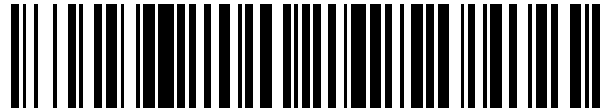


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 004**

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010 E 10196884 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2362209**

54 Título: **Aparato para detección y diferenciación del tipo de un objeto molecular**

30 Prioridad:

**11.03.2009 US 159310 P**  
**09.03.2010 US 720352**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.02.2016**

73 Titular/es:

**INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH  
INSTITUTE (100.0%)  
No. 195, Sec. 4, Chung Hsing Road  
Chutung, Hsinchu 31040, TW**

72 Inventor/es:

**CHEN, HUNG-CHUN;  
LI, MING-CHIA;  
CHU, CHANG-SHENG;  
LI, YU-TANG y  
CHIOU, CHUNG-FAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 559 004 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**

Aparato para detección y diferenciación del tipo de un objeto molecular

**Solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica las ventajas de prioridad con respecto a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 61/159.310, presentada el 11 de marzo de 2009.

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un aparato de detección para detectar y/o diferenciar un objeto. Además se refiere a un aparato de detección que es capaz de detectar y/o diferenciar un objeto que emite una luz de baja intensidad.

**Antecedentes**

10 El proyecto Genoma Humano (HGP) estimuló un gran aumento en el rendimiento de secuenciación y dio como resultado una disminución correspondiente en los costes de secuenciación. En contraste con los 13 años y el coste de casi tres billones de dólares americanos, por genoma los costes de secuenciación se han reducido de manera significativa - de hecho recientemente se han completado dos genomas individuales (McGuire *et al.*, *Science* 317: 1687 (2007)). Los genomas personales representan un cambio de paradigma en el tratamiento médico tanto para los  
15 pacientes como para los proveedores de cuidados de salud. Mediante la gestión de los factores de riesgo genéticos para la enfermedad, los proveedores de cuidados de salud pueden poner en práctica más fácilmente la medicina preventiva y proporcionar un tratamiento personalizado. Con grandes bancos de genomas completados, el diseño y la administración de los fármacos pueden ser más eficaces, impulsando el campo emergente de la farmacogenómica.

20 Muchas tecnologías convencionales de secuenciación de ADN ponen en práctica técnicas optoelectrónicas como un medio para detectar y/o diferenciar un objeto mediante la detección de la luz emitida desde el objeto. A menudo algunos aparatos de detección usados en estas tecnologías son caros y las eficacias no son elevadas.

Algunos métodos convencionales normalmente se basan en la medida dentro de una cierta banda de longitud de onda en la que la luz emitida desde el objeto(s) que se está detectando tiene la intensidad más elevada. A  
25 continuación, la intensidad medida se usa para calcular la concentración o cantidad de los objetos. Recientemente, la detección de la luz emitida desde un solo objeto se está haciendo popular. Por ejemplo, puede ser necesario detectar la luz fluorescente emitida desde una sola molécula de colorante con el fin de, por ejemplo, diferenciar la molécula. La intensidad de una luz fluorescente de este tipo puede ser muy baja, de modo que algunos aparatos y métodos de detección convencionales no son adecuados para detectar una luz tan débil. Además, la sensibilidad de algunos procedimientos analíticos tales como la citometría de flujo y dispositivo de laboratorio en un chip  
30 microfluídico de tipo citometría de flujo se puede limitar mediante la sensibilidad del detector de luz. El aumento de la sensibilidad que tales procedimientos podría permitirles detectar materiales presentes a niveles relativamente bajos que sin embargo pueden tener interés, por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico o de investigación.

Además, en muchos aparatos convencionales, a menudo se usan filtros de color, que permiten que una parte de la luz emitida dentro de una banda en una cierta longitud de onda pase a través y bloquee otra parte de la luz emitida.  
35 Por lo tanto, los aparatos son complicados y se necesita más espacio. Además, dado que parte de la luz emitida se bloquea con el filtro de color, se reduce el número de fotones que alcanzan el detector de luz. Esto hace que tales aparatos y métodos convencionales sean incluso menos adecuados para detección y/o determinación, por ejemplo, de un objeto con una emisión débil.

40 Por lo tanto, existe una necesidad de aparatos y un método para detectar y/o diferenciar un objeto, especialmente un objeto que emite luz de baja intensidad tal como una sola molécula de colorante.

El documento de patente US 2005/275839 (Figs. 1-2, 6) desvela un sistema y método para la detección, análisis y clasificación de micropartículas biológicas usando detección de luminiscencia a partir de materiales que se estimulan con fuentes de luz o que emiten a través de quimioluminiscencia en el que las firmas espectrales se almacenan y  
45 posteriormente se procesan en una etapa de análisis mediante la comparación de las firmas espectrales con un conjunto de firmas conocidas de luminiscencia espectral. En un ejemplo, la fluorescencia de la muestra objetivo se recoge en una región de observación y se dirige a un sistema detector. Se pueden usar diversas etiquetas de luminiscencia orgánicas e inorgánicas, cada una de las cuales con una propiedad única de excitación y emisión para proporcionar la identificación de una partícula biológica etiquetada. Algunos ejemplos de firmas espectrales para partículas que se han analizado se muestran en la Fig. 4. Como se muestra en la Fig. 1, la combinación de las señales de luminiscencia recogidas con la matriz del fotodetector de múltiples canales 108 forma las firmas espectrales. La recogida de los datos espectrales de la matriz del fotodetector de múltiples canales 108 permite la separación completa de las diferentes partículas coloreadas. Un análisis de la clasificación de estas partículas usando análisis de componentes principales ("PCA") se muestra en la Fig. 5. Un procesador 110 recibe las firmas  
50 espectrales del sistema de recogida de múltiples canales 104 a la comparación con firmas conocidas. Para emparejamiento de patrones se pueden usar algoritmos informáticos conocidos para emparejar la firma espectral.

Las entidades biológicas se clasifican en categorías usando análisis estadístico multivariado.

### Sumario de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un aparato para detectar un objeto capaz de emitir luz de acuerdo con la reivindicación 1 adjunta.

- 5 También de acuerdo con la invención, se proporciona un método para detectar un objeto capaz de emitir luz. El método comprende proporcionar un detector de luz que comprende al menos un primer sensor óptico y un segundo sensor óptico, en el que el detector de luz absorbe la luz emitida desde el al menos un objeto; procesar la señal de salida generada por los al menos dos sensores ópticos; y comparar al menos un resultado del procesamiento con al menos un resultado conocido que corresponde al menos un tipo conocido para determinar si él al menos un objeto pertenece a al menos un tipo conocido.
- 10

Algunos objetos y ventajas adicionales de la invención se describirán en parte en la descripción que sigue a continuación, y en parte serán evidentes a partir de la descripción, o se pueden aprender con la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención se realizarán y se conseguirán por medio de los elementos y combinaciones señalados en particular en las reivindicaciones adjuntas.

- 15 Se debe observar que tanto la descripción general mencionada anteriormente como la descripción detallada que sigue a continuación son solamente a modo de ejemplo y explicación y no son limitantes de la invención, tal como se reivindica.

Las figuras adjuntas, que se incorporan en la presente memoria descriptiva y que forman parte de la misma, ilustran una (varias) realización o realizaciones de la invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención

20

### Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un gráfico que muestra el coeficiente de absorción del silicio.

La FIG. 2 es una vista que muestra un aparato de detección de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 3 es una vista que muestra un detector de luz de acuerdo con la presente invención.

- 25 La FIG. 4 es una vista que muestra un detector de luz de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 5 es una vista que muestra una rejilla.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra los espectros de emisión de dos puntos cuánticos.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra las curvas de respuesta de dos fotodiodos de acuerdo con la presente invención.

- 30 La FIG. 8 es un gráfico que muestra los espectros de dos puntos cuánticos y las curvas de respuesta de dos fotodiodos en una figura.

La FIG. 9 es un diagrama de flujo que ilustra un método de detección de acuerdo con un ejemplo de la divulgación.

La FIG. 10 es un diagrama de flujo que ilustra un método de detección de acuerdo con otro ejemplo de la divulgación.

- 35 La FIG. 11 es un diagrama de flujo que ilustra un método de detección de acuerdo con aún otro ejemplo de la divulgación.

La FIG. 12 es un diagrama de flujo que ilustra un método de detección de acuerdo con un ejemplo adicional de la divulgación.

- 40 La FIG. 13 es un diagrama de flujo que ilustra un método de detección de acuerdo con todavía otra realización de la invención.

La FIG. 14 es un diagrama de flujo que ilustra un método de detección de acuerdo con todavía una realización adicional de la invención.

La FIG. 15 es un diagrama de flujo que ilustra un método de detección de acuerdo con todavía una realización adicional de la invención.

- 45 La FIG. 16 es una vista que muestra un ejemplo de aparatos de detección de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 17 es una vista que muestra un fotodiodo de múltiples uniones como un ejemplo del detector de luz de

acuerdo con la presente invención.

La FIG. 18 es un gráfico que muestra la curva de respuesta de un fotodiodo en el fotodiodo de múltiples uniones de la FIG. 11.

5 La FIG. 19 es un gráfico que muestra la curva de respuesta de otro fotodiodo en el fotodiodo de múltiples uniones de la FIG. 11.

La FIG. 20 es un gráfico que muestra los espectros de absorción de tres objetos sometidos a ensayo en un ejemplo de la presente invención.

La FIG. 21 es un gráfico que muestra los espectros de emisión de tres objetos sometidos a ensayo en un ejemplo de la presente invención.

## 10 Descripción detallada

Algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen un aparato de detección para detectar y/o distinguir un objeto. El aparato de detección es capaz de detectar luz débil emitida desde el objeto.

15 En lo sucesivo en el presente documento, se describirán realizaciones de acuerdo con la presente invención con detalle con referencia a las figuras. Siempre que sea posible, se usarán los mismos números de referencia a través de todas las figuras para hacer referencia a la misma parte o partes similares.

### 1. Aparato de la Invención

20 El aparato de detección de acuerdo con la presente invención se puede usar para detectar y/o diferenciar un objeto que es capaz de emitir luz. El objeto puede ser una fuente de luminiscencia, tal como una molécula de colorante fluorescente, una molécula de colorante fosforescente, un punto cuántico, o un producto luminiscente (por ejemplo, un producto de reacción en un estado excitado tal como oxígeno singlete o coelenteramida excitada) de un sistema bioluminiscente o quimioluminiscente. Un aparato de la invención puede comprender o no al menos una fuente de luz excitatoria, tal como al menos un láser. Para detectar objetos que son luminiscentes independientemente de la absorción de luz no se necesita una fuente de luz excitatoria ya que se pueden generar a través de bioluminiscencia o quimioluminiscencia, por ejemplo. El objeto también puede ser una molécula diana sin capacidad de emisión de luz, pero que se puede unir a un objeto etiquetado que es capaz de emitir luz (por ejemplo, una molécula de colorante fluorescente, una molécula de colorante fosforescente, o un punto cuántico). Un cierto objeto etiquetado puede ser capaz de ser unido a una molécula diana específica. Por lo tanto, la molécula diana se puede identificar a través del objeto etiquetado. Más de un objeto etiquetado se puede unir a una molécula diana. El aparato también se puede usar para controlar un gran número de objetos.

30 El aparato de detección de acuerdo con la presente invención comprende un detector de luz que detecta la luz emitida desde el objeto. El detector de luz es capaz de absorber al menos parcialmente la luz incidente en el mismo y generar señales de salida como respuesta a la luz. El detector de luz puede comprender un circuito de control para controlar el funcionamiento del detector de luz. El circuito de control puede comprender un circuito de amplificador de señales, convertidor de A/D, integrador, comparador, circuito lógico, circuito de lectura, memoria, microprocesador, reloj, y/o dirección.

35 El aparato de detección puede comprender un ordenador para procesar señales de salida desde el detector de luz y generar un resultado de determinación. El aparato de detección puede comprender adicionalmente una lámina ciega con un agujero de cabeza de alfiler. El aparato de detección también puede comprender un sitio conector al que se puede unir el objeto. El sitio conector se puede formar en el agujero de cabeza de alfiler o se puede formar fuera pero cerca del agujero de cabeza de alfiler. El aparato puede comprender adicionalmente una fuente de luz de excitación. El objeto puede absorber la luz emitida desde la fuente de luz de excitación y a continuación emitir otra luz a detectar por el aparato de detección. La luz emitida desde el objeto puede tener diferente longitud de onda a la de la luz emitida desde la fuente de luz de excitación.

#### 1.1 Sensor Óptico

45 El detector de luz de acuerdo con la presente invención comprende una pluralidad de sensores ópticos. Un sensor óptico de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, un fotodiodo, un fotodiodo de avalancha (APD), un fototransistor, un sensor fotoeléctrico, un fotodetector de infrarrojos de pozo cuántico (QWIP), una película fina sobre ASIC (TFA), un fotodetector de metal-semiconductor-metal (MSM), o una combinación de los mismos. En una realización de la presente invención, el sensor óptico puede ser un fotodiodo.

50 Un fotodiodo es un dispositivo en estado sólido que convierte la luz en corriente eléctrica o voltaje. Un fotodiodo normalmente se realiza con materiales semiconductores, tales como silicio. La estructura básica de un fotodiodo comprende una unión p-n formada por la unión de un semiconductor de tipo p y un semiconductor de tipo n. un fotodiodo puede tener solamente una unión p-n y proporcionar solamente una señal de salida, y por lo tanto se considera como un sensor óptico; un fotodiodo de múltiples uniones tiene más de una unión p-n y puede

proporcionar más de una señal de salida, en el que cada unión p-n se puede considerar como un sensor óptico.

Como alternativa, un fotodiodo puede ser un fotodiodo p-i-n. El fotodiodo p-i-n es un tipo especial de fotodiodo de unión p-n con una capa intrínseca, o una capa de tipo n ligeramente dopada, o una capa de tipo p ligeramente dopada, que forma sándwich entre la capa de tipo n y la capa de tipo p. En un fotodiodo p-i-n, el espesor de la región de agotamiento, que es casi toda la capa intrínseca, se puede preparar a medida para optimizar la eficacia cuántica y la respuesta de la frecuencia. (S. M. Sze, Physics of Semiconductor Devices, pp. 674-675, Wiley, 2007).

El semiconductor de tipo p y el semiconductor de tipo n se pueden formar dopando impurezas de tipo p e impurezas de tipo n en un sustrato semiconductor, respectivamente. Por ejemplo, el silicio, fósforo o arsénico pueden actuar como impurezas de tipo n, y el boro e indio pueden actuar como impurezas de tipo p. Generalmente, se pueden usar los métodos para introducir impurezas en un sustrato semiconductor: difusión e implantación de iones. Mediante la difusión o la implantación de impurezas de tipo p en un sustrato semiconductor de tipo n, la parte del sustrato semiconductor de tipo n se puede convertir en el semiconductor de tipo p. Por consiguiente, se puede formar una unión p-n. Como alternativa, mediante la difusión o la implantación de impurezas de tipo n en un sustrato semiconductor de tipo p, la parte del sustrato semiconductor de tipo p se puede convertir en el semiconductor de tipo n, y por lo tanto se puede formar una unión p-n. También se pueden usar otros métodos distintos de la difusión y la implantación de iones, el crecimiento epitaxial, para fabricar semiconductor de tipo n o semiconductor de tipo p, que es un proceso en el que crece una capa fina de un solo cristal en la superficie de un sustrato de un solo cristal. (D. A. Neamen, Semiconductor Physics & Devices, pp. 17-18, McGrawHill, 1997). Cuando una luz incide en un fotodiodo, se pueden generar pares de electrón-hueco en el fotodiodo. Si se genera un par de electrón-hueco en la región de agotamiento del fotodiodo, el potencial integrado en la región de agotamiento puede separar el electrón y el hueco y de este modo generar ya sea fotocorriente o voltaje.

Diferentes fotodiodos pueden tener diferentes capacidades para absorber una luz incidente. La capacidad se puede describir mediante el coeficiente de absorción  $\alpha$  del material que constituye el fotodiodo. La FIG. 1 muestra el coeficiente de absorción del silicio a diferentes longitudes de onda. El flujo de fotones  $\Phi$  de la luz incidente disminuye de forma exponencial con la profundidad a la que la luz penetra en el fotodiodo. El flujo de fotones a una profundidad  $\lambda$  dentro del fotodiodo se puede expresar como:

$$\Phi(\lambda, x) = \Phi_0(\lambda) \cdot e^{-\alpha x}$$

en la que  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz incidente y  $\Phi_0$  es el flujo de fotones en la superficie del fotodiodo. Por lo tanto, el flujo de fotones absorbido en la región de agotamiento se puede proporcionar mediante:

$$\Delta\Phi(\lambda) = \Phi_0(\lambda) \cdot (e^{-\alpha x_u} - e^{-\alpha x_l})$$

en la que  $x_u$  y  $x_l$  son las profundidades de los límites superior e inferior de la región de agotamiento, respectivamente.

El flujo de dos fotones absorbido en la región de agotamiento se puede convertir en una fotocorriente como una señal de salida del fotodiodo. La fotocorriente se puede representar mediante:

$$I_{PD}(\lambda) = 1,98 \times 10^{-16} \cdot A \cdot [\Phi_0(\lambda) \cdot R(\lambda)/\lambda]$$

en la que A es el área de la ventana óptica, y  $R(\lambda)$  es la respuesta de un fotodiodo, que se define como la cantidad de fotocorriente producida por una potencia unitaria de luz incidente.

## 1.2 Ordenador para procesamiento de señales

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un ordenador que es capaz de procesar señales de salida generadas por el detector de luz mediante la realización de una operación matemática o lógica en las señales de salida, y para determinar la presencia y tipo de un objeto. El ordenador usado para el procesamiento de señales de salida desde un sensor óptico puede ser, por ejemplo, un ordenador personal, un sistema electrónico de consumo basado en microprocesador o programable, un circuito lógico, o similares.

El ordenador puede comprender uno o más dispositivos de almacenamiento que almacenan de forma temporal o permanente datos y programa informático que contiene códigos de software que representan un algoritmo. El ordenador puede realizar procesamiento basado en el algoritmo. El dispositivo de almacenamiento puede ser una memoria solo de lectura (ROM), una memoria de acceso aleatorio (RAM), o una memoria con otras opciones de acceso. El dispositivo de almacenamiento se puede poner en práctica de forma física con medios de lectura en ordenador, tales como, por ejemplo: (a) medios magnéticos, tales como un disco duro, un disco flexible, u otro disco magnético, una cinta, una cinta de casete; (b) medios ópticos, tales como disco óptico (CD-ROM, disco versátil digital - DVD); (c) medios semiconductores, tales como DRAM, SRAM, EPROM, EEPROM, tarjeta de memoria, o mediante cualquier otro medio, tal como papel.

El ordenador puede comprender una o más interfases para recibir señales de salida desde el detector de luz. El ordenador puede comprender uno o más procesadores para el procesamiento de estas señales.

Además, el ordenador debe comprender uno o más dispositivos de entrada para recibir órdenes de un usuario, y puede comprender uno o más dispositivos de salida para la producción de los resultados del procesamiento. El dispositivo de entrada puede ser, por ejemplo, un ratón, un teclado, o un panel de control que tenga una pluralidad de botones. El dispositivo de salida puede ser, por ejemplo, una pantalla o una impresora.

### 5 1.3 Aparatos de detección a modo de ejemplo

Haciendo referencia a la FIG. 2, se ilustra un aparato de detección 1 de acuerdo con la presente invención. El aparato de detección 1 comprende un detector de luz 11 y un ordenador 12.

El detector de luz 11 comprende un primer sensor óptico 111 y un segundo sensor óptico 112. En algunas realizaciones, el detector de luz 11 puede comprender más de dos sensores ópticos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el detector de luz 11 puede comprender tres sensores ópticos o cuatro sensores ópticos. El primer sensor óptico 111 y el segundo sensor óptico 112 están apilados. En la configuración apilada, la luz emitida desde un objeto pasa a través del primer sensor óptico 111, y a continuación pasa a través del segundo sensor óptico 112. En algunas realizaciones, los sensores ópticos se pueden apilar de forma vertical o básicamente vertical. En otras realizaciones, los sensores ópticos se pueden aplicar de forma oblicua en una dirección con un cierto ángulo (tal como 10°, 30°, 45°, 60°, etc.) con respecto a la dirección vertical. En algunas realizaciones, el detector de luz 11 puede ser un fotodiodo de múltiples uniones que comprende una pluralidad de uniones p-n formadas en el mismo. En un fotodiodo de múltiples uniones, cada unión p-n puede formar la estructura básica de un sensor óptico individual. Cada uno del primer sensor óptico 111 y el segundo sensor óptico 112 puede comprender, por ejemplo, una unión p-n en el fotodiodo de múltiples uniones, respectivamente, tal como se muestra en la FIG. 3.

En algunas realizaciones, se pueden preparar diferentes sensores ópticos en el detector de luz 11 con el mismo material semiconductor, tal como silicio, germanio, GaAs, AlGaAs, InGaAs, InGaAsN, InGaP, CdTe, o CdS. En algunas realizaciones, se pueden preparar diferentes sensores ópticos en el detector de luz 11 con diferentes materiales semiconductores. Por ejemplo, la FIG. 4 muestra un detector de luz formado por dos sensores ópticos PD-1 y PD-2 apilados de forma vertical. El sensor óptico PD-1 se prepara con el material 1 y el material 2 mientras que PD-2 se prepara con el material 2 y el material 3. El material 1, material 2, y material 3 pueden ser una combinación de los materiales semiconductores mencionados anteriormente. Además, el espesor de estos sensores ópticos también puede ser diferente.

Como se muestra en la FIG. 2, la luz emitida desde un objeto, por ejemplo, un punto cuántico (QD) incidente en el detector de luz 11 puede ser absorbida parcialmente por el primer sensor óptico 111, generando una primera señal J1. La luz no absorbida pasa a través del primer sensor óptico 111 y a continuación la puede absorber parcialmente el segundo sensor óptico 112, generando una segunda señal J2. Estas señales se pueden enviar al ordenador 12 para su procesamiento.

En algunas realizaciones, la luz emitida desde un objeto puede incidir en el detector de luz 11 sin pasar a través de otro elemento óptico, tal como un filtro óptico, un prisma, o una lente (es decir, puede incidir directamente en el detector de luz). En algunas realizaciones, el aparato puede comprender adicionalmente una estructura óptica de captación de luz para captar la luz emitida desde el objeto.

En algunos ejemplos, el detector de luz 11 puede comprender dos o más sensores ópticos colocados de forma horizontal (no se muestra). En estos ejemplos, el aparato de detección 1 puede comprender adicionalmente una estructura óptica colocada entre el objeto y el detector de luz 11. La luz emitida desde el objeto se puede dirigir con la estructura óptica a uno o más de los sensores ópticos y la puede absorber parcialmente uno o más de los sensores ópticos. La dirección de la luz después de pasar a través de la estructura óptica puede ser diferente para la luz con diferente longitud de onda. Por lo tanto, diferentes sensores ópticos en el detector de luz con colocación horizontal pueden detectar con diferentes longitudes de onda.

En algunas realizaciones, la estructura óptica puede comprender un prisma. En algunas realizaciones, la estructura óptica puede comprender una lente. En algunas realizaciones, la estructura óptica puede comprender un prisma y una lente. El prisma puede ser, por ejemplo, un prisma triangular, un prisma de Abbe, un prisma de Pellin-Broca, un prisma de Amici, o una combinación de los mismos. La lente puede ser, por ejemplo, una lente convergente, una lente divergente, o una combinación de las mismas. La estructura óptica se puede preparar, por ejemplo, a partir de vidrio, plástico, u otros materiales que sean transparentes para las longitudes de onda de interés. La transparencia de la estructura óptica puede ser lo suficientemente elevada como para permitir que la mayor parte de la luz pase a través de la estructura óptica.

Como alternativa, en algunas realizaciones, la estructura óptica puede comprender una rejilla. La rejilla puede ser, por ejemplo, una rejilla binaria, una rejilla de escalera, una rejilla sinusoidal, una rejilla de múltiples niveles, una rejilla de volumen, o una combinación de las mismas. La FIG. 5 muestra, como un ejemplo, un aparato de detección de acuerdo con la presente divulgación. En este aparato de detección, el detector de luz comprende una pluralidad de sensores ópticos colocados de forma horizontal en diferentes posiciones. Se puede usar una rejilla para dirigir la luz de diferentes longitudes de onda desde un objeto a diferentes posiciones del detector de luz con el fin de su absorción mediante los diferentes sensores ópticos.

De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar un sistema de detección que comprende la matriz de los aparatos de detección de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con la presente invención, también se puede proporcionar un sistema de detección que comprende la matriz de los detectores de luz de acuerdo con la presente invención y un ordenador para el procesamiento de las señales de salida desde la matriz de los detectores de luz y para realizar la detección y/o diferenciación basándose en el resultado del procesamiento. Tales sistemas de detección pueden detectar y/o diferenciar una pluralidad de objetos de una vez, y por lo tanto pueden ser adecuados para secuenciación de ácidos nucleicos a gran escala en paralelo, por ejemplo.

El ordenador 12 puede comprender una unidad de procesamiento 121 y una unidad de salida 122. La unidad de procesamiento 121 procesa las señales de salida desde el detector de luz 11 y determina la presencia y tipo de un objeto. La unidad de salida 122 produce el resultado de determinación. En algunas realizaciones, el ordenador 12 también puede comprender un dispositivo de almacenamiento (no se muestra), que además en un programa informático. El programa informático puede contener códigos de software para dar órdenes al ordenador para que procese las señales.

El detector de luz 11 y el ordenador 12 se pueden integrar en una sola pieza de chip semiconductor. El detector de luz 11 y el ordenador 12 se pueden formar en chips semiconductores separados.

## 2. Métodos de Detección

La luz emitida desde diferentes objetos pueden tener diferentes espectros. Por ejemplo, la FIG. 6 muestra los espectros de emisión de dos puntos cuánticos ("QD") (QD-1 y QD-2) como los objetos. En este ejemplo, los picos de estos dos espectros de emisión están a diferentes longitudes de onda. En otros ejemplos, los espectros de emisión de diferentes objetos también pueden tener diferentes formas.

El primer sensor óptico 111 y el segundo sensor óptico 112 pueden tener diferentes propiedades de respuesta. La FIG. 7 muestra, como un ejemplo, las curvas de respuesta del primer sensor óptico 111 y el segundo sensor óptico 112. Las respuestas del primer sensor óptico 111 y el segundo sensor óptico 112 pueden diferir entre sí en que tienen diferentes formas y/o pueden tener picos en diferentes longitudes de onda.

Para una ilustración más clara, la FIG. 8 muestra las curvas de respuesta de dos sensores ópticos y los espectros de emisión de dos QD en una figura. En este ejemplo, la luz emitida desde QD-1 puede generar señales de fuerza similar en los dos sensores ópticos. Por otro lado, la luz emitida desde QD-2 puede generar una señal en el segundo sensor óptico 112 más fuerte que en el primer sensor óptico 111.

En algunas realizaciones, como se muestra en la FIG. 2, la luz emitida desde un objeto puede incidir en el detector de luz 11 y absorberse parcialmente por el primer sensor óptico 111 y el segundo sensor óptico 112, que a su vez generan las señales J1 y J2, respectivamente. El ordenador 12 procesa las señales J1 y J2, y diferencia el objeto.

La FIG. 9 muestra un diagrama de flujo de un método para diferenciar un objeto de acuerdo con un ejemplo de la presente divulgación. En la etapa 201, una luz emitida desde un objeto es incidente en el detector de luz 11. En la etapa 202, se generando señales de salida J1 y J2 por el primer sensor óptico y el segundo sensor óptico, respectivamente, y las señales J1 y J2 se envían al ordenador 12. En la etapa 203, el ordenador 12 procesa las señales J1 y J2. En la etapa 204, el ordenador 12 compara el resultado del procesamiento con un resultado conocido que corresponde a un tipo de objeto conocido. En la etapa 205, el ordenador 12 determina si el objeto pertenece al tipo conocido.

El procesamiento de las señales J1 y J2 comprende el cálculo de una proporción de J1 y J2. Si la proporción calculada está dentro de un cierto intervalo que corresponde al tipo de objeto conocido, se puede determinar que el objeto que se está detectando pertenece al tipo conocido. Por ejemplo, un tipo conocido de punto cuántico, QD-1, puede tener un intervalo correspondiente de  $0,7 < J2/J1 < 1, 2$ . Si la proporción calculada para un objeto que se está detectando es 0,9, se puede determinar que el objeto es un objeto de tipo QD-1.

La FIG. 10 muestra un diagrama de flujo de un método para diferenciar un objeto de acuerdo con otro ejemplo de la presente divulgación. En este ejemplo, se puede determinar que un objeto pertenece a uno de, por ejemplo, tres tipos de objetos conocidos, es decir, Tipo 1, Tipo 2, y Tipo 3. Las dos primeras etapas de este ejemplo pueden ser las mismas que las que aparecen en la realización indicada anteriormente. En la etapa 303, el ordenador 12 determina la relación entre estas dos señales J1 y J2. En la etapa 304, el ordenador 12 compara la relación con resultados conocidos que corresponden a tipos de objetos conocidos. En la etapa 305, el ordenador 12 determina el tipo al que pertenece el objeto basándose en el resultado de la comparación.

En este ejemplo, si  $J1 > J2$ , entonces se puede determinar que el objeto es un objeto de Tipo 1. Si  $J1 \approx J2$ , entonces se puede determinar que el objeto es un objeto de Tipo 2. Si  $J1 < J2$ , entonces se puede determinar que el objeto es un objeto de Tipo 3.

La FIG. 11 muestra un diagrama de flujo de un método para diferenciar un objeto de acuerdo con todavía otro ejemplo de la presente divulgación. En este ejemplo, se puede determinar que un objeto pertenece a uno de una pluralidad de tipos de objetos conocidos, es decir, del Tipo 1 al Tipo n. Las dos primeras etapas de este ejemplo

pueden ser las mismas que las que aparecen en la realización indicada anteriormente. En la etapa 403, el ordenador calcula la proporción de  $J_1$  y  $J_2$ . En la etapa 404, el ordenador 12 compara la proporción calculada con proporciones conocidas que corresponden a tipos de objetos conocidos. En la etapa 405, el ordenador 12 determina el tipo al que pertenece el objeto basándose en el resultado de la comparación.

- 5 En este ejemplo, si, entre todas las proporciones conocidas de los tipos conocidos, la proporción conocida del Tipo  $i$  ( $1 < i \leq n$ ) es la más cercana a la proporción calculada, entonces se puede determinar que el objeto es un objeto de Tipo  $i$ .

La FIG. 12 muestra un diagrama de flujo de un método para diferenciar un objeto de acuerdo con un ejemplo adicional de la presente divulgación. En este ejemplo, se puede determinar que un objeto pertenece a uno de una pluralidad de tipos de objetos conocidos, es decir, del Tipo 1 al Tipo  $n$ . Las primeras tres etapas de este ejemplo pueden ser las mismas que las que aparecen en la realización indicada anteriormente. En la etapa 504, el ordenador 12 compara la proporción calculada con intervalos de proporción conocidos que corresponden a tipos de objetos conocidos. En la etapa 505, el ordenador 12 determina el tipo al que pertenece el objeto basándose en el resultado de la comparación.

- 15 En este ejemplo, por ejemplo, si la proporción calculada entra en el intervalo de proporción que corresponde al Tipo  $i$  ( $1 < i \leq n$ ), entonces se puede determinar que el objeto es un objeto de Tipo  $i$ . Si la proporción calculada no entra dentro de ninguno de los intervalos, se puede indicar que el nivel de confianza es bajo y que no se puede determinar el tipo del objeto que se está detectando. Por ejemplo, suponiendo que el objeto de Tipo 1 tiene un intervalo de proporción correspondiente de  $0,7 < J_2/J_1 < 1,2$  y el objeto de Tipo 2 obtiene un intervalo de proporción correspondiente de  $J_2/J_1 > 2$ , si la proporción calculada para un objeto que se está detectando es 1, entonces se puede determinar que el objeto es un objeto de Tipo 1. Por otro lado, si la proporción calculada para un objeto que se está detectando es 1,5, entonces se puede informar que el nivel de confianza es bajo y que no se puede determinar el tipo del objeto.

- 25 En un ejemplo, la proporción de  $J_1$  y  $J_2$  puede ser  $J_2/J_1$ . En una realización, la proporción de  $J_1$  y  $J_2$  puede ser  $J_1/J_2$ . En algunos ejemplos, la proporción de  $J_1$  y  $J_2$  puede ser  $J_2/(c \times J_1)$  o  $J_1/(c \times J_2)$ , en las que "c" un coeficiente.

Después de enviar las señales al ordenador 12, el ordenador 12 realiza una etapa de determinación de si un objeto está presente en una muestra. La determinación se realizó mediante comparación de la suma de todas o algunas de las señales con un valor de umbral. Si la suma es igual o mayor que el umbral, se puede determinar que un objeto está presente. Por otro lado, si la suma es menor que el umbral, se puede determinar que un objeto está ausente. En otras realizaciones, si la suma es menor que el valor del umbral, se puede determinar que un objeto está presente.

En algunas realizaciones, el detector de luz 11 puede comprender tres o más sensores ópticos, cada uno de los cuales genera una señal de salida sobre la luz emitida desde un objeto incidente en el detector de luz 11. En algunas realizaciones, dos de las señales de salida generadas se pueden procesar con el ordenador 12 para diferenciar el objeto. En otras realizaciones, más o todas las señales de salida generadas se pueden procesar con el ordenador 12 para diferenciar el objeto.

La FIG. 13 muestra un diagrama de flujo de un método para diferenciar un objeto de acuerdo con todavía otra realización de la presente invención. En esta realización, el detector de luz 11 comprende tres sensores ópticos, PD1, PD2, y PD3. Un objeto en una muestra se puede detectar y determinar que pertenece a, por ejemplo, uno de los cuatro tipos, tales como colorante 1, colorante 2, colorante 3, y colorante 4. Las señales de salida generadas por estos tres sensores ópticos se representan con  $I_{PD1}$ ,  $I_{PD2}$ , e  $I_{PD3}$ , respectivamente, y se envían al ordenador 12 para su procesamiento. El método se describe a continuación.

En primer lugar, la muestra se puede excitar usando una fuente de luz de excitación. A continuación, los sensores ópticos PD1, PD2, y PD3 pueden generar las señales de salida  $I_{PD1}$ ,  $I_{PD2}$ , e  $I_{PD3}$ . Después de recibir las señales de salida, el ordenador 12 puede calcular una suma de estas señales. Si la suma es menor que un valor de umbral,  $V_{th}$ , el ordenador 12 puede generar un informe de que no se ha producido fluorescencia. De otro modo, el ordenador puede avanzar a la siguiente etapa.

50 Cuando se determina que no se ha producido fluorescencia y que existe un objeto, el ordenador 12 puede realizar primero una etapa de diferenciación original. En esta etapa, el ordenador 12 puede calcular una primera proporción entre  $I_{PD3}$  y la suma de todas las señales, y comparar esta proporción con un primer conjunto de valores de umbral, por ejemplo,  $V_{th1}$ ,  $V_{th2}$ ,  $V_{th3}$ , y  $V_{th4}$ , para determinar si la primera proporción calculada entra dentro de cualquier intervalo entre 0 y  $V_{th1}$ , entre  $V_{th1}$  y  $V_{th2}$ , entre  $V_{th2}$  y  $V_{th3}$ , o entre  $V_{th3}$  y  $V_{th4}$ . Sin embargo, si la primera proporción calculada no entra dentro de ninguna de los intervalos mencionados anteriormente, el ordenador 12 puede generar un informe de que se ha producido una emisión de error.

Después de eso, se realiza una etapa de confirmación. En la etapa de confirmación, se calcula una segunda proporción entre  $I_{PD2}$  e  $I_{PD3}$ , y se compara con un segundo conjunto de valores de umbral, por ejemplo,  $V_{th1}'$ ,  $V_{th2}'$ ,  $V_{th3}'$ , y  $V_{th4}'$  para determinar si la segunda proporción calculada entra dentro de cualquier intervalo entre 0 y  $V_{th1}'$ ,



entre  $V_{th1}'$  y  $V_{th2}'$ , entre  $V_{th2}'$  y  $V_{th3}'$ , o entre  $V_{th3}'$  y  $V_{th4}'$ .

Por ejemplo, si, en la etapa de diferenciación original, la primera proporción calculada entra dentro del intervalo entre  $V_{th1}$  y  $V_{th2}$ , se puede determinar que el objeto posiblemente pertenece al colorante de tipo 2. A continuación, el ordenador 12 puede avanzar hasta la etapa de confirmación para determinar si la segunda proporción calculada entra dentro del intervalo entre  $V_{th1}'$  y  $V_{th2}'$ . Si es afirmativo, se puede determinar que el objeto pertenece al colorante de tipo 2. De otro modo, el ordenador 12 puede generar un informe de que se ha producido una emisión de error.

Se indica que se puede realizar una cualquiera de la etapa de diferenciación original y la etapa de confirmación que se han descrito anteriormente de forma individual para diferenciar un objeto. La realización de ambas etapas en un procedimiento de discriminación, sin embargo, puede aumentar la precisión.

10 La FIG. 14 muestra un diagrama de flujo de un método para diferenciar un objeto. En este ejemplo el detector de luz 11 comprende una pluralidad de sensores ópticos PD1, PD2, ... PDn, en la que n es mayor que 1 y puede ser menor o igual que 6. Además, n puede ser igual a 3. El aparato se puede usar para detectar y diferenciar q objetos diferentes, por ejemplo, q colorantes diferentes, indicados como D1, D2, ... Dq.

15 La fuente de luz de excitación usada en la presente realización puede tener k bandas de luz de excitación diferentes, L1, L2, ... Lk, en la que k puede ser mayor o igual que 1 y menor o igual que 3. La fuente de luz de excitación se puede activar y desactivar siguiendo un conjunto de instrucciones, dando como resultado un conjunto de m condiciones de excitación diferentes Cj, en las que  $1 \leq j \leq m$ . Cada condición de excitación puede ser una combinación de diferentes bandas de luz de excitación. En la misma condición de excitación, la señal de salida generada por un cierto sensor óptico para diferentes colorantes puede ser diferente.

20 La señal de salida generada en el sensor óptico de i-th, PDi, (en el que  $1 \leq i \leq n$ ) en la condición de excitación de j-th, Cj, para un cierto colorante Ds (en el que  $1 \leq s \leq q$ ) se puede indicar como  $Ds\{J\{PDi:Cj\}\}$ . Diferentes combinaciones de PDi y Cj pueden dar como resultado un  $Ds\{J\{PDi:Cj\}\}$  diferente. Por lo tanto, antes de usar el aparato para detectar y diferenciar un colorante desconocido, mediante la realización de lectura de calibración usando diferentes combinaciones de PDi y Cj en entornos convencionales para un colorante Ds, se puede obtener una matriz de señales de salida. Esta matriz puede ser única para un colorante, y se puede denominar matriz de lectura patrón para un colorante Ds,  $M\{\text{colorante Ds}\}$ , como se muestra a continuación:

$$\begin{array}{cccc} Ds\{J\{PD1:C1\}\}, & Ds\{J\{PD2:C1\}\}, & \dots & Ds\{J\{PDn:C1\}\} \\ Ds\{J\{PD1:C2\}\}, & Ds\{J\{PD2:C2\}\}, & \dots & Ds\{J\{PDn:C2\}\} \\ \dots & & & \\ Ds\{J\{PD1:Cm\}\}, & Ds\{J\{PD2:Cm\}\}, & \dots & Ds\{J\{PDn:Cm\}\} \end{array}$$

Esta lectura de calibración se puede repetir para cada uno de los colorantes, creando q matrices de lectura patrón  $M\{\text{colorante D1}\}$ ,  $M\{\text{colorante D2}\}$ , ...  $M\{\text{colorante Dq}\}$ .

Para minimizar el impacto del fondo, también se puede obtener una lectura de fondo mediante el registro de señales de salida desde los sensores ópticos cuando no existe colorante, que puede dar como resultado una matriz de lectura de fondo  $M\{\text{fondo}\}$ :

$$\begin{array}{cccc} B\{J\{PD1:C1\}\}, & B\{J\{PD2:C1\}\}, & \dots & B\{J\{PDn:C1\}\} \\ B\{J\{PD1:C2\}\}, & B\{J\{PD2:C2\}\}, & \dots & B\{J\{PDn:C2\}\} \\ \dots & & & \\ B\{J\{PD1:Cm\}\}, & B\{J\{PD2:Cm\}\}, & \dots & B\{J\{PDn:Cm\}\} \end{array}$$

40 Cuando se aplica una muestra desconocida al aparato de detección, se miden las señales de salida generadas por los sensores ópticos en diferentes condiciones de excitación y se obtiene una matriz de lectura de la muestra  $M\{\text{muestra}\}$ :

$$\begin{array}{cccc} J\{PD1:C1\}, & J\{PD2:C1\}, & \dots & J\{PDn:C1\} \\ J\{PD1:C2\}, & J\{PD2:C2\}, & \dots & J\{PDn:C2\} \\ \dots & & & \\ J\{PD1:Cm\}, & J\{PD2:Cm\}, & \dots & J\{PDn:Cm\} \end{array}$$

Esta matriz de lectura de la muestra a continuación se puede comparar con las matrices de lectura patrón para determinar qué tipo de colorante contiene la muestra. Para minimizar el impacto del fondo en el resultado, la matriz de lectura de fondo se puede restar tanto de las matrices de lectura patrón como de la matriz de lectura de la

muestra antes de la comparación.

La comparación se puede realizar calculando un rango Rs para cada tipo de colorante Ds. Cuando se calcula Rs, se pueden aplicar factores de peso y métodos estadísticos. Por ejemplo, se puede usar un método de mínimos cuadrados o un método con la mayor probabilidad para encontrar el mejor emparejamiento. Algunos factores de peso se pueden aplicar a cada sensor óptico o modo de luz de excitación para aumentar la precisión del análisis.

Después de calcular Rs, el ordenador 12 puede indicar el colorante más probable, el segundo colorante probable, etc. de acuerdo con el rango Rs.

En la Secuenciación con el método de Síntesis, la secuencia de ADN se determina identificando el nucleótido recién añadido a la hebra en crecimiento. El proceso de adición de nucleótido se detecta con luz fluorescente emitida desde el fluoróforo unido al nucleótido. La reacción de incorporación de nucleótido se puede dividir en varias etapas: el acoplamiento del nucleótido en el sitio activo formado por polimerasa y molde, rotura del enlace de fosfato, y formación del nuevo enlace con el azúcar. Algunos nucleótidos simplemente se difunden en y fuera del sitio activo, con sin que se produzca una incorporación real. Para controlar la reacción de incorporación en tiempo real, puede ser necesario que el aparato de detección sea capaz de detectar la llegada de un fluoróforo, tiempo de retención, y tipo de fluoróforo. La razón por la cual se mide el tiempo de retención es que los nucleótidos que se difunden pueden permanecer durante un periodo de tiempo más corto que los nucleótidos incorporados. Mediante el ajuste de un umbral del tiempo de retención, se puede detectar un suceso de incorporación real. En la FIG. 15 se muestra un diagrama de flujo de un método de acuerdo con una realización adicional más de la presente invención, que se puede usar para detección de sucesos. Este método es básicamente similar al que se ha descrito anteriormente, con una etapa más añadida para determinar si se puede reivindicar un suceso. Por lo tanto, la descripción detallada de este método se omite. La FIG. 16 muestra un diagrama de bloques de un aparato de detección a modo de ejemplo que se puede usar en esta realización.

En algunos ejemplos, el detector de luz 11 puede comprender dos o más sensores ópticos colocados de forma horizontal. Las señales generadas por los sensores ópticos colocados de forma horizontal pueden entrar en el ordenador 12 y se pueden procesar de una manera similar a la de uno de los métodos que se han desvelado anteriormente para determinar la presencia de un objeto y/o para diferenciar el tipo de un objeto.

### 3. Aplicaciones

Los aparatos y sistemas de detección de acuerdo con la presente invención se pueden aplicar, por ejemplo, para detección de ácidos nucleicos, secuenciación de ADN, identificación de biomarcadores, o citometría de flujo. Los aparatos de detección pueden detectar y procesar señal de luz de baja intensidad, que hace posible la discriminación de objetos de una sola molécula.

En algunas realizaciones de los métodos de la presente invención, las etiquetas se unen al analito(s) (es decir, la sustancia(s) a detectar), la sonda(s), tales como cebadores, anticuerpos, u otros reactivos que interactúan con el analito(s), u otro reactivo(s), tales como nucleótidos (incluyendo análogos de nucleótido). Cualquier etiqueta se puede usar en el analito o sonda que puede ser útil en la correlación de la señal con la cantidad o presencia de analito.

Por ejemplo, en la presente invención se puede usar una gran diversidad de moléculas fluorescentes incluyendo moléculas pequeñas, proteínas fluorescentes y puntos cuánticos. Algunas moléculas fluorescentes útiles (fluoróforos) incluyen, pero no se limitan a: 1,5 IAEDANS; 1,8-ANS; 4-Metilumbeliferona; 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-Carboxifluoresceína (5-FAM); 5-Carboxinaftofluoresceína; 5-Carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA); 5-FAM (5-Carboxifluoresceína); 5-HAT (Hidroxi Triptamina); 5-Hidroxi Triptamina (HAT); 5-ROX (carboxi-X-rodamina); 5-TAMRA (5-Carboxitetrametilrodamina); 6-Carboxirrodamina 6G; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-Amino-4-metilcumarina; 7-Aminoactinomicina D (7-AAD); 7-Hidroxi-4-metilcumarina; 9-Amino-6-cloro-2-metoxiacridina; ABQ; Fucsina Ácida; ACMA (9-Amino-6-cloro-2-metoxiacridina); Naranja de Acridina; Rojo de Acridina; Amarillo de Acridina; Acriflavina; Acriflavina Feulgen SITSA; AFPs-Proteína AutoFluorescente-(Quantum Biotechnologies); Rojo Texas; Conjugado de Rojo Texas-X; Tiadicarboianina (DiSC3); Rojo de Tiazina R; Naranja de Tiazol; Tioflavina 5; Tioflavina S; Tioflavina TCN; Thiolyte; Naranja de Tiozol; Tinopol CBS (Calcofluor Blanco); TMR; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; Tricolor (PE-Cy5); TRITC (IsoTioCianato de TetrametilRodamina); True Blue; TruRed; Ultralite; Uranine B; Uvitex SFC; WW 781; X-Rodamina; XRITC; Naranja de Xileno; Y66F; Y66H; Y66W; YO-PRO-1; YO-PRO-3; YOYO-1; colorantes de interquelación tales como YOYO-3, Sybr Verde, naranja de Tiazol; miembros de la serie de colorantes Alexa Fluor (de Molecular Probes/Invitrogen) que cubren un amplio espectro y que emparejan las principales longitudes de onda de salida de fuentes de excitación comunes tales como Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, y 750; miembros de la serie de fluoróforos de Colorante Cy (GE Healthcare), que también cubren un amplio espectro tales como Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7; miembros de los fluoróforos de colorante Oyster (Denovo Bioiabels) tales como Oyster -500, -550, -556, 645, 650, 656; miembros de la serie de Etiquetas de DY (Dyomics), por ejemplo, con máximos de absorción que varían de 418 nm (DY-415) a 844 nm (DY-831) tales como DY-415, 495, -505, -547, -548, -549, -550, -554, -555, -556, -560, -590, -610, -615, -630, -631, -632, -633, -634, -635, -636, -647, -648, -649, -650, -651, -652, -675, -676, -677, -680, -681, -682, -700, -701, -730, -731, -732, -734, -750, -751, -752, -776, -780, -

781, -782, -831, -480XL, -481XL, -485XL, -510XL, -520XL, -521XL; miembros de la serie ATTO de etiquetas fluorescentes (ATTO-TEC GmbH) tales como ATTO 390, 425, 465, 488, 495, 520, 532, 550, 565, 590, 594, 610, 611X, 620, 633, 635, 637, 647, 647N, 655, 680, 700, 725, 740; miembros de la serie de colorantes CAL Fluor o de la serie Quasar (Biosearch Technologies) tales como CAL Fluor Gold 540, CAL Fluor Naranja 560, Quasar 570, CAL Fluor Rojo 590, CAL Fluor Rojo 610, CAL Fluor Rojo 635, Quasar 670; puntos cuánticos, tales como puntos cuánticos de la serie EviTags (Evident Technologies) o puntos cuánticos de la serie Qdot (Invitrogen) tales como los Qdot 525, Qdot565, Qdot585, Qdot605, Qdot655, Qdot705, Qdot 800; fluoresceína; rodamina; y/o ficoeritrina; o combinaciones de los mismos. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Estados Unidos N° 2008/0081769.

En algunas realizaciones, se proporciona al menos un sistema bioluminiscente o quimioluminiscente que genera luz en presencia de una entidad tal como un analito, reactivo como producto de reacción. Por ejemplo, un sistema bioluminiscente o quimioluminiscente se puede usar para detectar pirofosfato generado en una secuenciación mediante reacción de síntesis (que se analiza con más detalle a continuación); para detectar la presencia de metales tales como hierro o cobre mediante sus catálisis de una reacción de generación de luz; o para medirla cantidad de un reactivo unido con un analito, en el que el reactivo comprende al menos un componente del sistema bio- o quimioluminiscente.

Algunos ejemplos de sistemas bioluminiscentes conocidos en la técnica incluyen sistemas que comprenden al menos una luciferasa, por ejemplo, luciferasas de luciérnaga, que incluyen luciferasa de *Photinus pyralis*. Un sistema bioluminiscente se puede usar para detectar pirofosfato, por ejemplo, proporcionando luciferasa, ATP sulfurilasa, luciferina, y adenosina 5' fosfosulfato, junto con los componentes de la secuenciación mediante reacción de síntesis (en la que el dATP se puede sustituir con un análogo tal como dATPαS para evitar la luz no específica debida al consumo de dATP por la luciferasa). Cuando el pirofosfato se genera mediante un suceso de incorporación de nucleótido, la ATP sulfurilasa produce ATP de una manera dependiente de la adenosina 5' fosfosulfato. El ATP dirige la conversión de la luz de la luciferina en oxiluciferina más luz mediante luciferasa. Otros sistemas bioluminiscentes incluyen sistemas basados en foto proteínas tales como aequorina, que oxida la coelenterazina a coelenteramida excitada, que emite luz.

Algunos ejemplos de sistemas quimioluminiscentes incluyen luminol más peróxido de hidrógeno, que pueden experimentar una reacción de emisión de luz en presencia de un catalizador metálico u oxidante auxiliar; oxalato de difenilo más peróxido de hidrógeno y un colorante adecuado, que experimenta excitación y emisión de luz en una reacción de múltiples etapas que produce dióxido de carbono (algunos ejemplos de colorantes adecuados incluyen derivados de antraceno fenilado tales como 9,10-difenil-antraceno, 9,10-Bis(feniletinil)antraceno, y 1-Cloro-9,10-bis(feniletinil)antraceno, y rodaminas tales como rodamina 6G y rodamina B); sistemas que producen oxígeno singlete tales como peróxido de hidrógeno más hipoclorito sódico; y sistemas que comprenden una enzima tal como peroxidasa de rábano picante, que actúa en el luminol u otros sustratos disponibles en el mercado.

En algunos ejemplos, los métodos de la divulgación comprenden la formación de uniones covalentes, tal como entre reactivos o analitos y superficies o etiquetas. Por ejemplo, en procedimientos de secuenciación de una sola molécula, una molécula de ácido nucleico o una enzima tal como una polimerasa se puede unir a una superficie tal como un portaobjetos de vidrio. Tal unión puede permitir la adquisición de datos sobre múltiples ciclos de secuenciación. En algunas realizaciones, en la técnica se conocen muchos métodos para formar uniones covalentes, tales como de reactivos a superficies o etiquetas. También se pueden usar métodos de unión covalente. Se puede usar un número de diferentes modificadores químicos para facilitar la formación de unión. Algunos ejemplos de modificadores químicos incluyen grupos N-hidroxi succinimida (NHS), aminas, aldehídos, epóxidos, grupos carboxilo, grupos hidroxilo, hidrazidas, grupos hidrófobos, membranas, maleimidias, biotina, estreptavidina, grupos tiol, quelatos de níquel, grupos fotorreactivos, grupos de boro, tioésteres, cisteínas, grupos disulfuro, grupos haluro de alquilo y acilo, glutaciones, maltosas, azidas, fosfatos, y fosfinas. En el mercado hay disponibilidad de superficies tales como portaobjetos de vidrio con tales superficies químicamente modificadas para una serie de modificaciones. Estas se pueden preparar fácilmente para el resto, usando métodos convencionales (Microarray Biochip Technologies, Mark Schena, Editor, Marzo de 2000, Biotechniques Books). En algunas realizaciones, se forman uniones entre dos entidades usando una combinación apropiada de modificadores (por ejemplo, un modificador electrófilo y un modificador nucleófilo), en las que cada entidad comprende al menos un modificador.

En algunas realizaciones, se forman uniones entre dos entidades usando un modificador químico presente en una de las entidades y un resto de origen natural, por ejemplo, una amina o sulfhidrilo, de la otra entidad. En algunas realizaciones, se usan modificadores que son reactivos con respecto a las aminas. Una ventaja de esta reacción es puede que ser rápida y puede evitar la producción de productos secundarios tóxicos. Algunos ejemplos de tales modificadores incluyen ésteres de NHS, aldehídos, epóxidos, haluros de acilo, y tioésteres. La mayoría de las proteínas, péptidos, glicopéptidos, etc., tienen grupos amino libres, que pueden reaccionar con tales modificadores para unirlos de forma covalente a estos modificadores. También se pueden sintetizar sondas de ácidos nucleicos con grupos amino internos o terminales, and están disponibles en el mercado (por ejemplo, de IDT u Operón). Por lo tanto, alguna biomoléculas se pueden unir (por ejemplo, de forma covalente o de forma no covalente) a etiquetas, superficies, otros reactivos usando químicas similares.

Se puede usar un número de otros agentes de reticulación multifuncionales para convertir la reactividad química de un tipo de modificador en otra. Estos grupos pueden ser bifuncionales, trifuncionales, tetrafuncionales, etcétera.

También pueden ser homofuncionales o heterofuncionales. Un ejemplo de un agente de reticulación bifuncional es X-Y-Z, en el que X y Z son dos grupos reactivos, e Y es un conector de conexión. Además, si X y Z son el mismo grupo, tal como los ésteres de NHS, el agente de reticulación resultante, NHS-Y-NHS, es un agente de reticulación homobifuncional y se podría conectar con dos entidades cada una de las cuales que comprende una amina. Si X es éster de NHS y Z es un grupo maleimida, el agente de reticulación resultante, NHS-Y-maleimida, es un agente de reticulación heterobifuncional y se podría unir a una entidad que comprende una amina con una entidad que comprende un grupo tio. Algunos agentes de reticulación con un número de grupos funcionales diferentes están ampliamente disponibles. Algunos ejemplos de tales grupos funcionales incluyen ésteres de NHS, tioésteres, haluros de alquilo, haluros de acilo (por ejemplo, yodoacetamida), tioles, aminas, cisteínas, histidinas, disulfuros, maleimida, cis-dioles, ácido borónico, ácido hidroxámico, azidas, hidrazinas, fosfinas, grupos fotorreactivos (por ejemplo, antraquinona, benzofenona), acrilamida (por ejemplo, acridita), grupos de afinidad (por ejemplo, biotina, estreptavidina, maltosa, proteína de unión a maltosa, glutatión, glutatión-S-transferasa), aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, fosfatos, grupos hidrófobos (por ejemplo, fenilo, colesterol), etc.

Los expertos en la materia conocen otras alternativas de modificadores (tales como agentes de fotorreticulación y de reticulación térmica). Algunas tecnologías disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, las de Mosiac Technologies (Waltham, MA), EXIQON™ (Vedbaek, Dinamarca), Schleicher y Schuell (Keene, N.H.), Surmodics™ (St. Paul, MN), XENOPORE™ (Hawthorne, N.J.), Pamgene (Países Bajos), Eppendorf (Alemania), Prolinx (Bothell, WA), Spectral Genomics (Houston, TX), y COMBIMATRIX™ (Bothell, WA).

En algunas realizaciones, se proporciona superficies distintas del vidrio. Por ejemplo, también se pueden usar superficies metálicas, tales como oro, silicio, cobre, titanio, y aluminio, óxidos metálicos, tales como óxido de silicio, óxido de titanio y óxido de hierro, y plásticos, tales como poliestireno, y polietileno, zeolitas, y otros materiales. En algunas realizaciones, las capas de estos materiales pueden ser finas, por ejemplo, con un espesor menor de aproximadamente 100 nm para permitir la transmisión de luz.

### 3.1 Detección de ácidos nucleicos

Un aparato de detección de acuerdo con la presente invención se puede usar como parte de un sistema o en métodos o procesos de detección de moléculas, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos. Este aparato, y métodos o procesos que lo usan, son útiles, por ejemplo, para aplicaciones analíticas y de diagnóstico. Estas aplicaciones pueden ser privadas, públicas, comerciales, o industriales.

Un aparato de detección de acuerdo con la presente invención se puede usar con una gran diversidad de modalidades de secuenciación y puede ser adecuado para la secuenciación de moléculas individuales. Además, el aparato de detección de acuerdo con la presente invención tiene un diseño, ensamblaje, introducción simplificados con respecto a los dispositivos de biochip existentes. Por ejemplo, los ácidos nucleicos a secuencia se pueden fijar a sitios conectores aleatorios en la matriz del sistema, evitando la pérdida de tiempo y elementos de robótica de coste elevado para depositar o sintetizar ácidos nucleicos en posiciones determinadas previamente.

Un aparato de detección de acuerdo con la presente invención se puede usar como parte de un sistema o en métodos y procesos de detección de biomoléculas, que incluye hibridación o secuenciación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para secuenciación de todo el genoma, formación de perfiles de transcripción, formación de perfiles de transcripción comparativos, o identificación genética. La detección de biomoléculas también puede incluir detección y/o medida de interacciones de unión, por ejemplo, proteína/proteína, anticuerpo/antígeno, receptor/ligando, y ácido nucleico/proteína. Estas aplicaciones son útiles para procesos y métodos analíticos o de diagnóstico.

Algunos ácidos nucleicos adecuados para detección en el aparato proporcionado por la invención pueden formar parte, en algunas realizaciones, de una molécula de unión, que fija una molécula adecuada para someter al ensayo interacciones de unión, por ejemplo, proteínas, otros ácidos nucleicos, restos de carbohidratos, o moléculas pequeñas a un sitio conector en un dispositivo proporcionado por la invención. La molécula de unión puede, en algunas realizaciones, comprender adicionalmente una molécula de captura, que se une a la molécula que se está sometiendo a ensayo para interacciones de unión. El ácido nucleico en una molécula de unión sirve como una etiqueta de identificación para la molécula de captura de la molécula de unión mediante, por ejemplo, secuenciación directa o hibridación.

Los métodos proporcionados por la divulgación pueden comprender una etapa de fijación de una molécula a detectar a una matriz de dirección de un sistema de detección proporcionado por la invención. En algunas realizaciones, la matriz de dirección puede incluir una lámina ciega que tiene una pluralidad de agujeros de alfiler, y se pueden formar sitios conectores en lo alrededor de los agujeros de alfiler. Por lo tanto, un sistema de detección de acuerdo con la presente invención puede leer de forma simultánea millones de segmentos de ácidos nucleicos. Si cada segmento tiene una longitud de, por ejemplo, 1000 bases, un solo dispositivo podría obtener billones de bits de información de secuencias, haciendo posible, por ejemplo, la secuenciación y la resecuenciación de todo el genoma.

#### 3.1.1 Moléculas a detectar

Los ácidos nucleicos adecuados para detección con los métodos proporcionados por la presente divulgación pueden incluir cualquier ácido nucleico, que incluye, por ejemplo, ADN, ARN, o PNA (ácido nucleico peptídico), y pueden

contener cualquier secuencia - tanto conocida como desconocida, incluyendo secuencias de origen natural o artificiales. El ácido nucleico se puede derivar de forma natural, se puede producir de forma recombinante, o se puede sintetizar de forma química. El ácido nucleico puede comprender nucleótidos de origen natural, análogos de nucleótido no existentes en la naturaleza, o nucleótidos modificados. La longitud del ácido nucleico a detectar debe variar basándose en la aplicación real. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede incluir al menos 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000 bases, o más. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede tener de 10 a 20, de 10 a 50, de 10 a 100, de 50 a 100, de 50 a 500, de 50 a 1000, de 50 a 5000, de 500 a 2000, de 500 a 5000, o de 1000 a 5000 bases.

Un ácido nucleico puede ser monocatenario para detección. Los moldes de ácido nucleico monocatenario se pueden derivar de una molécula bicatenaria con medios conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, calentamiento o tratamiento con álcalis u otro agente químico. Los moldes de ácido nucleico monocatenario también se pueden producir, por ejemplo, mediante síntesis química o *in vitro*.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico a detectar se puede unir a un sitio conector en su extremo en las posiciones 5' o 3'. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede comprender adicionalmente uno o más cebadores de unión terminal acoplados al extremo en la posición 5', el extremo en la posición 3', o tanto al extremo en la posición 5' como al extremo en la posición 3' del ácido nucleico. En realizaciones en particular, un conector de unión terminal se puede fijar al extremo en la posición 3' del ácido nucleico. Los cebadores de unión terminal se pueden usar tanto para fijar el ácido nucleico a detectar a sitios conectores en el dispositivo como para proporcionar una secuencia complementaria para uno o más cebadores de detección, por ejemplo, un cebador de secuenciación.

### 3.1.1.1 Cebador de unión terminal

Los cebadores de unión terminal son moléculas cortas de ácido nucleico formadas normalmente por menos de 100 nucleótidos. En algunas realizaciones, el cebador de unión terminal puede tener una longitud de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 90 nucleótidos, o más. En ciertas realizaciones, los cebadores de unión terminal pueden tener una longitud de 8 a 25, de 10 a 20, de 10 a 30, o de 10 a 50 nucleótidos. En algunas realizaciones, los cebadores de unión terminal pueden no estar ramificados, sin embargo, en otras realizaciones, pueden estar ramificados.

El cebador de unión terminal se puede usar para unir el ácido nucleico a detectar a un sitio conector en la matriz de dirección. En algunas realizaciones, el cebador de unión terminal puede unir el ácido nucleico a la superficie de la matriz directamente, por ejemplo, mediante unión covalente (por ejemplo, unión de éster o tiol) o unión no covalente, por ejemplo, unión de antígeno/anticuerpo o biotina/avidina. En algunas realizaciones, el cebador de unión terminal puede unir el ácido nucleico a la superficie de la matriz indirectamente, por ejemplo, mediante la unión de una molécula intermedia, por ejemplo, una polimerasa. Por consiguiente, el cebador de unión terminal puede contener nucleótidos modificados o de otro modo se puede modificar para facilitar la unión a un sitio conector con medios conocidos en la técnica, por ejemplo, uniones disulfuro, tioéster, amida, fosfodiéster, o éster; o, por ejemplo, mediante unión de anticuerpo/antígeno o biotina/avidina, por ejemplo, el cebador de unión terminal puede contener un nucleótido que comprende un resto de antígeno o un nucleótido biotinilado. En realizaciones en particular, un nucleótido modificado puede estar en el extremo en la posición 3' de un cebador de unión terminal, en algunas realizaciones, el extremo en la posición 5' de un cebador de unión terminal puede contener un nucleótido modificado.

El cebador de unión terminal también puede servir como un complemento para uno o más cebadores usados para detectar el ácido nucleico, por ejemplo, un cebador de secuenciación. En algunas realizaciones, el cebador se puede usar para detectar el ácido nucleico mediante hibridación, por ejemplo, el cebador puede contener una etiqueta detectable, por ejemplo, una etiqueta fluorescente. En algunas realizaciones, el extremo en la posición 5' del cebador de unión terminal puede comprender una secuencia complementaria con un cebador de secuenciación. En algunas realizaciones, la secuencia de cebador de unión terminal que es complementaria con el cebador de secuenciación se puede orientar de modo que el extremo en la posición 3' del cebador de secuenciación puede ser inmediatamente adyacente al primer nucleótido en el ácido nucleico a secuenciar.

En algunas realizaciones, se pueden añadir cebadores de unión terminal a los extremos del ácido nucleico a detectar mediante una ligasa, por ejemplo, una ADN ligasa. En algunas realizaciones, el cebador de unión terminal y el ácido nucleico a detectar pueden ser ambos monocatenarios antes de la ligación. En otras realizaciones, ambos pueden ser bicatenarios. En otras realizaciones más, uno puede ser monocatenario y el otro puede ser bicatenario. La ligación se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, en el método de secuenciación de colonias, Shendure *et al.* (*Science*, 309: 1728-1732 (2005)) ligaron un cebador de unión terminal de T30 (32 pb) a un segmento de ADN de muestra con el kit Quick Ligation de New England Biolabs' (NEB). En ese punto, la solución de reacción de ligación incluía a 0,26 pMoles de ADN, 0,8 pMoles de cebador de unión terminal de T30, 4,0 µl de T4 ADN Ligasa, en 1X de Tampón Ligación Quick. Después de mezclar, la solución de reacción se incubó durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente, y a continuación se colocó en hielo. La reacción de ligación se detuvo calentando las muestras a 65 °C durante 10 minutos.

En otras realizaciones, el cebador de unión terminal se puede sintetizar en el ácido nucleico a detectar. Por ejemplo, el cebador de unión terminal puede ser un homopolímero añadido, por ejemplo, mediante transferasa terminal. Por ejemplo, Harris *et al.*, (*Science* 320:106-109 (2008)) añadieron una cola de poli A moldes de ADN, que sirvió como el

complemento para un cebador de secuenciación de poli T en la secuenciación de la molécula individual de un genoma viral.

### 3.1.1.2 Cebador de secuenciación

5 Un cebador de secuenciación es un oligonucleótido monocatenario complementario con un segmento del ácido nucleico a detectar o su cebador de unión terminal asociado. En algunas realizaciones, el cebador de secuenciación puede tener una longitud de al menos 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nucleótidos o más. En realizaciones en particular, el cebador de secuenciación puede tener una longitud de 8 a 25, de 10 a 20, de 10 a 30, o de 10 a 50 nucleótidos. El cebador de secuenciación puede estar formado por cualquier tipo de nucleótido, incluyendo nucleótidos de origen natural, análogos de nucleótido que no existen en la naturaleza, o nucleótidos modificados. En 10 ciertas realizaciones, el extremo en la posición 5' de un cebador de secuenciación se puede modificar para facilitar la unión a un sitio conector en la matriz de dirección después de la hibridación del cebador de secuenciación con un ácido nucleico a secuenciar, incluyendo una o más moléculas de unión terminal.

En algunas realizaciones, un cebador de secuenciación puede contener nucleótidos modificados, por ejemplo, ácidos nucleicos inmovilizados (LNA; ribonucleótidos modificados, que proporcionan aumento de interacciones de 15 apilamiento de bases en un ácido polinucleico). Como una ilustración de la utilidad de los LNA, Levin *et al.* (Nucleic Acid Research 34 (20): 142 (2006)) mostraron que un cebador que contenía LNA presentaba un aumento de la especificidad y presentaba una unión más fuerte con respecto al cebador correspondiente sin inmovilizar. Se prepararon tres variantes del cebador MCP1 (5'-ctaaatcttctgaat-3') que contenía 3 nucleótidos de LNA (en protecciones) a diferentes posiciones en el cebador: MCP1-LNA-3'(5'-ctaaatcttctgaat-3'); MCP1-LNA-5'(5'-CtTaAatcttctgaat-3'); y MCP1-LNA-par (S'-ctTaaatTtctTgaat-S<sup>1</sup>). Todos los cebadores sustituidos con LNA presentaban un aumento de T<sub>m</sub>, mientras que el cebador MCP1-LNA-5' presentaba una precisión de secuenciación particularmente aumentado (recuentos de Phred Q30). Por consiguiente, en realizaciones en particular, el cebador de secuenciación puede contener al menos un nucleótido inmovilizado en su región en la posición 5', es decir, la mitad, tercio, o cuarto del cebador de secuenciación en la posición 5'.

25 Algunos cebadores de secuenciación y ácidos nucleicos monocatenarios de muestra (es decir, un ácido nucleico a detectar que incluye al menos un cebador de unión terminal) se puede hibridar antes de su aplicación a un aparato de detección de acuerdo con la presente invención. El cebador de secuenciación y la muestra de ácido nucleico se pueden hibridar mezclando la muestra de ácido nucleico con un exceso molar de cebador de secuenciación en una solución que contiene sal, tal como 5X de SSC (o 5X de SSPE), Tween 20 al 0,1 % (o SDS al 0,1 %), y tampón de 30 BSA al 0,1 %. La mezcla se puede calentar a 65 °C durante al menos 5 minutos y enfriar lentamente a temperatura ambiente, para permitir la hibridación del cebador/molde. Algunos cebadores residuales se pueden eliminar con medios apropiados que incluyen, por ejemplo, un tamiz molecular.

Algunos cebadores, que incluyen los cebadores tanto de unión terminal como de secuenciación, se pueden diseñar con medios apropiados, que incluyen inspección visual de la secuencia o diseño de cebador asistido por ordenador. 35 Numerosos paquetes de software están disponibles para ayudar en el diseño del cebador, que incluyen DNASTar™ (DNASTar, Inc., Madison, WI), OLIGO 4.0 (National Biosciences, Inc.), Vector NTI® (Invitrogen), Primer Premier 5 (Premierbiosoft), y Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Los cebadores se pueden diseñar teniendo en cuenta, por ejemplo, la molécula a secuenciar, especificidad, longitud, temperatura de fusión deseada, estructura secundaria, dímeros de cebador, contenido de GC, pH y fuerza iónica de la solución 40 tampón, y la enzima usada (es decir, polimerasa o ligasa). Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª edición (2001), de Joseph Sambrook y David Russell.

### 3.1.1.3 Unión a la superficie de la matriz

Después de hibridar el cebador de secuenciación y el ácido nucleico a secuenciar, incluyendo uno o más cebadores de unión terminal, este complejo se puede preparar en un tampón adecuado, aplicado a la superficie de una matriz 45 de dirección, y se puede permitir que sea una. En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico (ácido nucleico a detectar y uno o más cebadores de unión terminal) se pueden fijar a sitios conectores y se pueden aplicar posteriormente cebadores de secuenciación o detección. En otras realizaciones, el complejo se puede hibridar antes de su aplicación a un dispositivo. Los sitios conectores en los que solamente se une una muestra de ácido nucleico se conocen como direcciones eficaces. En ciertas realizaciones, el complejo se puede aplicar al sistema de 50 detección y los ácidos nucleicos de muestra se pueden fijar a sitios conectores aleatorios en la matriz de dirección. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos de muestra se pueden aplicar a sitios conectores determinados previamente en la matriz de dirección con medios apropiados, que incluyen, por ejemplo, sistemas de robótica o de manipulación de líquidos.

En la técnica se conocen bien algunos medios apropiados para fijar ácidos nucleicos a un soporte sólido. En algunas 55 realizaciones, la muestra de ácido nucleico se puede fijar directamente a un sitio conector mediante unión covalente, por ejemplo, uniones disulfuro, tioéster, amida, fosfodiéster, o éster; o mediante unión no covalente, por ejemplo, unión de anticuerpo/antígeno o biotina/avidina. En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico se puede fijar a un sitio conector con una molécula de intervención. En algunas realizaciones, la molécula de intervención puede ser una polimerasa, por ejemplo, una ADN polimerasa.

Como un ejemplo ilustrativo de unión covalente, directa de un ácido nucleico, Adeesi *et al.* (Nucleic Acid Research, 28: 87 (2000)) modificaron el extremo en la posición 5' de un cebador para que incluyera un grupo funcional SH. De acuerdo con el método de Adeesi *et al.*, un ácido nucleico se puede preparar en solución salina taponada con fosfato 50  $\mu\text{M}$  ("PBS") (NaPi:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M a pH 6,5, NaCl 0,1 M). A continuación, aproximadamente 1 - 5  $\mu\text{l}$  de solución de cebador se pueden aplicar a una superficie de porta objetos de vidrio silanizado y se puede incubar en una caja de control de humedad a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 horas para unir el cebador a la superficie del chip. Después de completar la reacción de unión, la solución de PBS se lava con vibración dos veces a temperatura ambiente durante 5 minutos cada lavado para retirar el ADN no unido. Después de limpias, se añade  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM a una solución de PBS y se usa para aclarar la superficie de la matriz de dirección a temperatura ambiente, para desactivar el grupo tiol del ADN no unido. A continuación, la superficie de la matriz se lava, por ejemplo, una vez con 5X de Tween al 0,1 % de SSC y una vez con 5X de solución tampón de SSC. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método usado por Adeesi *et al.* se puede usar en los métodos proporcionados por la invención para fijar el complejo de muestra de ácido nucleico a un sitio conector, por ejemplo, a través del extremo en la posición 5' de un cebador de secuenciación o la muestra de ácido nucleico.

En una realización alternativa, la muestra de ácido nucleico puede comprender, por ejemplo, un nucleótido biotinilado, y se une a avidina en la superficie del sitio conector. En otra realización, la muestra de ácido nucleico puede comprender un resto antigénico, por ejemplo, BrdU o digoxigenina, que se une con un anticuerpo (o fragmento del mismo) en el sitio conector. Por "anticuerpo" se debe entender que este término incluye fragmentos de moléculas de inmunoglobina, que incluyen, por ejemplo, uno o más dominios de CDR; o fragmentos pesados variables o variables ligeros. Los anticuerpos pueden ser de origen natural, recombinante o sintético. Los anticuerpos también pueden incluir, por ejemplo, variantes policlonales y monoclonales. En algunas realizaciones, los anticuerpos se pueden unir a sus antígeno(s) con constantes de asociación de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  M, o superiores. La estructura, función y producción de anticuerpos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* CRC Press; 1ª edición (2006), de Gary Howard y Matthew Kasser.

En otra realización más, la muestra de ácido nucleico se puede fijar al sitio conector mediante una polimerasa, por ejemplo, ADN polimerasa. El experto en la materia observará que, para retener la función enzimática, se debería tener en cuenta la información disponible, tal como las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la enzima. Por ejemplo, las estructuras de las Taq y Phi29 polimerasas se conocen en la técnica, véase: Kim *et al.*, *Nature*, 376: 612-616 (1995) y Kamtekar *et al.*, *Mot. Cell*, 16: 609-618 (2004), respectivamente. En la técnica se conocen algunos medios para fijar una polimerasa a una superficie, a la vez que mantiene la actividad y se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2008/0199932, publicada el 21 de agosto de 2008 y en Korlach *et al.*, *PNAS* 105: 1176-1181 (2008).

En algunas realizaciones, una superficie de un sitio conector modificada con aldehído se trata con reactivo de silano que contiene aldehído. Los aldehídos reaccionan rápidamente con aminas primarias en las proteínas para formar una unión de base de Schiff. Dado que muchas proteínas presentan lisinas en sus superficies además de la  $\alpha$ -amina generalmente más reactiva en el extremo  $\text{NH}_2$ -terminal, estas se pueden unir a la lámina en una diversidad de orientaciones, que permiten que diferentes lados de la proteína interactúen con otras proteínas o moléculas pequeñas en solución. En otra realización, un fotoNHS (una molécula de N-hidroxi succinimido carboxilato unida a una molécula de azidonitrobenzoceno con un conector de cadena del carbono) se puede unir a una superficie modificada con amina en el dispositivo mediante fotoactivación de UV. En estas realizaciones, la luz UV excita el resto de azidonitrobenzoceno para producir nitreno altamente reactivo, por eliminación de nitrógeno. El nitreno reacciona rápidamente con  $\text{NH}_2$  en la superficie del dispositivo y forma un enlace de hidrazina. El otro extremo del conector es carboxilato de NHS, que reacciona con lisinas en la superficie de la polimerasa para producir un enlace covalente de amida. En otra realización, se puede hacer reaccionar un resto de carboxilato de NHS con amina primaria en la superficie del dispositivo en condiciones de tamponamiento. La luz UV se puede usar para activar un resto de azidonitrobenzoceno y para formar un nitreno altamente reactivo como un grupo deficiente en electrones y que reacciona fácilmente con la amina primaria de restos de lisina en la polimerasa.

### 3.1.2 Modalidades de secuenciación

Los aparatos de detección proporcionados por la presente invención se pueden usar para detectar y secuenciar ácidos nucleicos con medios conocidos en la técnica, tal como se revisa, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.946.249 y en Shendure *et al.*, *Nat. Rev. Genet.* 5: 335-44 (2004). Las modalidades de secuencia se pueden elegir entre métodos de secuenciación de moléculas individuales conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los métodos de secuenciación pueden depender de la especificidad ya sea de una ADN polimerasa o de una ADN ligasa y pueden incluir, por ejemplo, secuenciación de extensión de bases (extensiones por etapas de bases individuales), secuenciación de múltiples bases mediante síntesis (incluyendo, por ejemplo, secuenciación con nucleótidos etiquetados de forma terminal), y secuenciación oscilante, que se basa en la ligación. Los métodos por lo general implican proporcionar una muestra de ácido nucleico, que puede incluir al menos un cebador de unión terminal. El ácido nucleico se puede fijar a un sustrato (ya sea directa o indirectamente), por ejemplo, en un sitio conector. El ácido nucleico se puede proporcionar en una forma monocatenaria o se puede convertir en monocatenario, por ejemplo, mediante desnaturalización química o térmica. A continuación, la secuenciación puede comenzar en un cebador de secuenciación (la secuenciación basada en ligasa normalmente

se refiere a cebadores de ancla, que sirven para la finalidad análoga para cebadores de secuenciación).

Para modalidades de secuenciación de una sola molécula, la presente invención puede ofrecer la ventaja de ser capaz de volver a secuenciar moléculas individuales. Por ejemplo, después de la finalización de una lectura de la secuenciación, el cebador de secuenciación y los nucleótidos extendidos se pueden separar de la muestra de ácido nucleico, el dispositivo se lava, y la secuenciación se repite. En diversas realizaciones, la resecuenciación se puede realizar con el mismo método o con métodos diferentes. Al volver a secuenciar la misma molécula, se espera que algunos errores de secuenciación disminuyan como la potencia del número de lecturas de secuenciación. Por ejemplo, si las tasas de error por base para una sola lectura son  $10^{-3}$ , entonces después de dos lecturas, esto disminuye a  $(10^{-3})^2$ , es decir,  $10^{-6}$ . Esto es particularmente ventajoso para secuenciación de moléculas individuales ya que los nucleótidos modificados usados para la secuenciación pueden perder sus etiquetas o grupos de bloqueo dando como resultado, por ejemplo, supresiones falsas.

En general, en la secuenciación de moléculas individuales, al menos una molécula de ácido nucleico a secuenciar se fija a un sustrato y se pone en contacto con un cebador. El cebador se modifica, por ejemplo, realizando al menos una reacción de polimerización o ligación catalizada con enzimas. La al menos una reacción conduce a la emisión de luz correlacionada con la identidad de al menos una base comprendida por el ácido. Se entiende que "que conduce a" emisión de luz hace referencia a que la al menos una reacción provoca al menos una condición en la que se produce la emisión de luz correlacionada con la identidad de al menos una base comprendida por el ácido nucleico; esta aparición se puede realizar a través de interacción con luz excitatoria, un sistema quimio- o bioluminiscente, etc. La al menos una condición puede ser, por ejemplo, incorporación de un fluoróforo en el producto de la al menos una reacción, o la liberación de pirofosfato. Por lo tanto, se puede generar luz con o sin excitación externa. Por ejemplo, la secuenciación de una sola molécula se puede realizar con análogos de base terminadora reversibles que comprenden una etiqueta detectable unidad de forma covalente, por ejemplo, una etiqueta fluorescente, y un grupo de bloqueo para evitar cualquier extensión secundaria, en la que el análogo se excita y se detecta después de que se haya añadido al cebador, y la etiqueta y el grupo de bloqueo se retiran después de la adición para permitir otra ronda de extensión. Como alternativa, un producto de una etapa de extensión, tal como un pirofosfato, se puede detectar sin excitación externa proporcionando un sistema de detección quimio- o bioluminiscente que emite luz de una manera dependiente del pirofosfato. Esta y otras modalidades se analizan con más detalle a continuación.

La luz emitida se correlaciona con la identidad de al menos una base comprendida por el ácido nucleico. En algunas realizaciones, la correlación puede ser temporal; por ejemplo, el tiempo de emisión de la luz indica la identidad de la al menos una base, tal como es el caso cuando se proporcionan análogos de bases diferentes para uso en una reacción de polimerización en diferentes tiempos. En algunas realizaciones, la correlación puede ser espectral; por ejemplo, el espectro de la luz emitida indica la identidad de la al menos una base, tal como es el caso cuando se proporcionan análogos de bases diferentes que comprenden diferentes fluoróforos para uso en una reacción de polimerización.

En algunas realizaciones, la secuenciación de moléculas de ácido nucleico individuales comprende múltiples ciclos de secuenciación. Se entiende que un ciclo de secuenciación hace referencia a los sucesos que conducen a una emisión de luz correlacionados con la identidad de al menos una base que se repetiría con el fin de identificar al menos una segunda base comprendida por el ácido nucleico después de haber identificado una primera base. Por lo tanto, en los métodos de acuerdo con la invención que comprenden secuenciación de moléculas de ácido nucleico individuales, la secuencia de la molécula de ácido nucleico individual puede comprender al menos un número dado títulos de secuenciación que conducen al menos el número dado de emisiones de luz correlacionadas de forma colectiva con respecto a la identidad de al menos el número dado de bases comprendidas por el ácido nucleico, y el método comprende la identificación de al menos el número dado de bases comprendidas por el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el número dado puede ser, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, o 500.

Los métodos de secuenciación pueden comprender la determinación de la identidad de una o más bases comprendidas por un ácido nucleico. En algunas realizaciones de los métodos de acuerdo con la invención, en los que la realización de secuenciación de una sola molécula de ácido nucleico conduce a la emisión de luz que se detecta con al menos un detector de luz que comprende al menos un primer sensor óptico y un segundo sensor óptico, y se procesa la señal de salida de los al menos dos sensores ópticos, la identidad de al menos una base comprendida por un ácido nucleico se puede determinar por comparación de al menos un resultado del procesamiento con al menos un resultado conocido que corresponde al menos un tipo conocido.

Por ejemplo, un resultado del procesamiento por indicar un tiempo en el que se produjo la reacción; cuando la luz emitida se correlaciona temporalmente con la identidad de al menos una base comprendida por el ácido nucleico, dicho tiempo se puede usar para identificar al menos una base comprendida por el ácido nucleico.

En otro ejemplo, un resultado del procesamiento puede ser una determinación del fluoróforo que se incorporó en el producto de una reacción; cuando la luz emitida se correlaciona espectralmente con la identidad de al menos una base comprendida por el ácido nucleico, dicha determinación se puede usar para identificar al menos una base comprendida por el ácido nucleico.



### 3.1.2.1 Secuenciación de extensión de bases: extensión en etapas

En algunas realizaciones, un aparato de detección proporcionado por la invención se puede usar para detectar luz generada durante la secuenciación de extensión de bases. En algunas realizaciones, la secuenciación de extensión de bases comienza uniendo una muestra de ácido nucleico dúplex parcial que comprende un ácido nucleico monocatenario a secuenciar, un cebador de unión terminal asociado con el extremo en la posición 3' del ácido nucleico a secuenciar, y un cebador de secuenciación hibridado al mismo, a un sitio conector. En algunas realizaciones, se pueden aplicar polimerasa y nucleótidos modificados a continuación al aparato de detección de luz en un tampón adecuado. En algunas realizaciones, el complejo de muestra de ácido nucleico se puede fijar al sitio conector mediante una polimerasa en un sitio conector. En algunas realizaciones, los nucleótidos pueden incluir una etiqueta detectable unida de forma covalente, por ejemplo, una etiqueta fluorescente, y un grupo de bloqueo para prevenir cualquier extensión secundaria. Por consiguiente, la secuenciación se detiene después de la adición de un solo nucleótido al extremo en la posición 3' del cebador de secuenciación.

En una primera etapa de una realización de una reacción de secuenciación de extensión de bases, se puede añadir un nucleótido con un grupo de bloqueo fluorescente mediante una ADN polimerasa al extremo en la posición 3' del cebador de secuenciación. En algunas realizaciones, la etiqueta fluorescente puede actuar como el grupo de bloqueo. En otras realizaciones, pueden ser restos separados. Un solo nucleótido se puede incorporar en el extremo en la posición 3' del cebador de secuenciación y se identifica por su etiqueta con el detector de luz correspondiente. La etiqueta fluorescente y el grupo de bloqueo se retiran a continuación, por ejemplo, mediante lisis química o enzimática, para permitir ciclos adicionales de extensión de bases. En ciertas realizaciones, los grupos de etiqueta y de bloqueo se pueden eliminar de forma simultánea o de forma secuencial y en cualquier orden. Al recopilar el orden de las bases añadidas, la secuencia de la muestra de ácido nucleico se puede deducir en la dirección en la posición 3' a 5', de una base a una base.

Generalmente, existen dos maneras para reconocer el nucleótido añadido durante la extensión en etapas. En el primer caso, los cuatro nucleótidos pueden tener la misma etiqueta detectable, pero se añaden de uno en uno, en un orden determinado previamente. La identidad del nucleótido extendido se puede determinar mediante el orden en el que se añade el nucleótido en la reacción de extensión. El segundo modo para reconocer la base integrada durante la extensión, se pueden añadir cuatro nucleótidos diferentes al mismo tiempo y cada uno se acopla con una etiqueta distinta. En diferentes realizaciones, los espectros y/o la intensidad de excitación o de emisión puede diferir. La identidad del nucleótido añadido en la extensión se puede determinar mediante la intensidad y/o longitud de onda (es decir, espectros de excitación o emisión) de la etiqueta detectada.

### 3.1.2.2 la y la secuenciación mediante síntesis: extensión en múltiples etapas

En algunas realizaciones, la secuenciación mediante síntesis puede evolucionar con múltiples extensiones sin interrumpir, por ejemplo, sin el uso de grupos de bloqueo. En esta realización es, la reacción de polimerización se puede controlar detectando la liberación del pirofosfato después de la hidrólisis de nucleósido trifosfato, es decir, la liberación del complejo de fosfato  $\beta$  y  $\gamma$ . Este complejo se puede detectar directamente, por ejemplo, con un resto fluorescente en el complejo, o indirectamente, por ejemplo, por acoplamiento del pirofosfato a un sistema de detección quimio- o bioluminiscente, como se ha analizado anteriormente.

En algunas realizaciones, la muestra de ácido nucleico se puede secuenciar básicamente de forma continua mediante el uso de nucleótidos etiquetados con fosfato terminal. Algunas realizaciones a modo de ejemplo de nucleótidos etiquetados con fosfato terminal y métodos de su uso se describen, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N° 7.361.466 y en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2007/0141598, publicada el 21 de junio de 2007. En resumen, los nucleótidos se pueden aplicar al sistema proporcionado por la invención y, cuando se hidroliza durante la polimerización, el pirofosfato etiquetado se puede detectar mediante un detector de luz correspondiente. En algunas realizaciones, los cuatro nucleótidos pueden comprender distintas etiquetas y se pueden añadir de forma simultánea. En algunas realizaciones, los nucleótidos pueden comprender etiqueta que no se pueden distinguir, por ejemplo, idénticas, y se pueden añadir secuencialmente en un orden determinado previamente. La adición cíclica, secuencia de nucleótidos con etiquetas que no se pueden distinguir todavía permite múltiples etapas de polimerización sin interrumpir, por ejemplo, en secuencias de homopolímeros.

### 3.1.2.3 Secuenciación basada en ligasa

En otras realizaciones, una muestra de ácido nucleico se puede secuenciar en el aparato proporcionado por la invención mediante secuenciación con ligasa. Algunos métodos de secuenciación basada en ligasa se desvelan, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.750.341, la publicación de PCT WO 06/073504, y Shendure *et al.*, *Science*, 309: 1728-1732 (2005). En el método de Shendure *et al.*, por ejemplo, una muestra de ADN monocatenario desconocido se puede flanquear con dos cebadores de unión terminal y se puede inmovilizar en un soporte sólido. Una posición en particular en la secuencia desconocida (por ejemplo, la  $n^{\text{ésima}}$  base proximal a un cebador de unión terminal en particular) se puede interrogar mediante hibridación de un cebador de ancla denominado de este modo (que es análogo al un cebador de secuenciación) a uno de los cebadores de unión terminal y a continuación se puede aplicar una combinación de 4 nonúmeros degenerados a la mezcla. Los cuatro nonúmeros tienen distintas etiquetas fluorescentes y están degenerados en todas las posiciones excepto en la

posición de búsqueda, en la que cada nonúmero interroga con una base distinta - A, C, G, o T. La muestra se lava, se escanea con fluorescencia, y se identifica la base de búsqueda. A continuación, el cebador de ancla y el nonúmero ligado se separan de la muestra de ácido nucleico, el dispositivo se lava, y el proceso se repite, buscando una posición diferente. De forma ventajosa, este método no es progresivo, es decir, no es necesario la búsqueda de las bases en orden. Por lo tanto, los errores no son acumulativos. Además, este método puede buscar nucleótidos de cualquier dirección en la posición 5' o en la posición 3', es decir, no necesita síntesis canónica de ADN en la posición 5' → 3'. Por lo general con este método se puede secuenciar un total de aproximadamente 13 bases de una muestra de ácido nucleico.

### 3.1.2.4 Secuenciación de tercera generación

En algunas realizaciones, una muestra de ácido nucleico se puede secuenciar en el aparato proporcionado por la invención usando secuenciación de tercera generación. En la secuenciación de tercera generación, un portaobjetos con un revestimiento de aluminio con muchos agujeros pequeños (~50 nm) se usa como una vía de onda en modo cero (véase, por ejemplo, Levene *et al.*, *Science* 299, 682-686 (2003)). La superficie de aluminio se protege de la unión de la ADN polimerasa mediante química de polifosfonato, por ejemplo, química de polivinilfosfonato (véase, por ejemplo, Korkach *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 1176-1181 (2008)). Esto da como resultado una unión preferente de las moléculas de ADN polimerasa a la sílice expuesta en los agujeros del revestimiento de aluminio. Esta organización permite que se usen fenómenos de ondas evanescentes para reducir el fondo de fluorescencia, lo que permite el uso de concentraciones más elevadas de dNTP etiquetados con fluorescencia. El fluoróforo se une al fosfato terminal de los dNTP, de modo que la fluorescencia se libera después de la incorporación del dNTP, pero el fluoróforo no permanece unido al nucleótido recién incorporado, lo que significa que el complejo está listo inmediatamente para otra ronda de incorporación. Con este método, se puede detectar la incorporación de los dNTP en complejos individuales de cebador-molde presentes en los agujeros del revestimiento de aluminio. Véase, por ejemplo, Eid *et al.*, *Science* 323, 133-138 (2009). El uso del sistema de detección de acuerdo con la presente invención puede proporcionar una sensibilidad elevada, lo que permite una detección más eficaz de los dNTP incorporados, dando como resultado tasas de error relativamente bajo y/o lecturas más largas de los datos de las secuencias que se pueden interpretar.

### 3.1.3 Aplicaciones adicionales

Un sistema de detección de acuerdo con la presente invención puede detectar de forma simultánea millones de segmentos de ácidos nucleicos. Si cada segmento tiene una longitud de, por ejemplo, 1000 bases, se podría obtener un solo dispositivo cadena arriba de billones de secuencias de bases de una vez. A continuación se analizan algunas aplicaciones adicionales de los aparatos y métodos que se proporcionan en el presente documento.

#### 3.1.3.1 Secuenciación de todo el genoma

Un sistema de detección de acuerdo con la presente invención se puede usar para realizar secuenciación total o parcial del genoma de, por ejemplo, un virus, bacterias, hongos, eucariotas, o vertebrado, por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

El ADN genómico se puede cortar en fragmentos de al menos 20, 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1200, 1500 nucleótidos, o más largos, para secuenciación. En algunas realizaciones, el ADN genómico cortado puede tener una longitud de 20 a 50, de 20 a 100, de 20 a 500, de 20 a 1000, de 500 a 1200, o de 500 a 1500 nucleótidos. En algunas realizaciones, se puede hacer que los ácidos nucleicos a secuenciar, junto con cebadores de unión terminal asociados, se han monocatenarios, se pueden hibridar a un cebador de secuenciación, y se pueden aplicar a un sistema proporcionado por la invención para secuenciación tal como se ha descrito anteriormente.

#### 3.1.3.2 Formación de perfiles de expresión genética

En otras realizaciones, un sistema de detección de acuerdo con la presente invención se puede usar para secuenciar ADNc para formación de perfiles de expresión genética. Por ejemplo, los niveles de ARNm se pueden cuantificar midiendo la frecuencia relativa a la que se detecta una secuencia en particular en un dispositivo. Se pueden secuenciar varios millones de moléculas de ADNc en paralelo en un dispositivo proporcionado por la invención. Si una célula contiene, como promedio, 350.000 moléculas de ARNm, se espera que un transcrito presente en incluso una copia por célula se pueda secuenciar aproximadamente tres veces en un millón de reacciones de secuenciación. Por consiguiente, los dispositivos proporcionados por la invención son adecuados para secuenciación de una sola molécula con sensibilidad del número de copias individuales.

La síntesis del ADNc se conoce bien en la técnica y por lo general incluye extracción de ARN total con enriquecimiento opcional de ARNm. El ADNc se produce a partir de ARNm mediante etapas que incluyen, por ejemplo: transcripción inversa, para síntesis de la primera hebra; tratamiento de RNAsa, para retirar el ARN residual; cebado aleatorio de hexámero de la primera hebra, y síntesis de la segunda hebra con ADN polimerasa. El ADNc resultante es adecuado para secuenciación en los dispositivos proporcionados por la invención. Algunos métodos para aislar y preparar tanto ADN como ARN se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª edición (2001), de Joseph Sambrook y David Russell.

En algunas realizaciones, el ADNc se puede ligar con ácidos poli nucleicos adaptadores, los adaptadores se pueden procesar con enzimas de restricción especializadas, y por último, los ácidos nucleicos procesados se unen a oligonucleótidos complementarios fijados en sitios conectores de un aparato proporcionado por la invención. En realizaciones en particular, las moléculas adaptadoras pueden ser cebadores de unión terminal.

- 5 En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, la cola de poli-A de un ARNm puede servir como un cebador de unión terminal adecuado, que es complementario a un cebador de secuenciación de poli T.

### 3.1.3.3 Detección y/o medida de interacciones de unión

10 En otras realizaciones, un aparato de detección se puede usar para detectar diversas interacciones de unión que incluyen, por ejemplo, emparejamientos de bases de ADN/ADN, ARN/ARN, o ADN/ARN, interacciones de ácido nucleico/proteína, antígeno/anticuerpo, unión de receptor/ligando, y unión de enzima/sustrato. En general, una molécula de muestra se puede fijar a una molécula de unión que comprende una etiqueta de ácido nucleico de identificación (ID). En algunas realizaciones, la molécula de unión puede comprender adicionalmente una molécula de captura que se une a la molécula de muestra. La molécula de unión también debe comprender un medio para unirse a un sitio conector; por ejemplo, un resto para facilitar la unión química covalente, tal como uniones de disulfuro, tioéster, amida, fosfodiéster, o éster; o mediante unión no covalente, por ejemplo, unión de anticuerpo/antígeno o de biotina/avidina. En algunas realizaciones, una molécula de unión se puede fijar a la matriz mediante la etiqueta de ID.

20 Una molécula de muestra se puede aplicar a un sistema de acuerdo con la presente invención y se puede fijar a un sitio conector aleatorio mediante su molécula conectora, por ejemplo, mediante la unión de una molécula de captura localizada en la molécula de unión. En algunas realizaciones, la molécula de muestra de las moléculas conectoras se pueden mezclar, se puede permitir que se unan, y a continuación aplicar a un dispositivo proporcionado por la invención. En algunas realizaciones, la molécula conectora se puede aplicar primero al dispositivo, permitir que se fije a un sitio conector, y a continuación se puede aplicar la molécula de muestra. A continuación, la ID se puede detectar (por ejemplo, mediante hibridación o secuenciación) con los métodos de acuerdo con la invención para identificar la molécula de muestra asociada. Una pluralidad de especies de moléculas de muestra se pueden fijar a la misma matriz y se pueden distinguir por su etiqueta aunque sus interacciones de unión se pueden caracterizar usando las ID únicas de la molécula de captura a la que se une. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un método para detectar una molécula de muestra etiquetada puede comprender las etapas de unión de una molécula de muestra a un sitio con lector de un sistema de acuerdo con la presente invención con una molécula conectora que comprende una etiqueta de ácido nucleico (ID), realización de secuenciación de ácidos nucleicos de la ID, y detección de la molécula de muestra etiquetada. En realizaciones en particular, la secuenciación de ácidos nucleicos puede ser secuenciación de extensión de bases. En algunas realizaciones, la secuenciación de los ácidos nucleicos se puede elegir entre secuenciación basada en ligasa, o secuenciación de nucleótidos etiquetados con fosfato terminal.

35 Con el uso de "bits" de nucleótidos, se pueden fijar hasta  $4^n$  moléculas de captura distintas y se pueden fijar en un sistema de detección de acuerdo con la presente invención, en las que n es un número natural que representa la longitud de la ID secuenciada. Por ejemplo, 5 nucleótidos podrían proporcionar aproximadamente mil ID únicas, mientras que 12 nucleótidos proporcionan aproximadamente 16 millones de combinaciones. Por ejemplo, algunas moléculas conectoras se pueden fijar a un sistema de acuerdo con la presente invención y sus ubicaciones se pueden determinar detectando su etiqueta de ID correspondiente. A continuación, las moléculas conectoras pueden servir como sondas para, por ejemplo, investigar interacciones de unión con una o más moléculas de muestra etiquetadas. Es decir, un sistema con uno o más moléculas conectoras fijadas al mismo puede servir como una matriz de ensayo.

45 En ciertas realizaciones, las moléculas de muestra etiquetadas se pueden etiquetar con fluorescencia. Cuando se unen a la molécula de captura de una molécula conectora, una molécula de muestra etiquetada se puede detectar con el detector de luz que corresponde al sitio conector en el que se fija la molécula conectora. Por consiguiente, la presente divulgación puede comprender adicionalmente las etapas de aplicación de una molécula de muestra etiquetada a un sistema de acuerdo con la presente invención y detección de la molécula de muestra etiquetada. En realizaciones en particular, el sistema puede tener moléculas conectoras que comprenden una etiqueta de ácido nucleico (ID) fijada a sus sitios conectores. Múltiples moléculas de muestra etiquetadas se pueden aplicar a una matriz de sonda de forma simultánea y se pueden diferenciar por sus etiquetas, por ejemplo, por la intensidad y/o longitud de onda de sus etiquetas fluorescentes. Las constantes de disociación para interacciones de unión entre moléculas de muestra y moléculas de búsqueda etiquetadas se pueden deducir basándose tanto en la cinética (por ejemplo, tasas de replicación/no replicación) como en la estadística (por ejemplo, las porciones de moléculas de muestra en el estado unido o no unido en un tiempo dado) a una concentración dada de una molécula de búsqueda etiquetada.

60 En algunas realizaciones, la ID de una molécula de unión puede tener una longitud de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 90, 100, 150, 200, o más o más nucleótidos. En algunas realizaciones, la ID puede tener una longitud de 5 a 10, 20, 40, 80, o 160; o de 10 a 20 o 50; o de 20 a 35 nucleótidos. La ID contiene una secuencia de ácidos nucleicos única, es decir, un ácido nucleico a detectar. En realizaciones en particular, la secuencia de ácidos

nucleicos única puede tener una longitud de al menos 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, o más nucleótidos. En algunas realizaciones, la secuencia de ácidos nucleicos única puede tener una longitud de 4 a 10, 12, 15, o 20; o de 10 a 20 nucleótidos. La ID puede comprender al menos un cebador de unión terminal, es decir, la ID puede contener una secuencia complementaria con un cebador de secuenciación, que, en algunas realizaciones, se puede modificar para que se una a un sitio conector, por ejemplo, conteniendo un nucleótido biotinilado. En algunas realizaciones, la porción de cebador de unión terminal de la ID puede estar en la posición 3' con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos única. En algunas realizaciones, puede estar en la posición 5' con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos única. En otras realizaciones más, los cebadores de unión terminal pueden estar presentes en los extremos tanto en la posición 3' como la posición 5' de la secuencia de ácidos nucleicos única.

En ciertas realizaciones, las moléculas de muestra y las moléculas de captura pueden comprender restos elegidos entre un carbohidrato, lípido, proteína, péptido, antígeno, ácido nucleico, hormona, molécula orgánica pequeña (por ejemplo, un agente farmacéutico), o resto de vitamina; o una combinación de los mismos. Estos restos pueden ser de origen natural (por ejemplo, purificados de forma bioquímica) o sintéticos (por ejemplo, sintetizados de forma química o producidos de forma recombinante). Además, estos sustratos pueden contener ningún componente, algún componente, o todos los componentes no nativos (por ejemplo, aminoácidos no naturales, grupos de bloqueo o protectores, etc.). En realizaciones en particular, una molécula de muestra o moléculas de captura pueden ser proteínas, por ejemplo, un factor de crecimiento, antígeno peptídico, anticuerpo, o receptor.

En la técnica se conocen diversos medios para la conjugación de ácidos nucleicos con moléculas conectoras o sitios conectores, tal como se revisa, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004/0038331. La publicación '331 desvela métodos para formar conjugados de proteína y oligonucleótido en un soporte en fase sólida. El documento de Patente de Estados Unidos N° 4.748.111 proporciona un ejemplo de conjugación de una proteína con el extremo en la posición 3' de un ácido nucleico. En ese punto, en primer lugar se usa transferasa terminal para añadir un resto de ribosa a la porción de la molécula en el extremo 3'. A continuación, una reacción de oxidación con peryodato genera un grupo aldehído en la posición 3' en el ácido nucleico, que a continuación forma un enlace covalente con un grupo amida de una proteína. Cuando una proteína se conjuga con el extremo en la posición 3' de la ID, la unión a un sitio conector se realiza a través del extremo en la posición 5' de la ID.

En algunas realizaciones, una molécula de captura, por ejemplo, una proteína, se puede unir al extremo en la posición 5' de una ID. En estas realizaciones, el extremo en la posición 3' de la ID o el extremo en la posición 5' de un cebador de secuenciación se puede usar para fijar moléculas de captura a un sitio conector. El documento de Patente de Estados Unidos N° 6.013.434, por ejemplo, desvela conjugados de oligonucleótido-poliámina, en los que en la conexión se realiza a través del extremo en la posición 5' del oligonucleótido. El documento de Patente de Estados Unidos N° 6.197.513 desvela conjugados tanto de PNA como de ADN a moléculas con restos de ácido carboxílico, por ejemplo, proteínas, a través del extremo en la posición 5' del ácido nucleico. Las moléculas de PNA y ADN contienen restos de arilamina o aminoácido. El documento de Patente de Estados Unidos N° 6.153.737 desvela oligonucleótidos que contienen al menos un nucleósido funcionalizado en la posición 2', adecuado para conjugación al mismo de una variedad de moléculas.

### 3.1.3.4 Métodos de detección adicionales

#### (a) FRET

En algunas realizaciones, una molécula se puede detectar en un aparato de detección proporcionado por la invención mediante transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), en ocasiones conocida como transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Como se conoce en la técnica, la FRET se produce cuando una molécula dadora excitada transfiere energía de forma no radiativa a una molécula receptora, que emite la energía, por lo general en forma de luz. La FRET puede ayudar a reducir la luz de fondo, por ejemplo, proporcionando separación espectral mayor entre longitudes de onda de excitación y de emisión eficaces para una molécula que se está detectando. A menudo, la FRET se usa para detectar interacciones moleculares cercanas ya que su eficacia decae como la sexta potencia de la distancia entre moléculas dadoras yceptoras. Por ejemplo, Zhang *et al.* (*Nature Materials* 4: 826-31 (2005)) detectaron hibridación de ácidos nucleicos mediante FRET. Allí se conjugó una diana de ácido nucleico biotinilada con un dador de puntos cuánticos revestidos con avidina, que a continuación excitó a una sonda de ADN conjugada con Cy5. En algunas realizaciones, una molécula de captura etiquetada y una molécula de muestra etiquetada pueden formar un par de dador/aceptor (o viceversa) para detección mediante FRET.

En algunas realizaciones de secuenciación de ácidos nucleicos proporcionadas por la invención, los nucleótidos etiquetados de forma fluorescente pueden actuar como cromóforos aceptores para un cromóforo dador unido a una polimerasa o ligasa. Por consiguiente, en estas realizaciones, el cromóforo dador localizado en la polimerasa o ligasa puede excitar a un cromóforo aceptor en un nucleótido que se está pulverizando sobre, o ligando a, la muestra de ácido nucleico. Los nucleótidos que no están cerca de la polimerasa pueden no excitarse debido a la rápida disminución de la eficacia de FRET. En algunas realizaciones, la molécula dadora puede ser, por ejemplo, otro fluoróforo, por ejemplo, un punto cuántico. En la técnica se conocen puntos cuánticos, por ejemplo, puntos cuánticos semiconductores y se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional N° WO 03/003015. En la técnica se conocen algunos medios para acoplamiento de puntos cuánticos, por ejemplo, a biomoléculas, tal como se revisa,

por ejemplo, en Mednitz *et al.*, *Nature Materials* 4: 235-46 (2005) y en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>s 2006/0068506 y 2008/0087843, publicadas el 30 de marzo de 2006 y el 17 de abril de 2008, respectivamente. En algunas realizaciones, los puntos cuánticos se pueden conjugar con una molécula de ADN polimerasa. Como ya se ha analizado anteriormente para la conjugación de enzimas a sitios conectores, el experto en la materia observará indudablemente que cuando los fluoróforos se conjugan, por ejemplo, con una ADN polimerasa o ligasa, se debe tener cuidado para retener la función enzimática mediante el alivio de cualquier efecto de conjugación del fluoróforo en las estructuras primaria, secundaria y terciaria de la enzima.

#### (b) Excitación de múltiples fotones

En algunas realizaciones, un cromóforo se puede excitar con dos o más fotones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la excitación de ya sea un cromóforo dador o aceptor en FRET se puede realizar mediante dos o más fotones. La excitación de dos fotones y de múltiples fotones se describe adicionalmente, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup>s 6.344.653 y 5.034.613.

#### (c) Detección en tiempo resuelto

En algunas realizaciones, la fuente de luz de excitación y los detectores de luz de un aparato proporcionado por la invención se puede modular para que tenga un desplazamiento de fase característico. Usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 2008/0037008, publicada el 14 de febrero de 2008, la luz emitida desde una molécula que se está detectando en un aparato proporcionado por la invención se puede medir con un detector de luz correspondiente sin interferencia a partir de una fuente de luz de excitación.

#### (d) Citometría de flujo

En algunas realizaciones, la fuente de luz de excitación y los detectores de luz de un aparato proporcionado por la invención se puede usar para adquirir datos de citometría de flujo. La citometría de flujo por lo general implica el análisis óptico de una población de objetos en una suspensión líquida. Se puede que la suspensión fluya pasado un detector, permitiendo de este modo la detección secuencial de la luz de muchos objetos en la población. Los objetos se pueden elegir entre, por ejemplo, cells, microperlas, u otras partículas de tamaños similares, tales como partículas de un tamaño  $> 0,1 \mu\text{m}$ ,  $0,2 \mu\text{m}$ ,  $0,5 \mu\text{m}$ ,  $1 \mu\text{m}$ ,  $2 \mu\text{m}$ , o  $5 \mu\text{m}$  en al menos una dimensión (longitud, anchura, altura, diámetro, o similares, cuando sea apropiado para la forma de la partícula), y/o menor que  $5 \text{ mm}$ ,  $2 \text{ mm}$ ,  $1 \text{ mm}$ ,  $500 \mu\text{m}$ ,  $200 \mu\text{m}$ ,  $100 \mu\text{m}$ ,  $50 \mu\text{m}$ ,  $20 \mu\text{m}$  o  $10 \mu\text{m}$  en al menos una dimensión o todas las dimensiones. Los objetos se pueden hacer pasar en una sola fila entre una o más fuentes de luz de excitación y detectores, y se pueden adquirir datos de fluorescencia y/o dispersión del. En algunas realizaciones, los objetos pueden comprender al menos una, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro especies de fluoróforo. En algunas realizaciones, se detecta la luz emitida por al menos una subpoblación de los objetos.

El fluoróforo se puede elegir, por ejemplo, entre fluoróforos expresados de forma endógena por células, tales como proteínas fluorescentes (GFP, BFP, CFP, YFP, RFP, etc.), además de los fluoróforos analizados anteriormente, incluyendo fluoróforos con actividad de unión específica para una clase de biomolécula o una estructura celular (por ejemplo, DAPI, que es específica para ADN, o Azul de Evans, que tiñe membranas plasmáticas), fluoróforos conjugados con análogos de nucleótido, por ejemplo, dUTP conjugado con colorante de cianina, y fluoróforos sintéticos conjugados con un asociado de unión específico, tal como un anticuerpo, avidina, o una sonda de ácido nucleico. La cantidad de fluoróforo presente en y/o unido a una partícula, y por lo tanto la cantidad de de emisión que el fluoróforo genera cuando se excita con luz de una longitud de onda apropiada, case pueden correlacionar con la presencia y/o cantidad de una biomolécula, tal como ADN, membrana plasmática, o un ácido nucleico específico, proteína, otra biomolécula, o metabolito en o sobre la partícula.

La citometría de flujo puede comprender el análisis de una población de partículas para producir una distribución de frecuencia de intensidades de fluorescencia tal como un histograma. Cuando se usa más de un fluoróforo y/o dispersión de luz, también se adquieren datos, o la adquisición de los datos se realiza en tiempo resuelto, la distribución de la frecuencia puede ser multidimensional. El uso de una fuente de luz de excitación y detectores de luz de un aparato proporcionado por la invención puede dar como resultado datos de alta calidad, por ejemplo, permitiendo la adquisición de datos con sensibilidad privada y/o una proporción de señal a ruido elevada.

En algunas realizaciones, la realización de citometría del flujo puede comprender adicionalmente clasificación activada con fluorescencia. En tales realizaciones, las partículas se analizan en tiempo real mediante citometría de flujo y se clasifican de acuerdo con parámetros definidos por el usuario. Por ejemplo, algunas partículas que presentan fluorescencia detectable a partir de un fluoróforo dado, o que presentan tal fluorescencia dentro de un intervalo dado, se pueden clasificar aparte de las partículas que no satisfacen el criterio. Estas partículas se pueden recoger para análisis adicional. En algunas realizaciones, las partículas clasificadas de este modo son células vivas. La sensibilidad de los aparatos de detección de acuerdo con la invención puede permitir la clasificación de células con un nivel bajo de una actividad, tal como una actividad enzimática o una actividad promotora, aparte de las células en actividad indetectable y de células con actividad elevada. Por lo tanto, los métodos y aparatos de la invención pueden permitir el acceso a las poblaciones de células enriquecidas previamente inaccesibles con una

actividad promotora o enzimática baja dada.

#### (e) Otros aparatos y métodos de detección con fluorescencia

5 En algunas realizaciones, los métodos de la invención se refieren a detección de luz emitida por al menos un objeto que consiste en una célula biológica, que puede ser una célula viva o fijada. En algunas realizaciones, el al menos un objeto se elige entre al menos un objeto que comprende al menos un punto cuántico, al menos un objeto que comprende al menos una proteína fluorescente, y al menos un objeto que comprende al menos un resto tímico pequeño fluorescente. En algunas realizaciones, él al menos un objeto se etiqueta de forma fluorescente y comprende al menos un oligonucleótido, polinucleótido, oligopéptido, polipéptido, oligosacáridos polisacárido, o lípido.

10 En algunas realizaciones, el al menos un objeto comprende un número fijo y limitado de fluoróforos, tal como, como máximo 20, 10, 5, o 2 fluoróforos, que se pueden elegir entre puntos cuánticos, proteínas fluorescentes, y restos químicos pequeños fluorescentes. En algunas realizaciones, él al menos un objeto comprende solamente un solo fluoróforo elegido entre un punto cuántico, una proteína fluorescente, y un resto químico pequeño fluorescente. Anteriormente se analizaron muchos ejemplos de restos químicos pequeños fluorescentes. En algunas realizaciones, los restos químicos pequeños fluorescentes pueden tener un pico de emisión entre 300 y 800 nm y/o un rendimiento cuántico (fracción de fotones emitidos por fotón de longitud de onda de absorción máxima absorbida) de al menos 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, o 0,9.

#### 3.2 Servicio de análisis de biomoléculas

20 La presente divulgación también proporciona un método para proporcionar servicio de análisis de biomoléculas usando un aparato de detección de acuerdo con realizaciones de acuerdo con la presente invención. En algunas realizaciones, el método puede incluir las etapas de proporcionar una muestra que incluye una biomolécula a analizar desde un solicitante del servicio hasta un proveedor del servicio y el solicitante del servicio recibe los resultados analíticos del proveedor del servicio, en el que los resultados se pueden producir usando un aparato proporcionado por la invención. En algunos ejemplos, el método se puede realizar para consideración remunerativa, por ejemplo, convenios que de cuota por servicio o servicio contractual, además, la muestra se puede enviar directamente entre el solicitante del servicio y el proveedor del servicio, o se puede mediar con un vendedor. En algunas realizaciones, el proveedor o vendedor del servicio pueden estar localizados geográficamente en un territorio fuera de los Estados Unidos de América, por ejemplo en otro país.

#### 4. Ejemplos

##### 30 Ejemplo I

En este ejemplo, un aparato como se muestra en la FIG. 1 se usa para detectar y diferenciar tres tipos de objetos. El detector de luz usado en este ejemplo es un fotodiodo de múltiples uniones con una estructura P-N-P-N-P como se muestra en la FIG. 17. La capa de tipo p, 601, y la capa de tipo n, 602, constituyen el primer sensor óptico. La capa de tipo p, 603, y la capa de tipo n, 604, constituyen el segundo sensor óptico. Las tres capas de tipo p se conectan a tierra. Las capas de tipo n, 602 y 604, se conectan a electrodos para las señales de salida J1 y J2, respectivamente.

35 Como la fuente de excitación para excitar el objeto a detectar se usa un láser de diodo de 6,5 mW una longitud de onda central de 407 nm. La luz emitida desde el objeto es incidente en el detector de luz y la absorbe parcialmente el primer sensor óptico y el segundo sensor óptico, de forma secuencial. Las FIGS. 18 y 19 muestran las curvas de respuesta del primer sensor óptico y del segundo sensor óptico, respectivamente.

40 El fotodiodo de múltiples uniones se encierra dentro de una caja de color negro para minimizar el impacto de la luz del entorno. Se abre un agujero pequeño en la superficie de la caja por encima del fotodiodo. El objeto que se está detectando se inserta a través del agujero hasta una zona de detección, en la que el objeto se expone a la luz de excitación emitida desde la fuente de excitación. Un filtro óptico de capa fina de interferencia de paso largo se puede colocar entre la zona de detección y el fotodiodo para bloquear parcialmente la luz de excitación dispersada.

45 Para someter al ensayo del aparato de detección se usan tres objetos. El Objeto 1 es una primera solución de colorante que comprende Piranina disuelta en H<sub>2</sub>O desionizada con una concentración de  $5,0 \times 10^{-5}$  M, el Objeto 2 es una segunda solución de colorante que comprende Rodamina 6G (R6G) disuelta en H<sub>2</sub>O desionizada con una concentración de  $5,0 \times 10^{-5}$  M, y el Objeto 3 es una solución de puntos cuánticos que comprende puntos cuánticos con la composición de Cd<sub>x</sub>Zn<sub>1-x</sub>Se disuelta en Tolueno con una concentración de  $6,25 \times 10^{-4}$  M. Las FIGS. 20 y 21 muestran los espectros de absorción en los espectros de emisión de los tres objetos, respectivamente.

50 En este ejemplo, también se somete a ensayo una muestra de referencia que agua sin colorante ni puntos cuánticos. Los objetos y la muestra de referencia se someten a ensayo uno en cada etapa. La señal de salida J1 del primer sensor óptico y la señal de salida J2 del segundo sensor óptico se registran cada 5,12 milisegundos. Un registro de 10 lecturas consecutivas de cada objeto y las de la muestra de referencia se muestra en la Tabla 1.

55

**Tabla 1. Señales de salida desde el detector de luz**

Objeto	Sin objeto		Objeto 1		Objeto 2		Objeto 3	
	J1	J2	J1	J2	J1	J2	J1	J2
1	0,0012	0,017	0,4861	1,036	0,1423	0,787	0,051	0,3807
2	0,0022	0,017	0,4866	1,036	0,1428	0,787	0,0515	0,3807
3	0,0017	0,017	0,4851	1,036	0,1433	0,7865	0,051	0,3802
4	0,0017	0,017	0,4846	1,036	0,1418	0,7865	0,0505	0,3798
5	0,0007	0,0165	0,4866	1,036	0,1433	0,7865	0,0505	0,3807
6	0,0012	0,0165	0,4861	1,036	0,1423	0,787	0,0505	0,3807
7	0,0022	0,016	0,4851	1,036	0,1423	0,787	0,0501	0,3798
8	0,0022	0,016	0,4856	1,036	0,1428	0,787	0,0505	0,3812
9	0,0027	0,0165	0,4856	1,036	0,1438	0,7875	0,0501	0,3802
10	0,0022	0,0165	0,4851	1,036	0,1423	0,787	0,051	0,3798
Promedio	0,0020	0,017	0,486	1,036	0,143	0,787	0,051	0,380
STD	0,0006	0,0004	0,0007	0,0000	0,0006	0,0003	0,0004	0,0005

En este ejemplo, un valor de 0,2 se selecciona como el valor del umbral para determinar si un objeto está presente. Si una cualquiera de las señales de salida, J1 y J2, es mayor que 0,2, se determina que un objeto está presente.

- 5 Después de determinar la presencia de un objeto, se calcula una proporción  $R = J2/(2 \times J1)$ . Si  $0,5 < R < 1,5$ , se determina que el objeto que se está detectando es el Objeto 1. Si  $2,0 < R < 3,0$ , se determina que el objeto que se está detectando es el Objeto 2. Si  $3,5 < R < 4,5$ , se determina que el objeto que se está detectando es el Objeto 3. La Tabla 2 muestra algunos ejemplos de resultados de detección.

**Tabla 2. Ejemplos de resultados de detección**

Condiciones del Ensayo				Operación y Resultado				
				Presencia	Diferenciación			
					Criterios	Objeto 1	Objeto 2	Objeto 3
Lectura	J1	J2	Tipo	Si J1 o J2 > 0,2	$R = J2/(2 \times J1)$	$0,5 < R < 1,5$	$2,0 < R < 3,0$	$3,5 < R < 4,5$
1	0,0017	0,0155	Sin objeto	FALSO	-	-	-	-
2	0,0032	0,0155	Sin objeto	FALSO	-	-	-	-
3	0,4856	1,036	Objeto 1	VERDADERO	1,067	VERDADERO	FALSO	FALSO
4	0,4841	1,036	Objeto 1	VERDADERO	1,070	VERDADERO	FALSO	FALSO
5	0,4851	1,036	Objeto 1	VERDADERO	1,068	VERDADERO	FALSO	FALSO
6	0,1423	0,787	Objeto 2	VERDADERO	2,765	FALSO	VERDADERO	FALSO
7	0,1423	0,7855	Objeto 2	VERDADERO	2,760	FALSO	VERDADERO	FALSO
8	0,0501	0,3749	Objeto 3	VERDADERO	3,742	FALSO	FALSO	VERDADERO
9	0,0476	0,3734	Objeto 3	VERDADERO	3,922	FALSO	FALSO	VERDADERO

Condiciones del Ensayo				Operación y Resultado				
				Presencia	Diferenciación			
					Criterios	Objeto 1	Objeto 2	Objeto 3
Lectura	J1	J2	Tipo	Si J1 o J2 > 0,2	$R = J2 / (2 \times J1)$	$0,5 < R < 1,5$	$2,0 < R < 3,0$	$3,5 < R < 4,5$
10	0,0501	0,3739	Objeto 3	VERDADERO	3,732	FALSO	FALSO	VERDADERO

**Ejemplo II**

5 Un estudio reciente mostró que se puede producir un defecto en la activación de citoquinas en personas coinfectadas con VHC/VIH que limita la eficacia de la eliminación del VHC del hígado. (J. Med. Virol. 78: 202-207, 2006). El ARN viral de VHC y VIH de personas mono infectadas con VHC y coinfectadas con VHC/VIH se podría cuantificar usando un enfoque de baliza y detector molecular del Ejemplo 1.

**Extracción de ARN**

10 El ARN total se puede extraer de biopsias de hígado de personas mono infectadas con VHC y coinfectadas con VHC/VIH usando el kit de Tejido de ARN de Pureza Elevada (Roche Diagnostics; Meylan, Francia) y se puede eluir en 100 ul de agua sin Rnasa.

**Síntesis de ADNc**

15 El ARN total extraído de biopsias de hígado se transcribe de forma inversa con el kit de Transcriptasa Inversa Thermoscript usando el cebador RC21 (5'-CTC CCG GGG CAC TCG CAA GC-3' (SEC ID N°: 1)) a la VHC y el cebador gagR (5'-TTTGGTCCTTGTCTTA TGTCAGAAATG-3' (SEC ID N°: 2)) para el VIH, respectivamente. La presencia de cualquier ARN de VHC o/y VIH en la muestra provocará transcripción inversa y producirá ADNc monocatenarios complementarios. A continuación, el ARN se retira de la muestra.

**Sondas de baliza molecular**

20 Se sintetizan diferentes colores de balizas moleculares para detección de VHC o VIH. VHC: (5'-FAM-GCTAGCATTGGGCGTGCCCCGCIAGAGCTAGC-DABCYL-3' (SEC ID N°: 3)). VIH: (5'-HEX-GCTAGCATTGGGCGTGCCCCGCIAGAGCTAGC-DABCYL-3' (SEC ID N°: 4)). La detección de productos de ADNc en solución se realiza usando sondas de Balizas Moleculares (MB) que se divido con sus secuencias complementarias con etapa de desnaturalización a 95 °C durante 10 min, seguido de hibridación a 55 °C durante 4 horas.

**Detección de las Dianas**

25 La muestra de ADNc hibridar o se transporta a un reactor microfluídico embebido en electrodo (Wang, TH *et al.*, 2005) en el que se pone en marcha una región de detección enfocada con láser para rastreo de una sola molécula. La solución de muestra se introduce en la entrada de un microcanal y a continuación se dirige mediante bombeo hidrodinámico. Cuando las moléculas entran en la región del electrodo, su transporte está gobernado por fuerzas electrocinéticas controladas con electrodo, que las dirigen hacia la región de mínima energía, localizada en el centro del electrodo medio. El rayo láser enfocado de un espectroscopio de fluorescencia confocal se coloca en el extremo corriente debajo de la región de mínima energía, en el que se detectan estallidos fluorescentes emitidos desde moléculas individuales con un detector del Ejemplo 1. La presencia de VHC y VIH en la muestra se detectan y se diferencian a partir del colorante etiquetado en las sondas de baliza usando un método tal como en el Ejemplo I. La cantidad de ARN viral de VHC y VIH en la muestra se cuantifica de acuerdo con el número de la detección informada con el aparato de detección.

35 La memoria descriptiva se entiende más minuciosamente a la vista de las enseñanzas de las referencias mencionadas dentro de la memoria descriptiva. Las realizaciones dentro de la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de realizaciones de la invención y no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la invención. El experto en la materia reconoce fácilmente que otras muchas realizaciones están incluidas en la invención.

40 A menos que se indique de otro modo, se va a entender que todos los números expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. usados en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones, se modifican en todos los casos con el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique de otro modo al contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener con la presente invención. Por lo menos, y no como un intento de limitar la solicitud de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico se debería interpretar a la vista del número de dígitos significativos y enfoques de redondeo habituales.



A menos que se indique de otro modo, se va a entender que la expresión "al menos" que precede a una serie de elementos hace referencia a cada elemento en la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes para las realizaciones específicas de la invención que se describe en el presente documento. Se pretende que tales equivalentes se incluyan en las reivindicaciones adjuntas.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato para detectar un objeto capaz de emitir luz que comprende:
  - (a) un detector de luz (11)
 

que comprende al menos un primer sensor óptico y un segundo sensor óptico capaces de determinar la intensidad de la luz, en el que el primer sensor óptico (111)

y el segundo sensor óptico (112) están apilados y la luz emitida desde un objeto pasa a través del primer sensor óptico y a continuación pasa a través del segundo sensor óptico,

y en el que el primer sensor óptico y el segundo sensor óptico determinan intensidades de señales ópticas que son diferentes y estas señales ópticas diferentes se relacionan con diferentes longitudes de onda de la luz detectada; y
  - (b) un ordenador (12; 121)
 

que procesa las señales de salida generadas por los sensores ópticos y que compara un resultado del procesamiento con un resultado conocido que corresponde a un tipo de objeto conocido para determinar si el objeto pertenece al tipo de objeto conocido,

en el que el procesamiento de las señales comprende: calcular una suma de las señales; y comparar la suma con un valor de umbral para determinar la presencia de un objeto, en el que: cuando la suma es igual o mayor que el valor del umbral, se determina que un objeto está presente; y cuando la suma es menor que el valor del umbral, se determina que un objeto está ausente,

y en el que el procesamiento de las señales comprende adicionalmente:

cuando se determina que un objeto está presente; calcular una proporción de las señales; en el que la comparación de los resultados con el resultado conocido comprende la comparación de la proporción calculada con una proporción conocida que corresponde a un tipo conocido; y cuando la diferencia entre la proporción calculada y la proporción conocida está dentro de un cierto intervalo, se determina que el objeto pertenece al tipo conocido.
2. El aparato de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
  - (c) una estructura óptica que capta y dirige una luz emitida desde el objeto a sensores ópticos.
3. El aparato de la reivindicación 2, en el que la estructura óptica comprende una lente.
4. El aparato de la reivindicación 1, en el que los sensores ópticos son fotodiodos.
5. El aparato de la reivindicación 1, en el que los al menos dos sensores ópticos se forman mediante al menos dos uniones p-n apiladas dentro de un dispositivo.
6. El aparato de la reivindicación 1, en el que el detector de luz comprende un circuito de amplificador de señales, convertidor de A/D, integrador, comparador, circuito lógico, circuito de lectura, memoria, microprocesador, reloj, y/o dirección.
7. El aparato de la reivindicación 1, en el que el ordenador compara adicionalmente el resultado del procesamiento con una pluralidad de resultados conocidos que corresponden a una pluralidad de tipos conocidos para determinar el tipo al que pertenece el objeto.
8. El aparato de la reivindicación 1, en el que el ordenador compara adicionalmente la proporción calculada con una pluralidad de proporciones conocidas que corresponden a una pluralidad de tipos conocidos para determinar el tipo al que pertenece el objeto.
9. El aparato de la reivindicación 8, en el que se determina que un tipo conocido que tiene una proporción conocida que tiene la diferencia más pequeña con respecto a la proporción calculada entre la pluralidad de proporciones conocidas es el tipo al que pertenece el objeto.
10. El aparato de la reivindicación 1, en el que el objeto comprende al menos un punto cuántico, al menos una proteína fluorescente, o al menos un resto químico pequeño fluorescente.
11. El aparato de la reivindicación 1, en el que el objeto se etiqueta de forma fluorescente y comprende al menos un oligonucleótido, polinucleótido, oligopéptido, polipéptido, oligosacárido, polisacárido, o lípido.
12. El aparato de la reivindicación 1, en el que el objeto comprende un objeto diana sin capacidad de emisión de luz y un objeto de etiquetado con capacidad de emisión de luz.

13. El aparato de la reivindicación 1, en el que el objeto comprende un objeto diana sin capacidad de emisión de luz y un grupo de objetos etiquetados con capacidad de emisión de luz.

5 14. El aparato de la reivindicación 1, en el que el detector de luz es uno de al menos un detector de luz para detectar una pluralidad de objetos, estando la pluralidad de objetos formada por una suspensión líquida, y la suspensión fluye después del al menos un detector de luz.

15. Un sistema para detectar una pluralidad de objetos, sistema que comprende una matriz de los aparatos de la reivindicación 1.

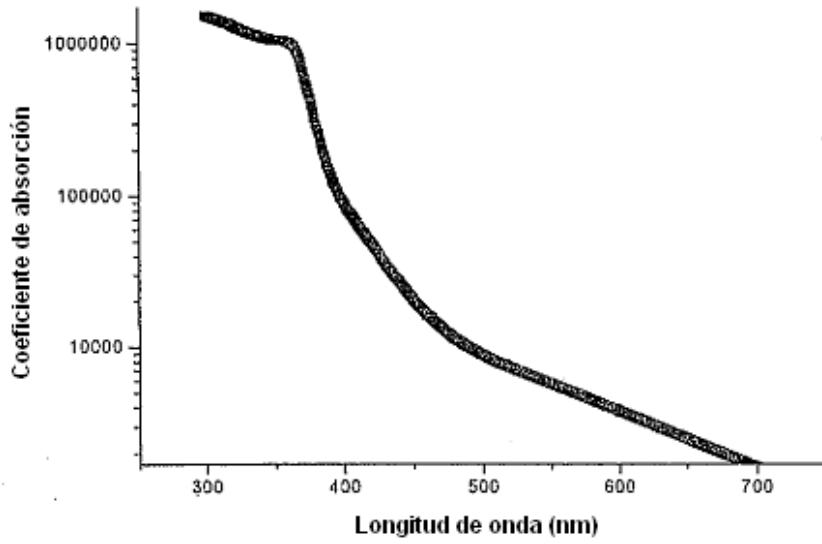


FIG. 1

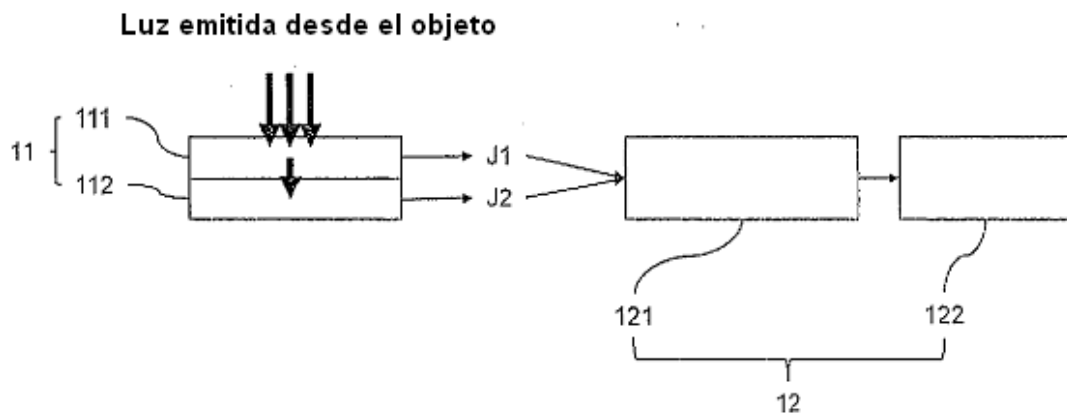


FIG. 2

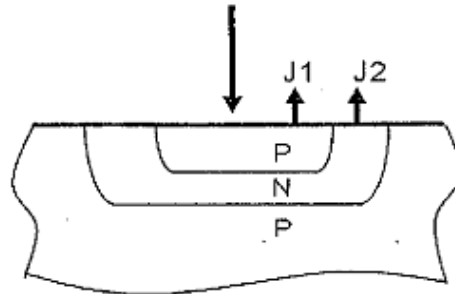


FIG. 3

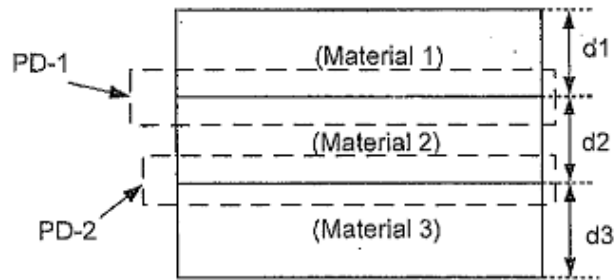


FIG. 4

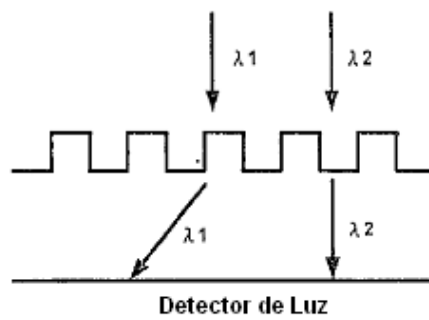


FIG. 5

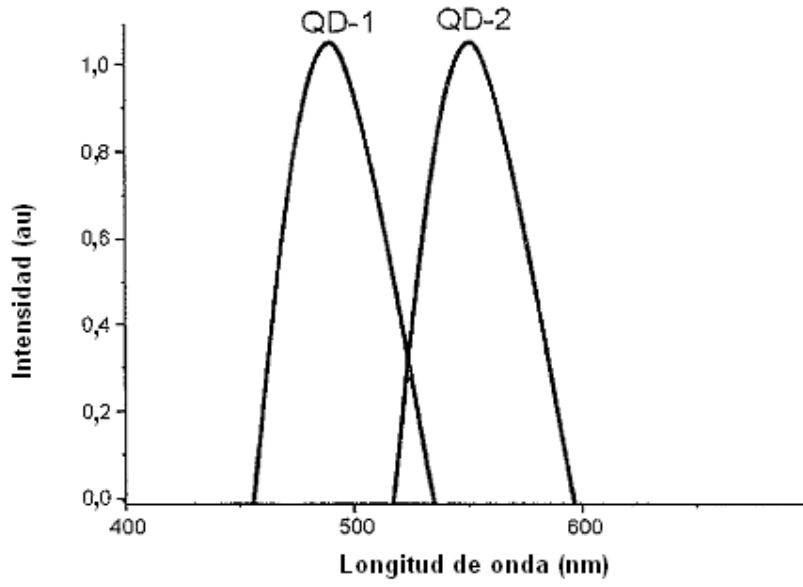


FIG. 6

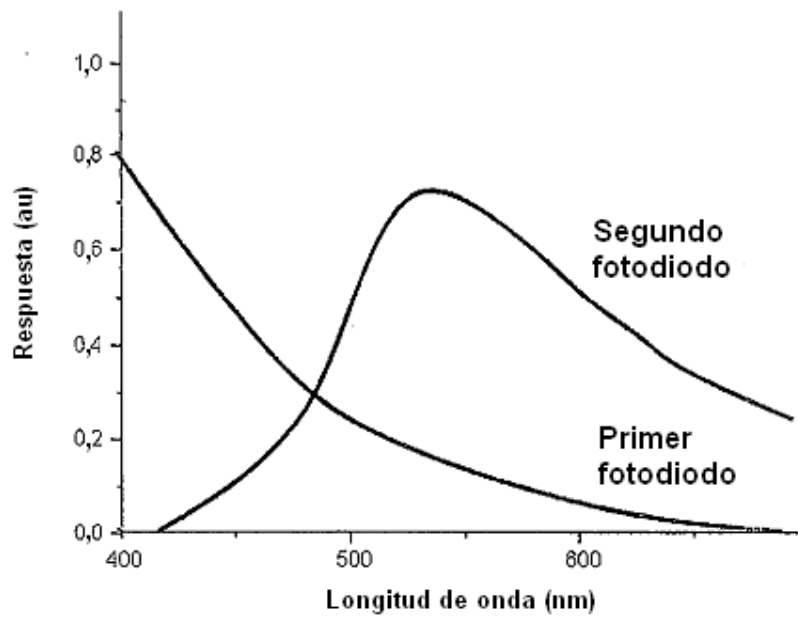


FIG. 7

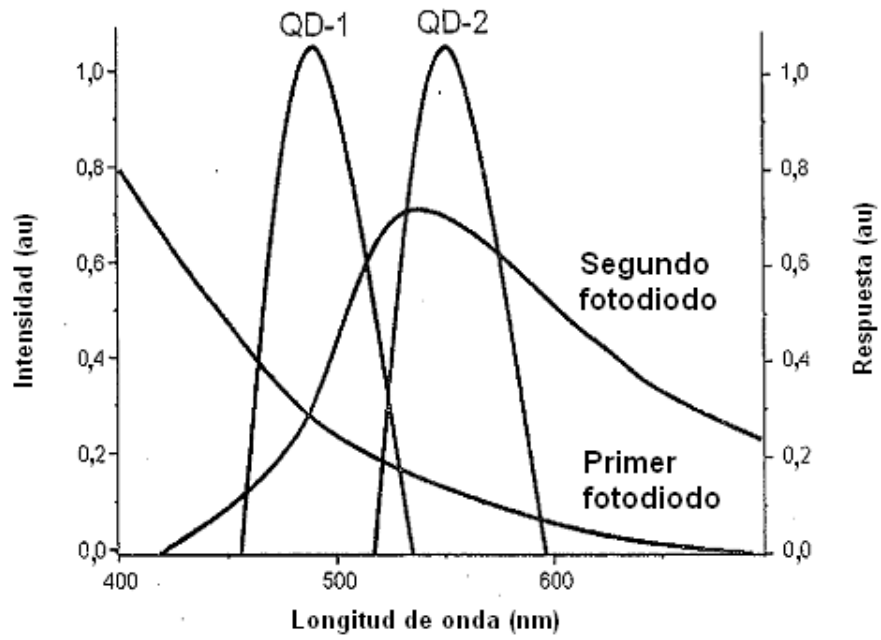


FIG. 8

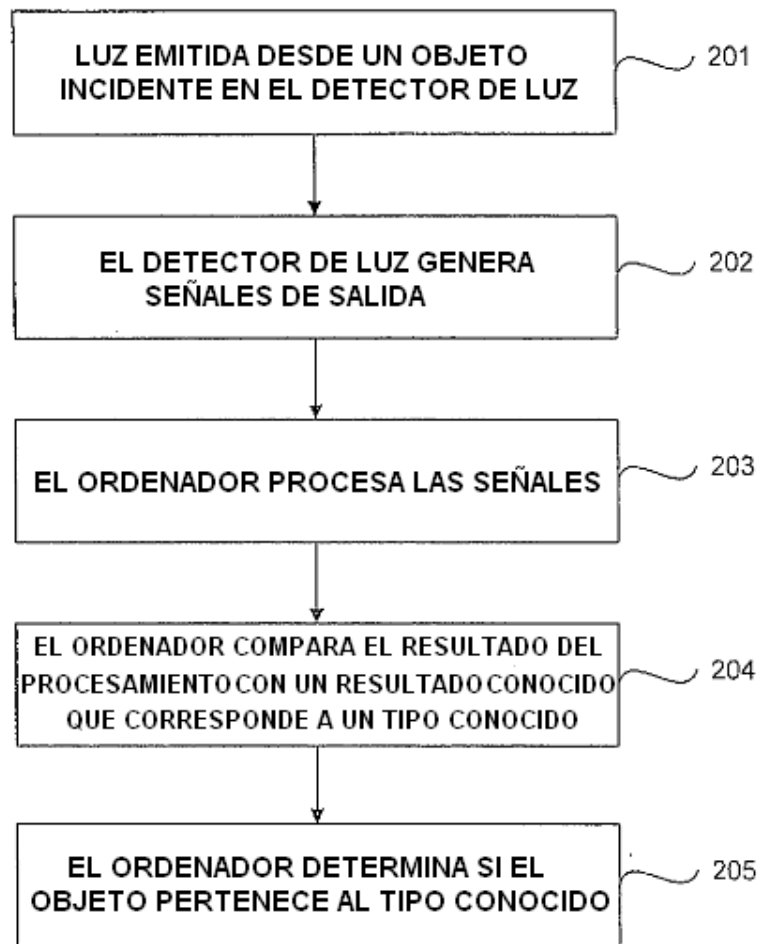


FIG. 9



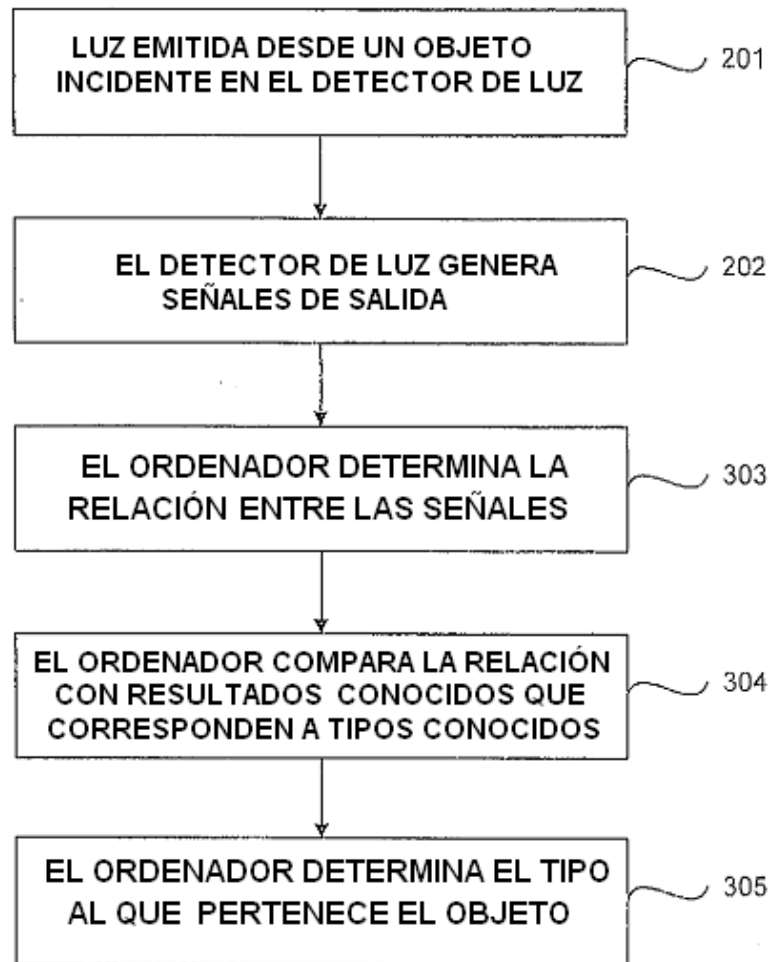


FIG. 10

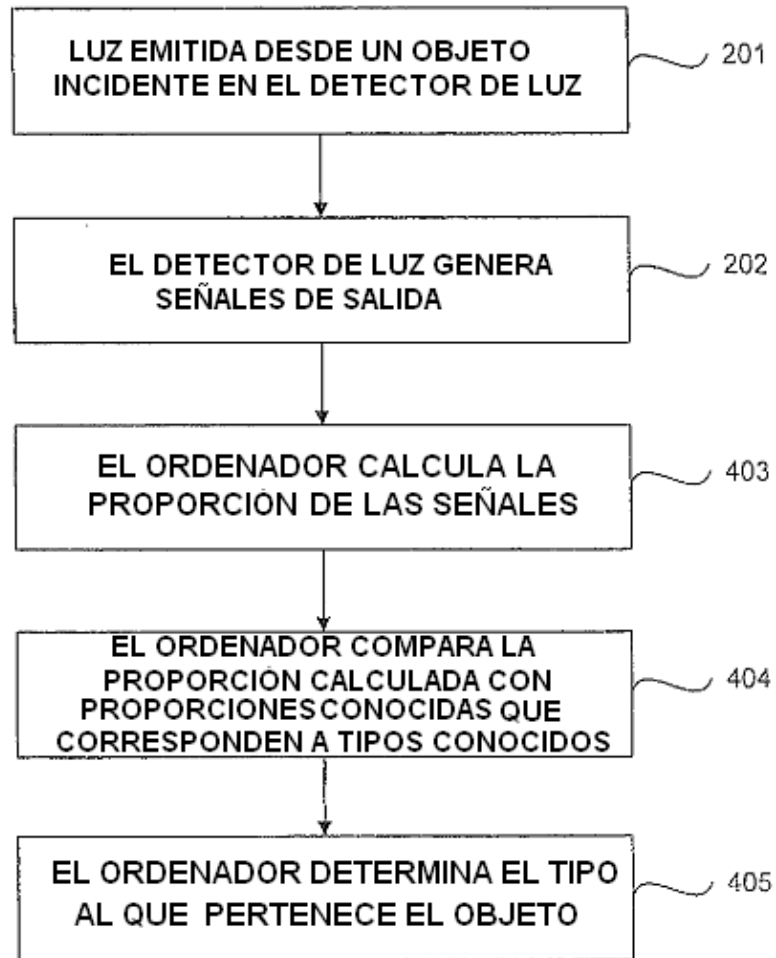


FIG. 11

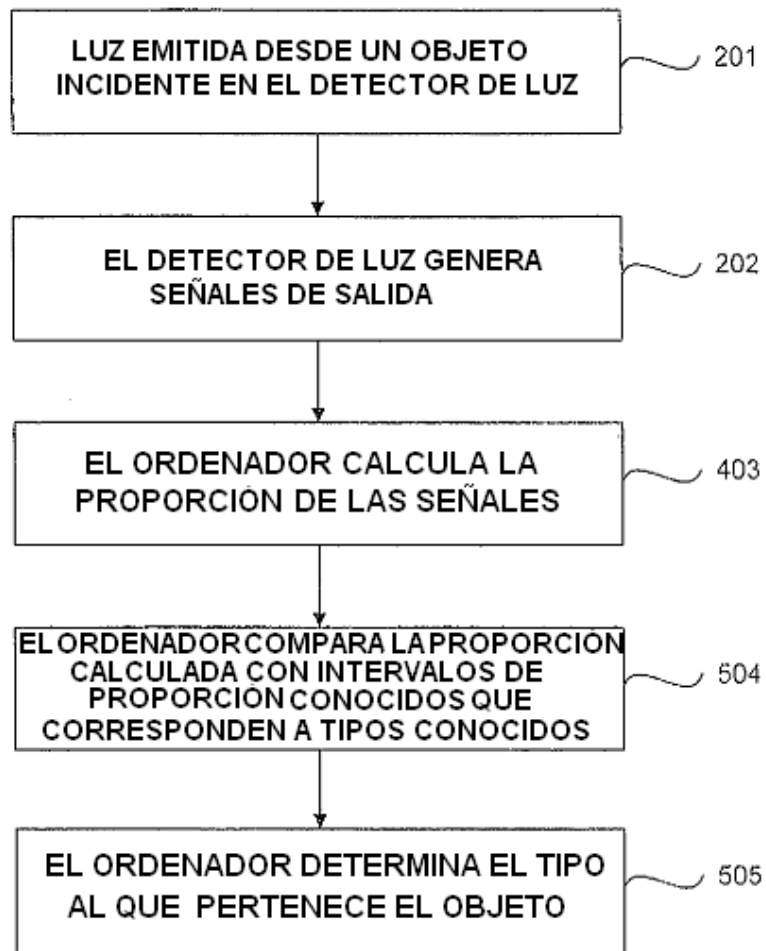


FIG. 12



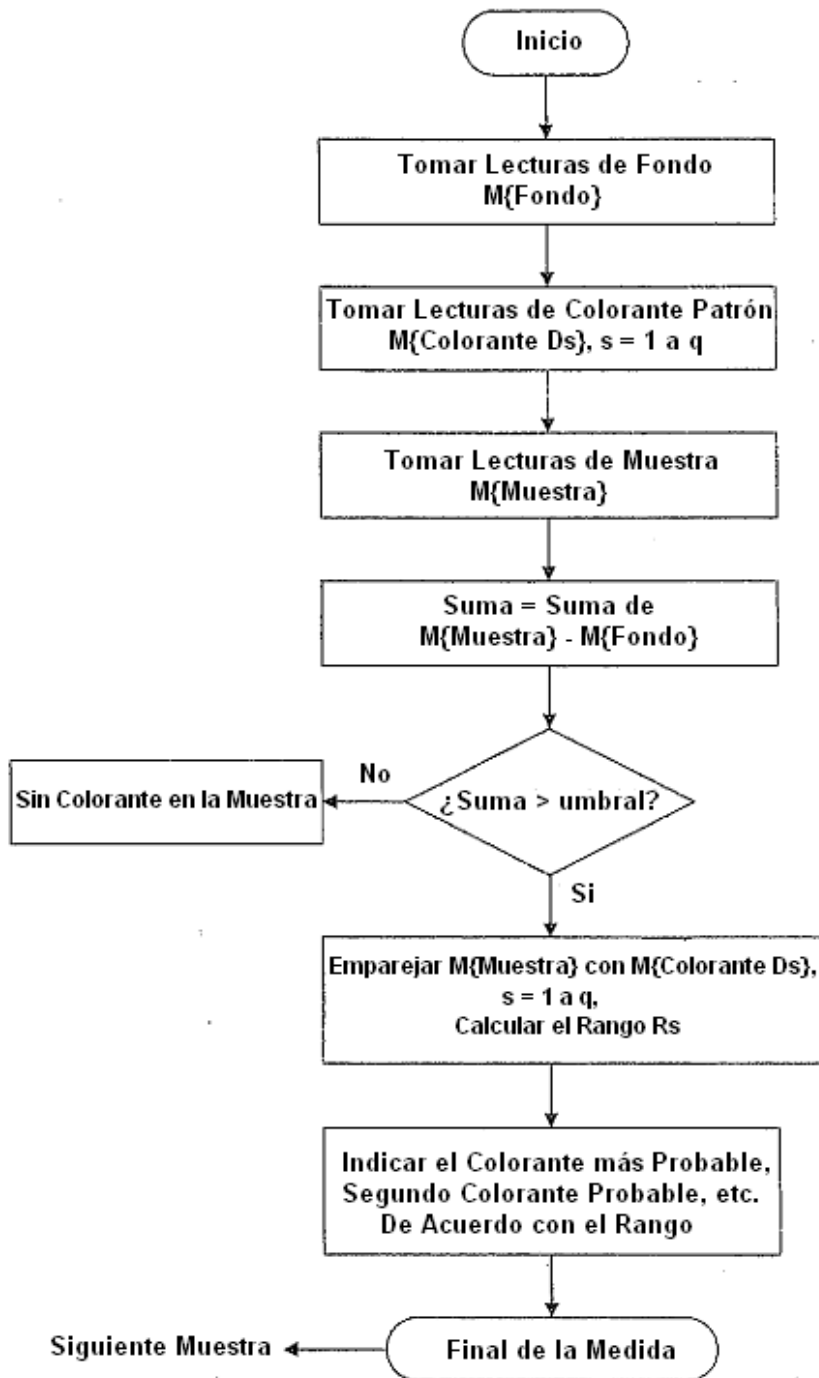


FIG. 14

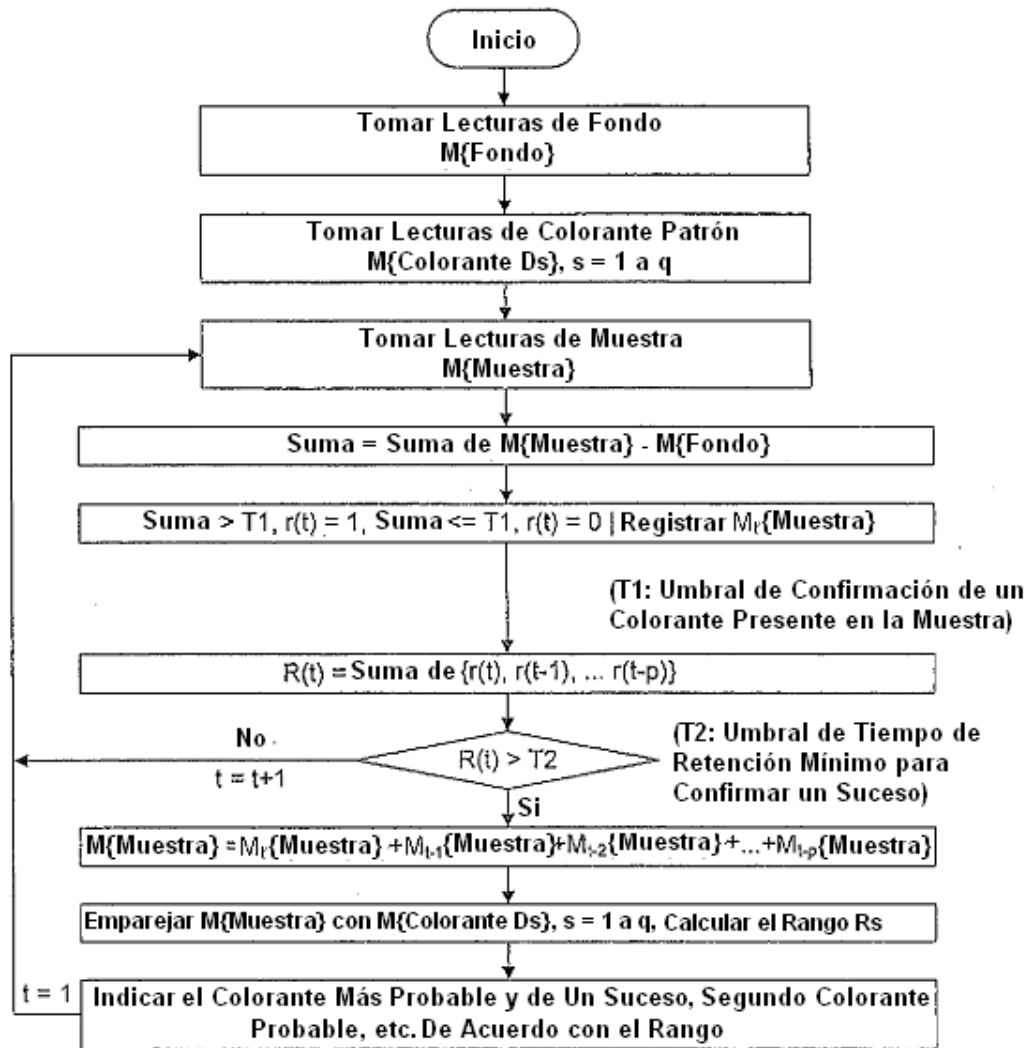


FIG. 15

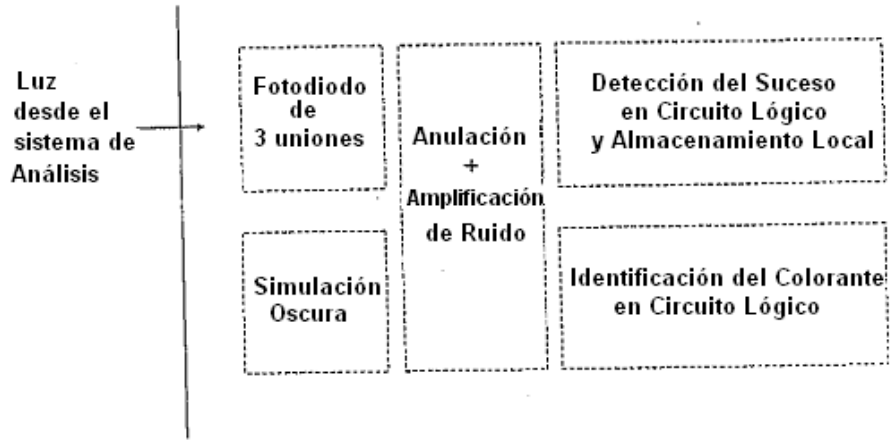


FIG. 16

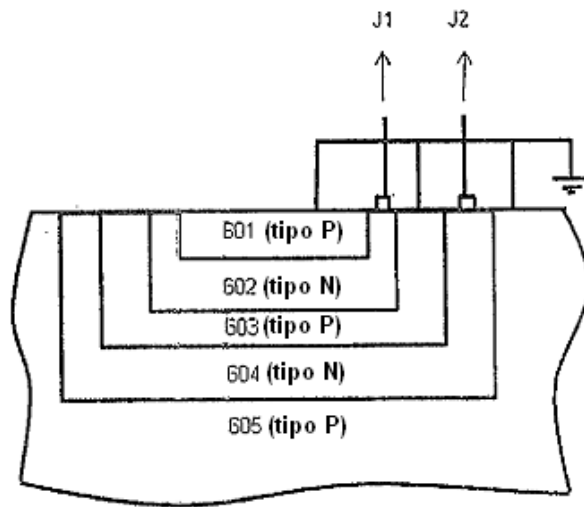


FIG. 17

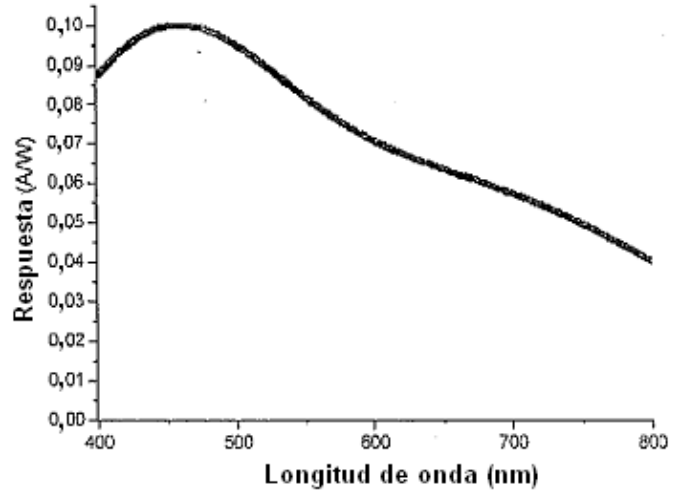


FIG. 18

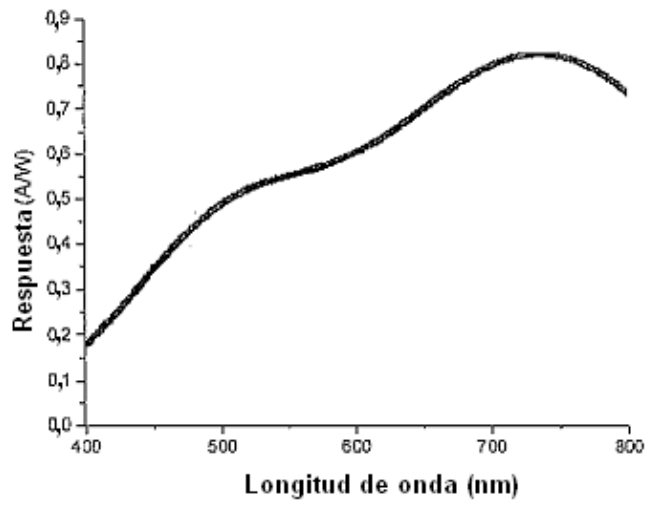


FIG. 19



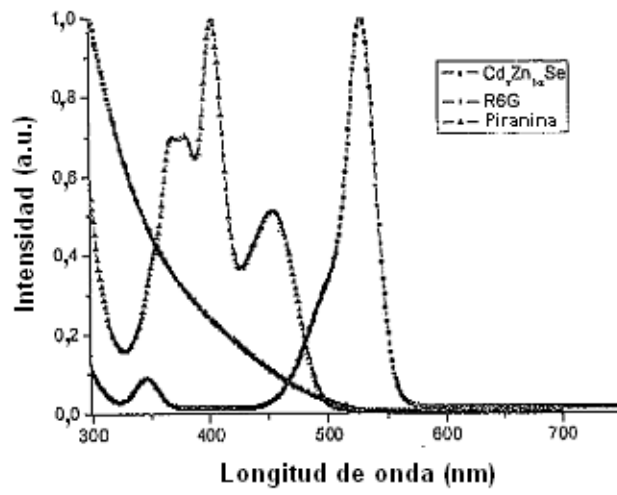


FIG. 20

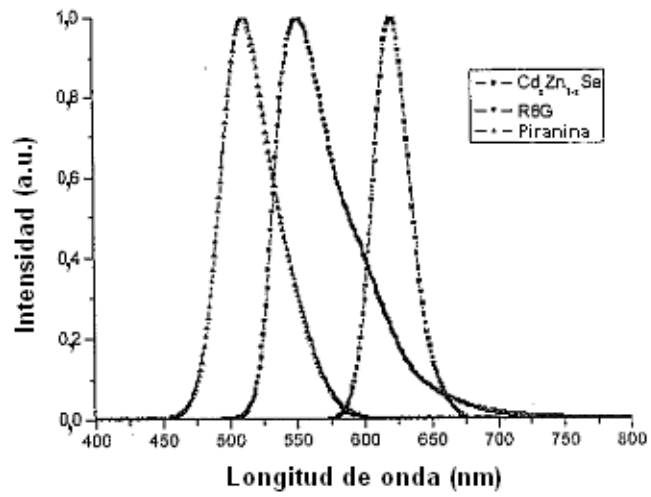


FIG. 21