Un generador de línea útil en la invención está configurado de manera típica para producir una línea de radiación que tiene una forma en la región de muestra que es rectangular o alargada. Entre las formas a título de ejemplo se incluyen, sin que ello sea limitativo, una forma rectangular, una forma elíptica u ovalada. Un generador de línea puede estar configurado para producir una línea de radiación que tenga una o varias de las propiedades que se indican más adelante.

20 Una línea de radiación que establece contacto con una pared de muestra puede tener una proporción de $1/e^2$ de la anchura de la dimensión vertical para la línea de radiación con respecto al cociente de la dimensión vertical para el conjunto detector rectangular dividido por la ampliación de la óptica de formación de imagen que resulta en la confocalidad en una dimensión. Por ejemplo, la proporción puede ser, como mínimo, de 0,5, 1, 1,5, 3 o superior. Un aparato de la invención puede estar configurado para tener un borde superior para la proporción que es, como máximo, aproximadamente 2, 1,5, 1, 0,5, o inferior. La proporción puede encontrarse fuera o dentro de los rangos anteriores, según deseo, incluyendo, por ejemplo, el rango de 0,5 a 3.

30 Una línea de radiación que establece contacto con la zona de muestra puede tener una proporción de la dimensión vertical para la línea de radiación con respecto al cociente para la dimensión vertical para el conjunto detector rectangular dividido por la ampliación de la óptica de formación de imagen que resulta en confocalidad en una dimensión. Por ejemplo, la proporción puede ser, como mínimo, aproximadamente de 0,1, 0,5, 1, 5, 10, o superior. El extremo superior de la proporción puede ser, como máximo aproximadamente 10, 5, 1, 0,5, 0,1 o inferior. La proporción puede encontrarse fuera o dentro de los rangos indicados, según deseo, incluyendo, por ejemplo, el rango de 0,1 a 10.

40 Además, la proporción de la dimensión vertical para la línea de radiación a la resolución Rayleigh de la lógica de formación de imagen, puede ser, como mínimo, aproximadamente 0,1, 0,5, 1,5, 10, o superior. El extremo superior de la proporción puede ser, como máximo, aproximadamente 10, 5, 1, 0,5, 0,1, o inferior. La proporción puede encontrarse fuera o dentro de los rangos anteriores según deseo, incluyendo, por ejemplo, que se encuentre en el rango de 0,1 a 10.

45 Si bien la invención se ha indicado como ejemplo con respecto a realizaciones en las que una zona de muestra establece contacto con una línea de radiación, se comprenderá que la radiación que establece contacto con la zona de muestra puede tener otras formas incluyendo, por ejemplo, una forma cuadrada o de círculo.

50 Tal como se describe más adelante, un aparato de la invención puede incluir un objetivo dispuesto para recibir radiación a través del mismo para iluminar una zona de muestra. El objetivo puede quedar dispuesto además para recoger radiación que procede de una región de muestra y dirigirla a un conjunto detector. Opcionalmente, el aparato puede incluir un segundo expansor dispuesto para recibir la radiación de excitación desde el generador de línea y enviar un haz expandido de la radiación al objetivo. El segundo expansor puede estar configurado, además, para disminuir el ángulo de campo de la línea de radiación. Por lo tanto, después de que el haz de excitación ha pasado a través del generador de línea y/o un segundo expansor, puede ser dirigido a un objetivo por un divisor de haz. En realizaciones específicas, el objetivo tiene una pupila externa dispuesta para recibir la línea de radiación de manera pasante para iluminar la zona de muestra. Preferentemente, el divisor del haz puede estar situado cerca de la pupila de entrada de la lente del objetivo el divisor del haz puede estar situado en una posición axial o lateral con respecto al objetivo. En caso deseado, el objetivo puede tener una propiedad de corrección de color, elevada apertura numérica, telecentricidad, afocalidad en el plano posterior, o una combinación de estas propiedades.

60 El divisor de haz dirige la línea de radiación a un objetivo. El objetivo puede ser un objetivo de microscopio. El objetivo puede tener una longitud focal de 20 mm. De acuerdo con ello, el objetivo puede poseer una apertura numérica de 0,366. Además, el objetivo puede tener un ángulo de campo de +/- 3 grados y una pupila de entrada que tiene un diámetro de 16 mm. Preferentemente, el objetivo es telecéntrico. Son lentes objetivo telecéntricas, a título de ejemplo, utilizables en la invención las que se describen en el documento US. 5.847.400.

65

La figura 14 muestra una disposición óptica global para los diferentes componentes descritos anteriormente en un escáner 118 de longitud de onda múltiple. El escáner 118 puede incluir una serie de fuentes de luz láser con dos de dichas fuentes mostradas en la realización de la figura 14. Éstos incluyen un primer láser 120 y un segundo láser 122. El primer láser 120 en las realizaciones previstas actualmente, puede ser un láser de 658 nm, un láser de 750 nm o un láser de 635 nm dependiendo de la aplicación deseada. El segundo láser 122 puede ser, por ejemplo, un láser de 488 nm, un láser de 594 nm o un láser de 532 nm. Por supuesto, se pueden utilizar láseres de diferentes longitudes de onda. En la presente realización, el primer láser 120 es un láser de 635 nm siendo el segundo láser 122 un láser de 488 nm o bien el primer láser 120 es un láser de 750 nm cuando el segundo láser 122 es un láser de 594 nm, o bien el primer láser 120 es un láser de 658 nm cuando el segundo láser 122 es un láser de 532 nm. La selección de la longitud de onda para cada láser dependerá, desde luego, de las propiedades de fluorescencia de los colorantes utilizados en el microconjunto, si bien las longitudes de onda de los láser utilizados al unísono para cualquier secuencia de formación de imagen específica serán distintas entre si para permitir diferenciación de los colorantes en los diferentes lugares del microconjunto.

Cada láser 120 y 122 está acoplado a una fibra de modalidad única 124 y 126, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente. Además, esta fibra 124 y 126 alimenta un módulo generador de línea 94 del tipo descrito anteriormente. Más abajo de cada módulo 94 se puede disponer una rueda de filtro 128 y 130. Las ruedas de filtro sirven para bloquear, pasar o atenuar la luz dependiendo de la función deseada.

La salida de cada uno de los láseres 120 y 122 será convertida en una distribución gaussiana casi pura por las respectivas fibras de modalidad única 124 y 126 y los haces resultantes serán convertidos en haces con secciones transversales lineales a las que se hace referencia también como líneas de radiación por los módulos generadores de línea 94. Más abajo de las ruedas de filtro 128 y 130, las dos líneas de radiación serán combinadas por un combinador de haz 132. La línea de radiación combinada 134 comprenderá entonces luz a dos diferentes longitudes de onda para irradiar el microconjunto. La línea de radiación combinada 134 es dirigida entonces a un divisor de haz dicróico 136 que dirige el haz hacia la óptica de enfoque 138. La óptica de enfoque 138 constituye un objetivo de microscopio que dirige confocalmente y concentra la línea de radiación a lo largo de la línea del microconjunto 14, tal como se ha descrito anteriormente. Si bien la invención se ha representado a título de ejemplo con respecto a una línea de radiación combinada que forma una línea de radiación única, se comprenderá que las dos líneas de radiación pueden estar combinadas de manera que dos líneas son casi colineales. De este modo, una parte del microconjunto que es irradiada con la línea de radiación combinada, será irradiada con las líneas casi colineales de radiación. Las dos líneas están típicamente separadas por una distancia equivalente a la anchura de cada línea, a efectos de minimizar la interferencia entre canales.

Tal como se ha mostrado esquemáticamente en la figura 14, el microconjunto 14 puede estar soportado sobre un marco que permite el enfoque adecuado y movimiento del microconjunto antes y durante la formación de imagen. El marco puede estar configurado para desplazar la muestra, cambiando de esta manera las posiciones relativas de la imagen rectangular y el conjunto detector rectangular en la dirección de escaneado (vertical). El movimiento de la platina de dilatación puede tener lugar en una o varias dimensiones, incluyendo, por ejemplo, una o ambas de las dimensiones ortogonales a la dirección de propagación para la línea de radiación e indicadas de manera típica como dimensiones X e Y. En realizaciones específicas, la platina de traslación puede ser configurada para desplazarse en la dirección perpendicular al eje de escaneado para un conjunto detector. Una platina utilizable en la invención puede ser configurada además para el movimiento en la dimensión a lo largo de la que se propaga la línea de radiación, indicada típicamente como dimensión Z. El movimiento de la dimensión Z puede ser utilizado para enfocar el aparato. En la configuración de la figura 14, los componentes de la platina incluyen accionadores de basculación 140, utilizados típicamente para enfocar la línea de radiación, accionadores en dirección Y y componentes de expulsión 142 para colocar en otro conjunto en posición de escaneado y para movimientos groseros de microconjunto entre escaneados y accionadores 144 en dirección X para movimientos de afino de microconjunto durante el escaneado.

Algunos lugares del microconjunto 14 pueden mostrar fluorescencia en longitudes de onda que corresponden a las del haz de excitación, devolviendo radiación para la formación de imagen. Tal como se apreciará por los técnicos en la materia, la longitud de onda a la que son excitados los colorantes de la muestra y la longitud de onda a la que tienen efecto fluorescente dependerá de los espectros de absorción y emisión de los colorantes específicos. Dicha radiación de vueltas se propagará a través del divisor de haz 136, tal como se ha indicado de manera general por el retrohaz 146 de la figura 14. Este retrohaz será dirigido de manera general hacia uno o varios detectores a efectos de formación de imagen. En la realización mostrada, por ejemplo, el haz es dirigido hacia un espejo 148 y desde allí a un segundo divisor de haz dicróico 150. Una parte del haz, tal como ha sido indicado por el numeral de referencia 154, es dirigida a continuación por espejos 152 a una rueda 158 de filtro paso banda que filtra el haz para obtener la longitud de onda de salida deseada que corresponde a uno de los colorantes fluorescentes de los lugares del microconjunto. En realizaciones específicas, las partes del haz que están dirigidas a diferentes espejos, pueden ser correspondientes líneas de un haz combinado que forma dos líneas casi colineales. Una lente de proyección 160 dirige entonces el haz filtrado a un sensor 164 de un dispositivo acoplado por carga (CCD) que produce señales de salida correspondientes a localizaciones de la radiación en el haz recibido. De modo similar, una segunda parte 156 del haz procedente del divisor de haz 150 es dirigida a otro espejo a través de una rueda distinta de filtro paso banda 158 y lente de proyección 160. El segundo haz 156 puede ser dirigido también a través de un dispositivo opcional

162 de compensación de aberración cromática que puede estar accionado a motor. El dispositivo 162 de compensación de aberración cromática sirve para llevar a confocalidad ambos canales de longitud de onda. Finalmente, el haz 156 centrado y enfocado por la rueda de filtro 158 y la lente 160 es dirigido a un segundo sensor CCD 166. La recepción en proceso de señales procedentes de los sensores 154 y 166 será controlada por un panel de control 168.

Un conjunto detector angular, según la invención, puede ser configurado para formar una ranura vertical, tal como se ha indicado anteriormente en esta descripción. En realizaciones específicas, el tamaño y dimensiones de la ranura virtual se pueden determinar a partir de la relación de la dimensión vertical para el conjunto de detector angular y el producto de la resolución Rayleigh de la óptica de formación de imagen multiplicado por la ampliación de la óptica de formación de imagen. Por ejemplo, la relación de la dimensión vertical para el conjunto detector rectangular y el producto de la resolución de Rayleigh de la óptica de formación de imagen multiplicado por la ampliación de la óptica de formación de imagen pueden encontrarse en un rango de 0,1 a 10 o en un rango de 0,5 a 3. Un aparato, según la invención puede estar configurado para obtener una imagen de una muestra a una resolución deseada u óptima de Rayleigh, incluyendo, por ejemplo, una resolución de Rayleigh comprendida entre 0,2 y 10 micras.

En realizaciones específicas, la relación de aspecto del número de elementos de detección en una primera dimensión al número de elementos de detección en la dimensión del eje de escaneado para un conjunto detector rectangular puede ser superior a 2, 10, 20, 50, 100, 1000 o más elevada. Por ejemplo, una cámara CCD de escaneado de línea puede estar configurada para captar cuatro mil (4.000) píxeles en la primera dimensión y n píxeles en la dimensión del eje de escaneado (vertical). La cámara de escaneado de líneas CCD puede ser diseñado de manera que la resolución, según la longitud de la línea, se corresponde a la resolución del sistema. En este caso, el eje horizontal comprende, aproximadamente, 4.000 elementos CCD, según la longitud de una línea de radiación de 2 mm, con el resultado de una resolución de 0,5 μm píxeles en el objeto. El número de elementos CCD "n" en la dirección perpendicular al eje horizontal, a la cual se hace referencia también como eje vertical, se puede escoger para recoger sustancialmente toda la radiación emitida, reduciendo al mismo tiempo la cantidad de radiación de fondo recogida. De acuerdo con una realización de la invención, el CCD tiene 4.096 píxeles, cada uno de ellos de 12 μm de tamaño. Para formar la imagen de una línea de 2mm a esta dimensión de CCD, requiere un aumento de 25x. De acuerdo con ello, n puede encontrarse dentro de un rango de 6 a 8 píxeles. La arquitectura de diseño limita el error de excitación en el eje confocal, de manera que, de forma predominante 100% de la radiación de excitación está contenida dentro de un punto comparable con la resolución del sistema. En este caso, las dimensiones del punto serían aproximadamente 1,0 μm .

Si bien el aparato se ha mostrado a título de ejemplo en lo anterior con respecto a una cámara de escaneado de línea CCD, se comprenderá que se puede utilizar cualquiera de una serie de otros detectores, incluyendo, sin que ello sea limitativo, un conjunto detector configurado para funcionamiento TDI, un detector CMOS, un detector APD, un contador de fotones de modalidad Geiger, u otro detector previsto en otros lugares de esta descripción.

En general, el funcionamiento de los diferentes componentes mostrados en la figura 14 se puede coordinar por el controlador del sistema 170. En una aplicación práctica, el controlador del sistema comprenderá hardware, firmware y software, diseñados para controlar el funcionamiento de los láseres, de movimiento y enfoque del objetivo 138, y el soporte del microconjunto, y la captación y proceso de señales desde los sensores 164 y 166. El controlador del sistema puede almacenar, por lo tanto, datos procesados y procesar de forma adicional los datos para generar una imagen reconstruida de los lugares irradiados que presentan fluorescencia en el microconjunto.

La figura 15 muestra la disposición alternativa para el escáner de longitud de onda múltiple, designada de manera general con el numeral de referencia 172. En esta disposición alternativa, se combinan haces de láseres separados y la sección transversal del haz combinado es convertido posteriormente en una forma lineal con una lente esférica. De este modo, igual que en la realización anterior resumida haciendo referencia a la figura 14, los láseres de entrada 120, 122 proporcionan longitudes de onda de la luz correspondientes a los colorantes utilizados en varios lugares sobre el microconjunto 14. En la realización 172, no obstante, un primer láser 120 emite su haz a una fibra de modalidad única 124, seguido de un colimador 174 que colima esta salida. La salida colimada puede ser dirigida a continuación a una rueda de filtro 130, y el haz resultante 176 es dirigido por los espejos 152 a un expansor de haz variable 180 del tipo descrito anteriormente con referencia a la figura 12.

De manera similar, la salida del segundo láser 122 es dirigida a través de una segunda rueda de filtro 130 y el haz resultante 178 es dirigido, tal como a través de los espejos 152 a un segundo expansor de haz variable 182. La salida de los expansores de haz variable es reunida a continuación por un combinador de haz 132. El haz combinado 182, que incluirá luz en las longitudes de onda deseadas para radiación del microconjunto es convertido en una línea por una lente esférica 100. Como antes, entonces, una línea de radiación combinada 134 que incluye luz en las longitudes de onda deseadas, será producida y dirigida al microconjunto 14 por el divisor de haz 136. Los componentes restantes del sistema pueden ser esencialmente idénticos a los descritos anteriormente con respecto a la figura 14.

La figura 16 proporciona una representación esquemática algo más detallada optomecánica de un escáner de longitud de onda múltiple, de acuerdo con aspectos de la realización prevista actualmente. El escáner 184 puede

incluir un primer conjunto de láser 186 que, por su parte, incluye múltiples láseres. En la realización mostrada, por ejemplo, el conjunto de láser 186 incluye un primer láser 188 que puede ser un láser de 488 nm, y un segundo láser 190 que puede ser un láser de 658 nm. El sistema puede incluir, además, un segundo láser 192 que puede incluir, por ejemplo, un láser 194 de 594 nm y un láser 196 de 750 nm. Tal como se apreciará por los técnicos en la materia, la inclusión de múltiples conjuntos de láser 190 y 192 podrán permitir llevar a cabo diferentes tipos de operaciones de escaneado con un escáner único, tal como decodificar funciones, funciones analíticas, y otras. Por ejemplo, los láseres 188 y 190 pueden ser utilizados conjuntamente entre sí para ciertos tipos de operaciones de decodificación, mientras que los láseres 194 y 196 pueden ser utilizados conjuntamente entre sí para otros tipos de decodificación. Los conjuntos pueden incluir otros láseres que pueden ser utilizados alternativamente, o se pueden prever otros conjuntos, tales como en conjunto que utiliza un láser de 635 nm y un láser de 532 nm, por ejemplo, para ciertas operaciones analíticas.

Los conjuntos láser 190 y 192 están acoplados a las fibras de modalidad única 122 y 124 que, tal como se ha descrito anteriormente, convierten la salida de los láseres a distribuciones Gaussianas casi puras. La luz transmitida a través de las fibras 122 y 124 es introducida en los módulos generadores de línea 94 para producir líneas de radiación. Los haces de radiación son dirigidos, a continuación, a los filtros de excitación 128 y combinados por el combinador 132 para formar una línea de radiación combinada 134. Una rueda filtro 130 puede filtrar esta línea de radiación combinada a efectos de bloquear, pasar o atenuar el haz, según deseo.

Igual que en las realizaciones anteriormente descritas, la línea de radiación combinada filtrada es dirigida a continuación al divisor de haz 136 y desde allí al objetivo 138. En la realización mostrada en la figura 16, el objetivo está dotado de un sistema de autoenfoque 198 que puede incluir uno o más dispositivos de accionamiento, tales como una bobina de voz, una etapa de motor lineal, una etapa de motor piezoeléctrico, o una etapa de flexión piezoeléctrica. Los sensores 200 proporcionan la detección de la distancia o foco del sistema en el microconjunto 14, y sirven para proporcionar realimentación para enfoque dinámico de la línea de radiación dirigida confocalmente sobre la profundidad apropiada a lo largo del microconjunto 14.

La figura 16 proporciona también algún detalle adicional respecto a una disposición prevista actualmente para desplazar el microconjunto 14 antes y durante el escaneado. Por ejemplo, una bandeja de manipulación de muestras 202 es dispuesta junto con un motor 204 para desplazar la bandeja hacia dentro y hacia fuera de una posición de formación de imagen. Una placa de adaptación 206 permite el posicionado del microconjunto en una estación de espera 208. Los accionadores 210 proporcionan posicionado adecuado del microconjunto en la estación de espera. Una etapa de aproximación 212 controlada por un motor paso a paso 214, permite un control aproximado de la posición del microconjunto con respecto a la línea de radiación combinada dirigida confocalmente hacia el microconjunto. La etapa de aproximación 212 puede ser utilizada, por ejemplo, para posicionar apropiadamente una parte del microconjunto, en los que están situados los lugares de los que se tiene que obtener imagen. Una etapa de precisión 216 que puede incluir un motor lineal 218 y un encoder lineal 220 sirven para proporcionar el posicionado preciso y el movimiento del microconjunto antes y durante el escaneado.

Igual que antes, la radiación resultante del efecto fluorescente de lugares individuales en el microconjunto es devuelta a través del divisor de haz 136 a espejos u otros dispositivos ópticos utilizados para dirigir el retro-haz a través de filtros paso-banda 158, lentes de proyección 160 y, finalmente, a detectores CCD 164 y 166.

Las siguientes disposiciones proporcionan una formación de imagen extremadamente rápida y precisa de múltiples lugares en un microconjunto por la utilización de una línea de radiación que excita dichos lugares simultáneamente. Se ha descubierto que la técnica de escaneado de línea confocal de la presente invención es particularmente útil en aplicaciones en las que los lugares en el microconjunto están separados entre sí a efectos de reducir, en combinación con el escaneado lineal anteriormente descrito, el potencial de interferencia entre la radiación devuelta de los lugares individuales. La figura 17 muestra una disposición prevista actualmente de lugares en una rejilla hexagonal para aprovechar este aspecto de la técnica de escaneado de línea confocal de la invención.

Tal como se ha mostrado en la figura 17, una sección 222 del conjunto, incluirá una serie de lugares 42 dispuestos según un modelo predeterminado. Una realización que se prevé actualmente dispone un modelo de condensación hexagonal, tal como se ha mostrado. El modelo incluye lo que se puede designar alineaciones adyacentes o líneas de lugares designadas por los numerales de referencia 224 y 226 en la figura 17. Tal como se apreciará por los técnicos en la materia, la orientación de las líneas se referirá de manera general con respecto a la dirección de exploración por la línea de radiación dirigida confocalmente que se ha descrito anteriormente. dado que las radiaciones dirigidas según líneas paralelas a las líneas de lugares 224 y 226, entonces, una parte de las líneas de lugares será iluminada por la radiación, y devolverán un retro-haz que será brillante en las zonas que presentan fluorescencia. Los lugares adyacentes 228 y 230 de cada alineación o línea de lugares estarán separados entre sí y ambos lugares estarán separados del lugar adyacente más próximo, tal como el lugar 232 de una alineación o línea adyacente 226. La distancia entre líneas o lugares sucesivos o adyacentes se puede designar de manera general por el numeral de referencia 234, por ejemplo, haciendo referencia al centro de los lugares de cada línea. Se observará que, con el modelo de condensación hexagonal de la figura 17, la distancia entre los centros de los lugares adyacentes en la misma línea, no obstante, es superior a la distancia entre líneas o lugares adyacentes. Además, en la orientación de la figura 17, la distancia entre centros de lugares adyacentes en la misma línea es

mayor que la distancia más próxima 236 entre lugares en las líneas adyacentes. En particular, para un modelo de condensación hexagonal del tipo mostrado en la figura 17, la distancia 234 será aproximadamente de 0,866 (el coseno de 60 grados) de la distancia 236.

5 Además, si los lugares 228, 230 y 232 se considera que tienen bordes 238, estos bordes estarán separados entre sí en una distancia superior a la que resultaría si los lugares estuvieran dispuestos según un modelo rectilíneo, es decir, la variación de la distancia entre los bordes 238 de los lugares 228 y 232 a lo largo del eje de escaneado, se puede indicar por el numeral de referencia 240. No obstante, la distancia real entre los bordes será superior, tal como se ha indicado por el numeral de referencia 242. También en este caso, para el modelo hexagonal que se ha
10 mostrado en la figura 17, la distancia 242 será aproximadamente 15% superior a la distancia 240.

Tal como se apreciará por los técnicos en la materia, al aumentar la densidad de los lugares sobre los microconjuntos disminuyendo por consiguiente la separación entre los lugares, se presentan exigencias crecientes en cuanto a la capacidad de enfocar cuidadosamente el haz de luz de irradiación sobre los lugares, y enfocar de
15 manera apropiada el retro-haz para el objetivo de formación de imagen. La presente técnica proporciona excelentes resultados en cuanto a la capacidad de irradiar confocalmente una línea de lugares, en el caso en que existe confocalidad en el eje paralelo a la anchura de la línea de radiación y no según la longitud de la línea de radiación. No obstante, la interferencia entre los lugares puede ser considerada como incapacidad relativa en distinguir entre los lugares, dado que las imágenes producidas a partir de lugares de alta intensidad se desvía en el eje no confocal a lugares adyacentes. Esto puede ser problemático, por ejemplo, cuando lugares de alta intensidad están
20 localizados inmediatamente adyacentes a lugares de intensidad muy baja. La combinación de escaneado de línea confocal con lugares empaquetados de forma no rectilínea, en particular en combinación con lugares empaquetados de forma hexagonal, se cree que proporciona una distinción muy superior entre lugares irradiados y lugares de formación de imagen, debido a la reducción de interferencia y efecto borroso entre los lugares de los que se ha sacado imagen.
25

La combinación de una disposición hexagonal de lugares y la orientación de línea de radiación anteriormente indicada es un ejemplo de una realización de la invención, en la que las distancias entre los lugares más próximos que son irradiados simultáneamente por una línea de radiación en una primera posición de escaneado, es superior
30 que la distancia entre los lugares adyacentes más próximos que son irradiados en diferentes momentos de tiempo por la línea de radiación de escaneado. Se comprenderá que también se pueden utilizar otras combinaciones de condensación de lugares y orientación de línea para conseguir ventajas similares. Por ejemplo, si bien lugares circulares en una retícula rectilínea no están empaquetados tan íntimamente como en una retícula hexagonal, la orientación para una línea de radiación y su dirección de escaneado se pueden seleccionar para la reducción deseada de interferencia. De manera más específica, la línea de radiación se puede orientar diagonalmente con respecto a las filas y columnas de lugares en la retícula rectilínea y la línea de radiación puede ser escaneada a través de la retícula en dirección diagonal para conseguir menos interferencia entre los lugares que si la línea de radiación estuviera orientada ortogonalmente con respecto a las filas y columnas de lugares en la retícula rectilínea y escaneados en la dirección ortogonal. Una ventaja es que la línea está orientada de manera tal que la mayor separación entre lugares adyacentes tiene lugar en el no confocal, paralelo a la línea de radiación.
40

Las disposiciones de condensación descritas anteriormente son particularmente útiles cuando se utilizan con una línea de radiación que es sustancialmente más estrecha que la anchura de los lugares que son irradiados. En realizaciones específicas, la anchura de la línea de radiación (es decir, la dimensión más corta de la línea) será
45 como máximo 75%, 66%, 50%, 30%, 25%, o 10% de la anchura de los lugares que están siendo irradiados. De modo general, son preferibles los lugares que tienen una forma regular, por ejemplo, lugares que tienen simetría de reflexión o simetría de rotación. No obstante, se pueden utilizar lugares con formas irregulares en caso deseado para una aplicación particular. Siempre que un lugar es regular o irregular en su forma, la anchura del lugar se medirá típicamente en la dimensión más ancha, por ejemplo, la anchura se mide como el diámetro de un lugar que
50 tiene sección circular.

Tal como se ha mostrado en las figuras 18-23, se puede generar una línea de difracción limitada con distribución uniforme de intensidad utilizando una serie de arquitecturas. En una de dichas realizaciones, mostrada en la figura
55 18, el generador de línea 244 puede estar formado con un conjunto de microlentes cilíndricas 246 y un condensador 248. Un conjunto de microlentes cilíndricas 246 es utilizado para enfocar el haz de excitación 250 al plano focal frontal de un condensador 248 en una dimensión, dejando una segunda dimensión sin afectar. Una línea de difracción limitada 252 con distribución de intensidad uniforme será generada en el plano focal posterior del condensador 248. La uniformidad de la línea está relacionada con el número de microlentes cilíndricas 246 que cubren la pupila de entrada del condensador 248. Cuanto mayor es el número de conjuntos de microlentes cilíndricas 246, más uniforme será la distribución de intensidad de línea.
60

De acuerdo con otra realización, y no como se ha mostrado en la figura 19, el generador de línea 244 puede estar formado con un difusor monodimensional 254 y un condensador 248. Un difusor monodimensional 254 que tiene uniformidad angular es situado en el plano focal frontal de un condensador 248. El difusor 254 abarca el haz colimado de entrada 250 en una dimensión que deja otra dimensión sin afectar. Una línea de difracción limitada 252 con distribución de intensidad uniforme será generada en el plano focal posterior del condensador 248. Dado que el
65

difusor 254 tiene uniformidad angular, la línea generada será uniforme.

En otra realización adicional de la invención, se utiliza un objetivo 256 como condensador 248. Preferentemente, la lente objetivo 256 es una lente telecéntrica con un tamaño de pupila externo de 15,75 mm. Preferentemente, este tamaño está configurado para corresponder con el diámetro del haz de excitación de entrada colimado 250. De forma adicional, el ángulo del campo de entrada de la lente es de +/- 3 grados, que corresponde a un campo de visión de 2mm.

La figura 20 muestra un difusor monodimensional 254 que se utiliza con el objetivo 256 antes descrito. Tal como se ha mostrado en la figura 20, un difusor monodimensional 254 está situado en el tope de pupila del objetivo 256. El objetivo 256 difunde el haz de entrada colimado 250 a diferentes ángulos en un rango determinado en una dimensión y deja otra dimensión sin afectar. El difusor 254 tiene uniformidad angular, es decir, las intensidades de haces difundidos a diferentes ángulos son las mismas. La lente 256 enfoca el haz en cada ángulo particular a un punto de la línea. La uniformidad de la línea es determinada por la sensibilidad angular del difusor 254. Además, la longitud de la línea de radiación 268 es determinada por el ángulo de apertura del difusor 254. Cuanto mayor es el ángulo abarcado, más larga será la línea de radiación generada 268. Si el ángulo abarcado del difusor 254 es +/- 3 grados, la longitud de la línea generada será de 2mm. Si bien la longitud de la línea de radiación 268 puede ser más larga de 2mm, la uniformidad deseada puede ser obtenida por una línea de 2mm de longitud.

De acuerdo con otra realización, la figura 21 muestra un conjunto de microlentes cilíndricas 246 que se utiliza con el objetivo antes descrito 256. Cada microlente cilíndrica 246 rastrea una parte del haz de entrada colimado 250, lo enfoca al tope de pupila del objetivo 256 en una dimensión, y deja la segunda dimensión sin afectar. El conjunto de microlentes cilíndricas 246 abarca el haz 250 a diferentes ángulos en un cierto rango en una dimensión. El ángulo abarcado está determinado por el número f de las microlentes cilíndricas 246. La lente objetivo 256 enfoca el haz 250 en cada ángulo hasta el punto de la línea. Dado que cada punto de la línea enfocada tiene contribución de todas las microlentes cilíndricas 246, la uniformidad de la línea está relacionada con el número de microlentes cilíndricas 246 que cubre la pupila de entrada de la lente objetivo 256. De acuerdo con una realización de la invención, se utilizan 158 microlentes para cubrir el tope de pupila a efectos de generar una excitación de línea uniforme 268.

Las figuras 22 y 23 muestran otras realizaciones adicionales de telescopios relevadores, configurados para tomar imágenes fluorescentes. Un telescopio relevador 258 está dispuesto entre el difusor monodimensional 254 (ver figura 22) o el conjunto de microlentes cilíndricas 246 (ver figura 23) y un divisor dicróico de haz 260. El divisor dicróico de haz 260 está configurado para separar la trayectoria de formación de imagen fluorescente (retro-haz) 262 de la trayectoria de excitación 250.

Una cámara CCD u otro conjunto detector utilizado en la invención, puede ser configurado para acumulación o "binado" ("binning"). El "binado" aumenta la sensibilidad del conjunto detector al sumar las cargas de múltiples píxeles del conjunto en un píxel. Entre los tipos de "binado" a título de ejemplo que pueden ser utilizados, se incluyen binado horizontal, vertical o completo. Con el binado horizontal, se suman pares de píxeles adyacentes en cada línea en un conjunto detector. Con el binado vertical, se suman pares de píxeles adyacentes de dos líneas en el conjunto. El binado completo es una combinación de binado horizontal y vertical en el que se suman cuatro píxeles adyacentes.

El binado en la invención, puede ser llevado a cabo con conjuntos más grandes de elementos sensores. Tal como se ha mostrado en la figura 24(a), la cámara de escaneo de línea CCD y la electrónica de control correspondiente, pueden estar configurados de manera tal que todos los elementos de píxel en el eje vertical están recogidos en un "bin" común y se leen como valor único, por lo tanto, el binado no debe ser limitado a pares adyacentes o a grupos adyacentes de elementos del conjunto. De acuerdo con ello, un conjunto de más de dos elementos sensores, tales como píxeles de una cámara CCD, pueden ser binados, incluso si el conjunto incluye elementos sensores no adyacentes. Los elementos sensores no adyacentes tienen lugar, por ejemplo, en una disposición lineal de tres elementos sensores en la que el primer y el tercer elemento están separados entre sí por el segundo elemento sensor.

Tal como se ha mostrado en la figura 24(b), en el binado, todos los píxeles de una fila son desplazados de una vez después de un tiempo único de integración. La ventaja de este enfoque cuando se utiliza en un aparato de la invención es que, en comparación con un diseño común TDI, la tasa de lectura es menos sensible a oscilaciones. Además, el aparato tendría confocalidad en un eje, y la tolerancia de la temporización de sincronización de la lectura con el movimiento de la platina en Y, se reduciría. La figura 24(b) muestra la proyección de un punto de láser de $1\mu\text{m}$ sobre una cámara CCD de escaneo de línea. La proyección es simétrica, tanto en el eje X como en el eje Y. La limitación del número de píxeles del CCD a 6 en el eje vertical crea una ranura vertical en dicho eje. El mismo efecto puede ser alcanzado con una cámara TDI, siendo la exigencia principal que el número de píxeles en el eje vertical sea optimizado para pasar una señal, mientras rechaza, simultáneamente el ruido de fondo. Para conseguir este efecto, la dimensión del punto de láser se dispone para que corresponda a la resolución del sistema conjuntamente con la limitación del número de píxeles verticales.

Una realización alternativa de la invención utiliza un diseño TDI que limita el número de píxeles verticales de manera

tal que se crea todavía la ranura virtual. Tal como se ha mostrado en la figura 24(c) en TDI, los píxeles son desplazados en sincronismo con la salida de encoder de la platina Y. Además, la ventaja con respecto a diseños de sistema en los que $n=1$ son que la eficiencia de captación del sistema se incrementaría y se disminuiría la sensibilidad a pequeños desplazamientos de alineación óptica. Se describen diseños y métodos de TDI a título de ejemplo que pueden ser utilizados en la invención en el documento US 5.754.291.

De acuerdo con otro ejemplo, la arquitectura del presente sistema de escaneado está configurada para utilizar formación de imagen por fluorescencia multispectral utilizando sensores de formación de imagen de escaneado de línea. Tal como se ha mostrado en la figura 25, la línea de radiación 134 es utilizada para excitar moléculas fluorescentes en un rango espectral completo y un elemento de dispersión cromática 264 es utilizado para extender la imagen de fluorescencia de línea 262 a múltiples sensores de formación de imágenes de escaneado de líneas 266. El sistema puede ser implementado utilizando iluminación lateral o iluminación colineal. De acuerdo con este ejemplo, un conjunto de filtro de banda múltiple 268 es utilizado para excitar y detectar múltiples moléculas de fluorescente. Tal como se ha representado en la figura 26, cada uno de una serie de sensores 266 está mapeado a un rango espectral de banda estrecha. Los sensores 266 pueden ser sensores de formación de imagen tales como CCD de escaneado de línea de tipo lineal o un CCD de escaneado de línea TDI. Los sensores son designados también como detectores.

Tal como se ha mostrado en la figura 27, de acuerdo con otro ejemplo, la arquitectura del sistema de escaneado se puede configurar para utilizar una técnica de iluminación de líneas múltiples. El sistema puede ser implementado utilizando iluminación lateral o iluminación colineal. En este caso, cada línea 268 excita una zona de muestra a una longitud de onda distinta, por ejemplo, para excitar diferentes moléculas fluorescentes. La imagen de fluorescencia de líneas múltiples resultantes es captada por un detector 266 con sensores 266 de formación de imagen de escaneado de múltiples líneas. Cada sensor 266 genera la correspondiente imagen fluorescente. Dado que la fluorescencia con diferentes rangos espectrales ya está separada espacialmente, no se requiere ningún elemento 264 de dispersión cromática. Un filtro 270 de ranuras múltiples es utilizado para bloquear de manera efectiva la radiación dispersa residual de Rayleigh y Raman.

Además, si se utiliza un elemento de dispersión cromática en el sistema de la figura 27, se pueden captar imágenes con resolución espectral más elevada. Tal como se ha mostrado en la figura 28, cada grupo de sensores 266 de la figura, puede funcionar también en modalidad TDI para generar una imagen integrada única que proporciona imágenes con resolución espectral jerárquica.

La arquitectura del sistema de escaneado se puede diseñar para excitar fluorescencia de múltiples colorantes en diferentes rangos espectrales simultáneamente. Las arquitecturas, a título de ejemplo, incluyen una línea única con múltiples colores utilizada en el sistema de la figura 25 o líneas múltiples espaciadas, con múltiples colores, utilizadas en el sistema de la figura 27. La fuente de radiación puede ser una lámpara de luz blanca con un filtro de excitación de bandas múltiples o una combinación de láseres múltiples. El filtro de excitación del conjunto 268 de filtros de bandas múltiples del sistema de la figura 25 no es necesario, por ejemplo, si se utiliza como fuente de radiación la combinación de láser múltiple. Además, la iluminación puede ser iluminación colineal (la iluminación comparte la misma lente objetivo 138 que la captación), tal como se ha mostrado en la figura 24 o iluminación de platina (campo oscuro), tal como se ha mostrado en la figura 28. Un divisor de haz dicróico de banda múltiple 136 (mostrado en la figura 25) puede ser utilizado para la iluminación colineal y puede ser omitido para la realización de iluminación lateral. Asimismo, tal como se ha mostrado en la figura 25, un filtro 272 de emisión de banda múltiple del conjunto 82 de filtro de banda múltiple puede ser utilizado para bloquear selectivamente la radiación de excitación mientras pasa por bandas de fluorescencia. Para iluminación con láseres múltiples, se puede utilizar también un filtro 270 de ranura múltiple para bloquear selectivamente la radiación de aplicación mientras pasan bandas de fluorescencia, lo que proporciona una detección de fluorescencia todavía más eficiente.

De acuerdo con realizaciones específicas, los filtros de emisión 272 pueden ser integrados con el sensor de imagen 266. Una orientación, a título de ejemplo, es la mostrada en la figura 29. Una orientación diferente para bloqueo de la iluminación multibanda e iluminación láser múltiple es demostrada en las figuras 30(a) y 30(b), respectivamente.

Un aparato o procedimiento del presente ejemplo es particularmente útil para obtener una imagen de un área bidimensional de una muestra. De este modo, en caso deseado, la detección puede ser sustancialmente restringida para obtener una imagen en dos de las tres dimensiones posibles para una muestra. De acuerdo con ello, se puede detectar o tomar imagen de una superficie para una muestra de interés. Una muestra especialmente relevante es un microconjunto de muestras. Utilizando el ejemplo se puede detectar o tomar imagen de la superficie de un microconjunto de muestras para determinar una o varias propiedades del microconjunto. Entre las propiedades a título de ejemplo de un microconjunto que pueden ser detectadas se incluyen, sin que ello sea limitativo, la presencia o ausencia de una etiqueta, la localización de una etiqueta en una localización particular, tal como una localización en la que reside una sonda específica, o una característica específica de una etiqueta tal como emisión de radiación a una longitud de onda específica o rango de longitudes de onda.

La detección de dichas propiedades por el microconjunto de muestras puede ser utilizada para determinar la presencia o ausencia de una molécula objetivo específica en una muestra a la que se ha establecido contacto con el

microconjunto. Esto puede ser determinado, por ejemplo, basándose en la unión de un analito objetivo marcado a una sonda específica de un microconjunto o debido a una modificación dependiente del objetivo de una sonda específica para incorporar, eliminar o alterar una etiqueta en la localización de la sonda. Se puede utilizar cualquiera de varios ensayos para identificar o caracterizar objetivos utilizando un microconjunto de muestras, tal como se describe, por ejemplo, en las publicaciones de solicitudes de patentes US No. 2003/0108867, 2003/0108900, 2003/0170684, 2003/0207295 o 2005/0181394.

Las etiquetas a título de ejemplo que pueden ser detectadas, por ejemplo, cuando se encuentran presentes en un microconjunto de muestras, incluyen, sin que ello sea limitativo, un cromóforo; luminóforo, fluoróforo, nanopartículas codificadas ópticamente, partículas codificadas con una red de difracción, etiqueta electroquimioluminiscente, tal como Ru(bpy)₂268+ o una fracción que puede ser detectada basándose en una característica óptica. Los fluoróforos que son útiles incluyen, por ejemplo, complejos de lantánidos fluorescentes incluyendo los de europio y terbio, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, coumarina, metilcoumarinas, pireno, verde de malaquita, Cy3, Cy5, estilbeno, amarillo Lucifer, Cascade Blue™ Texas Red, colorantes Alexa, ficoeritina, "bodipy" y otros conocidos en esta técnica, tales como los que se describen en la publicación Haughland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, OR) 6ª edición; catálogo de Synthegen (Houston, TX.), Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2ª edición, Plenum Press New York (1999), o WO 98/59066, todos ellos incorporados como referencia a la descripción actual.

Cualquiera de una variedad de microconjuntos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, los indicados en otras partes de esta descripción, pueden ser utilizados como muestra en la invención. Un microconjunto típico contiene lugares, a los que algunas veces se hace referencia como características, cada una de las cuales tiene una población de sondas. La población de sondas en cada lugar es típicamente homogénea, teniendo una especie única de sonda pero en algunas realizaciones las poblaciones pueden ser heterogéneas. Los lugares o características de un conjunto son típicamente discretos, estando separadas por espacios entre sí. Las dimensiones de los lugares de la sonda y/o separación entre los lugares pueden variar de manera que los conjuntos pueden tener elevada densidad, densidad media o densidad baja. Los conjuntos de alta densidad se caracterizan porque tienen lugares separados en menos de unos 15 µm. Los conjuntos de densidad media tienen lugares separados aproximadamente en 15 a 30 µm, mientras que los conjuntos de baja densidad tienen lugares separados en más de 30 µm. Un conjunto útil en la invención puede tener lugares separados en menos de 100 µm, 50 µm, 10 µm, 5 µm, 1 µm o 0,5 µm. Un aparato o procedimiento de la presente invención puede ser utilizado para tomar la imagen de un conjunto con una resolución suficiente para distinguir lugares en las densidades antes mencionadas o rangos de densidades.

Si bien la invención ha sido ejemplificada anteriormente con respecto a la utilización de un microconjunto de muestras como muestra, se comprenderá que otras muestras con características o lugares con las densidades antes indicadas pueden ser objeto de imagen en las resoluciones indicadas anteriormente. Otras muestra a título de ejemplo, incluyen, sin que ya sea limitativo, muestras biológicas tales como células o tejidos, chips electrónicos tales como los utilizados en procesadores de ordenador o similares. Un microconjunto u otra muestra puede ser situada en una región de muestra de un aparato de la invención por su colocación sobre una platina de muestras, tal como las descritas en otras partes de esta descripción.

Un aparato de la invención puede incluir además un procesador conectado operativamente a un conjunto detector rectangular o configurado de otra manera para obtener datos del conjunto detector rectangular, de manera que el procesador está configurado para llevar a cabo una serie de funciones en la imagen. El procesador puede incluir un sistema de ordenador de aplicación general que está programado con uno o varios módulos de programa o que tiene acceso a los mismos, involucrados en el análisis de datos de formación de imagen. Los sistemas de ordenador a título de ejemplo que son útiles en la invención incluyen, sin que ello sea limitativo, sistemas de ordenador personal tales como los basados en los microprocesadores Intel®, IBM® o Motorola®; o estaciones de trabajo tales como la estación de trabajo SPARC® o la estación de trabajo UNIX®. Los sistemas útiles incluyen los que utilizan los sistemas operativos Microsoft® Windows®, UNIX o LINUX®. Los sistemas y procedimientos descritos pueden también ser implementados para su aprovechamiento en sistemas cliente-servidor o en redes de área amplia tales como Internet.

El procesador puede ser incluido en un sistema ordenador configurado para operar como cliente o servidor. El procesador puede ejecutar instrucciones incluidas en uno o varios módulos de programa. Los resultados de uno o varios módulos de programa, tales como una imagen de una muestra o región de muestra o el análisis de la muestra o región de muestra pueden ser informados al usuario mediante un interfaz gráfico de usuario. Por ejemplo, los resultados pueden ser informados mediante un monitor o una impresora conectados operativamente al procesador. De este modo, se puede proporcionar al usuario una imagen de un conjunto u otra muestra mediante un interfaz gráfico de usuario.

De acuerdo con ciertos aspectos de la invención, se consiguen varias ventajas. El sistema de la presente invención escanea muestras de manera más rápida que otras tecnologías y proporciona una calidad de datos mejorada a un coste más bajo. De manera específica, la tasa de lectura de la presente invención es incrementada por un factor n en comparación con sistemas convencionales TRI. La confocalidad puede ser conseguida en uno o varios ejes. Además, la presente invención es menos sensible a desplazamientos de alineación óptica.

Además, los ejemplos descritos combinan unas ventajas de excitación/detección simultánea de múltiples moléculas fluorescentes utilizando filtros de banda múltiple y lectura paralela de múltiples sensores de toma de imágenes de escaneado de línea en la misma muestra. Los ejemplos pueden generar simultáneamente imágenes fluorescentes multiespectrales a alta velocidad. En realizaciones específicas, un aparato puede escanear una muestra a una velocidad mínima de aproximadamente 0,01 mm²/segundo. Dependiendo de la aplicación específica, también se pueden utilizar velocidades más rápidas, incluyendo, por ejemplo, en términos del área escaneada, una velocidad mínima de aproximadamente 0,02 mm²/segundo, 0,05 mm²/segundo, 0,1 mm²/segundo, 1 mm²/segundo, 1,5 mm²/segundo, 5 mm²/segundo, 10 mm²/segundo, 50 mm²/segundo o 100 mm²/segundo o más rápidas. En caso deseado, por ejemplo, para reducir ruidos, la velocidad de escaneado puede tener un límite superior aproximado de 0,05 mm²/segundo, 0,1 mm²/segundo, 1 mm²/segundo, 1,5 mm²/segundo, 5 mm²/segundo, 10 mm²/segundo, 50 mm²/segundo o 100 mm²/segundo. La velocidad de escaneado puede ser medida también en términos de velocidad de movimiento relativo para una imagen y detector en el eje de escaneado (vertical) y puede ser, por ejemplo, como mínimo, aproximadamente 0,1 mm/segundo, 0,5 mm/segundo, 1 mm/segundo, 10 mm/segundo o 100 mm/segundo. También en este caso, para reducir ruidos, la velocidad de escaneado puede tener un límite superior aproximado de 0,5 mm/segundo, 1 mm/segundo, 10 mm/segundo o 100 mm/segundo. Como resumen, el presente ejemplo puede ser utilizado para constituir formadores de imagen fluorescente multiespectrales que son más eficientes y efectivos en cuanto a costes que otros sistemas de formación de imagen.

Los siguientes son términos utilizados en la presente explicación y que están destinados a que tengan la significación que se describe a continuación.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “fuente de radiación” está destinado a significar un origen o generador de energía electromagnética propagada. El término puede incluir una fuente de iluminación que produce radiación electromagnética en el rango ultravioleta (UV) (aproximadamente 200 a 390 nm), visible (VIS) (aproximadamente 390 a 770 nm) o infrarrojo (IR) (aproximadamente 0,77 a 25 micras), u otros rangos del espectro electromagnético. Una fuente de radiación puede incluir, por ejemplo, una lámpara tal como la pantalla arco o una lámpara halógena de cuarzo o un láser, tal como un láser de estado sólido o un láser de gas, o un LED, tal como un sistema LED/fibra de modalidad única.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “radiación de excitación” está destinado a significar energía electromagnética propagada hacia una muestra o región de muestras. La radiación de excitación puede adoptar la forma que induzca cualquiera de una serie de respuestas desde una muestra, incluyendo, sin que ello sea limitativo, absorción de energía, reflexión, emisión de fluorescencia o luminiscencia.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “región de muestra” está destinado a significar una localización que tiene que ser detectada. La localización puede encontrarse, por ejemplo, en, encima o en las proximidades del dispositivo de soporte configurado para soportar o contener un objeto a detectar. La muestra puede ocupar una región de muestra permanentemente o temporalmente, de manera que la muestra puede ser retirada de la región de muestra. Por ejemplo, una región de muestra puede ser una localización sobre o cerca de una platina de traslación, estando ocupada la localización por un microconjunto de muestras cuando se sitúa sobre la platina de traslación.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “conjunto detector” está destinado a significar un dispositivo o aparato que tiene varios elementos que convierten la energía de los fotones con que se ha tenido contacto en una respuesta eléctrica. Un conjunto detector a título de ejemplo, es un dispositivo acoplado por carga (CCD) en el que los elementos son lugares de captación de carga fotosensible que acumulan carga como respuesta a los fotones que impactan. Otros ejemplos de conjuntos detectores incluyen, sin que ello sea limitativo, un conjunto detector de semiconductor de óxido de metal complementario (CMOS), un conjunto de detector fotodiodo de avalancha (APD) o un conjunto detector contador de fotones de modalidad Geiger. Los elementos de un conjunto detector pueden tener cualquiera de una variedad de disposiciones. Por ejemplo, un conjunto detector rectangular tiene elementos en una disposición ortogonal, bidimensional, en el que una primera dimensión a la que se hace referencia como dimensión “horizontal” es más larga que una segunda dimensión a la que se hace referencia como dimensión “vertical”. Un conjunto detector cuadrado tiene elementos en la disposición bidimensional, ortogonal en la que la primera y segunda dimensiones de la disposición tienen la misma longitud.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “imagen rectangular” está destinado a significar una representación formada ópticamente de una muestra, una parte de la muestra que tiene lugar dentro de un región bidimensional, ortogonal que tiene una dimensión horizontal que es más larga que la dimensión vertical. La imagen rectangular puede representar la totalidad de una imagen que emana de una región de muestra, o bien de forma alternativa, puede ser una parte rectangular de una imagen más grande, teniendo la imagen más grande cualquiera de una variedad de formas.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “dispositivo de escaneado” está destinado a significar un dispositivo capaz de detectar secuencialmente diferentes partes de una muestra. Un dispositivo de escaneado puede funcionar cambiando la posición de uno o varios componentes de un aparato de detección, incluyendo, por ejemplo, una muestra, fuente de radiación, dispositivo óptico que dirige radiación de excitación a una muestra,

dispositivo óptico que dirige radiación que emana de una muestra o conjunto detector. Se incluyen entre los dispositivos de escaneado a título de ejemplo, sin que ello sea limitativo, un galvanómetro configurado para desplazar un haz o línea de radiación sobre una muestra o una platina de traslación configurada para desplazar una muestra a través de un haz o línea de radiación.

5 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “Resolución de Rayleigh” es RR de la siguiente ecuación

$$RR = ((1.22)(\lambda)(f))/D$$

10 en la que λ es la longitud de onda, f es la longitud focal y D es la distancia entre dos objetos detectados. El término está destinado a ser coherente con su utilización en la técnica de óptica, por ejemplo, tal como se indica en la publicación Hecht, Optics, 4ª edición, Addison Wesley, Boston MA (2001).

15 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “ampliación” está destinado a significar la proporción de la dimensión de un objeto con respecto a la dimensión de la imagen del objeto. Por ejemplo, una ampliación se puede determinar a partir de la relación de la dimensión de la región de la muestra (es decir, el objeto) con respecto a la dimensión de una imagen de la región de una muestra en un conjunto detector. En sistemas que incluyen una lente objetivo y de proyección, la ampliación se puede determinar a partir de la proporción de la longitud focal del objetivo a la longitud focal posterior de la lente de proyección.

20 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “línea de radiación” esta destinado para significar un conjunto de ondas electromagnéticas o partículas propagadas en una dirección uniforme, de manera que la sección transversal bidimensional ortogonal a la dirección de propagación es rectangular o alargada. A título de ejemplo, las secciones transversales bidimensionales de una línea de radiación incluyen, sin estar limitadas a ello, una forma rectangular, elíptica u oval. La anchura en sección transversal de una línea de radiación puede tener una o ambas dimensiones en un rango de, por ejemplo, aproximadamente 0,05 μm , hasta unos 10 μm . Por ejemplo, una dimensión de la línea de radiación puede ser, como mínimo, aproximadamente 0,05 μm , 0,1 μm , 0,5 μm , 1 μm , 5 μm , o 10 μm . Además una dimensión de una línea de radiación puede ser, por ejemplo, como máximo, aproximadamente, 0,1 μm , 0,5 μm , 1 μm , 5 μm o 10 μm . Se comprenderá que estas dimensiones tienen simplemente carácter de ejemplo, y que se pueden utilizar en caso deseado líneas de radiación con otras dimensiones.

25 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “generador de línea” está destinado a significar un elemento óptico que está configurado para generar una línea de difracción limitada en cuanto a difracción o casi limitada en cuanto a difracción en el plano perpendicular al eje óptico de propagación con una distribución de intensidad sustancialmente uniforme a lo largo del eje horizontal de la línea. Entre los generadores de línea a título de ejemplo, se incluyen, sin que ello sea limitativo, un difusor monodimensional que tiene uniformidad angular, un conjunto de microlentes cilíndricas, elemento difractivo o lente refractiva asférica, tal como una lente Powell. El difusor monodimensional que tiene uniformidad angular o conjunto de lentes microcilíndricas puede ser colocado para dirigir la radiación a un condensador.

35 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “divisor del haz” está destinado a significar un elemento óptico que pasa una primera parte de un haz de radiación y refleja una segunda parte del haz. Por ejemplo, un divisor de haz puede estar configurado para pasar selectivamente radiación en una primera longitud de onda y reflejar radiación en un segundo rango de radiación de onda distinto. Cuando se utiliza para detección de fluorescencia, el divisor de haz reflejará de manera típica la radiación de excitación con longitud de onda más corta y transmitirá la radiación de emisión con longitud de onda más larga.

40 Tal como se utiliza en esta descripción el término “pupila externa” es utilizado en referencia a un objetivo en el que la pupila de entrada a la abertura posterior del objetivo se encuentra detrás de las dimensiones físicas del objetivo en la trayectoria del haz de excitación.

45 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “expansor” está destinado a significar uno o varios elementos ópticos configurados para ajustar el diámetro y la colimación de un haz de radiación. Por ejemplo, un expansor puede estar configurado para incrementar el diámetro de un haz de radiación en una magnitud deseada, tal como, como mínimo, dos veces, cinco veces, diez veces, o más. Los elementos ópticos de un expansor pueden incluir, por ejemplo, uno o varios espejos o lentes.

50 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “lente de proyección” está destinado a significar un elemento óptico configurado para transferir la imagen de un objeto a un detector. Por ejemplo, una lente puede ser situada para transferir una imagen que emana de una lente objetivo a un conjunto detector.

60 Tal como se utiliza en esta descripción, el término “filtro óptico” está destinado a significar un dispositivo para pasar o rechazar el paso selectivamente de radiación en una longitud de onda, polarización, o forma dependiente de frecuencia. El término puede comprender un filtro de interferencia en el que múltiples capas de materiales

5 dieléctricos permiten el paso o reflejan la radiación de acuerdo con la interferencia constructiva o destructiva entre reflexiones de diferentes capas. Los filtros de interferencia son conocidos también en la técnica de los filtros dicróicos o filtros dieléctricos. El término puede incluir un filtro de absorción que impide el paso de radiación que tiene una longitud de onda o rango de longitudes de onda selectivo por absorción. Los filtros de absorción comprenden, por ejemplo, cristal o líquido coloreado.

10 Un filtro puede tener una o varias características de transmisión de filtro específicas, incluyendo, por ejemplo, paso banda, paso corto, y paso largo. Un filtro de paso banda permite selectivamente el paso de la radiación en un rango de longitud de onda definido por una longitud de onda central de máxima transmisión de radiación (T_{max}) y una amplitud de banda y paso de bloques de radiación fuera de este rango. T_{max} define el porcentaje de radiación transmitida en la longitud de onda central. La amplitud de banda es descrita típicamente como la amplitud completa a la mitad del máximo (FWHM) que es el rango de longitudes de onda que pasan por el filtro a un valor de transmisión que es la mitad de T_{max}. Un filtro paso banda puede tener un FWHM de 10 nanómetros (nm), 20 nm, 30 nm, 40 nm o 50 nm. Un filtro paso banda permite el paso selectivamente de radiación de longitud de onda más larga, tal como se ha definido por un T_{max} y un corte en la longitud de onda. El corte en la longitud de onda es la longitud de onda en la que la transmisión de la radiación es la mitad de T_{max}; dado que la longitud de onda aumenta por encima del corte de longitud de onda, el porcentaje de transmisión aumenta, y al disminuir la longitud de onda por debajo del corte en longitud de onda, el porcentaje de transmisión disminuye. Un filtro de paso corto permite selectivamente el paso de radiación de longitud de onda más baja, tal como se define por T_{max} y una longitud de onda de corte. La longitud de onda de corte es la longitud de onda en la que la transmisión de radiación es la mitad de T_{max}; al aumentar la longitud de onda por encima del corte de longitud de onda, el porcentaje de transmisión disminuye y, al disminuir la longitud de onda por debajo de la longitud de onda de corte, el porcentaje de transmisión aumenta. Un filtro puede tener T_{max} de 50-100%, 60-90% o 70-80%.

25 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "microconjunto" se refiere a una población de diferentes moléculas sonda que están acopladas a uno o varios sustratos, de manera que las diferentes moléculas sonda pueden ser diferenciadas entre sí, de acuerdo con la localización relativa. Un conjunto puede incluir diferentes moléculas sonda o poblaciones de las moléculas sonda que están situadas en una localización sobre un sustrato direccionable de forma distinta. De forma alternativa, un microconjunto puede incluir sustratos separados, cada uno de los cuales lleva una molécula sonda distinta, o población de las moléculas sonda, que se puede identificar de acuerdo con las localizaciones de los sustratos sobre una superficie a la que están acoplados los sustratos, o de acuerdo con las localizaciones de los sustratos en un líquido. Conjuntos a título de ejemplo en los que están situados sustratos separados sobre una superficie incluyen, sin que ello sea limitativo, un conjunto Sentrix® o un conjunto Sentrix® BeadChip de la firma Illumina®, Inc. (San Diego, CA) u otros que incluyen cuentas en pocillos, tales como los descritos en las patentes US. No. 6.266.459, 6.355.431, 6.770.441, y 6.859.570; y publicación PCT No. WO 00/63437. Otros conjuntos que tienen partículas sobre una superficie incluyen los explicados en los documentos US 2005/0227252; WO 05/033681; y WO 04/024328.

40 Otros ejemplos de microconjuntos disponibles comercialmente que pueden ser utilizados en la invención incluyen, por ejemplo, un microconjunto Affymetrix® GeneChip® u otros microconjuntos sintetizados, de acuerdo con técnicas que se designan a veces como VLSIPS™ (Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis), tecnologías que se describen, por ejemplo, en las patentes US Nos. 5.324.633; 5.744.305; 5.451.683; 5.482.867; 5.491.074; 5.624.711; 5.795.716; 5.831.070; 5.856.101; 5.858.659; 5.874.219; 5.968.740; 5.974.164; 5.981.185; 5.981.956; 6.025.601; 6.033.860; 6.090.555; 6.136.269; 6.022.963; 6.083.697; 6.291.183; 6.309.831; 6.416.949; 45 6.428.752 y 6.482.591. Un microconjunto con puntos ("spotted") puede ser utilizado también en un procedimiento, según la invención. Un microconjunto con puntos a título de ejemplo, es el conjunto CodeLink™, disponible de la empresa Amersham Biosciences. Otro microconjunto utilizable en la invención es el fabricado utilizando procedimientos de impresión por chorro de tinta, tal como el SurePrint™ Technology que se puede conseguir de Agilent Technologies. Otros microconjuntos que pueden ser utilizables en la invención incluyen, sin que ello sea limitativo, los descritos en Butte, Nature Reviews Drug Discov. 1:951-60 (2002) or U.S. Pat Nos. 5,429,807; 5,436,327; 5,561,071; 5,583,211; 5,658,734; 5,837,858; 5,919,523; 6,287,768; 6,287,776; 6,288,220; 6,297,006; 50 6,291,193; y 6,514,751; y WO 93/17126; WO 95/35505.

55 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "integración con retraso de tiempo" o "TDI" está destinada a significar la detección secuencial de partes diferentes de una muestra por diferentes subconjuntos de elementos de un conjunto detector, en el que la transferencia de carga entre los subconjuntos de elementos tiene lugar a una velocidad sincronizada con el movimiento aparente de la muestra de la que se toma imagen y en la misma dirección. Por ejemplo, la TDI puede ser llevada a cabo por escaneado de una muestra, de manera que un dispositivo de transferencia de platina produce una imagen de vídeo continua de la muestra por medio de un apilamiento de conjuntos lineales alineados con el movimiento aparente de la muestra y sincronizados con la misma, de manera que, al desplazarse la imagen de una línea a la siguiente, la carga almacenada se desplaza con la misma. La acumulación de carga puede integrarse durante todo un tiempo requerido para que la alineación de cargas se desplace de un extremo del detector al registro serie (o al área de almacenamiento del dispositivo en el caso de una CCD de transferencia de imágenes).

65 Tal como se utiliza en esta descripción, el término "brazo de captación" está destinado a significar un componente

óptico o un conjunto de componentes ópticos dispuesto para dirigir la radiación de una región de muestra a un detector.

- 5 Si bien solamente algunas características de la invención han sido representadas y descritas, los técnicos en la materia idearán muchas modificaciones y cambios. Por lo tanto, se debe comprender que las reivindicaciones adjuntas están destinadas a cubrir todas las mencionadas modificaciones y cambios que queden incluidos dentro de la invención, tal como se define por dichas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Aparato para la formación de imágenes que comprende:

- 5 (a) una fuente de radiación dispuesta para enviar radiación de excitación, como mínimo, a una parte de una región de muestra;
- (b) un conjunto detector rectangular que tiene elementos que convierten la energía de los fotones contactados en una respuesta eléctrica, encontrándose dichos elementos en una disposición bidimensional, ortogonal, en la que una primera dimensión es más larga que una segunda dimensión;
- 10 (c) una óptica de formación de imágenes dispuesta para dirigir una imagen rectangular de dicha parte a dicho conjunto detector rectangular; y
- (d) un dispositivo de escaneo configurado para escanear dicha región de muestra en una dimensión de eje de escaneo, de manera que la parte de dicha región de muestra que forma una imagen rectangular en dicho conjunto detector rectangular, es cambiada,

15 en el que la más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto detector rectangular y la más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicha imagen se encuentran en dicha dimensión del eje de escaneo, y en el que dicha dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto de detector rectangular es suficientemente corta para conseguir confocalidad en un eje único de dicho conjunto detector rectangular, de manera que dicho eje único es dicha dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto detector rectangular.

2. Aparato, según la reivindicación 1, que comprende, además, un generador de línea dispuesto para recibir radiación de excitación desde dicha fuente de radiación, y enviar una línea de radiación a dicha región de muestra.

25 3. Aparato, según la reivindicación 2, en el que la más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicha línea de radiación es suficientemente corta para conseguir confocalidad en un eje único de dicho conjunto detector rectangular, de manera que dicho eje único es dicha dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto detector rectangular.

30 4. Aparato, según la reivindicación 1, que comprende, además, un microconjunto soportado por una platina de translación, de manera que dicho conjunto es facilitado a dicha región de muestra.

35 5. Aparato, según la reivindicación 1, en el que dicho conjunto detector rectangular está configurado para funcionamiento TDI (Integración de Retraso de Tiempo).

6. Aparato, según la reivindicación 1, en el que la relación de aspecto de dicho detector rectangular es superior a 20.

40 7. Aparato, según la reivindicación 1, en el que dicho aparato está configurado para obtener una imagen de dicha muestra que comprende una resolución de Rayleigh comprendido entre 0,2 y 10 micras.

8. Procedimiento de obtención de una imagen de una muestra, que comprende:

- 45 (a) contactar, como mínimo, una primera parte de una muestra con radiación de excitación bajo condiciones en las que se emana una radiación desde dicha primera parte;
- (b) dirigir dicha radiación emanada desde dicha primera parte para formar una imagen rectangular de dicha primera parte en un conjunto detector rectangular que tiene elementos que convierten la energía de los fotones contactados en una respuesta eléctrica, encontrándose dichos elementos en una disposición bidimensional ortogonal, en la que una primera dimensión es más larga que una segunda dimensión; y
- 50 (c) escanear dicha región de muestra en una dimensión de eje de escaneo, repitiendo de esta manera las etapas (a) y (b) para formar una imagen rectangular de una segunda parte de dicha muestra en dicho conjunto detector rectangular,

55 en el que la más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto detector rectangular y la más corta de las dos dimensiones rectangulares para dichas imágenes se encuentran en dicha dimensión del eje de escaneo, y

60 en el que dicha dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto detector rectangular es suficientemente más corta para conseguir confocalidad en un eje único de dicho conjunto detector rectangular, en el que dicho eje único es dicha dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto detector rectangular.

9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que dicha radiación de excitación que establece contacto, como mínimo, con una parte de dicha muestra, comprende una línea de radiación.

65 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicha línea de radiación es suficientemente corta para conseguir confocalidad en un eje único de dicho conjunto

detector rectangular, en el que dicho eje único es dicha dimensión más corta de las dos dimensiones rectangulares para dicho conjunto detector rectangular.

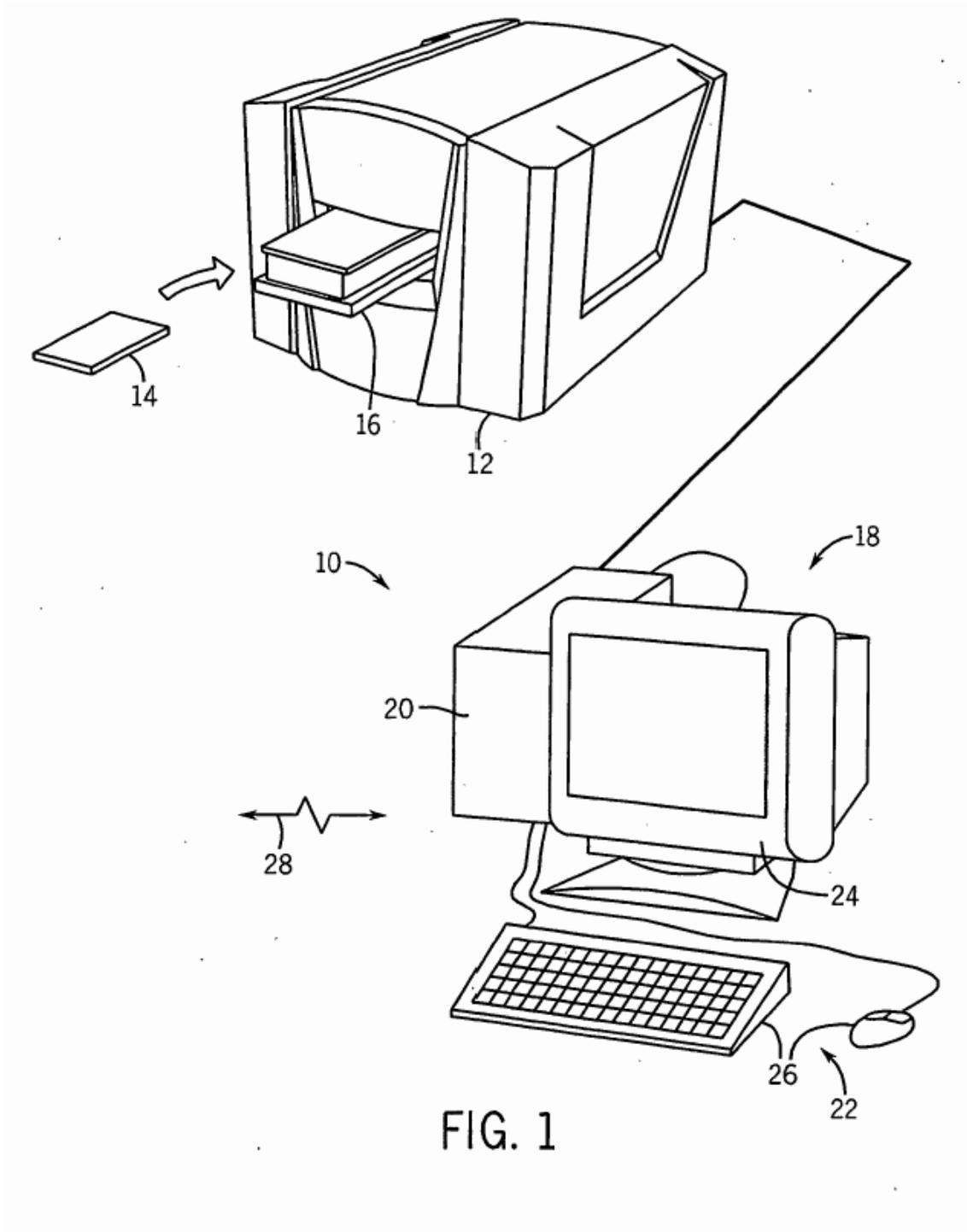
5 11. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que dicho escaneado de la muestra comprende el desplazamiento de dicha muestra, cambiando de esta manera las posiciones relativas de dicha imagen rectangular y dicho conjunto detector rectangular en dicha dimensión del eje de escaneado.

10 12. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que dicho escaneado comprende TDI (Integración de Retraso de Tiempo).

13. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que dicha muestra comprende un microconjunto que tiene una serie de lugares individuales.

15 14. Procedimiento, según la reivindicación 8, que comprende, además, la distinción de lugares individuales separados por una distancia comprendida en un rango de 0,1 a 50 micras.

15. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que dicha imagen de dicha muestra comprende una resolución Rayleigh comprendida entre 0,2 y 10 micras.



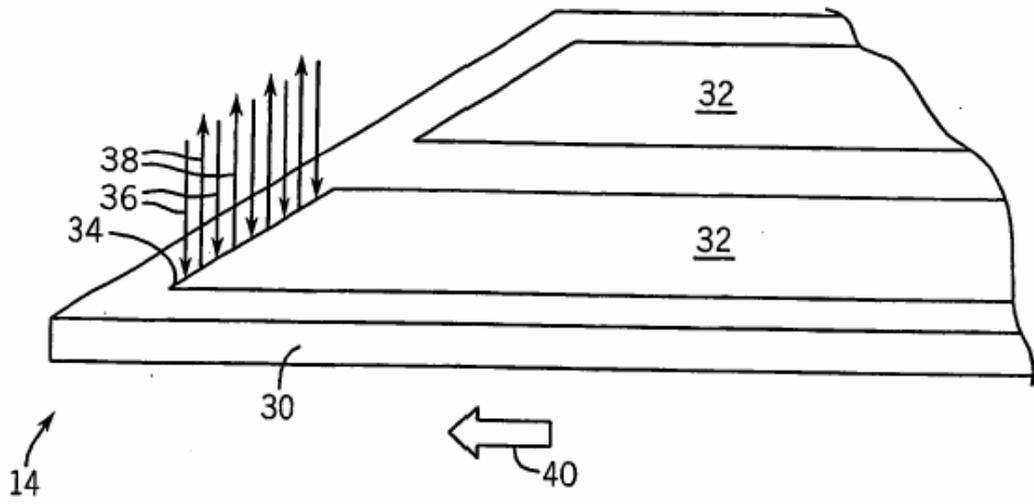


FIG. 2

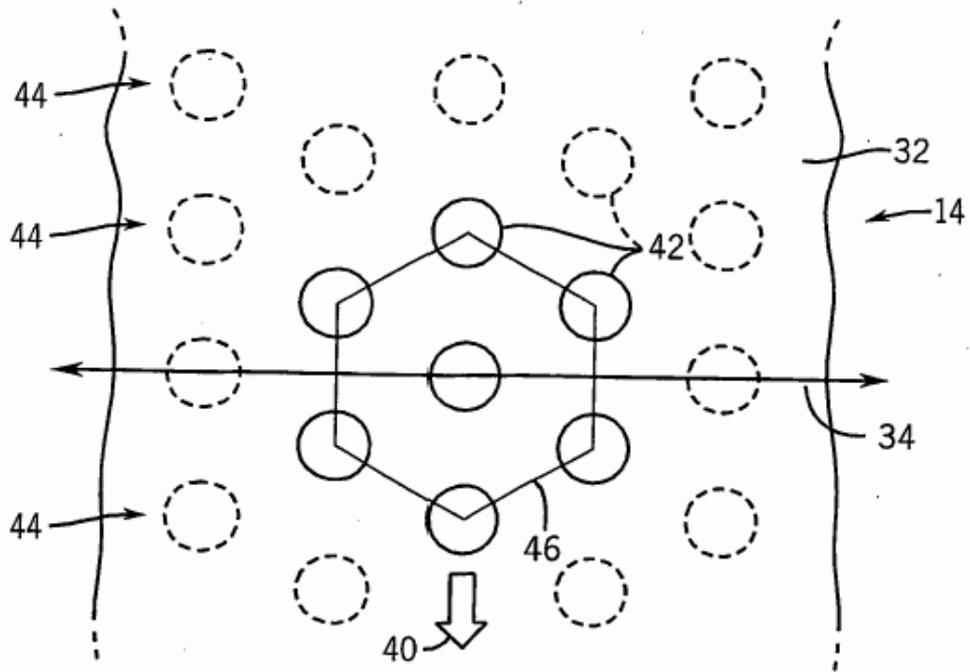


FIG. 3

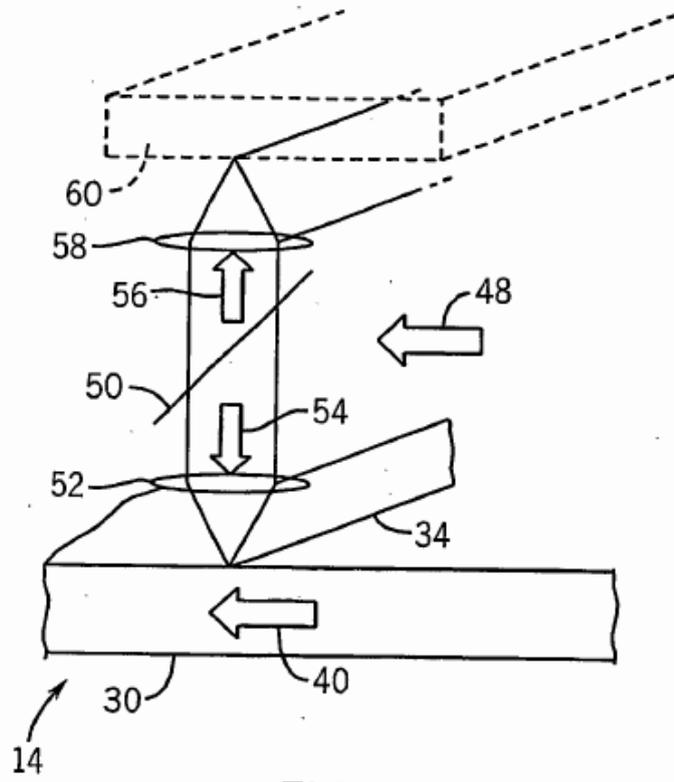


FIG. 4

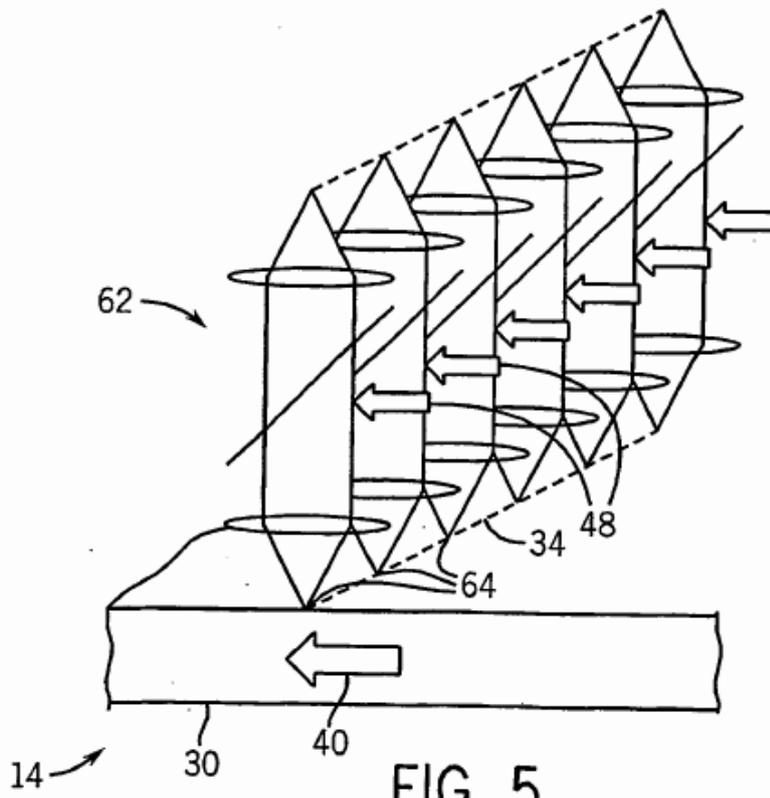


FIG. 5

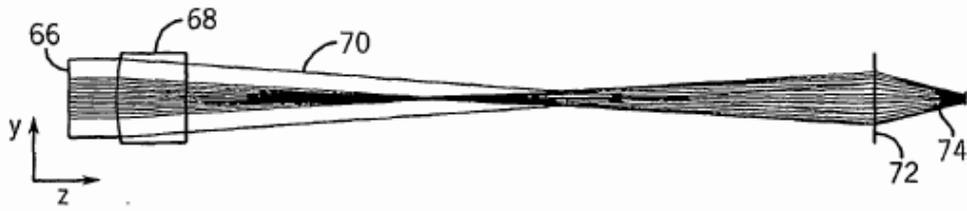


FIG. 6

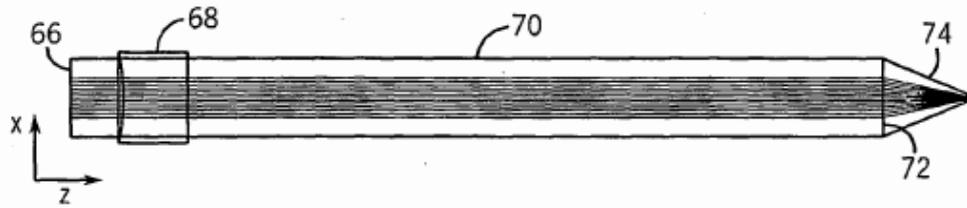


FIG. 7

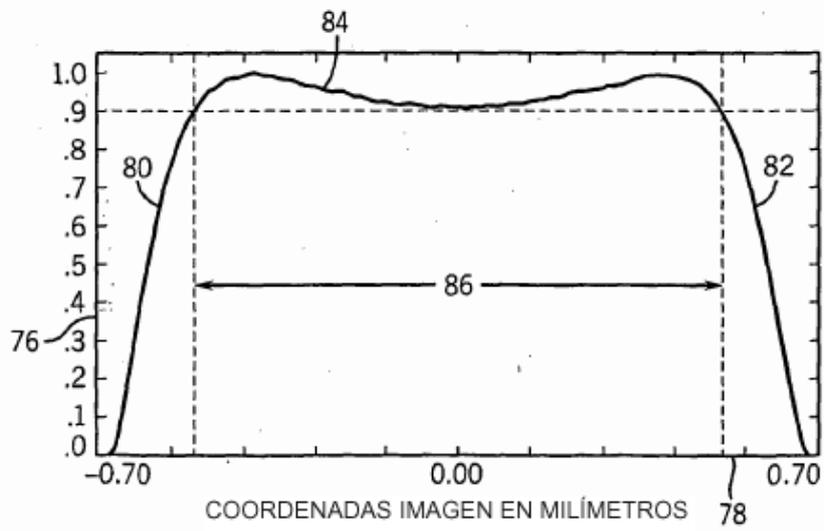


FIG. 8

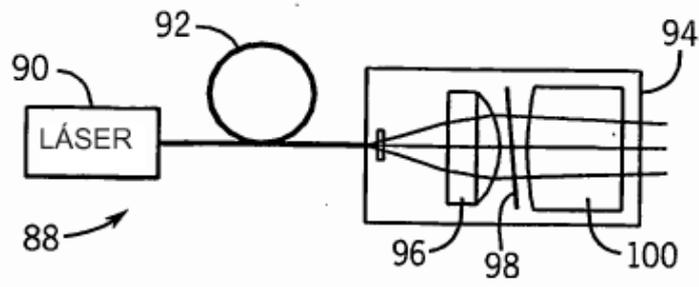


FIG. 9



FIG. 10

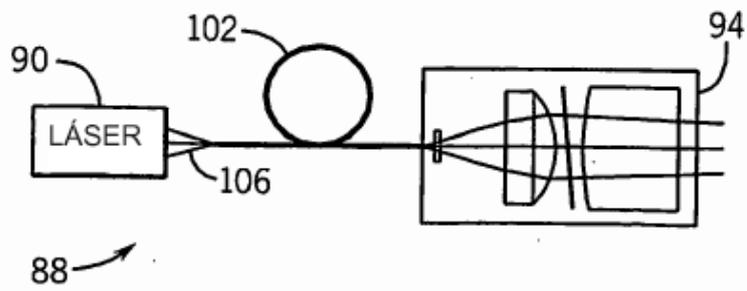


FIG. 11

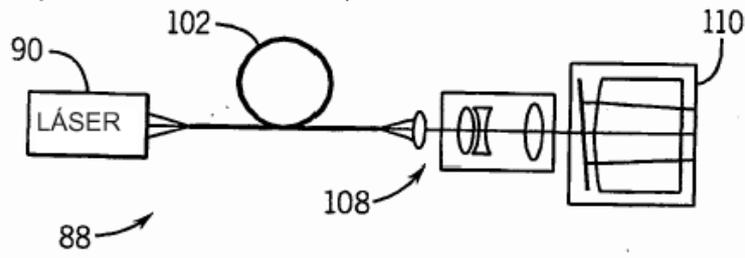


FIG. 12

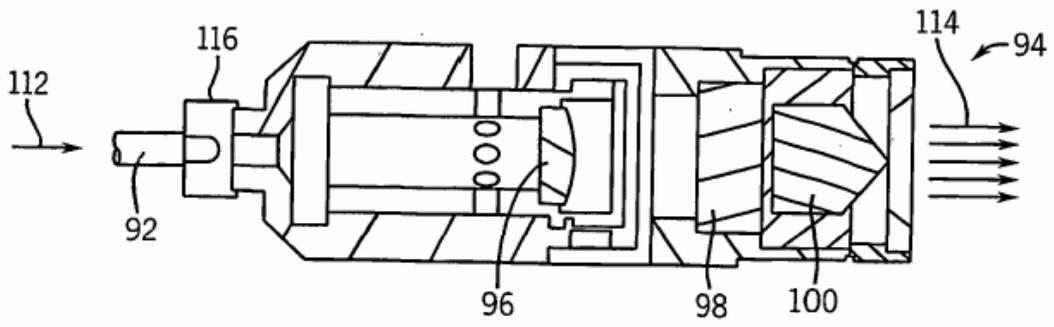
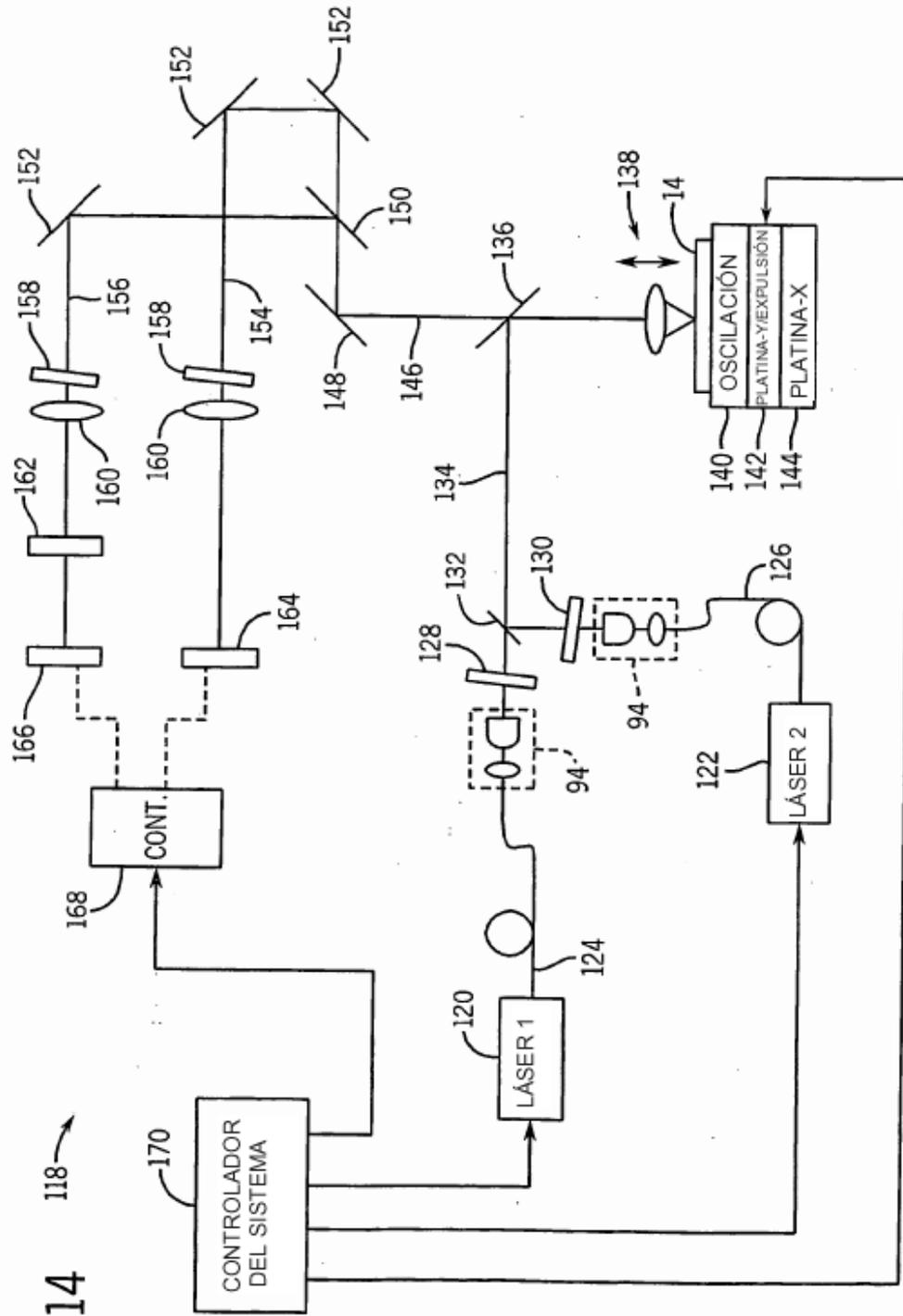
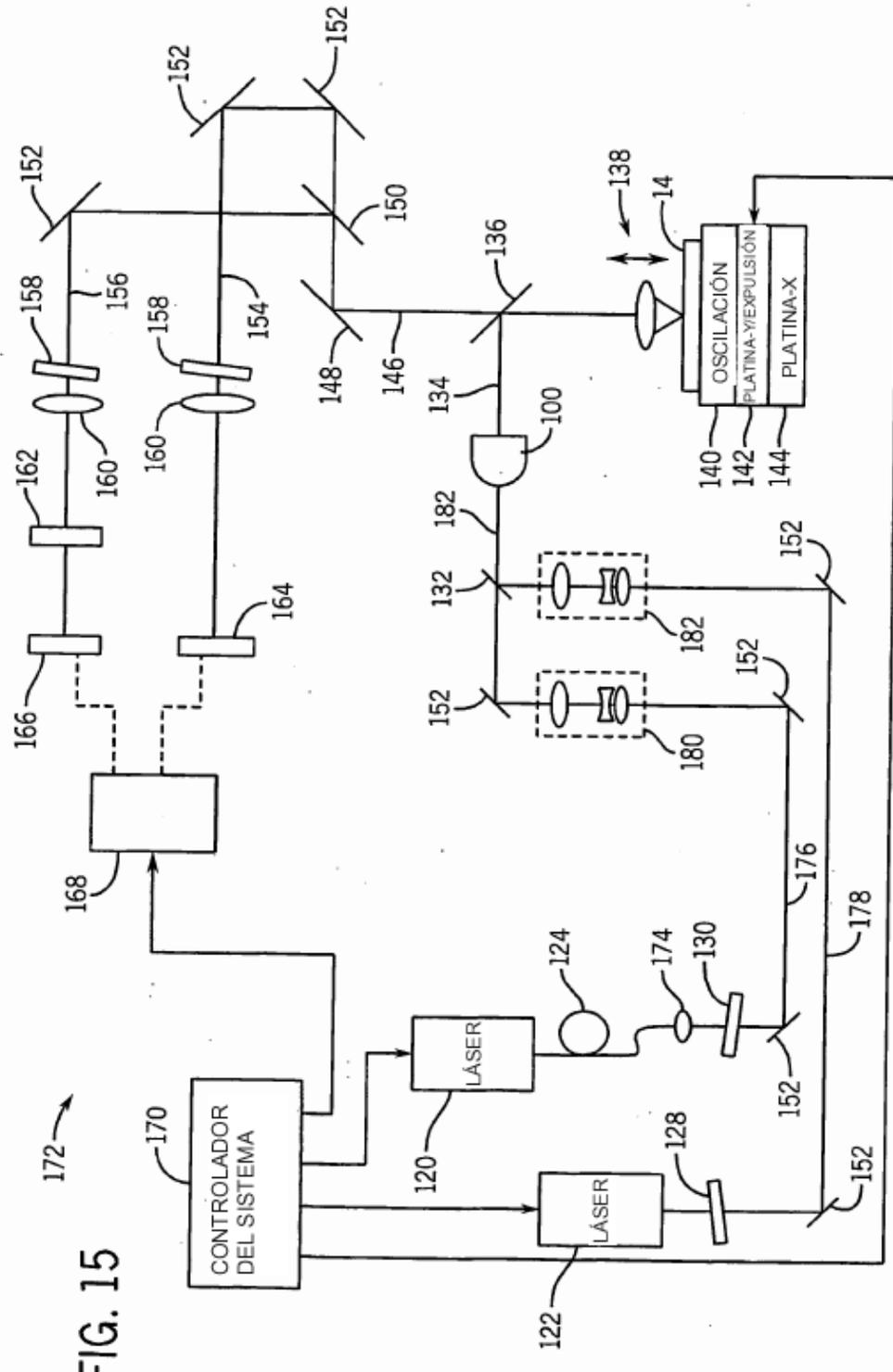


FIG. 13

FIG. 14





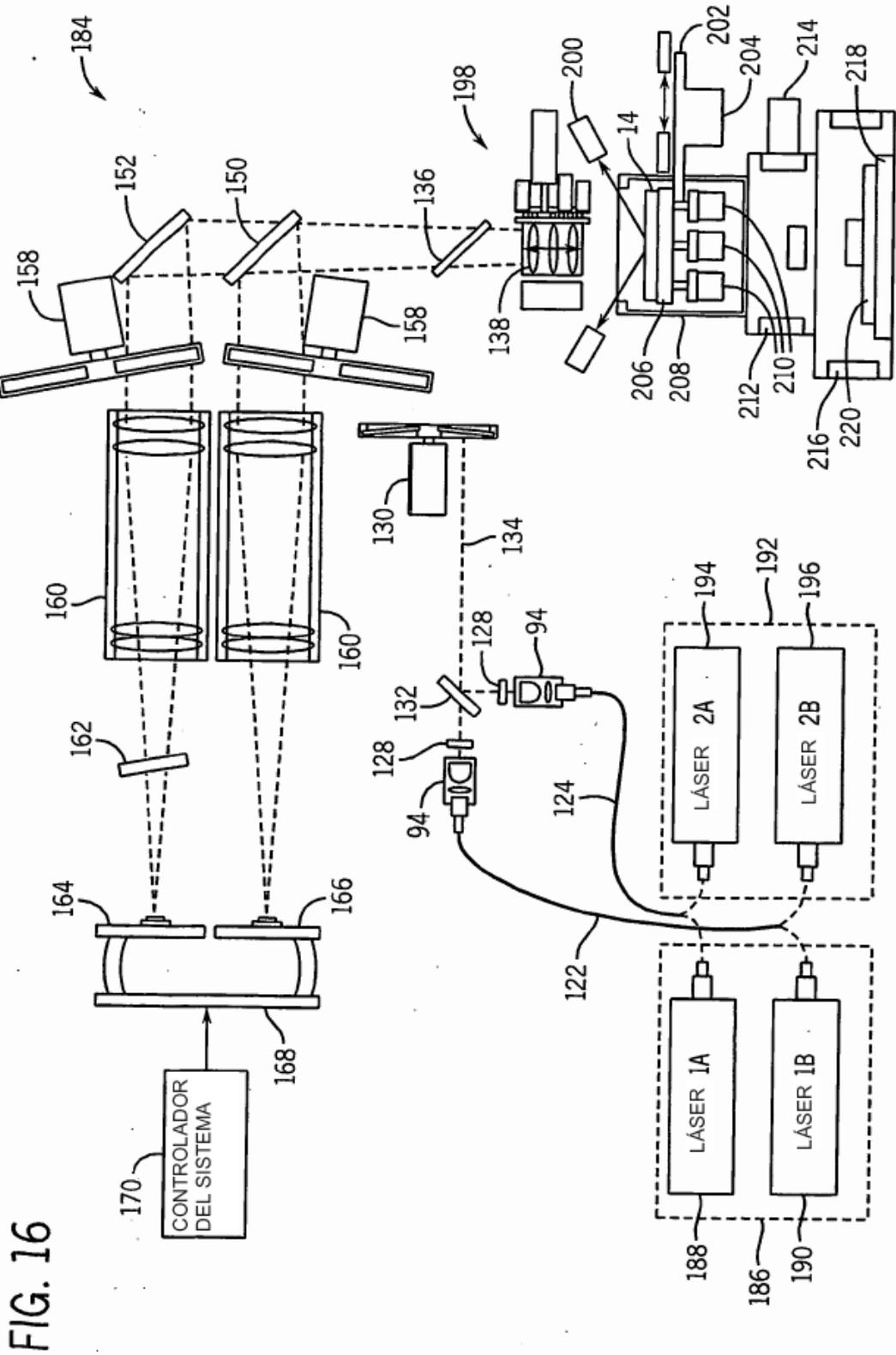


FIG. 16

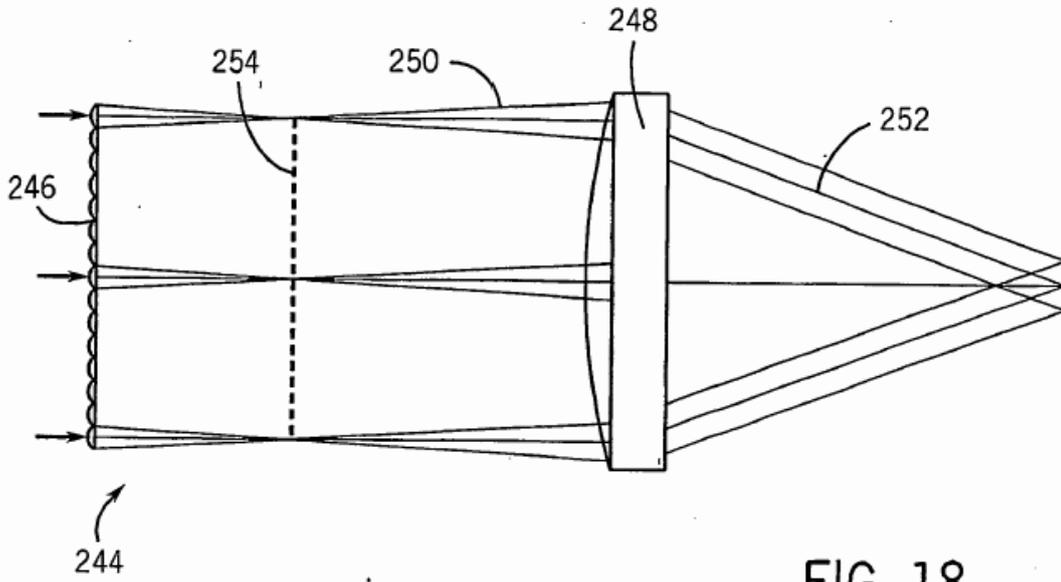


FIG. 18

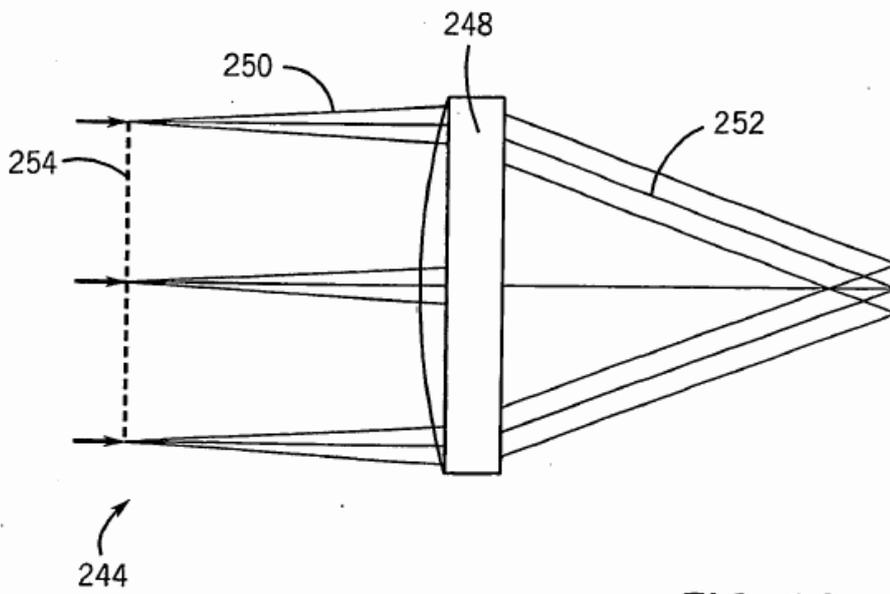
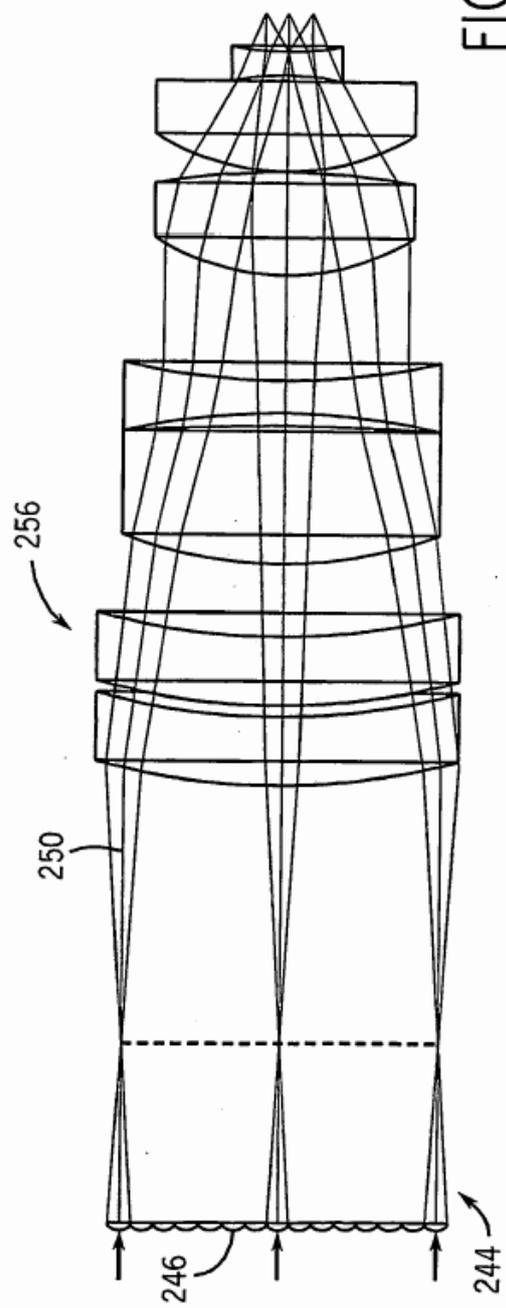
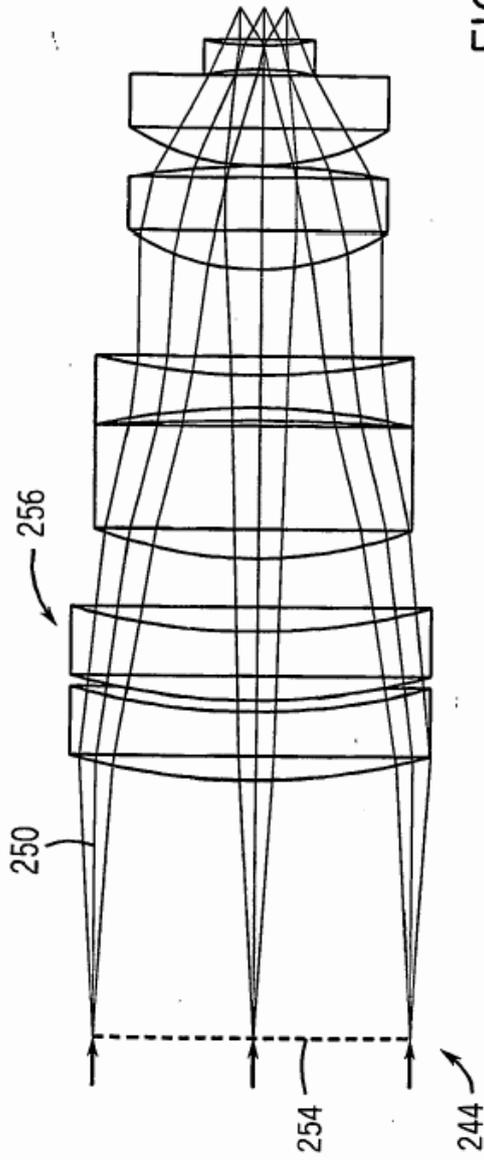


FIG. 19



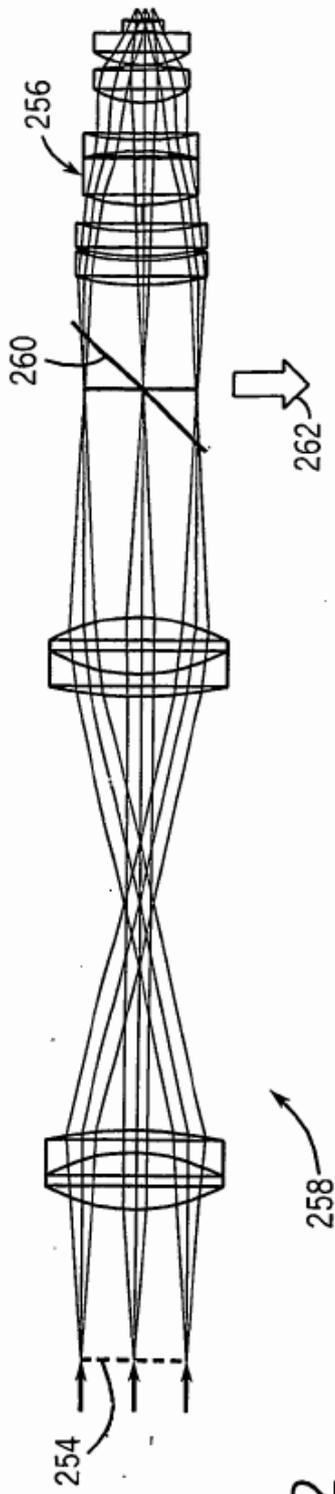


FIG. 22

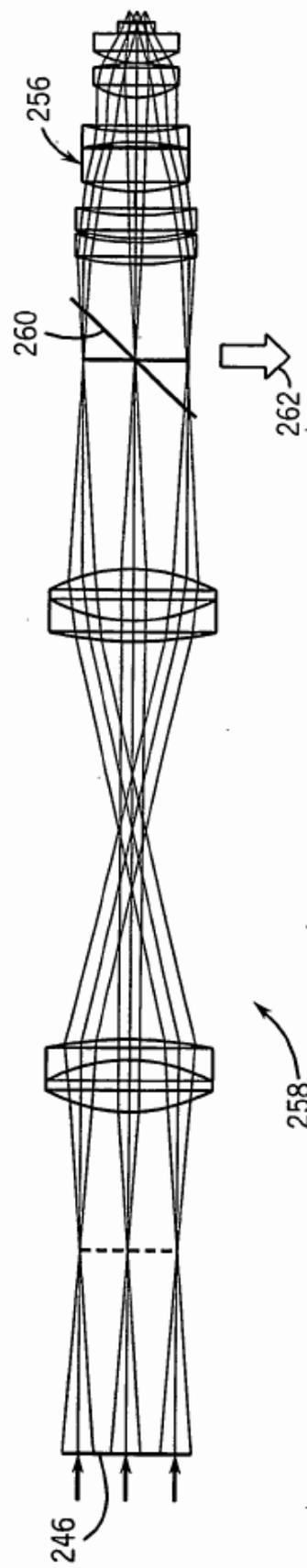


FIG. 23

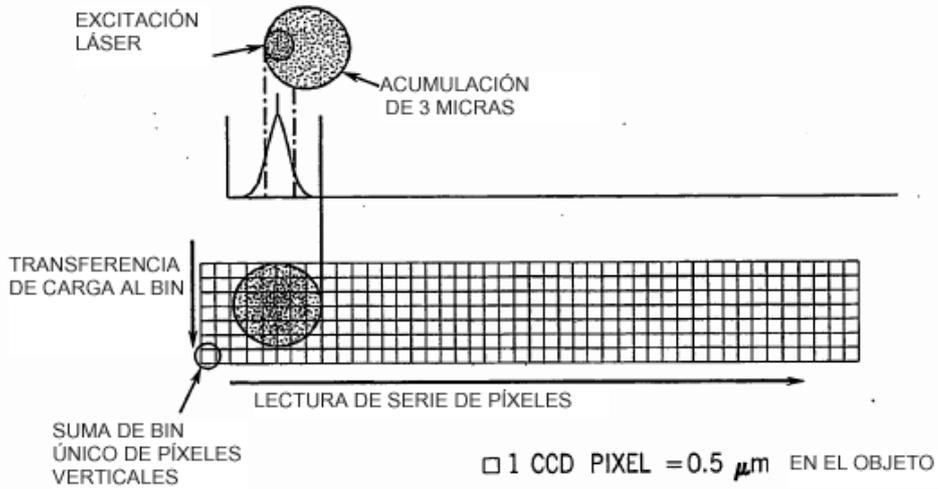


FIG. 24a

FIG. 24b

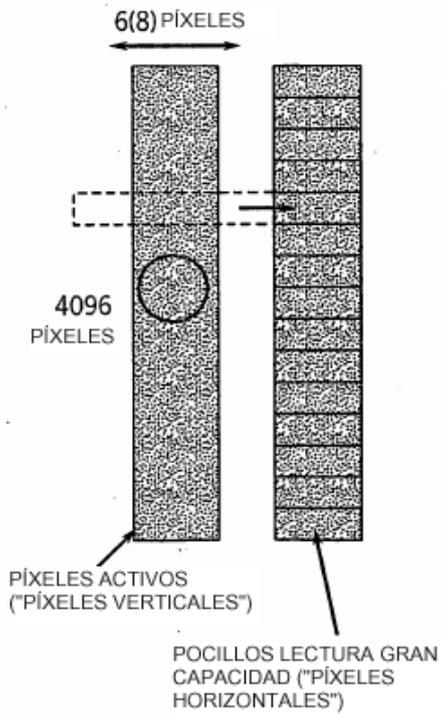
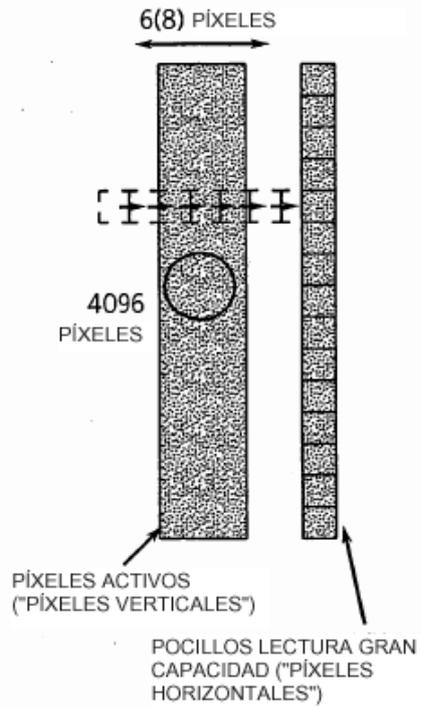


FIG. 24c



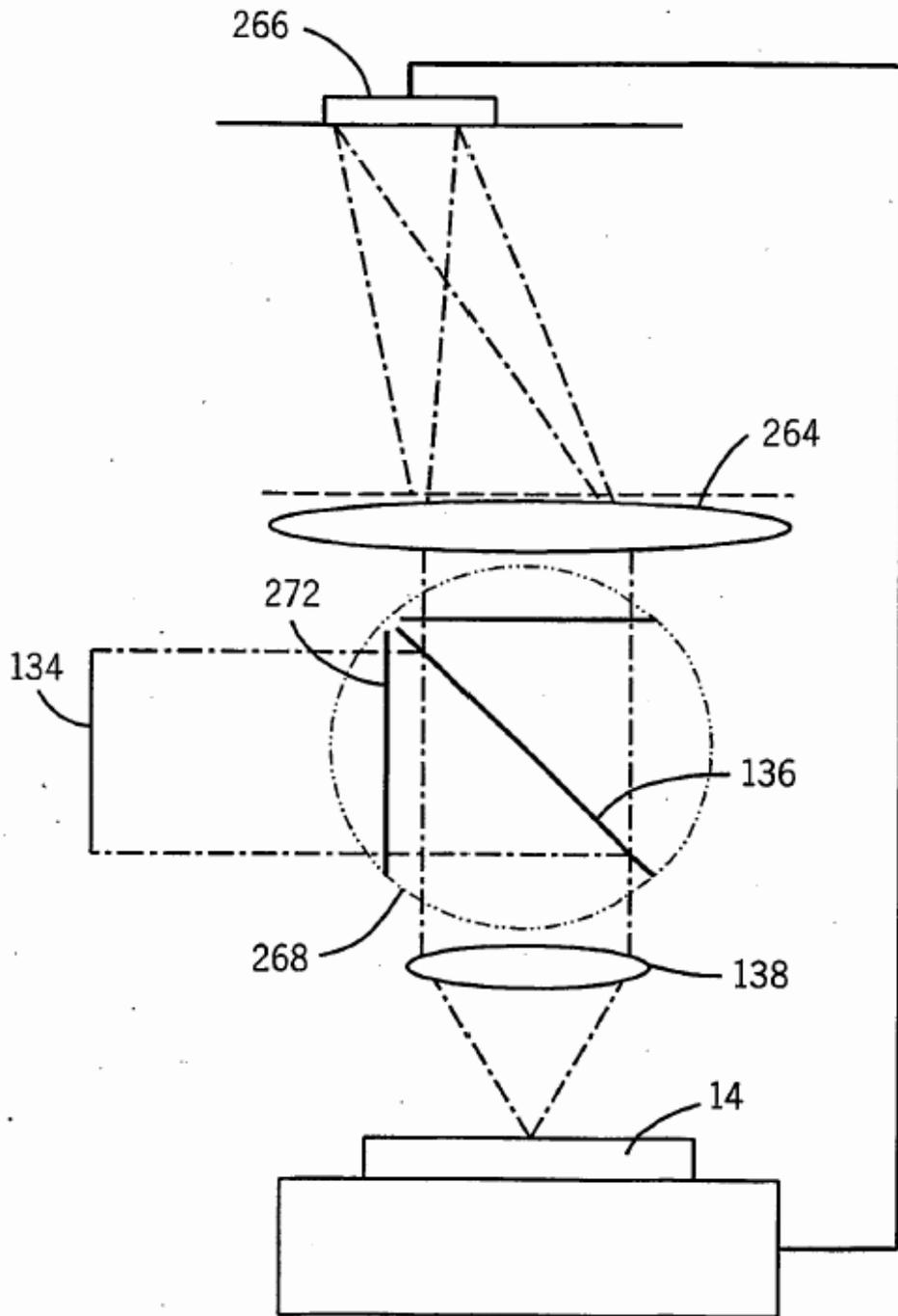


FIG. 25

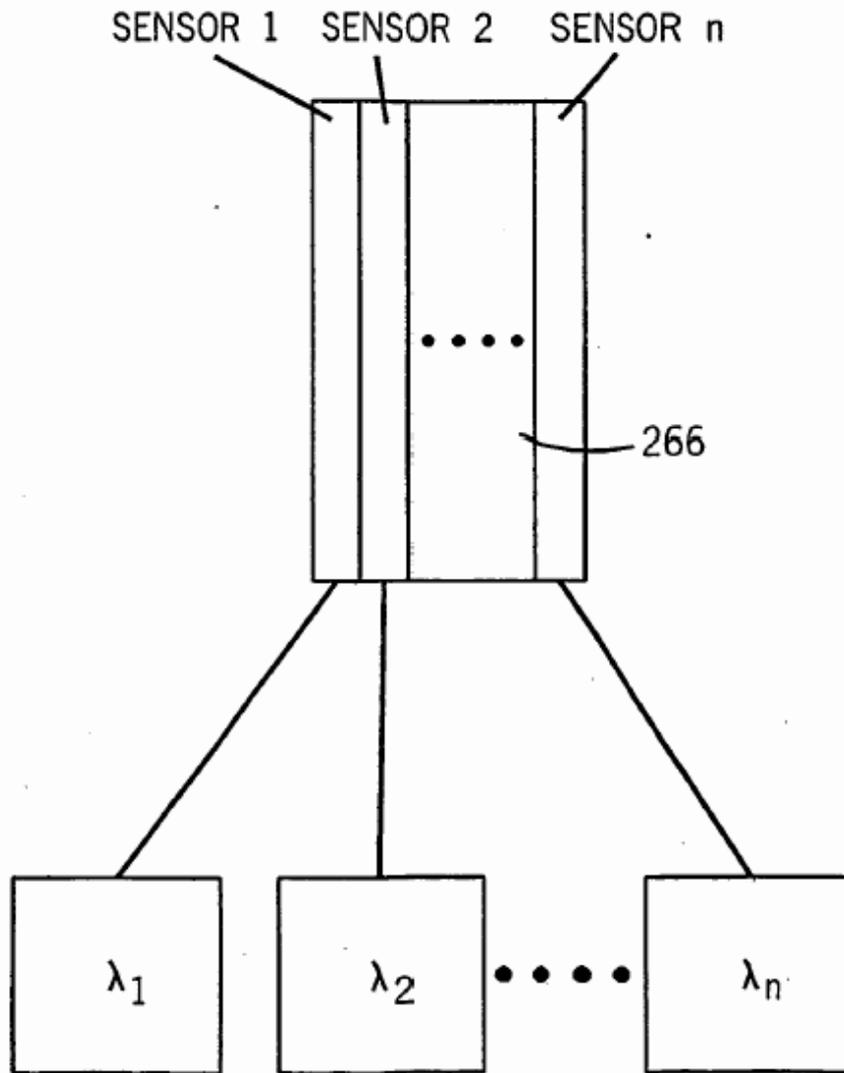


FIG. 26

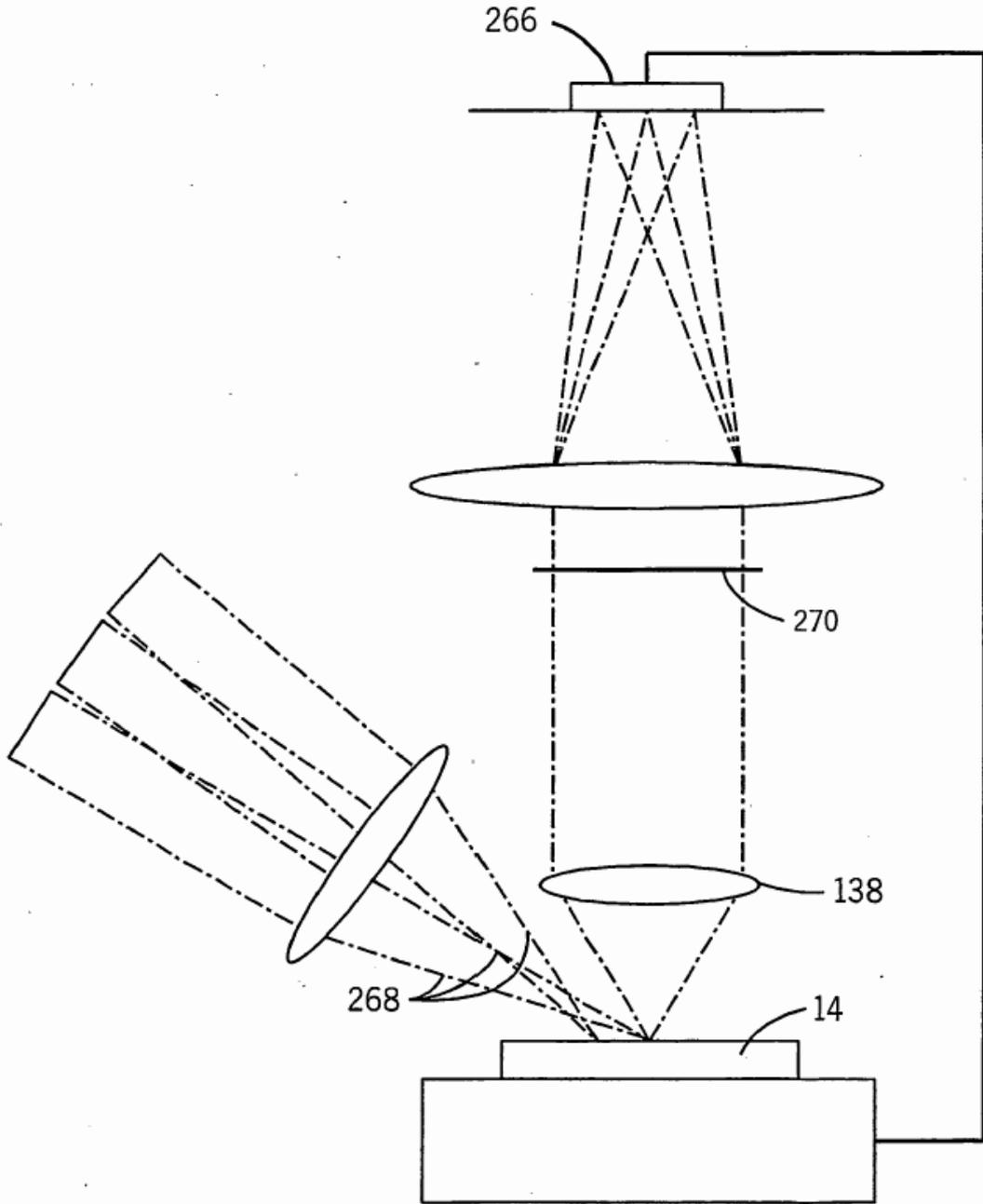


FIG. 27

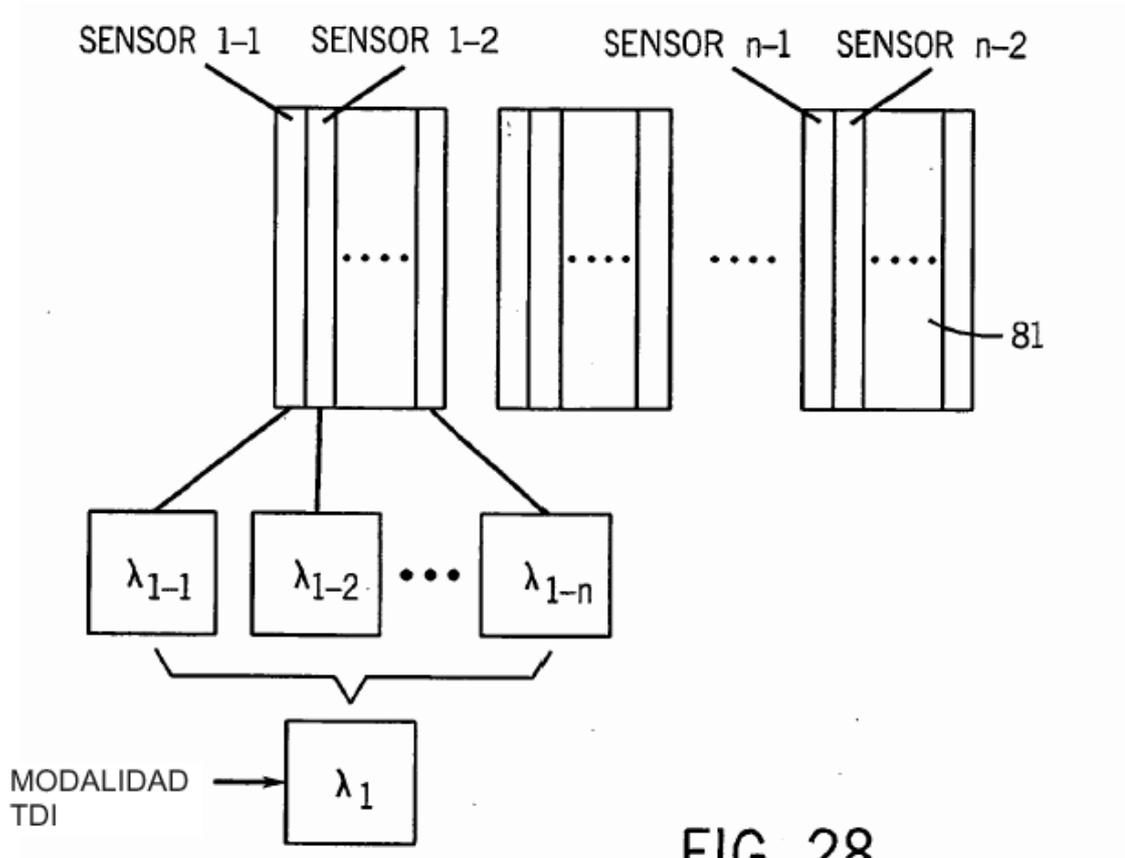


FIG. 28

FIG. 29

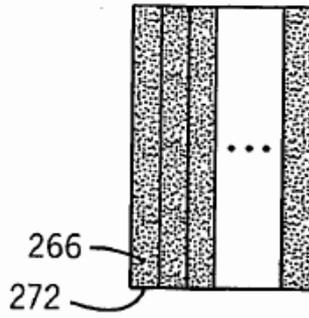
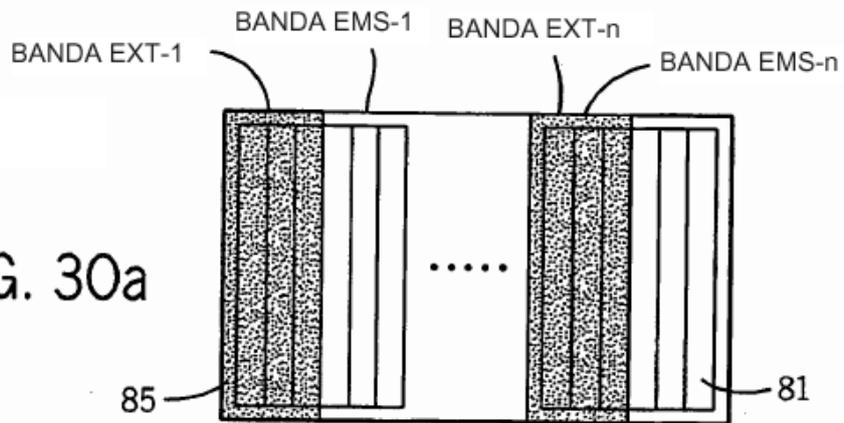
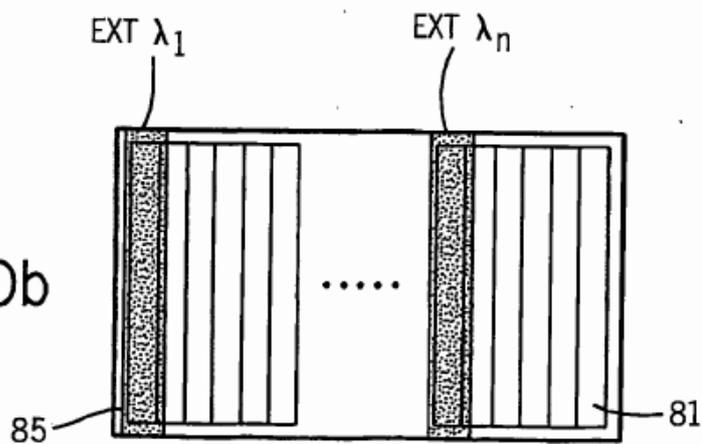


FIG. 30a



 BLOQUEADO
 TRANSPARENTE

FIG. 30b



 BLOQUEADO
 TRANSPARENTE