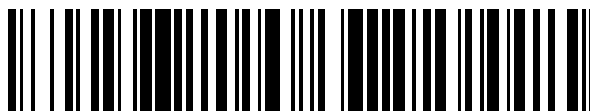


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 655**

51 Int. Cl.:

G02B 21/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2010 PCT/US2010/056844**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11093939**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2010 E 10782760 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2531880**

54 Título: **Procedimientos de enfoque y sistemas y conjuntos ópticos que usan los mismos**

30 Prioridad:

01.02.2010 US 300300 P

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

11.01.2017

73 Titular/es:

**ILLUMINA INC. (100.0%)
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122, US**

72 Inventor/es:

**BUERMANN, DALE y
KINDWALL, ALEXANDER P.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 596 655 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de enfoque y sistemas y conjuntos ópticos que usan los mismos

Antecedentes de la invención

5 Las realizaciones de la presente invención se refieren en general a sistemas y conjuntos ópticos, y más específicamente a procedimientos de enfoque para sistemas y conjuntos ópticos microscópicos. El documento WO 2008/032100 A1 describe un procedimiento según el preámbulo de la reivindicación 1 y un sistema óptico según el preámbulo de la reivindicación 9.

10 Existe una amplia diversidad de sistemas ópticos microscópicos para observar una muestra de interés que comprende sustancias biológicas o químicas. Por ejemplo, los generadores de imágenes de muestras pueden estar configurados para detectar una actividad que es indicativa de una reacción deseada (por ejemplo, eventos de unión entre los objetivos y las sondas). Dicha actividad puede ser identificada mediante la detección de emisiones de luz (por ejemplo, fluorescencia o quimioluminiscencia) desde los marcadores que se unen selectivamente a los objetivos o a las sondas. A continuación, la luz detectada es analizada para determinar las propiedades o las características de las sustancias biológicas o químicas. Existen otros sistemas ópticos microscópicos que están configurados para inspeccionar un objeto para determinar ciertas características o estructuras del objeto. Por ejemplo, los sistemas ópticos pueden ser usados para inspeccionar una superficie de un chip semiconductor u oblea de silicio para determinar si existen cualquier desviación o defecto en un patrón en la superficie. Otros sistemas ópticos incluyen perfilómetros que determinan los perfiles de la superficie de un objeto.

20 Los sistemas ópticos convencionales, tales como los descritos anteriormente, incluyen generalmente un sistema de control de enfoque que determina si el sistema óptico tiene o no un grado de enfoque aceptable con respecto al objeto. Por ejemplo, algunos sistemas ópticos convencionales usan un procedimiento de enfoque que incluye reflejar un haz de luz de referencia en una superficie del objeto y detectar el haz de luz reflejado con un detector (por ejemplo, un detector sensible a la posición (Position-Sensitive Detector, PSD)). El haz de luz reflejado forma un punto de haz sobre una superficie del detector. Si el punto de haz está desplazado una cierta cantidad con relación a una ubicación deseada sobre la superficie o si el punto de haz tiene una cierta morfología (por ejemplo, tamaño, forma y/o densidad), el sistema de control de enfoque puede determinar que el sistema óptico no está en foco apropiadamente y puede ajustar el objeto o los componentes ópticos del sistema en consecuencia.

25 Sin embargo, los sistemas de control de enfoque de dichos sistemas ópticos convencionales tienen ciertas limitaciones. Los sistemas de control de enfoque incluyen frecuentemente varios componentes ópticos que afectan a la trayectoria óptica del haz de luz de referencia antes y después de que el haz de luz sea reflejado por el objeto. Si cualquiera de estos componentes ópticos es desplazado de alguna manera desde una posición predeterminada durante el funcionamiento del sistema óptico o, de alguna manera, es afectado de manera adversa, el punto de haz no proporcionará información precisa relacionada con el enfoque del sistema. Dichos problemas pueden no ser identificados hasta después de que un objeto sea explorado, requiriendo de esta manera el uso de datos de baja calidad o requiriendo posiblemente otra exploración. En algunos casos, la adquisición de otra exploración puede no ser posible y puede llegar a desecharse una muestra valiosa. También puede ser necesario volver a calibrar los componentes ópticos del sistema de control de enfoque, cuyo remedio puede necesitar tiempo y costes sustanciales. Los datos de baja calidad, la pérdida de muestras o la pérdida de tiempo en la obtención de datos pueden ser particularmente problemáticos en aplicaciones diagnósticas o pronósticas en las que las muestras son frecuentemente escasas y los datos proporcionan información que es importante en la determinación de un plan de tratamiento para un paciente.

30 Además de lo indicado anteriormente, los sistemas ópticos convencionales pueden usar algoritmos complejos de análisis de punto de haz para analizar la ubicación, la forma y la densidad del punto de haz. Dicho análisis puede ser costoso y puede ser también sensible a la configuración de los componentes ópticos.

35 Por consiguiente, existe una necesidad de procedimientos de enfoque y sistemas de control de enfoque que reduzcan la sensibilidad a la alineación de los componentes ópticos. Además, existe una necesidad de sistemas de control de enfoque que usen formas alternativas de análisis de punto de haz. También hay una necesidad general de procedimientos de enfoque mejorados y sistemas de control de enfoque que sean más simples, más precisos y/o menos costosos que los procedimientos de enfoque y los sistemas de control de enfoque conocidos.

Breve descripción de la invención

40 Según una realización, se proporciona un procedimiento para controlar un enfoque de un sistema óptico según la reivindicación 1.

En otra realización, se proporciona un sistema óptico según la reivindicación 9.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un diagrama de bloques de un sistema óptico formado según una realización.

La Figura 2 es una vista en perspectiva de un conjunto óptico formado según una realización que puede ser usada con el sistema óptico mostrado en la Figura 1.

5 La Figura 3 es una vista en planta del conjunto óptico mostrado en la Figura 2.

La Figura 4 ilustra los haces de luz incidentes y reflejados cuando el conjunto óptico mostrado en la Figura 2 está en foco con respecto a un objeto.

La Figura 5 ilustra los puntos de haz sobre una superficie de detector que son proporcionados por los haces de luz reflejados mostrados en la Figura 4.

10 La Figura 6 ilustra los haces de luz incidentes y reflejados cuando el conjunto óptico mostrado en la Figura 2 está debajo del foco.

La Figura 7 ilustra puntos de haz sobre una superficie de detector proporcionados por los haces de luz reflejados mostrados en la Figura 6.

15 La Figura 8 ilustra los haces de luz incidente y reflejado cuando el conjunto óptico mostrado en la Figura 2 está encima del foco.

La Figura 9 ilustra puntos de haz sobre una superficie de detector que son proporcionados por los haces de luz reflejados mostrados en la Figura 8.

La Figura 10 ilustra realizaciones alternativas para determinar la separación relativa entre los haces de luz reflejados.

20 La Figura 11 ilustra la reflexión de los haces de luz reflejados paralelos por dos componentes ópticos, en el que uno de los componentes ópticos no está en una posición deseada.

La Figura 12 ilustra puntos de haz sobre una superficie de detector que son proporcionados por los haces de luz reflejados mostrados en la Figura 11.

25 La Figura 13 ilustra la reflexión de los haces de luz reflejados paralelos por dos componentes ópticos, en el que uno de los componentes ópticos no está en una posición deseada.

La Figura 14 ilustra puntos de haz sobre una superficie de detector que son proporcionados por los haces de luz reflejados mostrados en la Figura 13.

La Figura 15 es una vista lateral de una celda de flujo que puede ser usada en diversas realizaciones e ilustra la reflexión de los rayos de luz incidentes.

30 Las Figuras 16A y 16B son diagramas esquemáticos de conjuntos ópticos que pueden formarse según realizaciones alternativas.

La Figura 17 es una vista en perspectiva de un conjunto óptico formado según otra realización que puede ser usado con el sistema óptico mostrado en la Figura 1.

La Figura 18 es una vista en planta del conjunto óptico mostrado en la Figura 17.

35 La Figura 19 es una vista lateral de un dispositivo desviador de haz que puede ser usado según diversas realizaciones.

Las Figuras 20-22 ilustran un objeto que está siendo explorado por un conjunto óptico formado según diversas realizaciones.

40 La Figura 23 es una vista en perspectiva de un generador de imágenes de muestras formado según una realización.

La Figura 24 es un diagrama de bloques que ilustra un procedimiento para determinar un grado de enfoque de un objeto con respecto a un conjunto óptico.

La Figura 25 es un diagrama de bloques que ilustra un bucle de control para controlar un grado de enfoque de un sistema óptico con respecto a un objeto o muestra.

La Figura 26 es un diagrama de bloques que ilustra un procedimiento de determinación de una distancia de trabajo entre un objeto y una lente conjugada de un conjunto óptico.

La Figura 27 es un diagrama de bloques que ilustra un bucle de control para perfilar una superficie de un objeto.

5 La Figura 28 es un diagrama de bloques que ilustra un procedimiento de operación de un sistema óptico según diversas realizaciones.

Descripción detallada de la invención

10 Las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen sistemas ópticos que pueden ser usados para al menos uno de entre visualización, obtención de imágenes e inspección de diversos objetos. En algunas realizaciones, los sistemas ópticos incluyen generadores de imágenes de muestra que se usan para obtener imágenes de muestras para un análisis biológico o químico. Por ejemplo, un generador de imágenes de muestras puede estar configurado para realizar al menos una de entre una obtención de imágenes de fluorescencia de reflectancia interna total (Total-internal-reflectance-fluorescence, TIRF) y una obtención de imágenes de epifluorescencia. En realizaciones particulares, el generador de imágenes de muestras es un sistema de exploración mediante integración de retraso de tiempo (Time-Delay Integration, TDI). En otras realizaciones, los sistemas ópticos pueden estar configurados para inspeccionar superficies de microdispositivos, tales como chips semiconductores u obleas de silicio, para determinar si las superficies tienen cualquier desviación o defecto. En otras realizaciones, los sistemas ópticos incluyen perfilómetros que están configurados para determinar un perfil de una superficie o una topografía de un objeto.

20 En diversas realizaciones, los sistemas ópticos incluyen una lente conjugada que recibe uno o más pares de haces de luz incidentes paralelos. La lente conjugada puede dirigir los haces de luz incidentes a una región focal donde los haces de luz incidentes son reflejados por una superficie o interfaz de un objeto que está próximo a la región focal. A continuación, la lente conjugada puede recibir los haces de luz reflejados. Si el objeto está en foco, los haces de luz reflejados se proyectarán paralelos unos a los otros desde la lente conjugada. Si el objeto no está en foco, los haces de luz reflejados se proyectarán desde la lente conjugada de una manera no paralela.

25 Los sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden determinar un foco o parámetro de perfil que se basa efectivamente en o que viene determinado al menos parcialmente por la relación de proyección de los haces de luz reflejados que salen de la lente conjugada. El enfoque o parámetro de perfil puede ser una función de una o más características o elementos geométricos de un haz de luz reflejado, tal como una longitud de trayectoria óptica o un ángulo de proyección desde un componente óptico. Además, el parámetro puede ser una función de una relación entre los haces de luz reflejados (relación de características geométricas, distancia de separación entre puntos de haz, separación de trayectoria entre los haces). El enfoque y los parámetros de perfil pueden ser indicativos de un grado de enfoque del sistema óptico, una distancia de trabajo que separa la lente y el objeto, o un perfil de superficie (por ejemplo, altura) del objeto en un punto particular de la superficie del objeto.

35 A modo de ejemplo, debido a que los dos haces de luz reflejados no paralelos se propagan a lo largo de una pista óptica, una distancia que separa los haces de luz reflejados aumenta o disminuye. Los sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden determinar una separación relativa entre los haces de luz reflejados. La separación relativa se basa en o viene determinada al menos parcialmente por la relación de proyección de los haces de luz reflejados. Por ejemplo, los haces de luz pueden propagarse paralelos entre sí manteniendo de esta manera la separación relativa, convergiendo unos hacia los otros reduciendo de esta manera la separación relativa, o divergiendo alejándose unos de los otros aumentando de esta manera la separación relativa. La separación relativa puede ser determinada, por ejemplo, como una distancia de separación que se extiende entre los puntos de haz sobre la superficie de un detector. La separación relativa puede ser calculada también mediante la detección individual de los puntos de haz con diferentes detectores. La separación relativa puede ser usada para determinar una distancia de trabajo que se extiende entre la lente conjugada y el objeto que ha reflejado los haces de luz incidentes. La separación relativa puede ser usada también para determinar un grado de enfoque del sistema óptico. Además, la separación relativa puede ser usada para determinar un perfil de la superficie del objeto.

45 Además, tal como se describirá más detalladamente a continuación, las realizaciones descritas en la presente memoria incluyen uno o más sistemas de control de enfoque para determinar si el objeto, que puede incluir una muestra, está o no suficientemente dentro de un plano focal del sistema óptico de manera que el objeto pueda ser observado, puedan obtenerse imágenes del mismo y/o pueda ser inspeccionado. Más específicamente, las realizaciones pueden determinar si el sistema óptico tiene o no un grado de enfoque suficiente con respecto al objeto. La determinación del enfoque puede estar basada en haces de luz de referencia que inciden sobre el objeto. Tras determinar si el objeto está o no suficientemente en foco con respecto al sistema óptico, las realizaciones pueden mover automáticamente el objeto o el sistema óptico de manera que el objeto esté dentro del plano focal del sistema óptico.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "objeto" incluye todas las cosas que son adecuadas para obtener imágenes de las mismas, ser visualizadas, analizadas, inspeccionadas o perfiladas con los sistemas ópticos descritos en la presente memoria. A modo de ejemplo solamente, los objetos pueden incluir obleas o chips de semiconductores, medios grabables, muestras, celdas de flujo, micropartículas, porta-objetos o micromatrices. Generalmente, los objetos incluyen una o más superficies y/o una o más interfaces que un usuario puede desear obtener imágenes de las mismas, observarlas, analizarlas, inspeccionarlas y/o determinar un perfil de las mismas. Los objetos pueden tener superficies o interfaces con características en relieve tales como pozos, hoyos, crestas, bultos, perlas o similares.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "muestra" incluye diversos temas de interés. Una muestra puede ser fotografiada o explorada para su posterior análisis. En realizaciones particulares, una muestra puede incluir sustancias biológicas o químicas de interés, y, opcionalmente, un sustrato óptico que soporta las sustancias biológicas o químicas. Como tal, una muestra puede incluir o no un sustrato óptico. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sustancias biológicas o químicas" no pretende ser limitativa, sino que puede incluir una diversidad de sustancias biológicas o químicas que son adecuadas para obtener imágenes de las mismas o para ser examinadas con los sistemas ópticos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las sustancias biológicas o químicas incluyen biomoléculas, tales como nucleósidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, oligonucleótidos, proteínas, enzimas, polipéptidos, anticuerpos, antígenos, ligandos, receptores, polisacárido, carbohidrato, polifosfatos, nanoporos, orgánulos, capas lipídicas, células, tejidos, organismos y compuesto o compuestos químicos biológicamente activos, tales como análogos o miméticos de las especies indicadas anteriormente.

Las sustancias biológicas o químicas pueden estar soportadas por un sustrato óptico. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sustrato óptico" no pretende ser limitativa, sino que puede incluir diversos materiales que soportan las sustancias biológicas o químicas y permiten que las sustancias biológicas o químicas sean al menos una de entre observadas, se obtengan imágenes de las mismas y sean examinadas. Por ejemplo, el sustrato óptico puede comprender un material transparente que refleja una parte de la luz incidente y refracta una parte de la luz incidente. De manera alternativa, el sustrato óptico puede ser, por ejemplo, un espejo que refleja la luz incidente en su totalidad de manera que no se transmita luz a través del sustrato óptico. Típicamente, el sustrato óptico tiene una superficie plana. Sin embargo, el sustrato óptico puede tener una superficie con características con relieve, tales como pozos, hoyos, crestas, bultos, perlas o similares.

En una realización ejemplar, el sustrato óptico es una celda de flujo que tiene canales de flujo en los que se secuencian ácidos nucleicos. Sin embargo, en realizaciones alternativas, el sustrato óptico puede incluir uno o más porta-objetos, chips planos (tales como los utilizados en micromatrices), o micropartículas. En tales casos, cuando el sustrato óptico incluye una pluralidad de micropartículas que soportan las sustancias biológicas o químicas, las micropartículas pueden ser retenidas por otro sustrato óptico, tal como un porta-objetos o placa ranurada. En realizaciones particulares, el sustrato óptico incluye elementos de identificación óptica codificados basados en rejilla de difracción similares o idénticos a los descritos en la solicitud de patente US con N° de serie 10/661.234, en trámite, titulada "Diffraction Grating Based Optical Identification Element", presentada el 12 de Septiembre de 2003, descrita adicionalmente más adelante. Una celda o placa de tipo perla para retener los elementos de identificación ópticos puede ser similar o la misma que la descrita en la solicitud de patente US con N° de serie 10/661.836, en trámite, titulada "Method and Apparatus for Aligning Microbeads in Order to Interrogate the Same", presentada el 12 de Septiembre de 2003, y la patente N° 7.164.533, titulada "Hybrid Random Bead/Chip Based Microarray", concedida el 16 de Enero de 2007, así como las solicitudes de patente US con N° de serie 60/609.583, titulada "Improved Method and Apparatus for Aligning Microbeads in Order to Interrogate the Same", presentada el 13 de Septiembre de 2004, N° de serie 60/610.910, titulada "Method and Apparatus for Aligning Microbeads in Order to Interrogate the Same", presentada el 17 de Septiembre de 2004.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "componentes ópticos" o "componentes de enfoque" incluye diversos elementos que afectan a la transmisión de la luz. Los componentes ópticos pueden ser, por ejemplo, reflectores, elementos dicroicos, divisores de haz, colimadores, lentes, filtros, cuñas, prismas, espejos y similares.

A modo de ejemplo, los sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden ser construidos de manera que incluyan diversos componentes y conjuntos tal como se describe en la solicitud PCT PCT/US07/07991, titulada "System and Devices for Sequence by Synthesis Analysis", presentada el 30 de Marzo de 2007 y/o de manera que incluyan diversos componentes y conjuntos tal como se describe en la solicitud PCT PCT/US2008/077850, titulada "Fluorescence Excitation and Detection System and Method", presentada el 26 de Septiembre de 2008. En realizaciones particulares, los sistemas ópticos pueden incluir diversos componentes y conjuntos tal como se describe en la patente US N° 7.329.860. Los sistemas ópticos pueden incluir también diversos componentes y conjuntos tal como se describe en la solicitud de patente US N° 12/638.770, presentada el 15 de Diciembre de 2009.

En realizaciones particulares, los procedimientos y los sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden ser usados para secuenciar ácidos nucleicos. Por ejemplo, los protocolos de secuenciación por síntesis (Sequencing-By-Synthesis, SBS) son particularmente aplicables. En SBS, una pluralidad de nucleótidos modificados marcados con fluorescencia se usan para secuenciar densos racimos de ADN amplificado (posiblemente millones de racimos) presentes sobre la superficie de un sustrato óptico (por ejemplo, una superficie que define al menos parcialmente un canal en una celda de flujo). Las celdas de flujo pueden contener muestras de ácido nucleico para la secuenciación, en las que las células de flujo se colocan dentro de contenedores de celdas de flujo apropiados. Las muestras para la secuenciación pueden adoptar la forma de moléculas de ácido nucleico individuales que están separadas unas de las otras de manera que puedan distinguirse individualmente, poblaciones amplificadas de moléculas de ácido nucleico en forma de racimos u otras características, o perlas que están fijadas a una o más moléculas de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos pueden ser preparados de manera que comprendan un cebador de oligonucleótidos adyacente a una secuencia diana desconocida. Para iniciar el primer ciclo de secuenciación SBS, uno o más nucleótidos marcados de manera diferente, y ADN polimerasa, etc., pueden introducirse en/a través de la celda de flujo por medio de un subsistema de flujo de fluido (no mostrado). Puede añadirse un solo tipo de nucleótido cada vez, o los nucleótidos usados en el procedimiento de secuenciación pueden estar especialmente diseñados para poseer una propiedad de terminación reversible, permitiendo de esta manera que cada ciclo de la reacción de secuenciación ocurra de manera simultánea en presencia de diversos tipos de nucleótidos marcados (por ejemplo, A, C, T, G). Los nucleótidos pueden incluir restos de marcadores detectables tales como fluoróforos. Cuando los cuatro nucleótidos se mezclan entre sí, la polimerasa es capaz de seleccionar la base correcta a incorporar y cada secuencia es extendida en una sola base. Uno o más láseres pueden excitar los ácidos nucleicos e inducir fluorescencia. La fluorescencia emitida desde los ácidos nucleicos se basa en los fluoróforos de la base incorporada, y diferentes fluoróforos pueden emitir diferentes longitudes de onda de luz de emisión. Se describen procedimientos de secuenciación ejemplares, por ejemplo, en los documentos Bentley et al., *Nature* 456:53-59 (2008), WO 04/018497, US 7.057.026, WO 91/06678, WO 07/123744, US 7.329.492, US 7.211.414, US 7.315.019, US 7.405.281 y US 2008/0108082.

Otras técnicas de secuenciación que son aplicables para el uso de los procedimientos y los sistemas descritos en la presente memoria son piro-secuenciación, secuenciación por nanoporos y secuenciación por ligación. Las técnicas y las muestras de piro-secuenciación ejemplares que son particularmente útiles se describen en los documentos US 6.210.891, US 6.258.568, US 6.274.320 y Ronaghi, *Genome Research* 11: 3-11 (2001). Las técnicas y las muestras de nanoporos ejemplares que son también útiles se describen en Deamer et al., *Acc. Chem. Res.* 35: 817-825 (2002); Li et al., *Nat. Mater.* 2: 611-615 (2003); Soni et al., *Clin Chem.* 53: 1996-2001 (2007) Healy et al., *Nanomed.* 2: 459-481 (2007) y Cockroft et al., *J. Am. Chem. Soc.* 130: 818-820; y el documento US 7.001.792. Cualquiera de entre una diversidad de muestras puede ser usada en estos sistemas, tales como sustratos que tienen perlas generadas por PCR de emulsión, sustratos que tienen guías de onda en modo cero, sustratos que tienen nanoporos biológicos en bicapas lipídicas, sustratos de estado sólido que tienen nanoporos sintéticos, y otros conocidos en la técnica. Dichas muestras se describen en el contexto de diversas técnicas de secuenciación en las referencias citadas anteriormente y también en los documentos US 2005/0042648, US 2005/0079510, US 2005/0130173 y WO 05/010145.

En otras realizaciones, los sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden ser utilizados para la detección de muestras que incluyen micromatrices. Una micromatriz puede incluir una población de moléculas sonda diferentes que están fijadas a uno o más sustratos, de manera que las diferentes moléculas sonda puedan ser diferenciadas unas de las otras según la ubicación relativa. Una matriz puede incluir moléculas sonda diferentes, o poblaciones de las moléculas sonda, cada una situada en una ubicación direccionable diferente sobre un sustrato. De manera alternativa, una micromatriz puede incluir sustratos ópticos separados, tales como perlas, cada una con una molécula sonda diferente, o población de moléculas sonda, que puede ser identificada según las ubicaciones de los sustratos ópticos sobre una superficie a la que están fijados los sustratos o según las ubicaciones de los sustratos en un líquido. Las matrices ejemplares en las que los sustratos separados se encuentran sobre una superficie incluyen, sin limitación, una matriz Sentrix[®] Array o una matriz Sentrix[®] BeadChip Array disponible en Illumina[®], Inc. (San Diego, CA) u otras que incluyen perlas en pocillos, tales como las descritas en las patentes US N^o 6.266.459, 6.355.431, 6.770.441 y 6.859.570; y la publicación PCT N^o WO 00/63437. Otras matrices que tienen partículas sobre una superficie incluyen las establecidas en los documentos US 2005/0227252, WO 05/033681 y WO 04/024328.

Cualquiera de entre una diversidad de micromatrices conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las establecidas en la presente memoria, puede ser usada en las realizaciones de la invención. Una micromatriz típica contiene sitios, a veces denominados elementos, cada uno de los cuales tiene una población de sondas. La población de sondas en cada sitio es típicamente homogénea, con una sola especie de sonda, pero en algunas realizaciones cada una de las poblaciones puede ser heterogénea. Los sitios o elementos de una matriz son típicamente discretos, estando separados con espacios entre sí. El tamaño de los sitios de sonda y/o la separación entre los sitios pueden variar de manera que las matrices pueden ser de alta densidad, de densidad media o de

baja densidad. Las matrices de alta densidad se caracterizan por tener sitios separados por menos de aproximadamente 15 μm . Las matrices de densidad media tienen sitios separados por aproximadamente 15 a 30 μm , mientras que las matrices de baja densidad tienen sitios separados por más de 30 μm . Una matriz útil en la invención puede tener sitios que están separados por menos de 100 μm , 50 μm , 10 μm , 5 μm , 1 μm o 0,5 μm . Un aparato o procedimiento de una realización de la invención puede ser usado para obtener imágenes de una matriz con una resolución suficiente para distinguir los sitios en las densidades o los intervalos de densidades anteriores.

Otros ejemplos de micromatrices disponibles comercialmente que pueden ser usadas incluyen, por ejemplo, una micromatriz Affymetrix[®] GeneChip[®] u otra micromatriz sintetizada según técnicas denominadas a veces tecnologías VLSIPS[™] (Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis, síntesis de polímero inmovilizado a muy gran escala) tal como se describe, por ejemplo, en las patentes US N^o 5.324.633, 5.744.305, 5.451.683, 5.482.867, 5.491.074, 5.624.711, 5.795.716, 5.831.070, 5.856.101, 5.858.659, 5.874.219, 5.968.740, 5.974.164, 5.981.185, 5.981.956, 6.025.601, 6.033.860, 6.090.555, 6.136.269, 6.022.963, 6.083.697, 6.291.183, 6.309.831, 6.416.949, 6.428.752 y 6.482.591. Una micromatriz de dos canales puede ser usada también en un procedimiento según una realización de la invención. Una micromatriz de dos canales ejemplar es una matriz CodeLink[™] disponible en Amersham Biosciences. Otra micromatriz que es útil es una fabricada usando procedimientos de impresión de inyección de tinta tal como SurePrint[™] Technology disponible en Agilent Technologies.

Los sistemas y los procedimientos expuestos en la presente memoria pueden ser usados para detectar la presencia de una molécula diana particular en una muestra en contacto con la micromatriz. Esto puede determinarse, por ejemplo, en base a la unión de un analito diana marcado a una sonda particular de la micromatriz o debido a una modificación dependiente de diana de una sonda particular para incorporar, eliminar o alterar un marcador en la ubicación de sonda. Cualquiera de entre diversos ensayos puede ser usado para identificar o caracterizar objetivos usando una micromatriz tal como se describe, por ejemplo, en las publicaciones de solicitud de patente US N^o. 2003/0108867, 2003/0108900, 2003/0170684, 2003/0207295 o 2005/0181394.

Los marcadores ejemplares que pueden ser detectados según las realizaciones de la invención, por ejemplo, cuando están presentes en una micromatriz incluyen, pero no se limitan a, un cromóforo, luminóforo, fluoróforo, nanopartículas codificadas ópticamente, partículas codificadas con una rejilla de difracción, marcador electroquimioluminiscente tal como Ru(bpy)³²⁺, o resto que puede ser detectado en base a una característica óptica. Los fluoróforos que pueden ser útiles incluyen, por ejemplo, complejos lantánidos fluorescentes, incluidos los de europio y terbio, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, malacita verde, Cy3, Cy5, estilbeno, Lucifer amarillo, Cascade Blue[™], Texas Red, colorantes Alexa, ficoeritina, bodipy y otros conocidos en la técnica, tales como los descritos en Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, OR) 6^a Edición; The Synthegeen catalog (Houston, TX.), Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2^a ed., Plenum Press New York (1999), o el documento WO 98/59066.

En realizaciones particulares, el sistema óptico puede estar configurado para Time Delay integración (TDI) por ejemplo, en realizaciones de exploración en línea tal como se describe, por ejemplo, en la patente US N^o 7.329.860. A modo de ejemplo, el conjunto óptico puede tener una lente de 0,75 NA y una precisión del enfoque de +/- 125 a 500 nm. La resolución puede ser de 50 a 100 nm. El sistema puede ser capaz de obtener 1.000-10.000 mediciones /segundo no filtradas.

Aunque las realizaciones se ejemplifican con relación a la detección de muestras que incluyen sustancias biológicas o químicas soportadas por un sustrato óptico, se entenderá que otras muestras pueden ser analizadas, examinadas o pueden obtenerse imágenes de las mismas mediante las realizaciones descritas en la presente memoria. Otras muestras ejemplares incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas tales como células o tejidos, chips electrónicos, tales como los usados en los procesadores de ordenador, o similares. Los ejemplos de algunas de las aplicaciones incluyen microscopía, escáneres de satélite, reprografía de alta resolución, adquisición de imágenes de fluorescencia, análisis y secuenciación de ácidos nucleicos, secuenciación de ADN, secuenciación por síntesis, obtención de imágenes de micromatrices, obtención de imágenes de micropartículas codificadas holográficamente y similares.

En otras realizaciones, los sistemas ópticos pueden estar configurados para inspeccionar un objeto para determinar ciertas características o estructuras del objeto. Por ejemplo, los sistemas ópticos pueden ser usados para inspeccionar una superficie del objeto, (por ejemplo, chip semiconductor, oblea de silicio) para determinar si hay o no alguna desviación o defecto sobre la superficie.

La Figura 1 ilustra un diagrama de bloques de un sistema 100 óptico formado según una realización. A modo de ejemplo solamente, el sistema 100 óptico puede ser un generador de imágenes de muestras que obtiene imágenes de una muestra de interés para su análisis. En otras realizaciones, el sistema 100 óptico puede ser un perfilómetro que determina un perfil de una superficie (por ejemplo, la topografía) de un objeto. Además, otros tipos de sistemas ópticos diferentes pueden usar los mecanismos y los sistemas descritos en la presente memoria. En la

realización ilustrada, el sistema 100 óptico incluye un conjunto 106 óptico, un porta-objetos 102 para soportar un objeto 110 cerca de un plano FP focal del conjunto 106 óptico, y un controlador 115 de etapa que está configurado para mover el porta-objetos 102 en una dirección lateral (a lo largo de un eje X y/o un eje Y que se extienden en la página) o en una dirección vertical/de elevación a lo largo de un eje Z. El sistema 100 óptico puede incluir también un controlador de sistema o sistema 120 informático que está acoplado operativamente al conjunto 106 óptico, al controlador 115 de etapa y/o al porta-objetos 102.

En realizaciones particulares, el sistema 100 óptico es un generador de imágenes de muestras configurado para fotografiar muestras. Aunque no se muestra, un generador de imágenes de muestras puede incluir otros subsistemas o dispositivos para realizar diversos protocolos de ensayo. A modo de ejemplo solamente, la muestra puede incluir una celda de flujo que tiene canales de flujo. El generador de imágenes de muestras puede incluir un sistema de control de fluido que incluye depósitos de líquido que están acoplados de manera fluida a los canales de flujo a través de una red fluidica. El generador de imágenes de muestras puede incluir también un sistema de control de temperatura que puede tener un calentador/refrigerador configurado para regular una temperatura de la muestra y/o el fluido que fluye a través de la muestra. El sistema de control de temperatura puede incluir sensores que detectan una temperatura de los fluidos.

Tal como se muestra, el conjunto 106 óptico está configurado para dirigir la luz que entra a un objeto 110 y recibir y dirigir la luz de salida a uno o más detectores. La luz de salida puede ser la luz de entrada que ha sido al menos reflejada o refractada por el objeto 110 y/o la luz de salida puede ser la luz emitida desde el objeto 110. Para dirigir la luz de entrada, el conjunto 106 óptico puede incluir al menos una fuente 112 de luz de referencia y al menos una fuente 114 de luz de excitación que dirigen la luz, tal como haces de luz que tienen longitudes de onda predeterminadas, a través de uno o más componentes ópticos del conjunto 106 óptico. El conjunto 106 óptico incluye una lente 118 conjugada, para dirigir la luz de entrada hacia el objeto 110 y para dirigir la luz de salida hacia el detector o detectores.

En la realización ejemplar, la fuente 112 de luz de referencia puede ser usada por un sistema de medición de distancia o un sistema de control de enfoque (o mecanismo de enfoque) del sistema 100 óptico y la fuente 114 de luz de excitación puede ser usada para excitar las sustancias biológicas o químicas del objeto 110 cuando el objeto 110 incluye una muestra biológica o química. La fuente 114 de luz de excitación puede estar dispuesta para iluminar una superficie inferior del objeto 110, tal como en la obtención de imágenes TIRF, o puede estar dispuesta para iluminar una superficie superior del objeto 110, tal como en la obtención de imágenes de epifluorescencia. Tal como se muestra en la Figura 1, la lente 118 conjugada dirige la luz de entrada a una región 122 focal situada dentro del plano FP focal. La lente 118 tiene un eje 124 óptico y está posicionada a una distancia WD_1 de trabajo desde el objeto 110 medida a lo largo del eje 124 óptico. El controlador 115 de etapa puede mover el objeto 110 en la dirección Z para ajustar la distancia WD_1 de trabajo de manera que, por ejemplo, una parte del objeto 110 esté dentro de la región 122 focal.

Para determinar si el objeto 110 está en foco o no (es decir, suficientemente dentro de la región 122 focal o el plano FP focal), el conjunto 106 óptico está configurado para dirigir al menos un par de haces de luz a la región 122 focal en la que está situado aproximadamente el objeto 110. El objeto 110 refleja los rayos de luz. Más específicamente, una superficie exterior del objeto 110 o una interfaz en el objeto 110 refleja los haces de luz. A continuación, los haces de luz reflejados vuelven a, y se propagan a través de, la lente 118. Tal como se muestra, cada haz de luz tiene una trayectoria óptica que incluye una parte que todavía no ha sido reflejada por el objeto 110 y una parte que ha sido reflejada por el objeto 110. Las partes de las trayectorias ópticas antes de la reflexión se designan como haces 130A y 132A de luz incidentes y se indican con flechas que apuntan hacia el objeto 110. Las partes de las trayectorias ópticas que han sido reflejadas por el objeto 110 se designan como haces 130B y 132B de luz reflejados y se indican con flechas que apuntan alejándose del objeto 110. Para fines ilustrativos, los haces 130A, 130B, 132A, y 132B de luz se muestran como teniendo trayectorias ópticas diferentes dentro de la lente 118 y cerca del objeto 110. Sin embargo, en la realización ejemplar, los haces 130A y 132B de luz se propagan en direcciones opuestas y están configurados para tener las mismas trayectorias ópticas o trayectorias ópticas sustancialmente superpuestas dentro de la lente 118 y cerca del objeto 110, y los haces 130B y 132A de luz se propagan en direcciones opuestas y están configurados para tener las mismas trayectorias ópticas o trayectorias ópticas sustancialmente superpuestas dentro de la lente 118 y cerca del objeto 110.

En la realización mostrada en la Figura 1, los haces 130A, 130B, 132A y 132B de luz pasan a través de la misma lente que se usa para la obtención de imágenes. En una realización alternativa, los haces de luz usados para la medición de la distancia o la determinación de enfoque pueden pasar a través de una lente diferente que no es usada para la obtención de imágenes. En esta realización alternativa, la lente 118 está dedicada para el paso de los haces 130A, 130B, 132A y 132B para la medición de la distancia o la determinación de enfoque, y una lente separada (no mostrada) es usada para obtener imágenes del objeto 110. De manera similar, se entenderá que los sistemas y los procedimientos expuestos en la presente memoria para la determinación de enfoque y la medición de la distancia pueden realizarse usando una lente objetivo común que es compartida con la óptica de obtención

de imágenes o, de manera alternativa, las lentes objetivo ejemplificadas en la presente memoria pueden estar dedicadas a la determinación de enfoque o a la medición de distancia.

5 Los haces 130B y 132B de luz reflejados se propagan a través de la lente 118 y, opcionalmente, pueden ser dirigidos además por otros componentes ópticos del conjunto 106 óptico. Tal como se muestra, los haces 130B y 132B de luz reflejados son detectados por al menos un detector 144 de enfoque. En la realización ilustrada, ambos haces 130B y 132B de luz reflejados son detectados por un único detector 144 de enfoque. Los haces de luz reflejados pueden ser usados para determinar la separación RS_1 relativa. Por ejemplo, la separación RS_1 relativa puede ser determinada por la distancia que separa los puntos de haz de los haces 130B y 132B de luz reflejados incidentes sobre el detector 144 de enfoque (es decir, una distancia de separación). La separación RS_1 relativa
10 puede ser usada para determinar un grado de enfoque del sistema 100 óptico con respecto al objeto 110. Sin embargo, en realizaciones alternativas, cada haz 130B y 132B de luz reflejado puede ser detectado por un detector 144 de enfoque correspondiente separado y la separación RS_1 relativa puede ser determinada en base a una ubicación de los puntos de haz en los detectores 144 de enfoque correspondientes.

15 Si el objeto 110 no está dentro de un grado de enfoque suficiente, el sistema 120 informático puede operar el controlador 115 de etapa para mover el porta-objetos 102 a una posición deseada. De manera alternativa o adicional al movimiento del porta-objetos 102, el conjunto 106 óptico puede ser movido en la dirección Z y/o a lo largo del plano XY. Por ejemplo, el objeto 110 puede ser movido relativamente una distancia ΔZ_1 hacia el plano FP focal si el objeto 110 está situado por encima del plano FP focal (o la región 122 focal), o el objeto 110 puede ser movido relativamente una distancia ΔZ_2 hacia el plano FP focal si el objeto 110 está situado por debajo del plano FP focal (o la región 122 focal). En algunas realizaciones, el sistema 100 óptico puede sustituir la lente 118 con
20 otra lente 118 u otros componentes ópticos para mover la región 122 focal del conjunto 106 óptico.

El ejemplo expuesto anteriormente y en la Figura 1 se ha presentado con relación a un sistema para controlar el enfoque o para determinar el grado de enfoque. El sistema es útil también para determinar la distancia WD_1 de trabajo entre el objeto 110 y la lente 118. En dichas realizaciones, el detector 144 de enfoque puede funcionar como un detector de distancia de trabajo y la distancia que separa los puntos de haz sobre el detector de distancia de trabajo puede ser usada para determinar la distancia de trabajo entre el objeto 110 y la lente 118. Para facilitar la descripción, en la presente memoria se ejemplifican diversas realizaciones de los sistemas y los procedimientos con relación al control de enfoque o a la determinación del grado de enfoque. Se entenderá que los sistemas y los procedimientos pueden ser usados también para determinar la distancia de trabajo entre un objeto y una lente. De manera similar, los sistemas y los procedimientos pueden ser usados también para determinar un perfil de una superficie de un objeto.
25

En la realización ejemplar, durante el funcionamiento, la fuente 114 de luz de excitación dirige la luz de entrada (no mostrada) sobre el objeto 110 para excitar sustancias biológicas o químicas marcadas con fluorescencia. Los marcadores de las sustancias biológicas o químicas proporcionan señales 140 de luz (denominadas también emisiones de luz) que tienen una longitud o unas longitudes de onda predeterminadas. Las señales 140 de luz son recibidas por la lente 118 y a continuación son dirigidas por otros componentes ópticos del conjunto 106 óptico a al menos un detector 142 de objetos. Aunque la realización ilustrada sólo muestra un detector 142 de objetos, el detector 142 de objetos puede comprender múltiples detectores. Por ejemplo, el detector 142 de objetos puede incluir un primer detector configurado para detectar una o más longitudes de onda de luz y un segundo detector configurado para detectar una o más longitudes de onda de la luz diferentes. El conjunto 106 óptico puede incluir un conjunto de lente/filtro que dirige las diferentes señales de luz a lo largo de diferentes trayectorias ópticas hacia los detectores de objeto correspondientes. Dichos sistemas ópticos se describen más detalladamente en la solicitud PCT N° PCT/US07/07991, titulada "System and Devices for Sequence by Synthesis Analysis", presentada el 30 de Marzo de 2007 y la solicitud PCT N° PCT/US2008/077850, titulada "Fluorescence Excitation and Detection System and Method", presentada el 26 de Septiembre de 2008.
30
35
40
45

El detector 142 de objetos comunica los datos de objeto relacionados con las señales 140 de luz detectadas al sistema 120 informático. A continuación, el sistema 120 informático puede registrar, procesar, analizar y/o comunicar los datos a otros usuarios o sistemas informáticos, incluyendo sistemas informáticos remotos a través de una línea de comunicación (por ejemplo, Internet). A modo de ejemplo, los datos de objeto pueden incluir datos de obtención de imágenes que son procesados para generar una imagen o imágenes del objeto 110. A continuación, las imágenes pueden ser analizadas por el sistema informático y/o un usuario del sistema 100 óptico. En otras realizaciones, los datos de objeto pueden incluir no sólo las emisiones de luz desde las sustancias biológicas o químicas, sino que pueden incluir también luz que ha sido al menos reflejada o refractada por el sustrato óptico u otros componentes. Por ejemplo, las señales 140 de luz pueden incluir luz que ha sido reflejada por micropartículas codificadas, tales como los elementos de identificación óptica codificados holográficamente descritos anteriormente.
50
55

En algunas realizaciones, un único detector puede proporcionar ambas funciones, tal como se ha descrito

anteriormente con relación a los detectores 142 y 144 de objetos y de enfoque. Por ejemplo, un único detector puede detectar los haces 130B y 132B de luz reflejados y también las señales 140 de luz.

5 El sistema 100 óptico puede incluir una interfaz 125 de usuario que interactúa con el usuario a través del sistema 120 informático. Por ejemplo, la interfaz 125 de usuario puede incluir una pantalla (no mostrada) que muestra y solicita información a un usuario y un dispositivo de entrada de usuario (no mostrado) para recibir las entradas del usuario.

10 El sistema 120 informático puede incluir, entre otras cosas, un módulo 150 de análisis de objeto y un módulo 152 de control de enfoque. El módulo 152 de control de enfoque está configurado para recibir datos de enfoque obtenidos por el detector 144 de enfoque. Los datos de enfoque pueden incluir señales representativas de los puntos de haz incidentes sobre el detector 144 de enfoque. Los datos pueden ser procesados para determinar la separación relativa (por ejemplo, la distancia de separación entre los puntos de haz). A continuación, puede determinarse un grado de enfoque del sistema 100 óptico con respecto al objeto 110 en base a la separación relativa. En realizaciones particulares, puede determinarse la distancia WD_1 de trabajo entre el objeto 110 y la lente 118. De manera similar, el módulo 150 de análisis objeto puede recibir datos de objeto obtenidos por los detectores 142 de objetos. El módulo de análisis de objeto puede procesar o analizar los datos de objeto para generar imágenes del objeto.

20 Además, el sistema 120 informático puede incluir cualquier sistema basado en procesador o basado en microprocesador, incluyendo sistemas que usan microcontroladores, ordenadores con un conjunto reducido de instrucciones (Reduced Instruction Set Computer, RISC), circuitos integrados específicos de aplicación (Application Specific Integrated Circuits, ASIC), matriz de puertas programable por campo (Field Programmable Gate Array, FPGA), circuitos lógicos, y cualquier otro circuito o procesador capaz de ejecutar las funciones descritas en la presente memoria. Los ejemplos anteriores son solamente ejemplares y, de esta manera, no pretenden limitar en modo alguno la definición y/o el significado de la expresión controlador de sistema. En la realización ejemplar, el sistema 120 informático ejecuta un conjunto de instrucciones que están almacenadas en uno o más elementos de almacenamiento, memorias o módulos con el fin de al menos obtener o analizar datos de un objeto. Los elementos de almacenamiento pueden estar en la forma de fuentes de información o elementos de memoria física dentro del sistema 100 óptico.

30 El conjunto de instrucciones puede incluir diversos comandos que instruyen al sistema 100 óptico para realizar protocolos específicos. Por ejemplo, el conjunto de instrucciones puede incluir diversos comandos para realizar ensayos y obtener imágenes del objeto 110 o para determinar un perfil de una superficie del objeto 110. El conjunto de instrucciones puede estar en la forma de un programa de software. Tal como se usan en la presente memoria, los términos "software" y "firmware" son intercambiables, e incluyen cualquier programa informático almacenado en una memoria para su ejecución por un ordenador, incluyendo memoria RAM, memoria ROM, memoria EPROM, memoria EEPROM y memoria RAM no volátil (NVRAM). Los tipos de memoria anteriores son solamente ejemplares y, de esta manera, no son limitativos en lo que se refiere a los tipos de memoria que pueden ser usados para el almacenamiento de un programa de ordenador.

40 Tal como se ha descrito anteriormente, la fuente 114 de luz de excitación genera una luz de excitación que es dirigida sobre el objeto 110. La fuente 114 de luz de excitación puede generar uno o más haces láser en una o más longitudes de onda de excitación predeterminadas. La luz puede ser movida en un patrón de cuadrícula a través de partes del objeto 110, tal como grupos de columnas y filas del objeto 110. De manera alternativa, la luz de excitación puede iluminar una o más regiones enteras del objeto 110 cada vez y detenerse en serie a través de las regiones en un patrón de exploración de tipo "paso y disparo" ("step and shoot"). Puede usarse también una exploración lineal, tal como se describe, por ejemplo, en la patente US N° 7.329.860. El objeto 110 produce señales 140 de luz, que pueden incluir emisiones de luz generadas en respuesta a la iluminación de un marcador en el objeto 110 y/o luz que ha sido reflejada o refractada por un sustrato óptico del objeto 110. De manera alternativa, las señales 140 de luz pueden ser generadas, sin iluminación, en base totalmente a las propiedades de emisión de un material dentro del objeto 110 (por ejemplo, un componente radiactivo o quimioluminiscente en el objeto).

50 Los detectores 142 y 144 de objetos y de enfoque pueden ser, por ejemplo, fotodiodos o cámaras. En algunas realizaciones en la presente memoria, los detectores 142 y 144 pueden comprender una cámara que tiene un sistema óptico de obtención de imágenes basado en CCD de 1 mega píxeles, tal como una cámara CCD 1002 x 1004 con píxeles de 8 μm que, a un aumento 20x, puede opcionalmente obtener imágenes de un área de 0,4 x 0,4 mm por cuadro ("tile") usando una luz de excitación que tiene un tamaño de punto de láser de 0,5 x 0,5 mm (por ejemplo, un punto cuadrado o un círculo de 0,5 mm de diámetro, o un punto elíptico, etc.). Las cámaras pueden tener opcionalmente más o menos 1 millón de píxeles, por ejemplo puede usarse una cámara de 4 mega píxeles. En muchas realizaciones, se desea que la velocidad de lectura de la cámara sea lo más rápida posible, por ejemplo la velocidad de transferencia puede ser de 10 MHz o superior, por ejemplo de 20 o 30 MHz. Más píxeles

significan generalmente que pueden obtenerse imágenes de un área de superficie mayor y, por lo tanto, más reacciones de secuenciación u otros eventos detectables ópticamente, simultáneamente para una única exposición. En realizaciones particulares, la cámara CCD/láseres TIRF pueden recopilar aproximadamente 6.400 imágenes para interrogar 1.600 cuadros (ya que las imágenes se obtienen opcionalmente en 4 colores diferentes por cada ciclo usando combinaciones de filtros, elementos dicróicos y detectores, tal como se describe en la presente memoria). Para una cámara CCD de 1 mega píxel, opcionalmente ciertas imágenes pueden contener entre aproximadamente 5.000 y 50.000 racimos de ácido nucleico únicos separados aleatoriamente (es decir, imágenes sobre la superficie de la celda de flujo). A una velocidad de obtención de imágenes de 2 segundos por cuadro para los cuatro colores, y una densidad de 25.000 racimos por cuadro, los sistemas de la presente invención pueden cuantificar opcionalmente aproximadamente 45 millones de características por hora. A una velocidad de obtención de imágenes más rápida, y una mayor densidad de racimos, puede mejorarse la velocidad de obtención de imágenes. Por ejemplo, una velocidad de lectura de una cámara de 20 MHz, y un racimo resuelto cada 20 píxeles, la lectura puede ser de 1 millón de racimos por segundo. Un detector puede estar configurado para Time Delay Integration (TDI), por ejemplo en realizaciones de exploración en línea tal como se describe, por ejemplo, en la patente US N° 7.329.860. Otros detectores útiles incluyen, pero no se limitan a, un detector de fotodiodo de cuadrante óptico, tal como los que tienen una matriz 2 x 2 de áreas individuales de fotodiodos activos fabricados en un único chip, cuyos ejemplos están disponibles en Pacific Silicon Sensor (Westlake Village, CA), o un detector sensible a la posición, tal como los que tienen un fotodiodo PIN monolítico con una resistencia uniforme en una o dos dimensiones, cuyos ejemplos están disponibles en Hamamatsu Photonics, K.K., (Hamamatsu City, Japón).

Las Figuras 2 y 3 ilustran vistas en perspectiva y en planta de un conjunto 202 óptico formado según una realización. El conjunto 202 óptico puede ser usado con el sistema 100 óptico (Figura 1) u otros sistemas ópticos. Tal como se muestra, el conjunto 202 óptico incluye un tren 240 óptico de componentes 241-245 ópticos que dirigen los haces 230 y 232 de luz a lo largo de una pista óptica o camino óptico entre un objeto de interés (no mostrado) y un detector 250 de enfoque. En realizaciones particulares, el detector de enfoque puede ser denominado también detector de distancia. La serie de componentes 241-245 ópticos del tren 240 óptico incluye un generador 241 de doble haz, un divisor 242 de haz, una lente 243 conjugada, un combinador 244 de haz y un espejo 245 desviador.

El conjunto 202 óptico incluye una fuente 212 de luz de referencia que proporciona un haz 228 de luz al generador 241 de doble haz. La fuente 212 de luz de referencia puede ser, por ejemplo, un láser de 660 nm. El generador 241 de doble haz proporciona un par de haces 230A y 232A de luz incidentes paralelos y dirige los haces 230A y 232A de luz incidentes hacia el divisor 242 de haz. En la realización ilustrada, el generador 241 de doble haz comprende un único cuerpo que tiene superficies 260 y 262 paralelas opuestas (Figura 3). La primera superficie 260 refleja una parte del haz 228 de luz que forma el haz 230A de luz incidente y refracta una parte del haz 228 de luz. La parte refractada del haz 228 de luz es reflejada por la segunda superficie 262 opuesta hacia la primera superficie 260, que forma el haz 232A de luz incidente.

El generador 241 de doble haz dirige los haces 230A y 232A de luz incidentes paralelos hacia el divisor 242 de haz. El divisor 242 de haz refleja los haces 230A y 232A de luz incidentes hacia la lente 243 conjugada. En la realización ejemplar, el divisor 242 de haz incluye un par de reflectores (por ejemplo, pestañas aluminizadas) que están posicionados para reflejar los haces 230A y 232A de luz incidentes y los haces 230B y 232B de luz reflejados. El divisor 242 de haz está posicionado para reflejar los haces 230A y 232A de luz incidentes de manera que los haces 230A y 232A de luz incidentes se propaguen en paralelo a un eje 252 óptico de la lente 243. El eje 252 óptico se extiende a través de un centro de la lente 243 y cruza una región 256 focal (Figura 2). La lente 243 puede ser una lente objetivo conjugada cerca-infinito. En disposiciones alternativas, los haces 230A y 232A de luz incidentes se propagan de una manera no paralela con respecto al eje 252 óptico. Mostrados también en la Figura 3, los haces 230A y 232A de luz incidentes pueden separarse homogéneamente del eje 252 óptico a medida que los haces 230A y 232A de luz incidentes se propagan a través de la lente 243.

Tal como se ha descrito anteriormente con respecto al sistema 100 óptico, los haces 230A y 232A de luz incidentes convergen hacia la región 256 focal (Figura 2) y son reflejados por un objeto 268 (mostrado en la Figura 4) situado próximo a la región 256 focal y vuelven a, y se propagan a través de, la lente 243 como los haces 230B y 232B de luz reflejados. Los haces 230B y 232B de luz reflejados pueden propagarse a lo largo de una trayectoria óptica sustancialmente igual o superpuesta con respecto a los haces 232A y 230A de luz incidentes, respectivamente, a través de la lente 243 y hacia el generador 241 de doble haz. Más específicamente, el haz 230B de luz reflejado se propaga en una dirección opuesta a lo largo de sustancialmente la misma trayectoria óptica del haz 232A de luz incidente, y el haz 232B de luz reflejado se propaga en una dirección opuesta a lo largo de sustancialmente la misma trayectoria óptica del haz 230A de luz incidente. Los haces 230B y 232B de luz reflejados salen de la lente 243 separados por una separación PS_2 entre trayectorias que es sustancialmente igual a una separación PS_1 entre trayectorias que separa los haces 230A y 232A de luz incidentes (mostrados en la Figura 3).

Tal como se muestra en las Figuras 2 y 3, los haces 230B y 232B de luz reflejados son incidentes sobre y son dirigidos por el generador 241 de doble haz a través de un limitador 254 de rango hacia el combinador 244 de haces. En la realización ilustrada, el combinador 244 de haces está configurado para modificar la separación PS entre trayectorias que separa los haces 230B y 232B de luz reflejados. La separación PS entre trayectorias en el combinador 244 de haces puede ser re-escalada para ser sustancialmente igual a una distancia SD_1 de separación de los haces 230B y 232B de luz reflejados detectados por el detector 250 de enfoque. La distancia SD_1 de separación es una distancia medida entre los haces de luz reflejados en una parte predeterminada de la pista óptica, tal como en el detector 250 de enfoque. En realizaciones particulares, la distancia SD_1 de separación en el detector 250 de enfoque es menor que la separación PS entre trayectorias en el combinador 244 de haces de manera que sólo un único detector 250 de enfoque pueda detectar ambos haces 230B y 232B de luz reflejados. Además, el combinador 244 de haces puede igualar sustancialmente las longitudes de las trayectorias ópticas de los haces 230B y 232B de luz reflejados.

Los haces 230B y 232B de luz reflejados se propagan sustancialmente paralelos entre sí entre los componentes ópticos después de salir de la lente 243. En la realización ilustrada, los haces 230B y 232B de luz reflejados se propagan sustancialmente paralelos entre sí a lo largo de la pista óptica entre la lente 243 y el detector 250 de enfoque. Tal como se usa en la presente memoria, dos haces de luz se propagan "sustancialmente paralelos" uno al otro si los dos haces de luz son esencialmente coplanares y, si se permite que se propaguen infinitamente, no se cruzan entre sí o convergen/divergen uno con relación al otro a una velocidad lenta. Por ejemplo, dos haces de luz son sustancialmente paralelos si un ángulo de intersección es menor de 20° o, más particularmente, menor de 10° o incluso más particularmente menor de 1° . Por ejemplo, los haces 230B y 232B de luz reflejados pueden propagarse sustancialmente paralelos entre sí entre el divisor 242 de haz y el generador 241 de doble haz; entre el generador 241 de doble haz y el combinador 244 de haces; entre el combinador 244 de haces y el espejo 245 desviador; y entre el espejo 245 desviador y el detector 250 de enfoque.

El tren 240 óptico está configurado para mantener una relación de proyección (descrita más adelante) entre los haces 230B y 232B de luz reflejados a lo largo de la pista óptica de manera que pueda determinarse un grado de enfoque. A modo de ejemplo, si el conjunto 202 óptico está en foco con el objeto, los haces 230B y 232B de luz reflejados se propagarán paralelos entre sí entre cada componente óptico en el tren 240 óptico. Si el conjunto 202 óptico no está en foco con el objeto, los haces 230B y 232B de luz reflejados son co-planares, pero se propagan en pequeños ángulos uno con respecto al otro. Por ejemplo, los haces 230B y 232B de luz reflejados pueden divergir uno del otro o converger uno hacia el otro a medida que los haces 230B y 232B de luz reflejados viajan a lo largo de la pista óptica al detector 250 de enfoque.

Para este fin, cada componente 241-245 óptico puede tener una o más superficies que están conformadas y orientadas para al menos reflejar o refractar los haces 230B y 232B de luz reflejados de manera que los haces 230B y 232B de luz reflejados mantengan la relación de proyección entre los haces 230B y 232B de luz reflejados. Por ejemplo, los componentes 242 y 245 ópticos tienen una superficie plana que refleja ambos haces 230B y 232B de luz incidentes. Los componentes 241 y 244 ópticos pueden tener también superficies paralelas cada una de las cuales refleja uno de los haces 230B y 232B de luz incidentes. Por consiguiente, si los haces 230B y 232B de luz reflejados son paralelos, los haces 230B y 232B de luz reflejados permanecerán paralelos entre sí después de salir de cada componente óptico. Si los haces 230B y 232B de luz reflejados convergen o divergen uno hacia el otro a cierta velocidad, los haces 230B y 232B de luz reflejados convergerán o divergirán uno hacia el otro a la misma velocidad después de salir de cada componente óptico. Por consiguiente, los componentes ópticos a lo largo de la pista óptica pueden incluir una superficie plana que refleja al menos uno de los haces de luz reflejados o un par de superficies paralelas, donde cada superficie refleja un haz correspondiente de entre los haces de luz reflejados.

Un sistema óptico puede incluir uno o más conjuntos ópticos para la determinación de una distancia de trabajo o enfoque. Por ejemplo, un sistema óptico puede incluir dos conjuntos ópticos del tipo mostrado en las Figuras 2 y 3 para permitir la determinación del enfoque en dos posiciones diferentes sobre un objeto o para proporcionar la determinación de la distancia de trabajo entre el sistema óptico y el objeto en dos posiciones diferentes. Para realizaciones en las que hay presentes más de un conjunto óptico, los conjuntos ópticos pueden ser discretos y separados o los conjuntos ópticos pueden compartir componentes ópticos. Los conjuntos ópticos pueden compartir componentes ópticos tales como una fuente 212 de luz de referencia, un detector 250 de enfoque, un espejo 245 desviador, un combinador 244 de haces, un generador 241 de doble haz, un divisor 242 de haz, un reflector 280 de entrada de epifluorescencia (EPI) y un limitador 254 de rango. Los componentes ópticos pueden ser compartidos colocando un divisor de haz aguas arriba de los componentes compartidos en el tren óptico. Aunque ejemplificados para el conjunto óptico mostrado en las Figuras 2 y 3, una o más versiones de otros conjuntos ópticos que se ejemplifican en la presente memoria pueden estar presentes en un sistema óptico particular. Además, un sistema óptico particular puede incluir varias combinaciones de los conjuntos ópticos establecidos en la presente memoria.

Tal como se muestra en la Figura 3, los haces 230B y 232B de luz reflejados son incidentes, en última instancia, sobre una superficie 264 de detector del detector 250 de enfoque en puntos de haz correspondientes. Los puntos

de haz están separados por una distancia SD_1 de separación. La distancia SD_1 de separación indica si el conjunto 202 óptico tiene un grado de enfoque suficiente con respecto al objeto. La distancia SD_1 de separación sobre la superficie 264 del detector indica también una distancia de trabajo entre la lente 243 y el objeto cuya imagen está siendo obtenida.

5 En otras realizaciones, los componentes 241-245 ópticos pueden ser sustituidos con componentes ópticos alternativos que realizan sustancialmente la misma función que la descrita anteriormente. Por ejemplo, el divisor 242 de haz puede ser remplazado con un prisma que dirige los haces 230A y 232A de luz incidentes a través de la lente 243 en paralelo al eje 252 óptico. El combinador 244 de haces puede no ser usado o puede ser remplazado con un plano óptico que no afecta a la separación entre trayectorias de los haces de luz reflejados. Además, los componentes 241-245 ópticos pueden tener tamaños y formas diferentes y pueden estar dispuestos en diferentes configuraciones u orientaciones según se desee. Por ejemplo, el tren 240 óptico del conjunto 202 óptico puede estar configurado para un diseño compacto.

10 Además, en realizaciones alternativas, los haces de luz paralelos pueden ser proporcionados sin el generador 241 de doble haz. Por ejemplo, una fuente 212 de luz de referencia puede incluir un par de fuentes de luz que están configuradas para proporcionar haces de luz incidentes paralelos. En realizaciones alternativas, el detector 250 de enfoque puede incluir dos detectores de enfoque dispuestos lado a lado en posiciones fijas, conocidas, uno respecto al otro. Cada detector de enfoque puede detectar un haz de luz reflejado separado. La separación relativa entre los haces de luz reflejados puede ser determinada en base a las posiciones de los puntos de haz con los detectores de enfoque respectivos y la posición relativa de los detectores de enfoque uno respecto al otro.

15 Aunque no se ilustra en las Figuras 2 y 3, el conjunto 202 óptico puede estar configurado también para facilitar la recogida de la luz de salida que es proyectada desde el objeto 268. Por ejemplo, el conjunto 202 óptico puede incluir un reflector 280 de entrada de epifluorescencia (PAI) que está posicionado para reflejar la luz incidente que es proporcionada por una fuente de luz de excitación (no mostrada). La luz puede ser dirigida hacia el divisor 242 de haz que refleja al menos una parte de la luz de excitación y dirige la luz a lo largo del eje 252 óptico a través de la lente 243. La lente 243 dirige la luz sobre el objeto 268, que puede proporcionar la luz de salida. A continuación, la lente 243 recibe la luz de salida (por ejemplo, las emisiones de luz) desde el objeto 268 y dirige la luz de salida de nuevo hacia el divisor 242 de haz. El divisor 242 de haz puede permitir que una parte de la luz de salida se propague a través del mismo a lo largo del eje óptico. A continuación, la luz de salida puede ser detectada por un detector de objetos (no mostrado).

20 Tal como se muestra en la Figura 3, el reflector 280 de entrada EPI incluye dos pasos 282 y 284 que permiten que los haces 230 y 232 de luz se propaguen a través de los mismos sin ser afectados por el reflector 280 de entrada. Por consiguiente, el divisor 242 de haz puede reflejar los haces 230A, 230B, 232A y 232B de luz incidentes y reflejados y puede reflejar también la luz de excitación.

25 Las Figuras 4-9 muestran diferentes relaciones de proyección entre los haces 230B y 232B de luz reflejados y los puntos 270 y 272 de haz correspondientes sobre la superficie 264 del detector. Tal como se ha descrito anteriormente, la relación de proyección entre los haces de luz reflejados se basa en la posición en la que se encuentra el objeto con relación a la región focal. Cuando el objeto es movido con respecto a la región focal, la relación de proyección entre los haces de luz reflejados cambia y, por consiguiente, cambia también la separación relativa entre los haces de luz reflejados. Las Figuras 4-9 ilustran cómo puede cambiar una distancia SD de separación medida entre los puntos de haz a medida que cambia la relación de proyección entre los haces de luz reflejados. Sin embargo, la distancia SD de separación es sólo una manera de determinar la separación relativa entre los haces de luz reflejados. Por consiguiente, las personas con conocimientos en la materia entienden que las Figuras 4-9 ilustran sólo una manera de determinar la separación relativa y que son posibles otras maneras de determinar la separación relativa o la relación de proyección.

30 Las Figuras 4 y 5 muestran una relación de proyección entre los haces 230B y 232B de luz reflejados cuando el conjunto 202 óptico (Figura 2) está en foco con respecto a un objeto 268. Tal como se muestra, los haces 230A y 232A de luz incidentes se propagan a través de la lente 243 paralelos entre sí y separados por una separación PS_1 entre trayectorias. En la realización ilustrada, los haces 230A y 232A de luz incidentes se propagan paralelos al eje 252 óptico de la lente 243 y son equidistantes desde el eje 252 óptico. En realizaciones alternativas, los haces 230A y 232A de luz incidentes pueden propagarse de manera no paralela con respecto al eje 252 óptico y tienen separaciones diferentes del mismo. En una realización alternativa particular, uno de los haces 230A o 232A de luz incidentes coincide con el eje 252 óptico de la lente 243 y el otro está separado del eje 252 óptico.

35 Los haces 230A y 232A de luz incidentes son dirigidos por la lente 243 para converger hacia la región 256 focal. En dichas realizaciones, en las que los haces de luz incidentes no son paralelos al eje óptico, la región focal puede tener una ubicación diferente de la ubicación mostrada en la Figura 4. Los haces 230A y 232A de luz incidentes son reflejados por el objeto 268 y forman los haces 230B y 232B de luz reflejados. Los haces 230B y 232B de luz

reflejados vuelven a, y se propagan a través de, la lente 243 y en paralelo al eje 252 óptico. Los haces 230B y 232B de luz reflejados salen de la lente 243 paralelos entre sí y separados por una separación PS_2 entre trayectorias. Cuando el conjunto 202 óptico está en foco, las separaciones PS_1 y PS_2 entre trayectorias son iguales.

5 Por consiguiente, cuando el conjunto 202 óptico está en foco, la relación de proyección de los haces 230B y 232B de luz reflejados que salen de la lente 243 incluye dos haces de luz paralelos. El tren 240 óptico está configurado para mantener la relación de proyección paralela. Por ejemplo, cuando el conjunto 202 óptico está en foco, los haces 230B y 232B de luz reflejados son paralelos entre sí cuando salen del generador 241 de doble haz, cuando
10 salen del combinador 244 de haces, y cuando son reflejados por el espejo 245 desviador. Aunque la relación de proyección se mantiene, la separación PS_2 entre trayectorias puede ser re-escalada por un combinador de haces.

Tal como se muestra en la Figura 5, los haces 230B y 232B de luz reflejados de la Figura 4 son incidentes sobre la superficie 264 de detector y forman los puntos 270 y 272 de haz. Cuando el conjunto 202 óptico está en foco, los puntos 270 y 272 de haz tienen una distancia SD_2 de separación. La distancia SD_2 de separación puede estar basada en (o puede ser una función de) las dimensiones del combinador 244 de haces y un ángulo de incidencia
15 con respecto a las superficies paralelas del combinador 244 de haces y los haces 230B y 232B de luz reflejados incidentes. La distancia SD_2 de separación se basa también en la relación de proyección de los haces 230B y 232B de luz reflejados que salen de la lente 243. Tal como se muestra en la Figura 5, la superficie 264 del detector tiene un punto central o región 266. Si todos los componentes 241-245 ópticos (Figura 2) del tren 240 óptico están en las posiciones deseadas respectivas, los puntos 270 y 272 de haz pueden estar separados homogéneamente
20 desde la región 266 central a lo largo de un eje X y centrados verticalmente dentro de la superficie 264 de detector. Tal como se muestra también, los puntos 270 y 272 de haz pueden tener una morfología seleccionada que está correlacionada con el conjunto 202 óptico que está en foco. Por ejemplo, los puntos 270 y 272 de haz pueden tener un radio de Airy que está correlacionado con el conjunto 202 óptico que está en foco.

Las Figuras 6 y 7 muestran una relación de proyección entre los haces 230B y 232B de luz reflejados cuando el conjunto 202 óptico (Figura 2) está debajo del foco. Tal como se ha descrito anteriormente, los haces 230A y 232A de luz incidentes se propagan a través de la lente 243 paralelos entre sí y separados por la separación PS_1 entre trayectorias. Los haces 230A y 232A de luz incidentes se cruzan entre sí en la región 256 focal y, a continuación, son reflejados por el objeto 268 para formar los haces 230B y 232B de luz reflejados. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 6, cuando los rayos 230B y 232B de luz reflejados salen de la lente 243, los haces 230B y 232B de luz reflejados son ligeramente convergentes hacia el eje 252 óptico y entre sí. Tal como se muestra
30 también, la separación PS_2 entre trayectorias es mayor que la separación PS_1 entre trayectorias.

Por consiguiente, cuando el objeto 268 está situado por debajo de la región 256 focal, la relación de proyección de los haces 230B y 232B de luz reflejados incluye dos haces de luz que convergen uno hacia el otro. De manera similar a lo indicado anteriormente, el tren 240 óptico está configurado para mantener la relación de proyección convergente. Por ejemplo, los haces 230B y 232B de luz reflejados convergen uno hacia el otro cuando salen del generador 241 de doble haz, cuando salen del combinador 244 de haces y cuando son reflejados por el espejo 245 desviador.
35

Tal como se muestra en la Figura 7, cuando el objeto 268 está situado por debajo de la región 256 focal, los puntos 270 y 272 de haz tienen una distancia SD_3 de separación que es menor que la distancia SD_2 de separación (Figura 5). La distancia SD_3 de separación es menor debido a que los haces 130B y 132B de luz reflejados convergen uno hacia el otro a lo largo de la pista óptica entre la lente 243 y el detector 250 de enfoque. Tal como se muestra también en la Figura 7, los puntos 270 y 272 de haz pueden tener una morfología seleccionada que está correlacionada con los puntos 270 y 272 de haz. La morfología de los puntos 270 y 272 de haz cuando el objeto 268 está situado por debajo de la región 256 focal es diferente de la morfología de los puntos 270 y 272 de haz cuando el objeto 268 está en foco. Los puntos 270 y 272 de haz pueden tener un radio de Airy diferente que está correlacionado con el objeto que está por debajo de la región 256 focal.
40
45

Las Figuras 8 y 9 muestran una relación de proyección entre los haces 230B y 232B de luz reflejados cuando el conjunto 202 óptico (Figura 2) está encima del foco. Tal como se ha descrito anteriormente, los haces 230A y 232A de luz incidentes se propagan a través de la lente 243 paralelos entre sí y separados por una separación PS_1 entre trayectorias. Antes de que los haces 230A y 232A de luz incidentes lleguen a la región 256 focal, los haces 230A y 232A de luz incidentes son reflejados por el objeto 268 para formar los haces 230B y 232B de luz reflejados. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 8, cuando los haces 230B y 232B de luz reflejados salen de la lente 243, los haces 230B y 232B de luz reflejados divergen alejándose del eje 252 óptico y uno del otro. Tal como se muestra también, la separación PS_2 entre trayectorias es menor que la separación PS_1 entre trayectorias.
50

Por consiguiente, cuando el objeto 268 está situado por encima de la región 256 focal, la relación de proyección de los haces 230B y 232B de luz reflejados incluye dos haces de luz que divergen uno del otro. El tren 240 óptico está
55

configurado para mantener la relación de proyección divergente. Por ejemplo, los haces 230B y 232B de luz reflejados divergen uno del otro cuando salen del generador 241 de doble haz, cuando salen del combinador 244 de haces y cuando son reflejados por el espejo 245 desviador.

5 Tal como se muestra en la Figura 9, cuando el objeto 268 está situado por encima de la región 256 focal, los puntos 270 y 272 de haz tienen una distancia SD_4 de separación que es mayor que la distancia SD_2 de separación. La distancia SD_4 de separación es mayor debido a que los haces 130B y 132B de luz reflejados divergen uno del otro a lo largo de la pista óptica entre la lente 243 y el detector 250 de enfoque. Tal como se muestra también en la Figura 9, los puntos 270 y 272 de haz pueden tener una morfología seleccionada que está correlacionada con los puntos 270 y 272 de haz. La morfología de los puntos 270 y 272 de haz cuando el objeto 268 está situado por encima de la región 256 focal es diferente de la morfología de los puntos 270 y 272 de haz cuando el objeto 268 está en foco o por debajo de la región 256 focal. De manera similar, los puntos 270 y 272 de haz pueden tener un radio de Airy diferente que está correlacionado con el objeto que está por debajo de la región 256 focal.

15 Tal como se ha descrito anteriormente, si el objeto 268 está por debajo de la región 256 focal, la distancia SD_3 de separación es menor que la distancia SD_2 de separación en la que el objeto 268 está dentro de la región 256 focal. Si el objeto 268 está por encima de la región 256 focal, la distancia SD_4 de separación es mayor que la distancia SD_2 de separación. Como tal, el conjunto 202 óptico no sólo determina que el objeto 268 no está situado dentro de la región 256 focal, sino que puede determinar también una dirección para mover el objeto 268 con respecto a la lente 243. Además, un valor de la distancia SD_3 de separación puede ser usado para determinar la distancia para mover el objeto 268 con respecto a la lente 243. Tal como se expone en la presente memoria, una medición de la distancia de separación en un detector puede ser usada para determinar la distancia de trabajo entre la lente y un objeto que está siendo detectado a través de la lente. Además, la distancia de separación en el detector puede ser usada para determinar un perfil de una superficie del objeto.

25 Por consiguiente, la separación relativa (por ejemplo, una distancia de separación) es una función de la relación de proyección (es decir, a qué velocidad divergen o convergen los haces 230B y 232B de luz reflejados) y una longitud de la pista óptica medida desde la lente 243 al detector 250 de enfoque. A medida que la pista óptica entre la lente 243 y el detector 250 de enfoque aumenta en longitud, la distancia de separación disminuye o aumenta si el objeto no está en el foco. De esta manera, la longitud de la pista óptica puede estar configurada para facilitar la distinción de las distancias SD_3 y SD_4 de separación. Por ejemplo, la pista óptica puede estar configurada de manera que los haces de luz reflejados convergentes no se crucen entre sí y/o puede estar configurada de manera que los haces de luz divergentes no superen una separación relativa predeterminada entre sí. Con este fin, la pista óptica entre los componentes ópticos del tren 240 óptico puede ser alargada o acortada según se desee.

30 Además, pueden añadirse componentes ópticos adicionales, tales como un dispositivo desviador de haz, para aumentar la longitud de la trayectoria óptica. Un dispositivo desviador de haz u otro dispositivo para aumentar la longitud de la trayectoria óptica puede actuar como un amplificador ya que el aumento de la longitud de la trayectoria para dos haces que se desvían de la paralela aumentará la magnitud de la desviación según es percibida sobre la superficie de un detector que intersecta los dos haces (es decir, la mayor longitud de trayectoria aumentará la distancia de separación de los puntos generados a partir de haces divergentes y disminuirá la distancia de separación para los puntos generados a partir de haces convergentes).

40 En realizaciones particulares, el sistema informático que recibe los datos de enfoque desde el detector 250 de enfoque sólo identifica un centroide de cada punto de haz para determinar la distancia SD de separación. Sin embargo, el sistema informático puede analizar también una morfología de cada punto de luz. Tal como se ha mostrado anteriormente, los puntos 270 y 272 de haz pueden tener diferentes radios de Airy (o discos) en base al grado de enfoque del conjunto 202 óptico. Los radios de Airy pueden ser analizados además de la distancia SD de separación para determinar un grado de enfoque del conjunto 202 óptico.

45 La Figura 10 ilustra realizaciones alternativas para determinar la separación relativa entre los haces 902 y 904 de luz reflejados. Tal como se muestra en la Figura 10, los haces 902 y 904 de luz reflejados salen de la lente 906 teniendo una relación de proyección divergente. Sin embargo, la relación de proyección puede ser también paralela o convergente. Los haces 902 y 904 de luz reflejados pueden ser redirigidos a lo largo de una pista óptica por un tren 908 óptico (indicado generalmente por un cuadro de líneas discontinuas).

50 La Figura 10 ilustra diversas realizaciones en las que los detectores de punto tienen relaciones espaciales conocidas uno con respecto a los otros y detectan los puntos de haz correspondientes. Los detectores de punto pueden ser, por ejemplo, detectores de enfoque o detectores de distancia de trabajo, tal como se ha descrito anteriormente. En una primera realización, el haz 902 de luz reflejado puede tener una trayectoria 912 óptica y es incidente sobre un detector 916 de punto. El haz 904 de luz reflejado puede tener una trayectoria 914 óptica y es incidente sobre un detector 918 de punto. (Los componentes 933 y 935 ópticos se proporcionan como cuadros de líneas discontinuas para indicar que los componentes ópticos están opcionalmente presentes, por ejemplo, no

estando presentes en una primera realización de la Figura 10). Los detectores 916 y 918 de punto tienen una relación espacial conocida unos con respecto a los otros. Por ejemplo, los detectores 916 y 918 de punto pueden estar orientados para estar orientados en una dirección común y para estar separados entre sí una distancia D_1 . Cada uno de los detectores 916 y 918 de punto puede detectar un punto 922 y 924 de haz correspondiente de entre los haces 902 y 904 de luz reflejados, respectivamente.

Tal como se ha descrito anteriormente, cuando un objeto es movido con respecto a la región focal, la relación de proyección entre los haces de luz reflejados cambia. Cuando la relación de proyección cambia, las ubicaciones de los puntos de haz sobre las superficies del detector se mueven de una manera predeterminada. El cambio en la ubicación de cada punto de haz puede ser usado para determinar un grado de enfoque del objeto, una distancia de trabajo desde la lente al objeto, o un perfil de la superficie del objeto. Más específicamente, el cambio de ubicación de punto de cada haz reflejado puede ser usado para determinar la separación relativa entre los haces 902 y 904 de la luz reflejados. En la primera realización, los puntos 922 y 924 de haz se mueven en una manera similar a la descrita con respecto a los puntos 270 y 272 de haz en las Figuras 4-9.

En una segunda realización mostrada en la Figura 10, el haz 902 de luz reflejado puede tener una trayectoria 932 óptica en la que el haz es reflejado, por separado, por un componente 933 óptico y es incidente sobre un detector 936 de punto. El haz 904 de luz reflejado puede tener una trayectoria 934 óptica en la que el haz es reflejado, por separado, por un componente 935 óptico y es incidente sobre un detector 938 de punto. Los detectores 936 y 938 de punto tienen una relación espacial conocida uno con respecto al otro. Los detectores 936 y 938 de punto están directamente enfrentados entre sí. Tal como se muestra, cada uno de los detectores 936 y 938 de punto puede detectar un punto 942 y 944 de haz correspondiente a partir de los haces 902 y 904 de luz reflejados, respectivamente. En la segunda realización, los puntos 942 y 944 de haz se mueven en una dirección común cuando la relación de proyección de los haces 902 y 904 de luz reflejados cambia. La separación relativa puede ser determinada como una función de la distancia y la dirección movida por los puntos 942 y 944 de haz.

La segunda realización puede ser usada en sistemas ópticos en los que, por ejemplo, el espacio del sistema es limitado o está restringido. Además, la segunda realización puede ser usada cuando es deseable igualar las longitudes de trayectoria óptica de los haces 930 y 932 de luz reflejados. Por ejemplo, los componentes 933 y 935 ópticos pueden estar situados a diferentes distancias D_2 y D_3 desde los detectores 936 y 938 de punto correspondientes para igualar las longitudes de trayectoria óptica. En realizaciones alternativas, los sistemas ópticos pueden tener configuraciones diferentes de los detectores de punto, tal como se muestra en la Figura 10. Por ejemplo, en una realización, el sistema óptico puede tener detectores 918 y 936 de punto. Por consiguiente, los sistemas ópticos pueden determinar la separación relativa en base no sólo a las ubicaciones de punto en uno o más detectores de punto, sino también en base a las relaciones espaciales entre los detectores de punto.

Las Figuras 11-14 ilustran un efecto sobre los haces de luz reflejados por dos componentes ópticos cuando uno de los componentes ópticos está mal posicionado. A lo largo de la vida útil de un sistema óptico, diversos componentes ópticos usados por el mecanismo de enfoque pueden ser desplazados, rotados o sino movidos desde una posición deseada o preestablecida. Tal como se muestra en la Figura 11, los componentes 341 y 342 ópticos están posicionados uno respecto al otro y están configurados para facilitar el redireccionamiento de los haces de luz reflejados hacia una superficie 364 del detector (mostrada en la Figura 12). El componente 341 óptico se muestra tanto en una posición deseada (indicada mediante líneas continuas) como en una posición mal orientada (indicada mediante líneas discontinuas) donde el componente 341 óptico es girado alrededor de un eje 390. Los haces de luz reflejados se muestran en una trayectoria óptica deseada (indicada mediante líneas continuas) y en una trayectoria óptica (indicada mediante líneas discontinuas) en la que el componente 341 óptico ha sido girado ligeramente.

La Figura 12 ilustra puntos 370 y 372 de haz sobre una superficie 364 del detector que son proporcionados por los diferentes conjuntos de haces de luz reflejados mostrados en la Figura 11. Los puntos 370A y 372A de haz ilustran una ubicación relativa de los puntos de haz cuando los componentes 341 y 342 ópticos están posicionados apropiadamente. Los puntos 370B y 372B de haz ilustran una ubicación relativa de los puntos de haz cuando los componentes 341 y 342 ópticos no están posicionados apropiadamente. Los puntos 370A y 372A de haz tienen una distancia SD_5 de separación, y los puntos 370B y 372B de haz tienen una distancia SD_6 de separación. Tal como se muestra, las distancias SD_5 y SD_6 de separación son sustancialmente iguales. Las distancias SD_5 y SD_6 de separación son sustancialmente iguales debido a que cada haz de luz reflejado es afectado de manera similar por el componente 341 óptico. De esta manera, la distancia SD de separación puede mantenerse incluso cuando uno de los componentes ópticos está mal posicionado.

Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 12, el par de puntos 370B y 372B de haz han sido desplazados una distancia 392 lateral debido al movimiento del componente 341 óptico desde la posición deseada. El sistema informático puede estar configurado para determinar el enfoque en base a la separación relativa (por ejemplo, distancia de separación) entre los puntos 370B y 372B de haz, independiente del desplazamiento. El sistema

informático puede determinar que los puntos 370 y 372 de haz han sido desplazados conjuntamente desde ubicaciones deseadas. Por ejemplo, el sistema informático puede determinar una deriva común por los puntos 370 y 372 de haz en la que los puntos de haz se han movido en una dirección y una distancia comunes desde una ubicación original o una ubicación deseada. Dicha información puede ser usada como un diagnóstico de sistema, por ejemplo, alertando al sistema informático de que al menos uno de los componentes ópticos se ha movido desde la posición o las posiciones deseadas.

Tal como se muestra en la Figura 13, los componentes 341 y 342 ópticos están posicionados uno con relación al otro y están configurados para facilitar el redireccionamiento de los haces de luz reflejados hacia una superficie 364 del detector (mostrada en la Figura 14). El componente 342 óptico se muestra en una posición mal orientada en la que el componente 342 óptico ha sido girado alrededor de un eje 394 desde la posición mostrada en la Figura 10. Tal como se muestra, los haces de luz reflejados son reflejados por el componente 342 óptico de manera que los haces de luz se proyectan en un ángulo alejándose del plano de la página.

La Figura 14 ilustra los puntos 370 y 372 de haz sobre la superficie 364 del detector que son proporcionados por los haces de luz reflejados mostrados en la Figura 13. Los puntos 370A y 372A de haz ilustran una ubicación relativa de los puntos de haz cuando los componentes 341 y 342 ópticos están posicionados apropiadamente. Los puntos 370B y 372B de haz ilustran una ubicación relativa de los puntos de haz cuando los componentes 341 y 342 ópticos no están posicionados apropiadamente. Los puntos 370A y 372A de haz tienen una distancia SD_7 de separación, y los puntos 370B y 372B de haz tienen una distancia SD_8 de separación. Tal como se muestra, las distancias SD_7 y SD_8 de separación son sustancialmente iguales. Las distancias SD_7 y SD_8 de separación son sustancialmente iguales debido a que cada haz de luz reflejado es afectado de manera similar por el componente 342 óptico. De manera similar, el par de puntos 370B y 372B de haz ha sido desplazado una distancia 396 vertical debido al movimiento del componente 341 óptico desde la posición deseada.

El sistema informático puede determinar que los puntos 370 y 372 de haz han sido desplazados conjuntamente desde las ubicaciones deseadas. Por ejemplo, el sistema informático puede determinar una deriva común por los puntos 370 y 372 de haz en la que los puntos de haz se han movido en una dirección y una distancia comunes desde una ubicación original o una ubicación deseada. Dicha información puede ser usada para un diagnóstico del sistema para identificar que los componentes están mal alineados y, en algunas realizaciones, para indicar la naturaleza o el tipo de la mala alineación.

Tal como se ilustra mediante los ejemplos mostrados en las Figuras 11 a 14, una ventaja de las realizaciones particulares de la invención es que el enfoque puede ser determinado independientemente de la mala alineación de los componentes ópticos. Por el contrario, muchos otros sistemas de enfoque que se basan en la ubicación de un punto de haz con relación a una ubicación fija pueden estar sujetos a error debido a la falta de alineación de los componentes ópticos. A su vez, esto puede requerir un nivel de atención no deseado para la calibración del sistema de lo necesario para las realizaciones de la presente invención. De manera similar, la distancia de trabajo entre una lente objetivo y un objeto puede ser determinada independientemente de dicha falta de alineación de los componentes ópticos.

En algunas realizaciones, uno o más de los componentes ópticos en el tren óptico puede ser movido de manera selectiva. Por ejemplo, si el par de puntos 370 y 372 de haz se moviera tanto que uno o más de los puntos de haz fuese indetectable, el sistema óptico podría mover, de manera selectiva, al menos uno de los componentes 341 a 342 ópticos para mover el par de puntos de haz a una posición aceptable. Los componentes 341 y 342 ópticos podrían ser al menos girados o movidos a una posición diferente.

Además, en realizaciones alternativas, uno o más de los componentes ópticos podría ser movido de manera selectiva para redirigir los haces de luz reflejados a un detector diferente. Por ejemplo, si los haces de luz reflejados requieren un tipo diferente de detección o una superficie detector de tamaño diferente debido a un cambio en las lentes conjugadas, uno o más de los componentes ópticos podría ser movido para cambiar la pista óptica y para dirigir los haces de luz reflejados a un detector diferente.

Con referencia a la realización ilustrada mostrada en las Figuras 4-9, los haces 230A y 232A de luz incidentes están igualmente descentrados con relación al eje 252 óptico. Sin embargo, en realizaciones alternativas, los haces 230A y 232A de luz incidentes pueden estar ubicados en posiciones diferentes. Por ejemplo, el haz 230A de luz incidente puede estar ubicado a una distancia o separación mayor desde el eje 252 óptico que el haz 232A de luz incidente. En dichas realizaciones, los puntos 270 y 272 de haz todavía pueden ser usados para determinar la distancia de separación. Sin embargo, debido a las diferentes distancias desde el eje 252 óptico, los puntos 270 y 272 de haz pueden tener cambios de posición de diferente magnitud sobre la superficie 264 del detector. Por ejemplo, el punto 270 de haz puede moverse una distancia mayor sobre la superficie 264 del detector que la distancia en la que se mueve el punto 272 de haz sobre la superficie 264 del detector. Sin embargo, la diferencia esperada en la magnitud del cambio puede ser tomada en cuenta con el fin de determinar con precisión el grado

de enfoque o la distancia de trabajo para el sistema óptico en base a la separación relativa entre el punto 270 de haz y el punto 272 de haz.

5 En otras realizaciones, uno de los haces de luz incidentes puede coincidir con el eje 252 óptico mientras que el otro haz de luz está separado de y se propaga a lo largo del eje 252 óptico. En dichas realizaciones, el haz de luz
 10 incidente que está separado del eje óptico se moverá cuando el objeto es movido fuera de foco tal como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, el punto de haz correspondiente al haz de luz incidente que coincide con el eje 252 óptico no se moverá sobre la superficie 264 del detector cuando el objeto es movido fuera de foco. No obstante, los cambios en la separación relativa entre los puntos de haz pueden ser usados para determinar el grado de enfoque o la distancia de trabajo para el sistema óptico. Además, los cambios en la posición de los
 15 componentes ópticos (por ejemplo, rotación, deriva) u otros efectos adversos pueden causar que ambos puntos de haz se muevan. En esta realización, el movimiento del haz que coincide con el eje óptico es indicativo de la alineación alterada de los componentes ópticos y será distinguible de un cambio de enfoque o un cambio en la distancia de trabajo entre la lente y el objeto que se está observando. La distinción puede realizarse debido a que un cambio de enfoque o de distancia de trabajo no causaría el movimiento del haz que coincide con el eje óptico en ausencia de un cambio en la alineación de los componentes. De esta manera, el uso de un haz que coincide
 20 con el eje óptico puede ser ventajoso para proporcionar información de diagnóstico acerca de la alineación del sistema óptico, además de proporcionar información acerca del grado de enfoque o la distancia de trabajo entre una lente de objetivo y un objeto que está siendo observado.

20 La Figura 15 es una vista lateral de una celda 400 de flujo que puede ser usada en diversas realizaciones. Cuando el objeto incluye una celda de flujo u otros sustratos ópticos que tienen múltiples capas de diferente índice de refracción, los haces de luz incidentes pueden ser reflejados en múltiples puntos dentro de la celda de flujo. Por ejemplo, la celda 400 de flujo incluye un cubreobjetos o capa 402 superior que tiene superficies 404 y 406 opuestas y una capa 408 inferior que tiene superficies 410 y 412 opuestas. Tal como se muestra, las capas 402 y 408 superior e inferior tienen un canal 414 de flujo de la celda 400 de flujo que se extiende entre las mismas. El canal
 25 414 de flujo puede incluir un fluido F que fluye a través del mismo. Cuando los haces 430A y 432A de luz incidentes son dirigidos hacia una región 456 focal dentro o a lo largo de la celda 400 de flujo, los haces 430A y 432A de luz incidentes pueden ser reflejados por la celda 400 de flujo en múltiples puntos P a lo largo de un eje 452 óptico de la lente (no mostrada). Por ejemplo, si el conjunto óptico está configurado para explorar la superficie 410 de la capa 408 inferior, los haces 430A y 432A de luz incidentes son reflejados en los puntos P₁-P₄ de reflexión antes de llegar a la región 456 focal. Dicha reflexión proporciona haces de luz reflejados no deseados (indicados mediante líneas discontinuas). Los haces de luz reflejados no deseados pueden ser detectados por un detector de enfoque (no mostrado).

30 Por consiguiente, en algunas realizaciones, un conjunto óptico puede incluir un limitador de rango, tal como el limitador 254 de rango mostrado en las Figuras 2 y 3. Los limitadores de rango incluyen ranuras o aberturas que filtran o eliminan los haces de luz reflejados no deseados a partir de la luz de salida de manera que el detector de enfoque no malinterprete las señales de luz que inciden sobre la superficie del detector de enfoque. El limitador 254 de rango puede estar configurado para eliminar los haces de luz reflejados que no están dentro de, por ejemplo, +/- 20um de la región 456 focal. El limitador de rango incluye una abertura para cada haz de luz reflejado, tal como los haces 230B y 232B de luz reflejados mostrados en las Figuras 2 y 3. Además, los haces de luz reflejados que
 40 divergen o convergen con un ángulo excesivo pueden ser filtrados también por el limitador de rango.

45 Las Figuras 16A y 16B ilustran conjuntos 850 y 880 ópticos alternativos. En diversas realizaciones, los sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden usar una pluralidad de pares de haces de luz incidentes. Por ejemplo, el conjunto 850 óptico incluye una lente 854 conjugada y componentes 860 y 862 ópticos para suministrar y recibir haces de luz tal como se ha descrito en la presente memoria para facilitar la obtención de imágenes/exploración/ perfilación de un objeto 852. El componente 860 óptico está configurado para dirigir un primer par de haces 870 y 872 de luz incidentes paralelos en paralelo a un eje 875 óptico de la lente 854 de manera que el primer par de haces 870 y 872 de luz incidentes sean dirigidos hacia una región 856A focal situada sobre el eje 875 óptico. El componente 862 óptico está configurado para dirigir un segundo par de haces 874 y 876 de luz incidentes paralelos a la lente 854 en un ángulo no ortogonal con respecto al eje 875 óptico de manera que
 50 el segundo par de haces 874 y 876 de luz incidentes sean dirigidos hacia una región 856B focal situada en una ubicación diferente sobre el plano focal.

55 La Figura 16B ilustra el conjunto 880 óptico, que incluye una lente 882 conjugada y un componente 884 óptico común. El componente 884 óptico está configurado para dirigir múltiples pares de haces de luz incidentes a una lente 886 conjugada. En la realización ilustrada, el componente 884 óptico es un generador de haz tal como los descritos anteriormente. Aunque no se muestra, el componente 884 óptico puede recibir haces de luz separados desde fuentes de luz separadas en las que los haces de luz son incidentes sobre el componente 884 óptico en diferentes ángulos. De esta manera, el componente 884 óptico puede generar pares 890 y 892 primero y segundo de haces de luz incidentes que no son paralelos uno con respecto al otro. Tal como se ha descrito anteriormente

con respecto a la Figura 16A, los pares 890 y 892 primero y segundo de haces de luz incidentes son dirigidos hacia regiones 888A y 888B focales separadas situadas en un plano focal común.

5 Los conjuntos 850 y 880 ópticos pueden ser usados en diversos sistemas ópticos para diversos fines. En ambos conjuntos 850 y 880 ópticos, los puntos de haz correspondientes a los haces de luz reflejados pueden ser detectados y la separación relativa para cada par de haces de luz reflejados puede ser determinada. Mediante la
 10 determinación de si los diferentes pares de haces de luz incidentes están o no en foco con el objeto, dichos sistemas ópticos pueden determinar un ángulo del objeto con respecto al eje óptico de la lente o de cualquier otro eje de referencia. De esta manera, la información puede ser usada para determinar si el objeto está inclinado o no o si ha cambiado de orientación. Además, pueden usarse múltiples pares de haces de luz incidentes como un mecanismo redundante para perfilar una superficie o para determinar una distancia de trabajo entre la lente y el objeto. Aunque los conjuntos 850 y 880 ópticos muestran sólo dos pares de haces de luz incidentes, pueden usarse más de dos pares. En realizaciones particulares, puede ser ventajoso usar al menos 3 pares de haces incidentes o usar al menos 4 pares de haces incidentes. Las múltiples regiones focales pueden estar alineadas linealmente o pueden estar posicionadas de manera no lineal con el fin de definir una forma geométrica
 15 bidimensional sobre el objeto.

La información acerca del ángulo o de la orientación de un objeto puede ser procesada por un controlador de sistema de un sistema óptico para ajustar el ángulo del objeto. El ángulo puede ser ajustado para conseguir una inclinación o un ángulo deseado de un objeto. Por ejemplo, el ángulo de un objeto plano puede ser ajustado de
 20 manera que esté más cerca de ser ortogonal al eje óptico de una lente objetivo usada para obtener imágenes del objeto. De esta manera, un sistema óptico puede estar configurado para ajustar un objeto para posicionar una superficie plana del objeto para que sea ortogonal al eje óptico de una lente que se usa para obtener imágenes de la superficie.

Las Figuras 17 y 18 son vistas en perspectiva y en planta, respectivamente, de un conjunto 502 óptico formado según otra realización. El conjunto 502 óptico puede ser usado con diversos sistemas ópticos, tales como el sistema 100 óptico mostrado en la Figura 1. Tal como se muestra, el conjunto 502 óptico incluye un tren 540
 25 óptico de componentes 541-545 ópticos que dirige los haces de luz a lo largo de una pista óptica entre un objeto de interés (no mostrado) y un detector 550 de enfoque. La serie de componentes 541-545 ópticos del tren 540 óptico incluye un generador 541 de doble haz, un espejo 542 de enfoque de objetivo, una lente 543 conjugada, un combinador 544 de haces y un dispositivo 545 desviador de haz.

30 El conjunto 502 óptico incluye una fuente 512 de luz de referencia que proporciona un haz 528 de luz. En algunas realizaciones, el haz 528 de luz puede ser transmitido primero a través de una lente 546 colimadora (Figura 18) y una cuña 547 óptica (Figura 18). La cuña 547 óptica puede ser girada para un ajuste fino de una trayectoria óptica de los haces de luz. Tal como se muestra en las Figuras 17 y 18, el haz 528 de luz es incidente sobre el generador 541 de doble haz, que proporciona un par de haces de luz incidentes paralelos tal como se ha descrito
 35 anteriormente. Los haces de luz incidentes paralelos son dirigidos hacia el espejo 542 de enfoque.

La lente 546 colimadora puede ser usada para configurar los haces de luz incidentes y reflejados según se desee. Por ejemplo, la lente 546 colimadora puede modificar el haz 528 de luz de manera que los rayos de luz de los haces de luz incidentes no sean precisamente paralelos entre sí. Además, los rayos de luz pueden ser modificados de manera que los haces de luz reflejados tengan un diámetro mínimo en el detector 550 de enfoque cuando el
 40 conjunto 502 óptico está en foco.

El generador 541 de doble haz dirige los haces de luz incidentes paralelos hacia el espejo 542 de enfoque. El espejo 542 de enfoque refleja los haces de luz incidentes hacia la lente 543 conjugada. Tal como se muestra, el espejo 542 de enfoque incluye un par de reflectores 551 y 553 (por ejemplo, pestañas aluminizadas) que está posicionados para reflejar los haces de luz incidentes y los haces de luz reflejados desde el objeto. Los reflectores
 45 551 y 553 pueden funcionar de manera similar a un limitador de rango en el sentido de que los reflectores 551 y 553 pueden estar dimensionados para reflejar sólo un rango limitado de los haces de luz reflejados. El espejo 542 de enfoque está posicionado para reflejar los haces de luz incidentes de manera que los haces de luz incidentes se propaguen en paralelo a un eje 552 óptico de la lente 543. La lente 543 puede ser una lente objetivo conjugada cerca-infinito.

50 Tal como se ha descrito anteriormente con respecto al conjunto 202 óptico, los haces de luz reflejados pueden propagarse a lo largo de una trayectoria óptica sustancialmente igual o superpuesta con respecto a los haces de luz incidentes a través de la lente 543 al espejo 542 de enfoque que dirige el haz de luz reflejado hacia el generador 541 de doble haz. Tal como se muestra en las Figuras 17 y 18, los haces de luz reflejados son incidentes sobre y son dirigidos por el generador 541 de doble haz hacia el combinador 544 de haces. En la realización ilustrada, el combinador 544 de haces está configurado para modificar una separación entre trayectorias que separa los haces
 55 de luz reflejados. La separación entre trayectorias en el combinador 544 de haces puede ser re-escalada para que

sea sustancialmente igual a la distancia de separación de los haces de luz reflejados en el detector 550 de enfoque.

Al igual que el tren 240 óptico (Figura 2) descrito anteriormente, el tren 540 óptico está configurado para mantener una relación de proyección entre los haces de luz reflejados a lo largo de la pista óptica de manera que pueda determinarse un grado de enfoque. Tal como se muestra también en las Figuras 17 y 18, el tren 540 óptico puede incluir un dispositivo 545 desviador de haz. El dispositivo 545 desviador de haz funciona para aumentar una longitud de trayectoria óptica entre la lente 543 y el detector 550 de enfoque. El dispositivo 545 desviador de haz puede aumentar la ganancia y el rango del conjunto 502 óptico.

La Figura 19 es una vista lateral de un dispositivo 545 desviador de haz. El dispositivo 545 desviador de haz incluye un par de lados 560 y 562 separados entre sí. El lado 560 incluye una ventana 561 de entrada que está dimensionada para recibir los haces de luz reflejados desde el combinador 544 de haces. Los haces de luz reflejados entran en el dispositivo 545 desviador de haz a través de la ventana 561 de entrada y son reflejados repetidamente hacia atrás y adelante entre los lados 560 y 562. Los lados 560 y 562 pueden estar aluminizados para reducir las pérdidas ópticas. Los haces de luz reflejados pueden ser transmitidos a través de una ventana 563 de salida y se propagan al detector 550 de enfoque (mostrado en la Figura 17).

Con cada iteración en la que los haces de luz reflejados se propagan entre los lados 560 y 562, una longitud de trayectoria óptica de los haces de luz reflejados aumenta en una anchura W del dispositivo 545 desviador de haz. El número de iteraciones puede estar basado en un ángulo de incidencia entre los haces de luz reflejados y los lados 560 y 562 y una longitud L del dispositivo 545 desviador de haz. Por consiguiente, el dispositivo 545 desviador de haz puede estar dimensionado, conformado y orientado para proporcionar un aumento en la longitud de la trayectoria óptica. A su vez, el aumento de la longitud de la trayectoria óptica puede funcionar como un amplificador para aumentar la ganancia y el rango del conjunto 502 óptico.

En la realización ilustrada, el dispositivo 545 desviador de haz tiene un cuerpo óptico que tiene un material transparente. Sin embargo, en realizaciones alternativas, el dispositivo 545 desviador de haz puede incluir dos espejos opuestos con aire ambiente entre los mismos. Además, en la realización ilustrada, los lados 560 y 562 opuestos se extienden en paralelo entre sí. En realizaciones alternativas, el dispositivo 545 desviador de haz puede incluir múltiples lados o superficies que pueden extenderse o no paralelos entre sí. Opcionalmente, el detector 550 de enfoque puede estar fijado al dispositivo 545 desviador de haz.

Volviendo a las Figuras 17 y 18, el conjunto 502 óptico puede incluir también un par de detectores 570 y 572 de fase. Los detectores 570 y 572 de fase están posicionados para recibir partes respectivas de los haces de luz reflejados que son transmitidos a través del combinador 544 de haces. Los detectores 570 y 572 de fase pueden ser usados en sistemas ópticos que exploran continuamente un objeto cuando hay movimiento relativo entre el objeto y la lente conjugada en una dirección que es ortogonal (o perpendicular), al eje óptico. Los detectores 570 y 572 de fase detectan una fase de la intensidad de los haces de luz reflejados para determinar, por ejemplo, cualquier diferencia de fase que se produzca entre los haces de luz reflejados. Aunque los sistemas ejemplares en las Figuras 17 y 18 incluyen una combinación de un detector de fase y un detector de enfoque, se entenderá que puede usarse cualquier tipo de detector en ausencia del otro.

Las Figuras 20-22 ilustran un objeto 564 que está siendo explorado por el conjunto 502 óptico (Figura 17) mientras el objeto 564 se está moviendo relativamente en una dirección lateral (indicada por la flecha XD) con respecto a la lente 543 (Figura 17). La dirección XD lateral es ortogonal al eje 552 óptico de la lente 543. Para mover el objeto 564 con relación a la lente 543, el objeto 564 puede ser movido en la dirección XD lateral por un controlador de etapa y/o la lente 543 es movida en una dirección opuesta a la dirección XD lateral. En realizaciones particulares, el conjunto 502 óptico puede usar un mecanismo de detección de fase diferencial para determinar un grado de enfoque. El conjunto 502 óptico puede usar, de manera alternativa o adicional, un mecanismo de detección de fase diferencial para determinar la distancia de trabajo entre el objeto 564 y la lente 543. La Figura 20 ilustra el objeto 564 que está en foco con una región 556 focal a medida que el objeto 564 es movido en la dirección XD lateral. Si una superficie 565 del objeto 564 está situada dentro de un plano FP focal del conjunto 502 óptico, los detectores 570 y 572 de fase (Figura 17) detectarán una fase sustancialmente común para los haces 530B y 532B de luz reflejados.

La Figura 21 ilustra una exploración del objeto 564 cuando el objeto 564 está por debajo de la región 556 focal, y la Figura 22 ilustra una exploración del objeto 564 cuando el objeto 564 está por encima de la región 556 focal. Si la superficie 565 del objeto 564 está por debajo del plano FP focal, tal como se muestra en la Figura 21, los detectores 570 y 572 de fase detectarán continuamente una diferencia de fase de los haces de luz reflejados a medida que el conjunto 502 óptico explora el objeto 564. La diferencia de fase indica que el objeto 564 está por debajo de la región 556 focal o plano FP focal. De manera similar, si la superficie 565 del objeto 564 está por encima del plano FP focal, tal como se muestra en la Figura 22, los detectores 570 y 572 de fase detectarán

continuamente una diferencia de fase de los haces 530B y 532B de luz reflejados. La diferencia de fase indica que el objeto 564 está por encima de la región 556 focal.

5 El objeto 564 en las Figuras 20-22 es explorado con los haces de luz incidentes a lo largo de una superficie sustancialmente plana. Sin embargo, en realizaciones alternativas, el objeto puede incluir una matriz de micropartículas o puede tener una superficie con características de relieve tales como regiones irregulares (por ejemplo, una superficie reglada o ranurada). A medida que el conjunto 502 óptico explora la superficie del objeto, la altura o elevación de la superficie detectada puede cambiar frecuentemente debido a las micropérlas o a la superficie irregular. Dependiendo del movimiento del objeto, un haz de luz reflejado puede ser perturbado (por ejemplo, incidente sobre una micropérla) antes que el otro haz de luz reflejado. En dichas realizaciones, pueden determinarse también las posiciones relativas de las micropartículas u otras características de la superficie, unas respecto a las otras, a lo largo de la superficie.

15 La Figura 23 es una vista en perspectiva de un generador 600 de imágenes de muestra formado según una realización. El generador 600 de imágenes de muestra puede tener características, componentes, sistemas y conjuntos similares a los descritos anteriormente con respecto al sistema 100 óptico y a los conjuntos 202 y 502 ópticos. Tal como se muestra, el generador 600 de imágenes de muestra incluye una base 602 de generador de imágenes que soporta una etapa 604 que tiene un soporte 606 de muestras sobre el mismo. El soporte 606 de muestras está configurado para soportar una o más muestras 608 durante una sesión de obtención de imágenes. Las muestras 608 se ilustran como celdas de flujo en la Figura 23. Sin embargo, pueden usarse otras muestras.

20 El generador 600 de imágenes de muestra incluye también una carcasa 610 (ilustrada en líneas de trazos) y un puntal 612 que soporta la carcasa 610. La carcasa 610 puede incluir al menos una parte de un conjunto 614 óptico en la misma. El conjunto 614 óptico puede incluir un conjunto 616 de enfoque y un conjunto 630 de detección de muestra. El conjunto 616 de enfoque puede ser similar al conjunto 502 óptico descrito anteriormente. Por ejemplo, el conjunto 616 de enfoque puede incluir una cámara 620 de exploración en línea con enfoque automático que recibe los rayos de luz reflejados para determinar un grado de enfoque del generador 600 de imágenes de muestra. El generador 600 de imágenes de muestra puede incluir también una rueda 622 de filtros y un espejo 624 de alineación que dirige la luz hacia un detector 632 de muestras, que se muestra como una cámara K4 en la Figura 23.

30 La Figura 24 es un diagrama de bloques que ilustra un procedimiento 700 para determinar un grado de enfoque de un objeto con respecto a un conjunto óptico. El procedimiento 700 puede ser llevado a cabo por diversos sistemas ópticos, tales como los descritos en la presente memoria. El procedimiento 700 incluye proporcionar en 702 un par de haces de luz incidentes a una lente conjugada. La lente conjugada puede ser una lente cerca-infinito, tal como se ha descrito anteriormente con respecto a las lentes 243 y 543. Los haces de luz incidentes puede ser dirigidos para propagarse a través de la lente en paralelo a un eje óptico de la lente y son dirigidos por la lente para converger hacia una región focal. En 704, los haces de luz incidentes son reflejados por el objeto que está posicionado cerca de la región focal. Los haces de luz reflejados vuelven a, y se propagan a través de, la lente. En diversas realizaciones, el procedimiento puede incluir una o más maneras de determinar un grado de enfoque del conjunto óptico con respecto al objeto en base a características relativas de los haces de luz reflejados tal como se indica mediante las tres opciones 706, 708 y 710 ejemplares mostradas en la Figura 24.

40 Por ejemplo, el procedimiento 700 puede incluir determinar en 706 una distancia de separación que se mide entre los haces de luz reflejados. Por ejemplo, los haces de luz reflejados pueden ser incidentes sobre una superficie de detector y pueden formar puntos de haz sobre la misma. El detector puede comunicar los datos relativos a los puntos de haz detectados a un sistema informático, tal como el sistema 120 informático. El sistema informático puede incluir un módulo de control de enfoque que analiza los puntos de haz. Por ejemplo, el módulo de control de enfoque puede determinar un centroide de cada punto de haz y, a continuación, puede calcular una distancia de separación medida entre los puntos de haz.

45 Además de (o de manera alternativa a) la determinación de la distancia de separación de los puntos de haz, el procedimiento 700 puede incluir el análisis en 708 de una morfología (por ejemplo, tamaño, forma y densidad) de cada punto de haz. La morfología de cada punto de haz puede cambiar debido al grado de enfoque del conjunto óptico o debido a imperfecciones, tales como suciedad o burbujas, que interfieren con los haces de luz reflejados. Por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, los puntos de haz pueden tener diferentes radios de Airy dependiendo de si el objeto está en foco, debajo del foco, o encima del foco.

50 Además de (o de manera alternativa a) la determinación de la distancia de separación y las morfologías de los puntos de haz, el procedimiento 700 puede incluir en 710 la detección de una fase de cada uno de los haces de luz reflejados. Una parte de cada haz de luz reflejado puede ser incidente sobre y detectado por un detector de fase correspondiente. El detector de fase detecta una fase del haz de luz reflejado correspondiente.

55 El procedimiento incluye también la determinación en 712 de un grado de enfoque del conjunto óptico con respecto

al objeto en base a al menos una de entre la distancia de separación de los puntos de haz, las morfologías de los puntos de haz, y una comparación de las mediciones de fase. En realizaciones particulares, el grado de enfoque solo es determinado por la distancia de separación de los puntos de haz. En otras realizaciones, el grado de enfoque solo es determinado mediante la comparación de las fases detectadas de los haces de luz reflejados.

5 En 714, el objeto puede ser movido en una dirección hacia o alejándose de la lente en base al grado de enfoque. Por ejemplo, el objeto puede ser movido para mejorar el grado de enfoque. En algunas realizaciones, el objeto es movido en una dirección hacia o alejándose de la lente en base a las ubicaciones relativas de los puntos de haz sobre una superficie de detector, tal como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el objeto es movido en una dirección en base a una comparación de las mediciones de fase.

10 En realizaciones alternativas, las operaciones del procedimiento 700 pueden ser usadas para determinar las características de una superficie de un objeto. Por ejemplo, diversos sistemas y conjuntos ópticos pueden usar la distancia de separación determinada o las mediciones de fase detectadas para determinar una altura de una superficie. Por ejemplo, puede determinarse una altura de diversos elementos de un dispositivo semiconductor que son montados o depositados sobre una superficie del dispositivo. Las posiciones relativas de los diversos
15 elementos pueden ser determinadas también explorando la superficie a una velocidad predeterminada.

La Figura 25 es un diagrama de bloques que ilustra un bucle de control para controlar un grado de enfoque de un sistema óptico con respecto a un objeto. En 802, puede iniciarse una sesión de obtención de imágenes. En 804, el sistema óptico establece que un objeto, que puede incluir un objeto tal como se ha descrito anteriormente, está posicionado cerca de una región focal de una lente conjugada del sistema óptico. El sistema óptico puede reflejar
20 haces de luz incidentes con el objeto tal como se ha descrito anteriormente.

Opcionalmente, en 806, el sistema óptico puede determinar valores de referencia o estándares para facilitar la determinación de si el sistema óptico está en foco o no. Por ejemplo, el objeto puede ser movido en una dirección Z hacia y alejándose de la lente mientras se detectan las características relativas de los haces de luz reflejados. El sistema óptico puede detectar puntos de haz a partir de los haces de luz reflejados sobre una superficie del
25 detector y registrar las posiciones relativas de los puntos de haz a medida que el objeto es movido desde una posición encima del foco a través del plano focal y a una posición debajo del foco. Por ejemplo, los puntos de haz pueden tener una distancia de separación y morfologías de punto particulares cuando el objeto está situado a una distancia conocida por encima del plano focal, en el plano focal, y a una distancia conocida por debajo del plano focal, respectivamente. La distancia de separación deseada puede estar basada también en (o puede ser una
30 función de) las dimensiones de un generador de doble haz que proporciona haces de luz incidentes paralelos o, de manera alternativa, un combinador de haces que re-escala una separación entre trayectorias de los haces de luz reflejados. El sistema óptico puede determinar también los valores de referencia o estándares en base a las mediciones de fase detectadas de los haces de luz reflejados, tal como se ha descrito anteriormente.

En 808, el objeto es movido relativamente a una nueva posición y se mide un grado de enfoque en la nueva
35 posición. El sistema óptico en 810 puede consultar si el grado de enfoque calculado es suficiente o no. Si el grado de enfoque calculado es suficiente, el sistema óptico mueve el objeto a una nueva posición en 808. Si el grado de enfoque calculado no es suficiente, el sistema óptico consulta en 812 si la sesión de obtención de imágenes se ha completado. Por ejemplo, si el objeto se ha movido lateralmente más allá de la región focal, el sistema óptico puede determinar una puntuación nula. Si la sesión de obtención de imágenes no se ha completado, el sistema
40 óptico en 814 mueve el objeto en una dirección Z hacia o lejos de la lente. La dirección puede basarse en las características relativas determinadas por el sistema óptico. Por ejemplo, si las ubicaciones relativas de los puntos de haz indican que el objeto está debajo del foco, el objeto puede ser movido verticalmente hacia arriba hacia el plano focal. Una cantidad de movimiento puede ser también una función de las características relativas. Opcionalmente, el sistema óptico puede volver a determinar el nuevo grado de enfoque en la nueva posición Z
45 antes de moverse a una nueva posición lateral para confirmar que el grado de enfoque es suficiente. A continuación, el sistema óptico mueve en 808 el objeto a una nueva posición lateral.

La Figura 26 es un diagrama de bloques que ilustra un procedimiento 1000 para determinar una distancia de trabajo entre un objeto y una lente conjugada del conjunto óptico. La distancia de trabajo puede ser usada a continuación para determinar el grado de enfoque o un perfil de superficie de un objeto. El procedimiento 1000
50 puede ser realizado por diversos sistemas ópticos, tales como los descritos en la presente memoria. El procedimiento 1000 incluye proporcionar en 1002 un par de haces de luz incidentes a una lente conjugada. La lente conjugada puede ser una lente cerca-infinito tal como se ha descrito anteriormente con respecto a las lentes 243 y 543. Los haces de luz incidentes pueden ser dirigidos para propagarse a través de la lente en paralelo a un eje óptico de la lente. La lente dirige los haces de luz incidente para converger hacia una región focal. En 1004, los haces de luz incidentes son reflejados por el objeto posicionado cerca de la región focal. Los haces de luz reflejados vuelven a, y se propagan a través de, la lente.

Por ejemplo, el procedimiento 1000 puede incluir la determinación en 1006 de una separación relativa que es medida entre los haces de luz reflejados. Por ejemplo, los haces de luz reflejados pueden ser incidentes sobre una o más superficies del detector y pueden formar puntos de haz sobre la misma. El detector o los detectores pueden comunicar los datos relativos a los puntos de haz detectados a un sistema informático, tal como el sistema 120 informático. El sistema informático puede incluir un módulo que analiza los puntos de haz, tal como se ha descrito anteriormente. Además de (o de manera alternativa a) la determinación de la separación relativa de los puntos de haz, el procedimiento 1000 puede incluir el análisis en 1008 de una morfología (por ejemplo, tamaño, forma y densidad) de cada punto de haz. Por otra parte, además de (o de manera alternativa a) la determinación de la separación relativa y las morfologías de los puntos de haz, el procedimiento 1000 puede incluir en 1010 la detección de una fase de cada uno de los haces de luz reflejados. Una parte de cada haz de luz reflejado puede ser incidente sobre y puede ser detectado por un detector de fase correspondiente. El detector de fase detecta una fase del haz de luz reflejado correspondiente.

El procedimiento incluye también la determinación en 1012 de una distancia de trabajo del conjunto óptico con respecto al objeto en base a al menos una de entre la separación relativa entre el haz de luz reflejado, las morfologías punto de haz, y una comparación de las mediciones de fase. En 1014, un sistema informático registra la distancia de trabajo en la ubicación particular con respecto al objeto. En 1016, el sistema informático puede determinar un perfil de la superficie del objeto en base a las distancias de trabajo determinadas por el sistema óptico. De manera alternativa o adicional, un sistema informático puede determinar un ángulo de la superficie del objeto con respecto al eje óptico de la lente objetivo. El sistema informático puede estar configurado además para instruir al sistema óptico para ajustar el ángulo relativo entre la superficie del objeto y el eje óptico para conseguir una punta o inclinación u orientación deseadas. Por ejemplo, puede realizarse un ajuste para posicionar la superficie del objeto para ser ortogonal al eje óptico de la lente objetivo.

La Figura 27 es un diagrama de bloques que ilustra bucles de control para operar un sistema óptico según diversas realizaciones. En 1202, puede iniciarse una sesión de determinación del perfil de un objeto. El objeto puede ser, por ejemplo, una celda de flujo o un chip de semiconductores. En 1204, el sistema óptico puede ser calibrado para determinar una separación relativa de referencia que representa cuando el objeto está dentro de la región focal. Por ejemplo, pueden obtenerse imágenes del objeto a medida que el objeto es movido a lo largo del eje z hacia y desde la lente, tal como se ha descrito anteriormente. Un análisis de las imágenes puede determinar un grado de enfoque de referencia o distancia de trabajo de referencia desde la lente. En otra realización, la lente puede ser remplazada por un espejo. De esta manera, la separación relativa determinada de los haces de luz reflejados puede funcionar como una separación relativa de referencia que identifica cuándo el objeto está dentro de la región focal.

En 1206, el sistema óptico puede consultar a un usuario acerca de qué bucle de control realizar. Un primer bucle de control puede ser seleccionado por el usuario. El primer bucle de control puede ser un sistema de "bucle abierto", en el que el porta-objetos posiciona en 1208 el objeto en una posición z predeterminada. En 1210, al menos uno de entre el conjunto óptico y el porta-objetos puede ser movido en una dirección que es perpendicular al eje óptico de la lente. En realizaciones particulares, por ejemplo, aquellas que usan múltiples pares de haces incidentes tal como se muestra en las Figuras 16A y 16B, el soporte puede ser movido para ajustar la punta o la inclinación del objeto. En 1212, el sistema óptico supervisa la separación relativa a medida que el sistema óptico explora la superficie. Por ejemplo, el sistema óptico puede registrar una separación relativa para una serie de puntos de datos y asociar cada punto de datos con una posición a lo largo de la superficie. Cuando la distancia de trabajo disminuye (es decir, cuando la altura de la superficie del objeto aumenta) la separación relativa puede aumentar tal como se muestra en la Figura 9. Cuando la distancia de trabajo aumenta (es decir, cuando la altura de la superficie del objeto disminuye) la separación relativa puede disminuir tal como se muestra en la Figura 7. Por consiguiente, puede determinarse un perfil o topografía de la superficie del objeto.

El usuario puede seleccionar también un segundo bucle de control. El segundo bucle de control puede ser un sistema de "bucle cerrado" en el que el sistema óptico está configurado para mover el porta-objetos de manera que el objeto se mantenga dentro de la región focal. En 1213, el objeto es posicionado dentro de la región focal. En 1214, al menos uno de entre el conjunto óptico y el porta-objetos puede ser movido en una dirección que es perpendicular al eje óptico de la lente. En realizaciones particulares, por ejemplo, aquellas que usan múltiples pares de haces incidentes tal como se muestra en las Figuras 16A y 16B, el soporte puede ser movido para ajustar la punta o la inclinación del objeto. En 1216, el sistema óptico supervisa la separación relativa a medida que el sistema óptico explora la superficie. Cuando el objeto es movido fuera de la región focal o ya no está suficientemente en foco, el sistema óptico puede mover el objeto en la dirección z para permanecer dentro de la región focal. Por ejemplo, si la separación relativa cambia con relación a la separación relativa de referencia, el porta-objetos puede mover el objeto en una dirección que se basa en el cambio de la separación relativa. Cuando el sistema óptico mueve el porta-objetos, el sistema óptico registra la distancia que se mueve el objeto. La distancia registrada es indicativa del perfil variable. Cuando la distancia de trabajo disminuye (es decir, cuando la altura de la superficie del objeto aumenta) el sistema óptico mueve el objeto lejos de la lente. Cuando la distancia

de trabajo aumenta (es decir, cuando la altura de la superficie del objeto disminuye) el sistema óptico mueve el objeto hacia el objetivo.

5 Por consiguiente, durante los bucles de control primero y segundo, los sistemas ópticos descritos en la presente memoria pueden supervisar la separación relativa del objeto a medida que el objeto es explorado. El sistema óptico puede registrar un cambio en la distancia de trabajo, que es indicativa de un cambio en el perfil o la topografía de la superficie del objeto. En 1216, el sistema óptico puede determinar un perfil de la superficie en base a los cambios en la distancia de trabajo.

10 La Figura 28 es un diagrama de bloques de un procedimiento 1100 para operar un sistema óptico, tal como los sistemas ópticos descritos anteriormente. El procedimiento 1100 incluye proporcionar en 1102 al menos un par de haces de luz incidentes paralelos a una lente conjugada. El par de haces de luz incidentes paralelos pueden propagarse en paralelo al eje óptico de la lente o pueden formar un ángulo no ortogonal con respecto al eje óptico. En 1104, los haces de luz incidentes son reflejados por un objeto situado cerca de una región focal. Los haces de luz reflejados vuelven a, y se propagan a través de, la lente. Los haces de luz reflejados tienen una relación de proyección determinada por la posición del objeto con respecto a la región focal.

15 El procedimiento 1100 incluye también, en 1108, dirigir los haces de luz reflejados con una pluralidad de componentes ópticos. Los componentes ópticos pueden estar dimensionados, conformados y posicionados unos respecto a los otros para mantener la relación de proyección. Por ejemplo, cada componente óptico puede incluir una de entre una superficie plana común que refleja ambos haces de luz reflejados o unas superficies primera y segunda paralelas cada una de las cuales refleja uno de los haces de luz reflejados. En 1108, puede determinarse al menos uno de entre un grado de enfoque, una distancia de trabajo y un perfil de superficie de un objeto en base a la relación de proyección. El grado de enfoque, la distancia de trabajo y el perfil de la superficie pueden ser determinados por una separación relativa de los haces de luz reflejados, tal como se ha descrito anteriormente.

25 Por consiguiente, las realizaciones descritas en la presente memoria pueden incluir procedimientos y diversos sistemas y conjuntos ópticos que controlan el enfoque reflejando los haces de luz incidentes con un objeto y usando las posiciones, orientaciones relativas, y las características de los haces de luz reflejados para determinar un grado de enfoque o una distancia de trabajo entre la lente y el objeto.

30 Debe entenderse que la descripción anterior pretende ser ilustrativa, y no restrictiva. Por ejemplo, las realizaciones descritas anteriormente (y/o sus aspectos) pueden ser usadas en combinación unas con las otras. Además, pueden realizarse muchas modificaciones para adaptar una situación o un material particular a las enseñanzas de la invención sin apartarse de su alcance. Aunque los componentes y los procedimientos específicos descritos en la presente memoria pretenden definir los parámetros de las diversas realizaciones de la invención, estos no son, en modo alguno, limitativos y son realizaciones ejemplares. Muchas otras realizaciones serán evidentes para las personas con conocimientos en la materia tras la revisión de la descripción anterior. Por lo tanto, el alcance de la invención debería determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con la completa doctrina de equivalentes aplicable a dichas reivindicaciones. En las reivindicaciones adjuntas, las expresiones "que incluye/n" y "en el/la que" se usan como equivalentes españoles de las expresiones respectivas "que comprende/n" y "donde".
35 Además, en las reivindicaciones siguientes, los términos "primero", "segundo" y "tercero", etc. se usan simplemente como etiquetas, y no pretenden imponer requisitos numéricos a sus objetos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para controlar un enfoque de un sistema (100) óptico, en el que el procedimiento comprende:
 - proporcionar un par de haces (130A, 132A) de luz incidentes a una lente (118) conjugada, en el que los haces de luz incidentes son dirigidos por la lente para converger hacia una región (122) focal;
 - 5 reflejar los haces de luz incidentes con un objeto (110) posicionado cerca de la región focal, en el que los haces (130B, 132B) de luz reflejados vuelven a, y se propagan a través de, la lente;
 - determinar la separación relativa entre los haces de luz reflejados; y
 - determinar un grado de enfoque del sistema óptico con respecto al objeto en base a la separación relativa, caracterizado por que los haces de luz incidentes se propagan en paralelos entre sí cuando son recibidos por la lente y por que el objeto está en foco cuando los haces de luz reflejados salen de la lente en paralelo entre sí.
 - 10
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además mover al menos uno de entre la lente y el objeto para ajustar una posición relativa de la lente y el objeto, una respecto al otro, cuando el objeto no está en foco, mejorando de esta manera el grado de enfoque.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la operación de provisión incluye proporcionar un único haz de luz a un generador de doble haz que proporciona el par de haces de luz incidentes y, opcionalmente, en el que el generador de doble haz tiene superficies paralelas primera y segunda, en el que el generador de doble haz refleja y refracta partes del único haz de luz incidente para generar el par de haces de luz incidentes.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-3, en el que los haces de luz reflejados están separados por una separación entre trayectorias cuando salen de la lente, en el que el procedimiento comprende además modificar los haces de luz reflejados para re-escalar la separación entre trayectorias de manera que sea sustancialmente igual a la separación relativa y, opcionalmente, en el que la determinación de la separación relativa comprende determinar una distancia de separación entre los puntos de haz y, opcionalmente, en el que los haces de luz incidentes son reflejados por el objeto en múltiples puntos a lo largo de un eje óptico de la lente, en el que el procedimiento comprende además filtrar los haces de luz reflejados de manera que la separación relativa corresponda a un par predeterminado de haces de luz reflejados.
- 25
- 30 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además mover relativamente el objeto en una dirección que es sustancialmente perpendicular al eje óptico de la lente, en el que la operación de movimiento relativo incluye mover al menos uno de entre el objeto y la lente conjugada, en el que la operación de determinación incluye supervisar de manera continua la separación relativa.
- 35 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que los haces de luz reflejados salen de la lente y se propagan a lo largo de una pista óptica entre la lente y un detector, en el que la pista óptica tiene una longitud que está configurada para facilitar la determinación de la separación relativa y, opcionalmente, en el que un dispositivo desviador de haz re-dirige los haces de luz reflejados desde múltiples superficies para aumentar la longitud de las trayectorias ópticas de los haces de luz reflejados.
- 40 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el objeto es una muestra que comprende sustancias biológicas o químicas, en el que el sistema óptico realiza uno de entre una obtención de imágenes de epifluorescencia y una obtención de imágenes mediante fluorescencia de reflectancia interna total (Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF) de la muestra y, opcionalmente, en el que el objeto es una muestra que comprende sustancias biológicas o químicas, en el que el sistema óptico realiza un análisis de integración de retraso de tiempo (Time Delay Integration, TDI) de la muestra y, opcionalmente, en el que la muestra incluye una celda de flujo.
- 45 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el par de haces de luz incidentes es un primer par de haces de luz incidentes, en el que la operación de provisión comprende además proporcionar un segundo par de haces de luz incidentes a la lente conjugada, en el que los haces de luz incidentes del segundo par se propagan en paralelo entre sí cuando son recibidos por la lente, el primer par de haces de luz incidentes se propaga a través de la lente conjugada en un primer ángulo con respecto a un eje óptico y el segundo par de haces de luz incidentes se propaga a través de la lente conjugada en un segundo ángulo diferente con respecto al eje
- 50 óptico.
9. Un sistema (100) óptico, que comprende:

una fuente (112) de luz de referencia configurada para proporcionar un par de haces (130A, 132A) de luz incidentes,

una lente (118) conjugada posicionada para recibir los haces de luz incidentes, en el que la lente dirige los haces de luz incidentes hacia una región (122) focal,

5 un porta-objetos (102) configurado para soportar un objeto (110) con respecto a la región focal, en el que el objeto refleja los haces de luz incidentes de manera que los haces (130B, 132B) de luz reflejados vuelvan a, y se propaguen a través de, la lente; y

10 un módulo (152) de control de enfoque configurado para determinar una separación relativa entre los haces de luz reflejados y determinar un grado de enfoque en base a la separación relativa, caracterizado por que dichos haces de luz incidentes se propagan paralelos uno al otro y por que el objeto está en foco cuando los haces de luz reflejados salen de la lente paralelos entre sí.

10. Sistema óptico según la reivindicación 9, que comprende además un generador de doble haz que recibe un único haz de luz desde la fuente de luz de referencia, en el que el generador de doble haz proporciona el par de haces de luz incidentes a partir del único haz de luz y, opcionalmente, en el que el generador de doble haz incluye un cuerpo óptico que tiene superficies primera y segunda paralelas, en el que el cuerpo óptico refleja y refracta partes del único haz de luz incidente para generar el par de haces de luz incidentes.

11. Sistema óptico según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que los haces de luz reflejados están separados por una separación entre trayectorias cuando salen de la lente, en el que el sistema óptico comprende además un combinador de haces que modifica los haces de luz reflejados de manera que la separación entre trayectorias es re-escalada y, opcionalmente, en el que los haces de luz incidentes son reflejados por el objeto en múltiples puntos a lo largo del eje óptico, en el que el sistema óptico comprende además un limitador de rango, en el que el limitador de rango filtra los haces de luz reflejados de manera que la separación relativa corresponda a un par predeterminada de entre los haces de luz reflejados.

12. Sistema óptico según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, que comprende además un dispositivo desviador de haz que redirige los haces de luz reflejados desde múltiples superficies para aumentar una longitud de una pista óptica de los haces de luz reflejados.

13. Sistema óptico según una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que el objeto es una muestra que comprende sustancias biológicas o químicas, en el que el sistema óptico realiza una de entre una obtención de imágenes de epifluorescencia y una obtención de imágenes mediante fluorescencia de reflectancia interna total (TIRF) y, opcionalmente, en el que el sistema óptico realiza un análisis de integración de retraso de tiempo (TDI) del objeto.

14. Sistema óptico según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que los haces de luz incidentes y reflejados que se propagan a través de la lente están separados de manera sustancialmente homogénea del eje óptico.

15. Sistema óptico según una cualquiera de las reivindicaciones 9-14 que comprende además un detector que comprende una superficie de detector, en el que los haces de luz reflejados son incidentes sobre la superficie del detector en puntos de haz correspondientes.

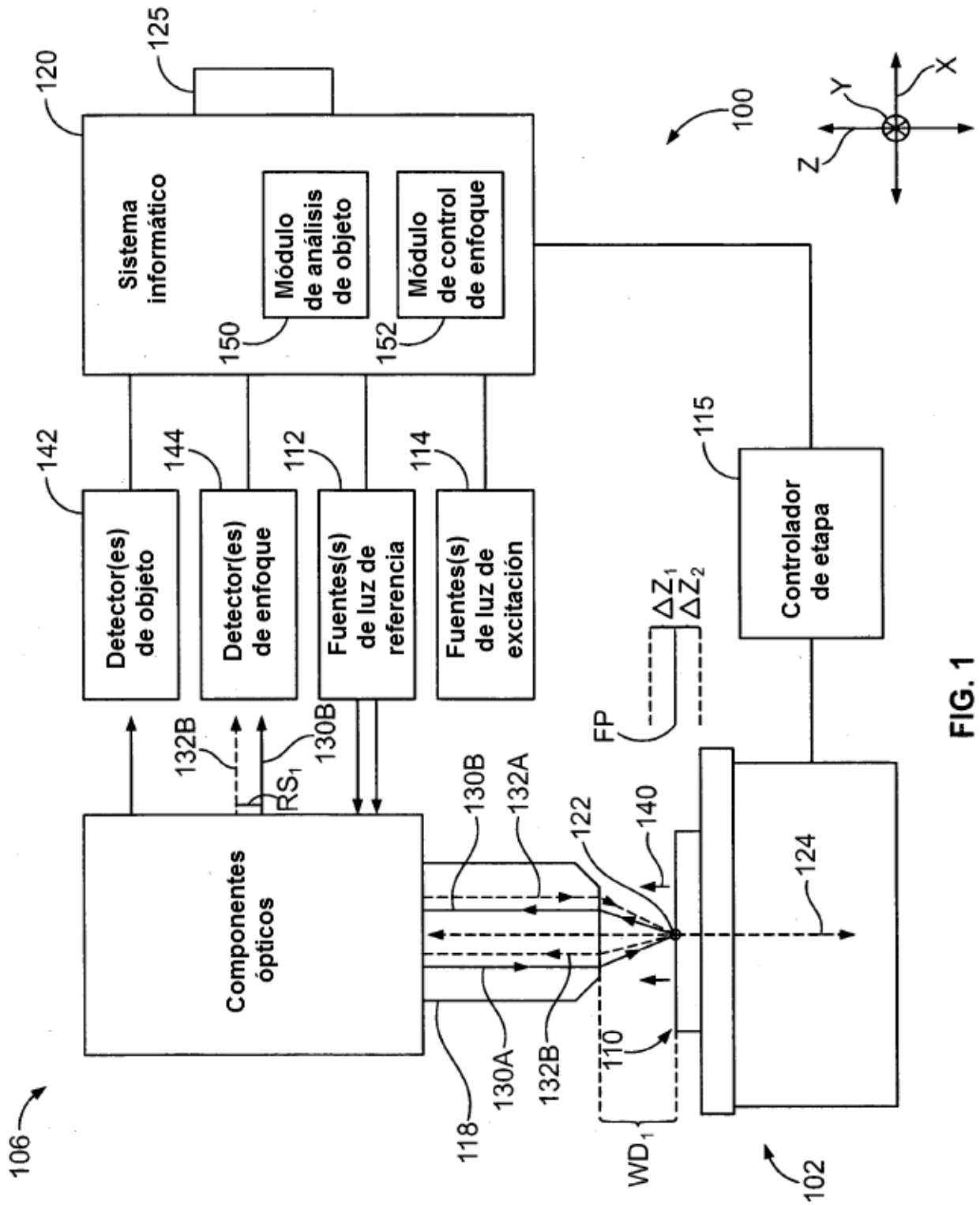


FIG. 1

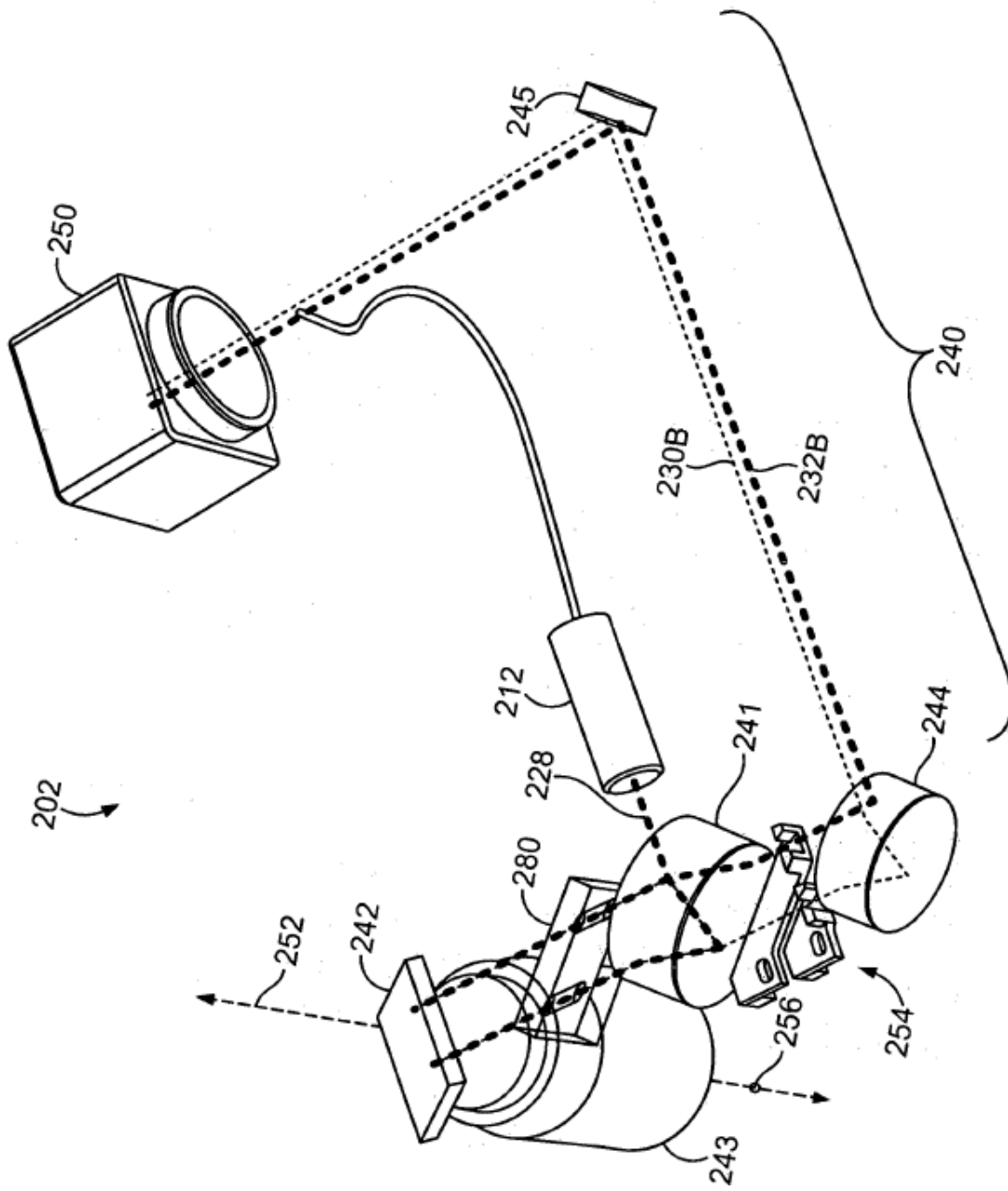


FIG. 2

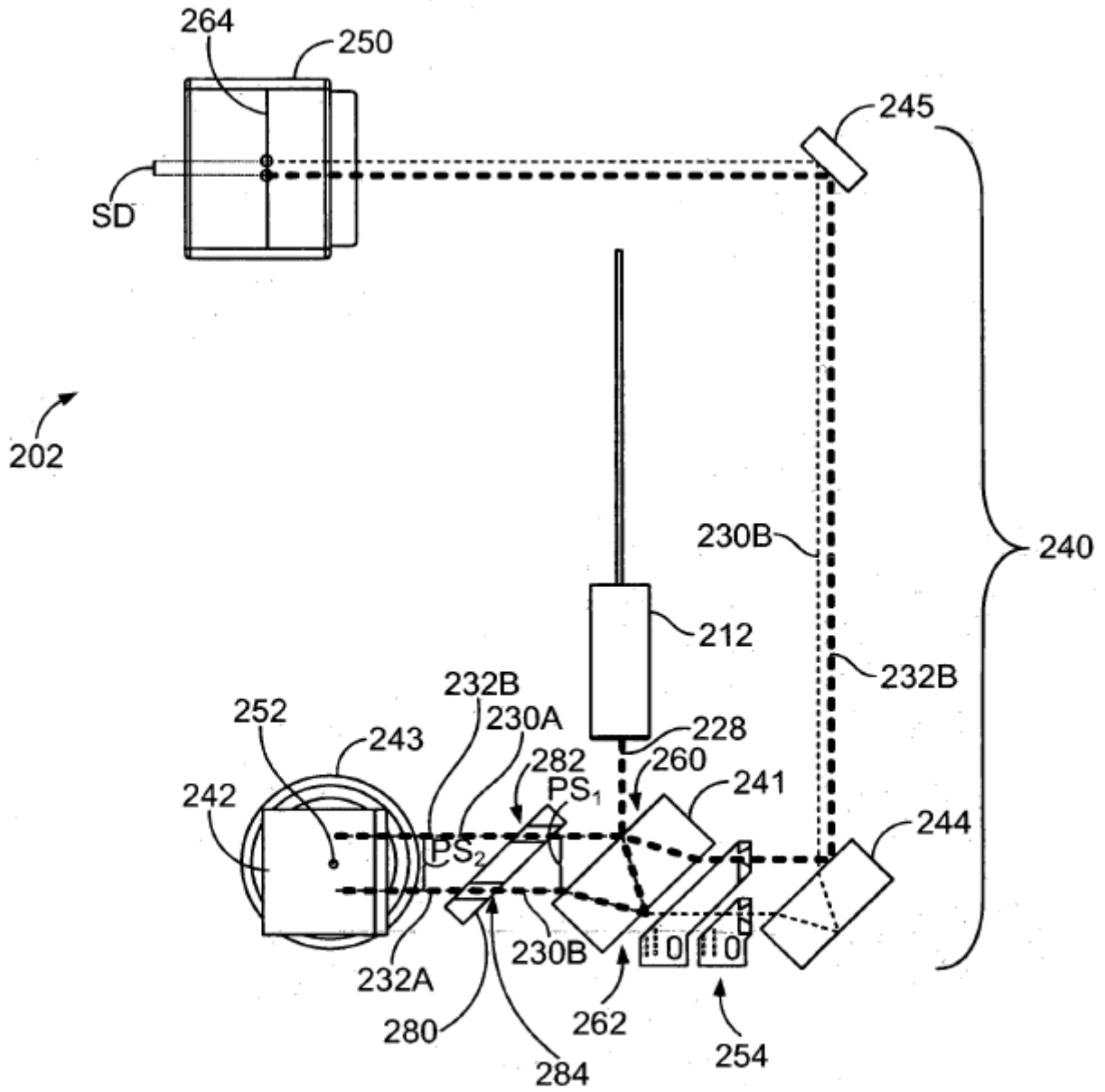


FIG. 3

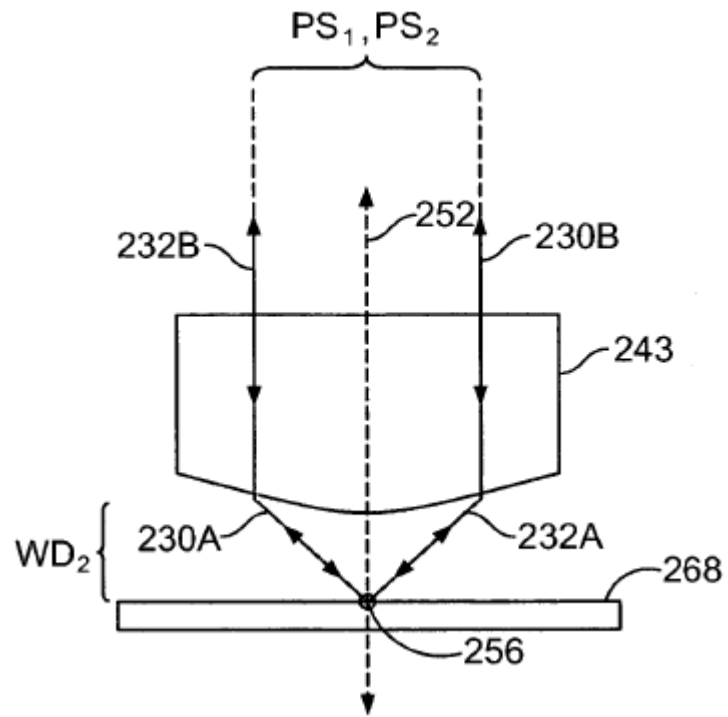


FIG. 4

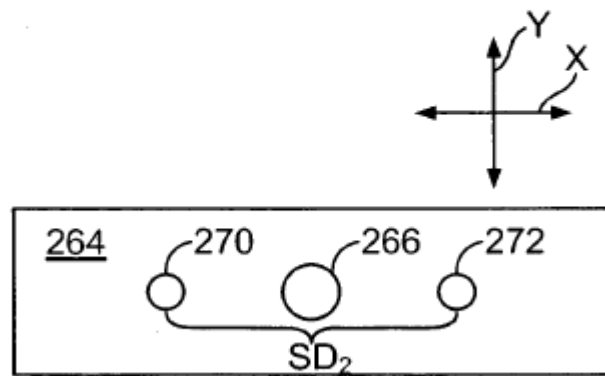
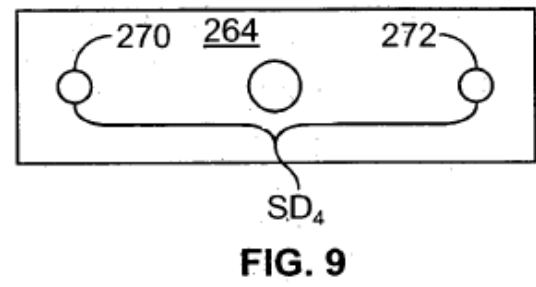
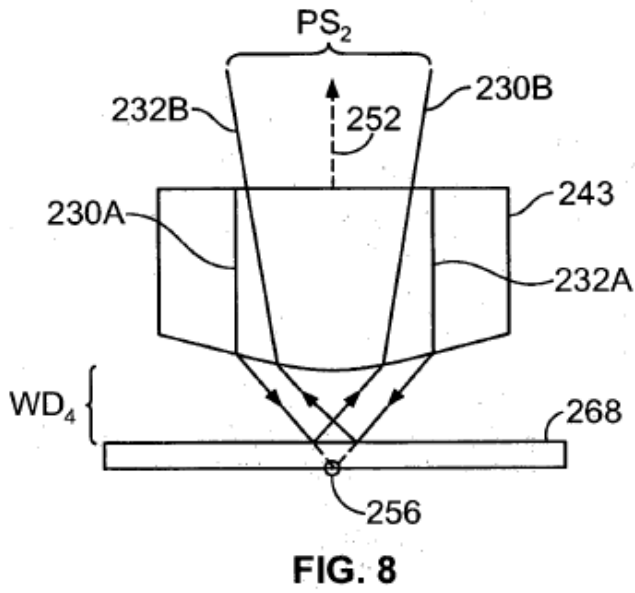
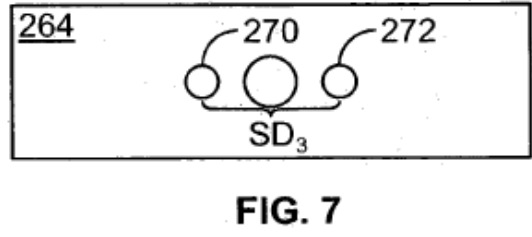
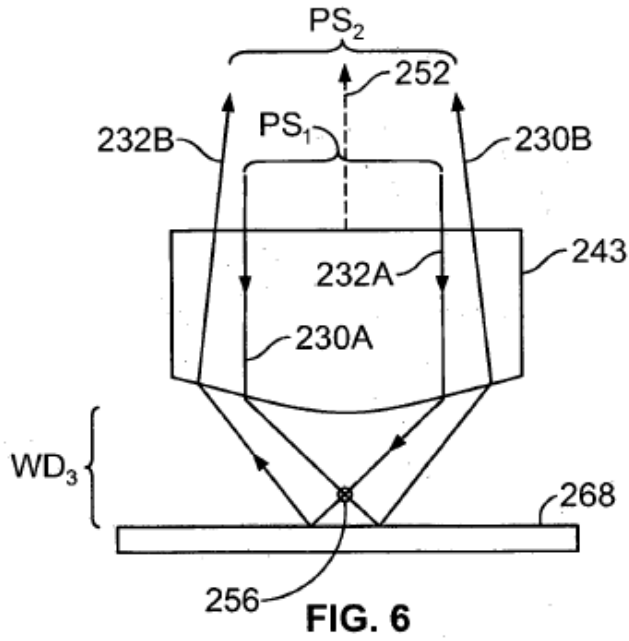


FIG. 5



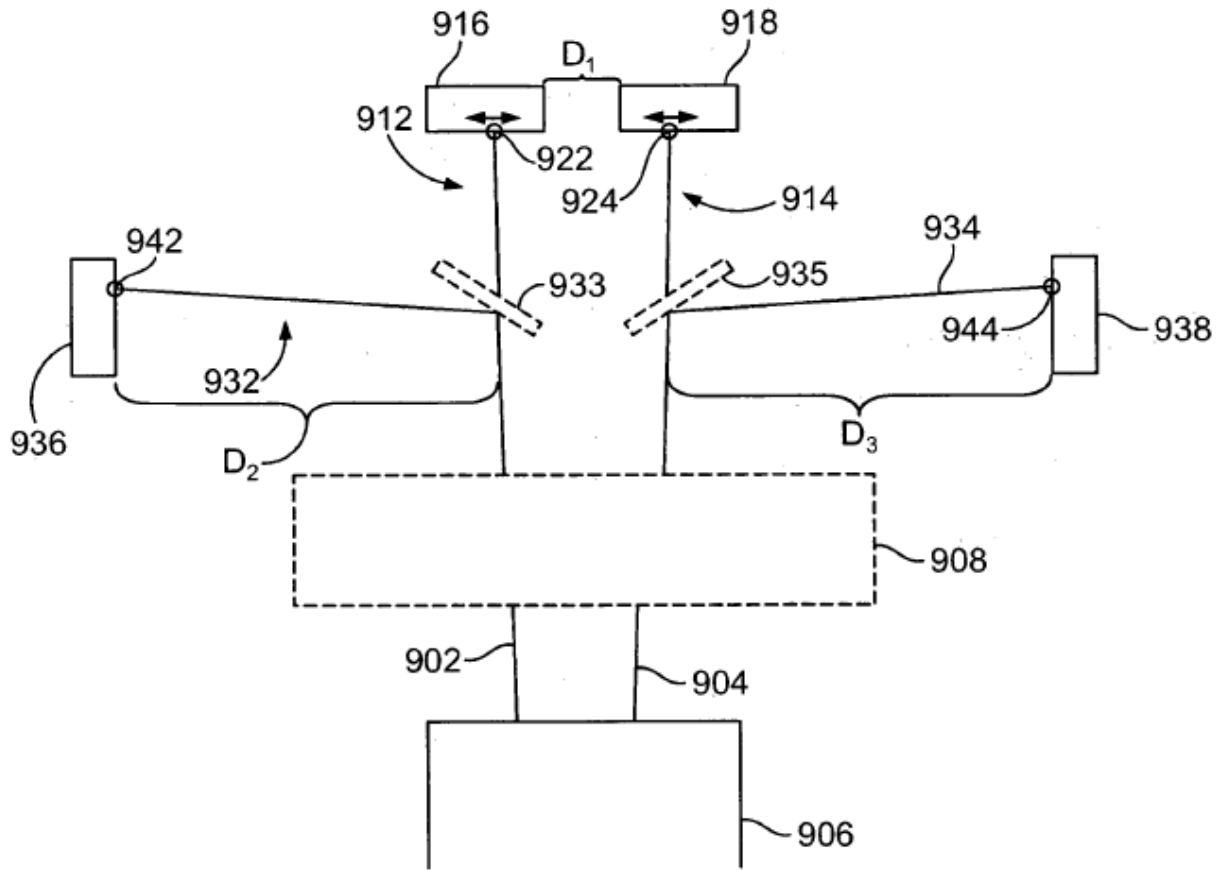


FIG. 10

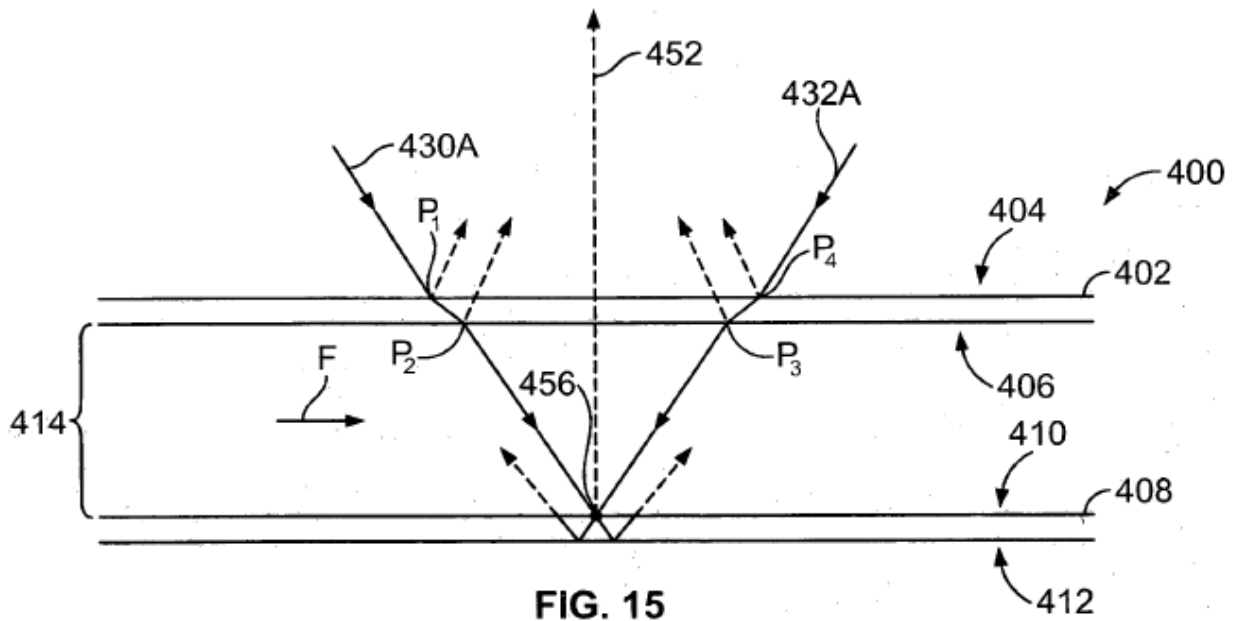


FIG. 15

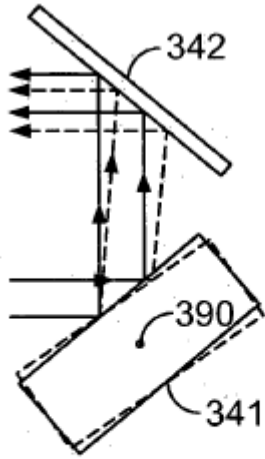


FIG. 11

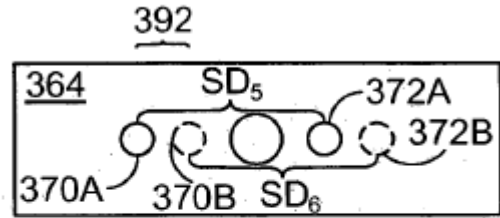


FIG. 12

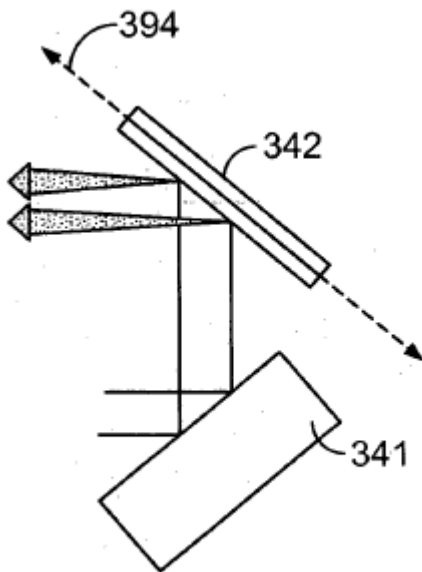


FIG. 13

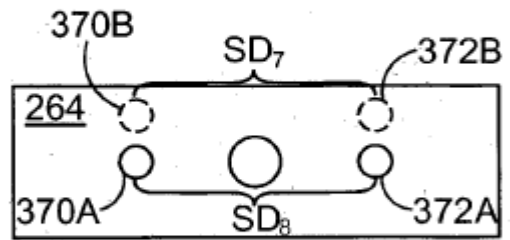


FIG. 14

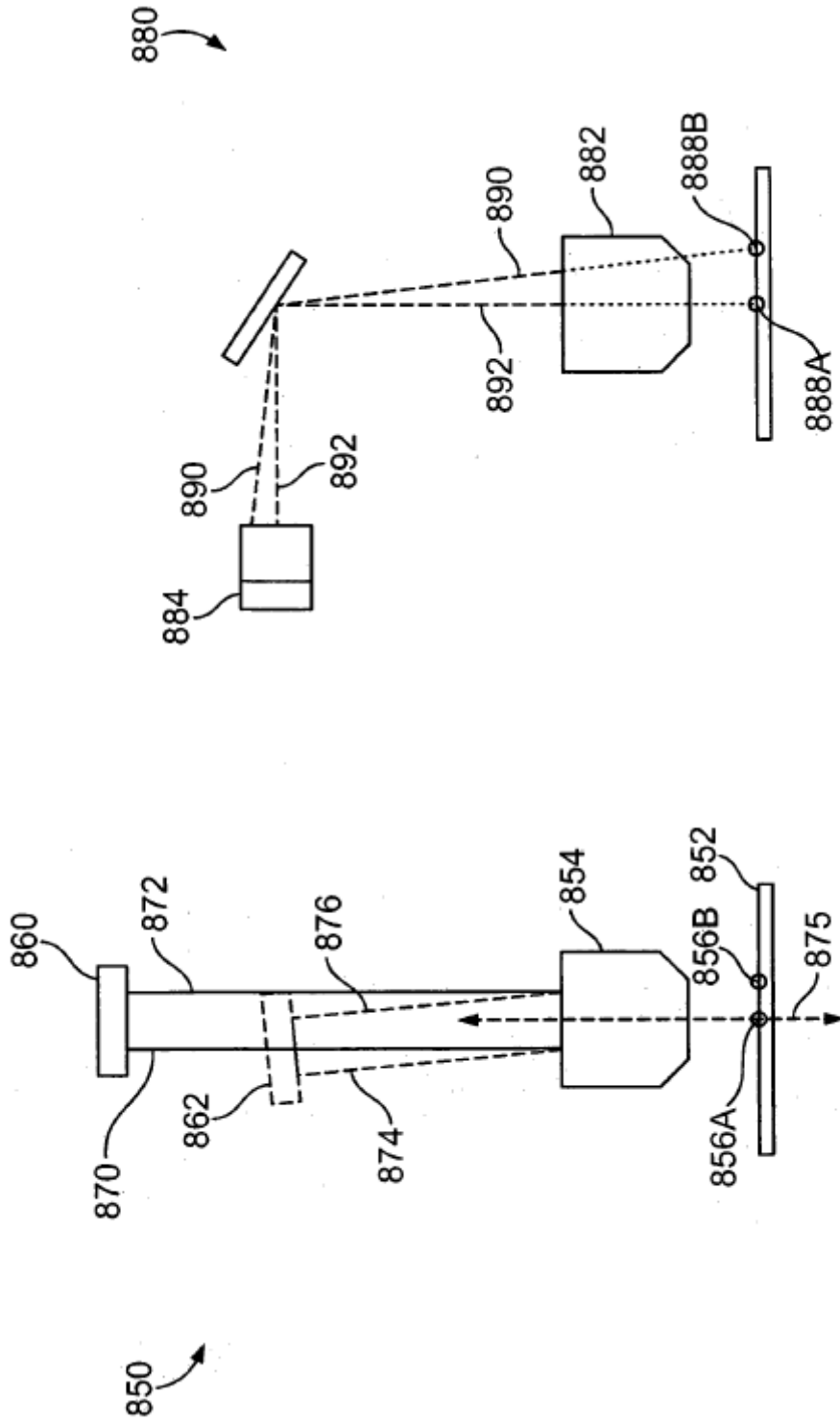


FIG. 16B

FIG. 16A

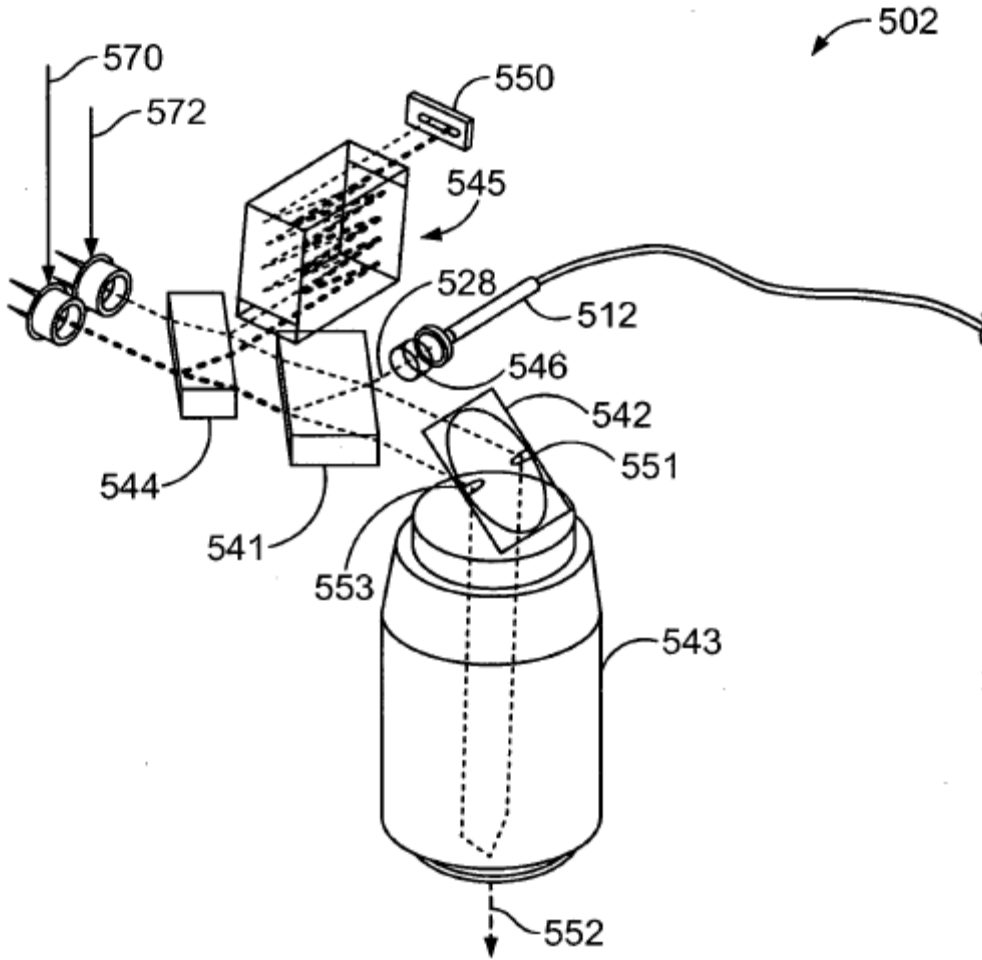


FIG. 17

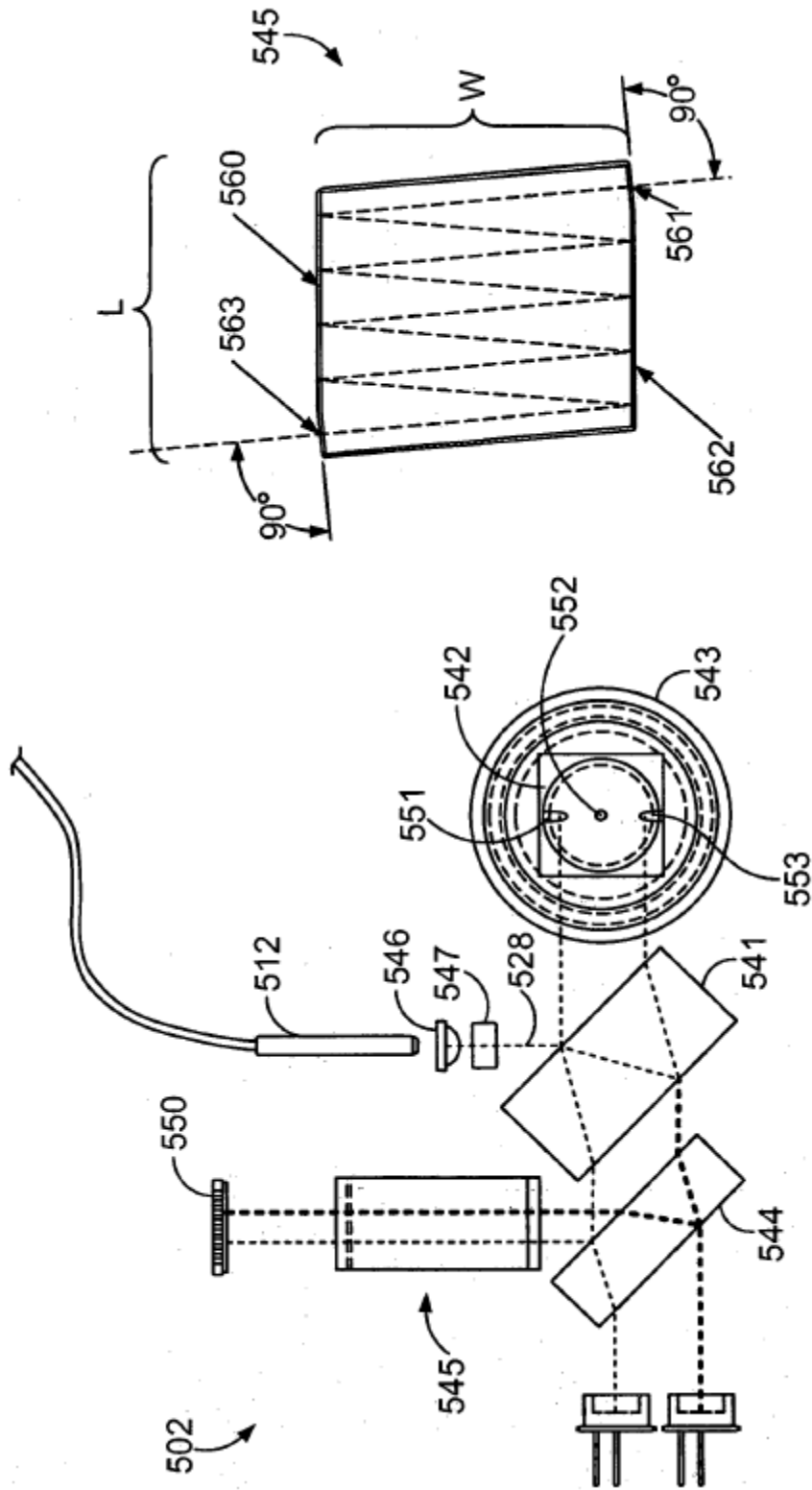


FIG. 19

FIG. 18

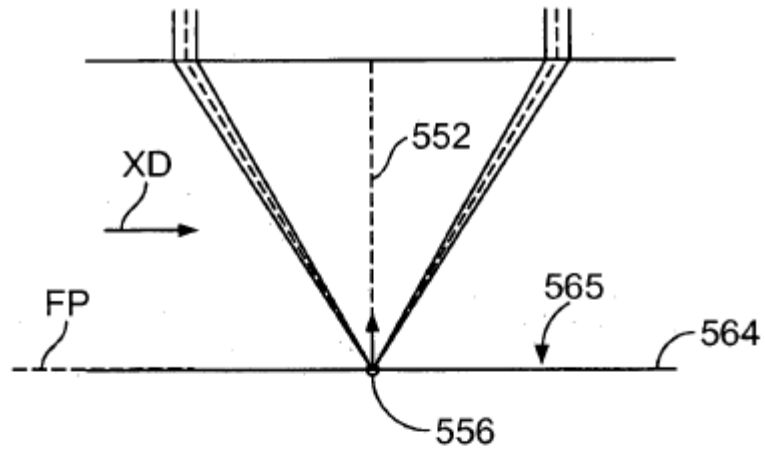


FIG. 20

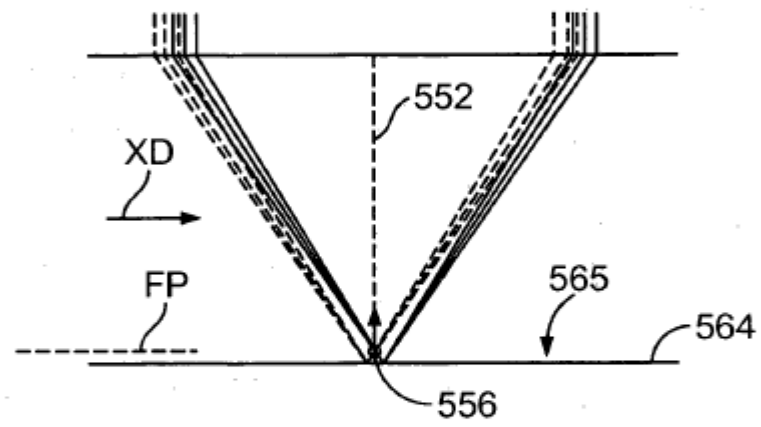


FIG. 21

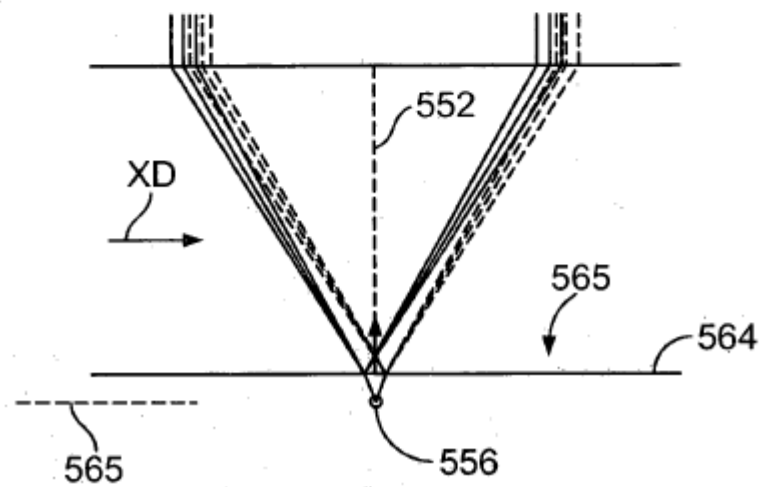


FIG. 22

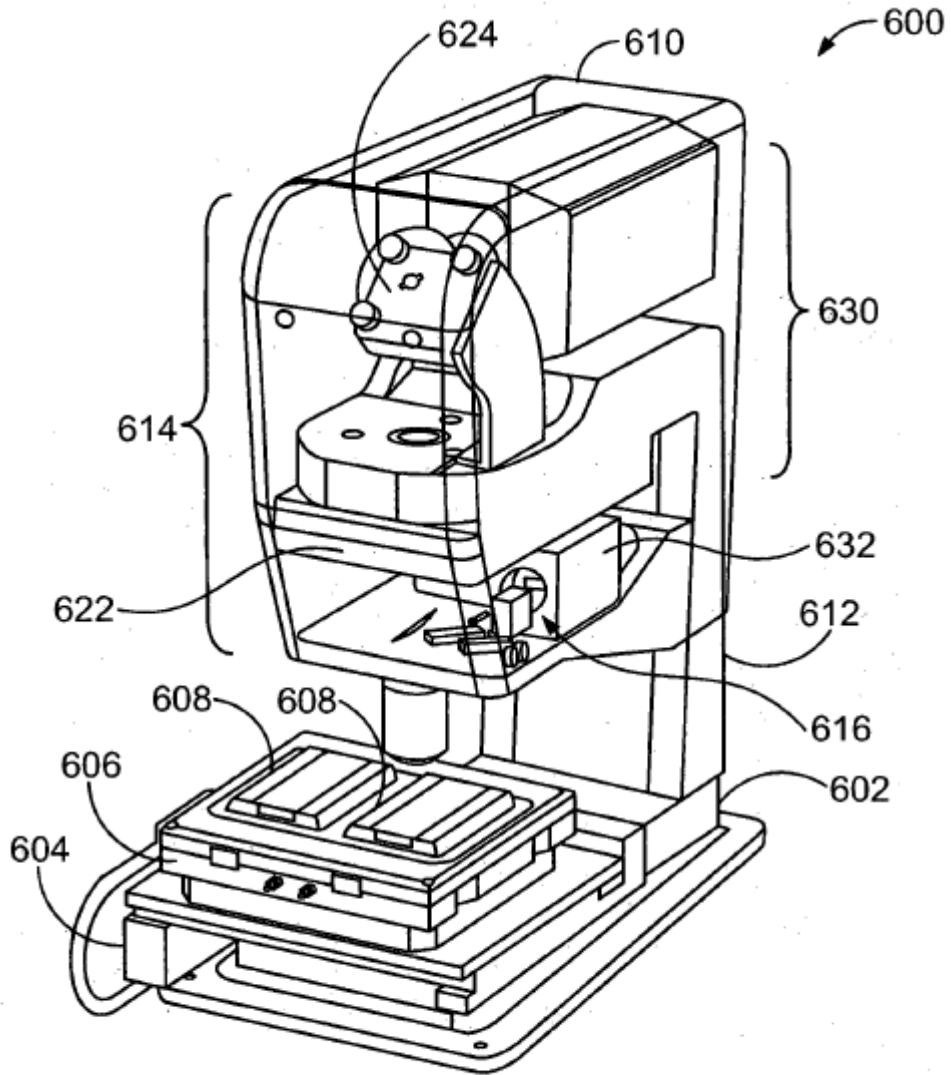


FIG. 23

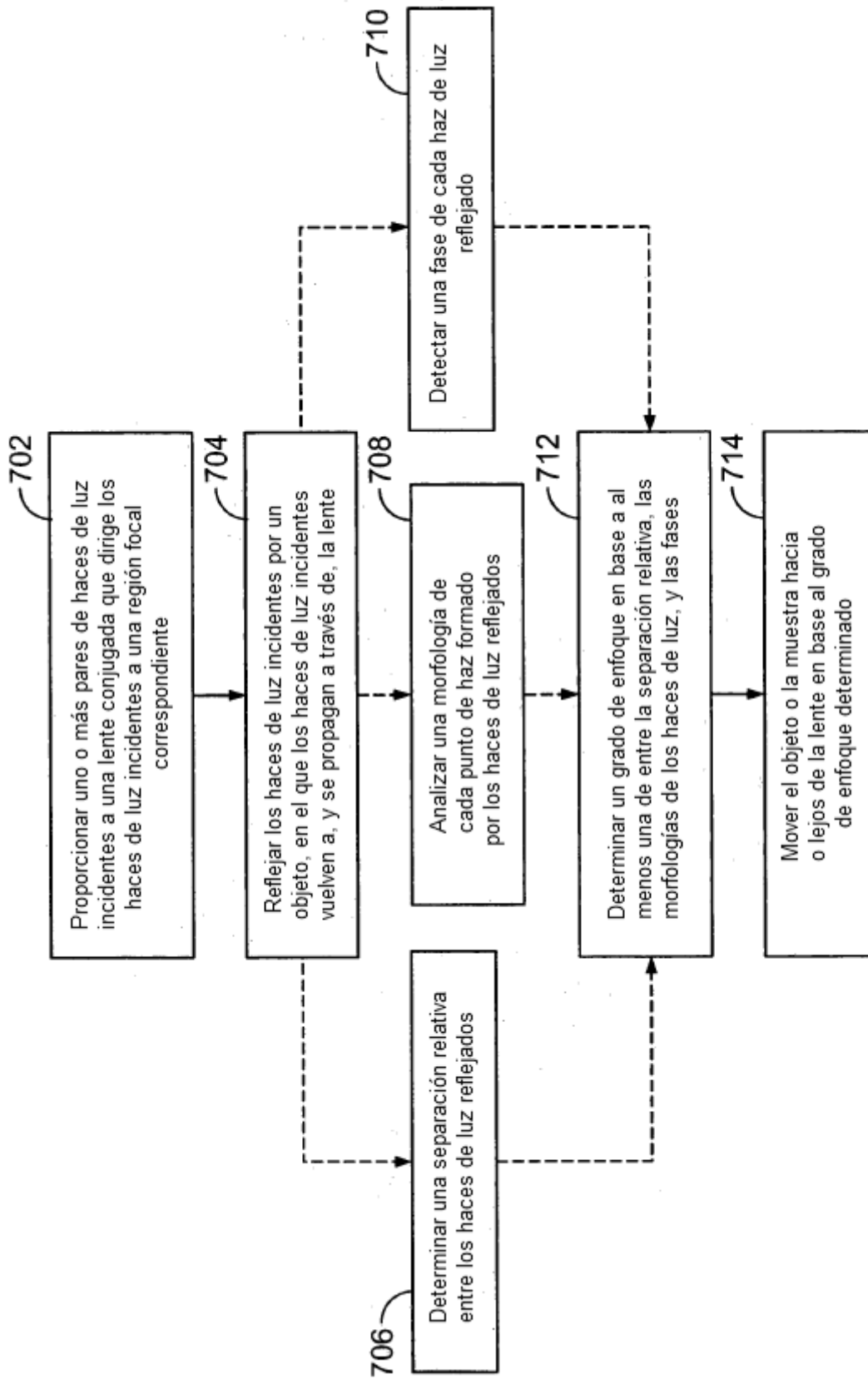


FIG. 24

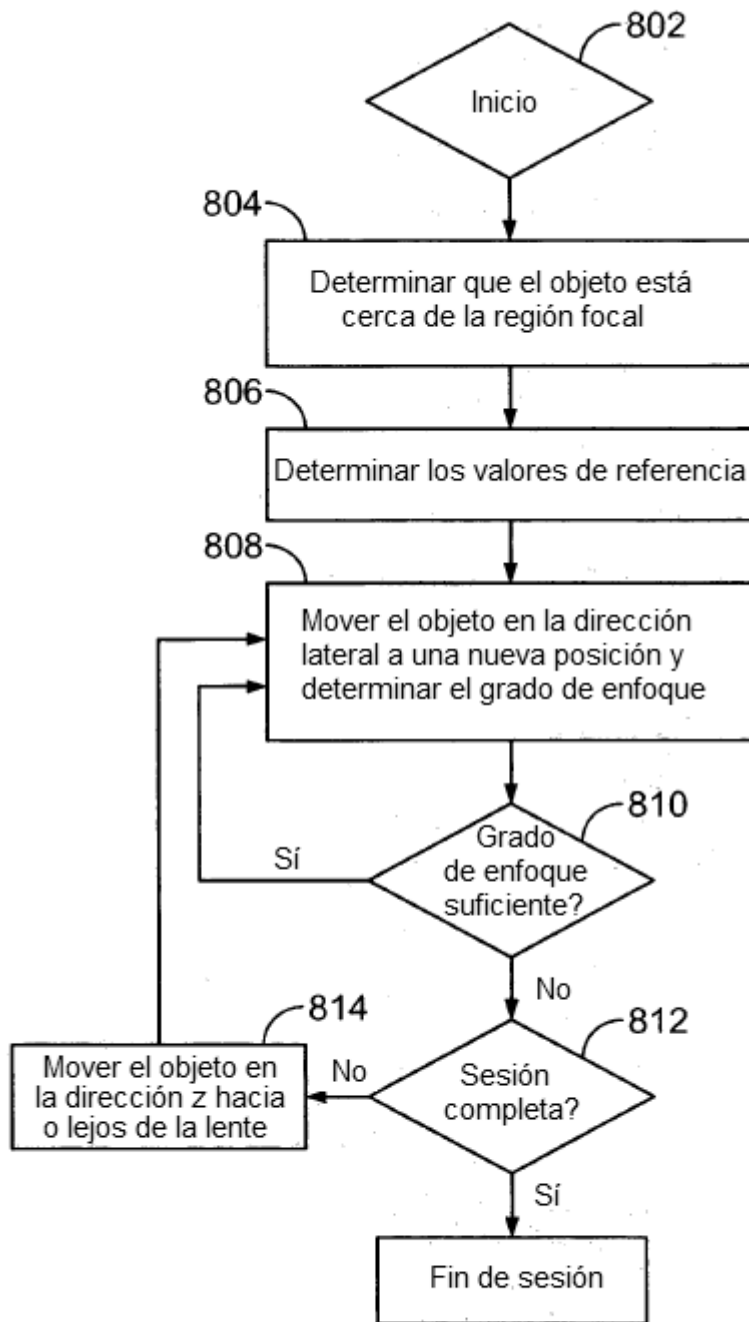


FIG. 25

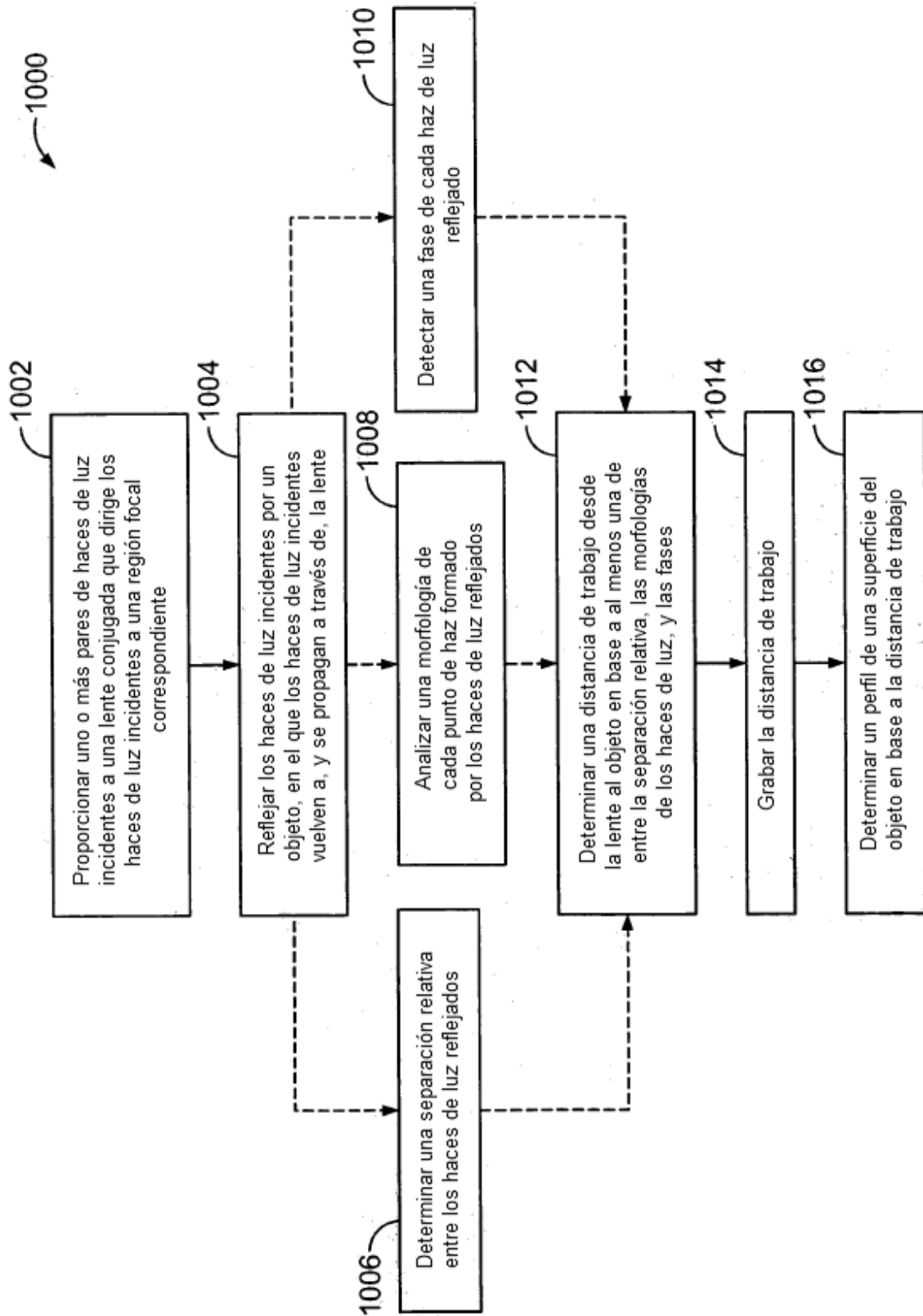


FIG. 26

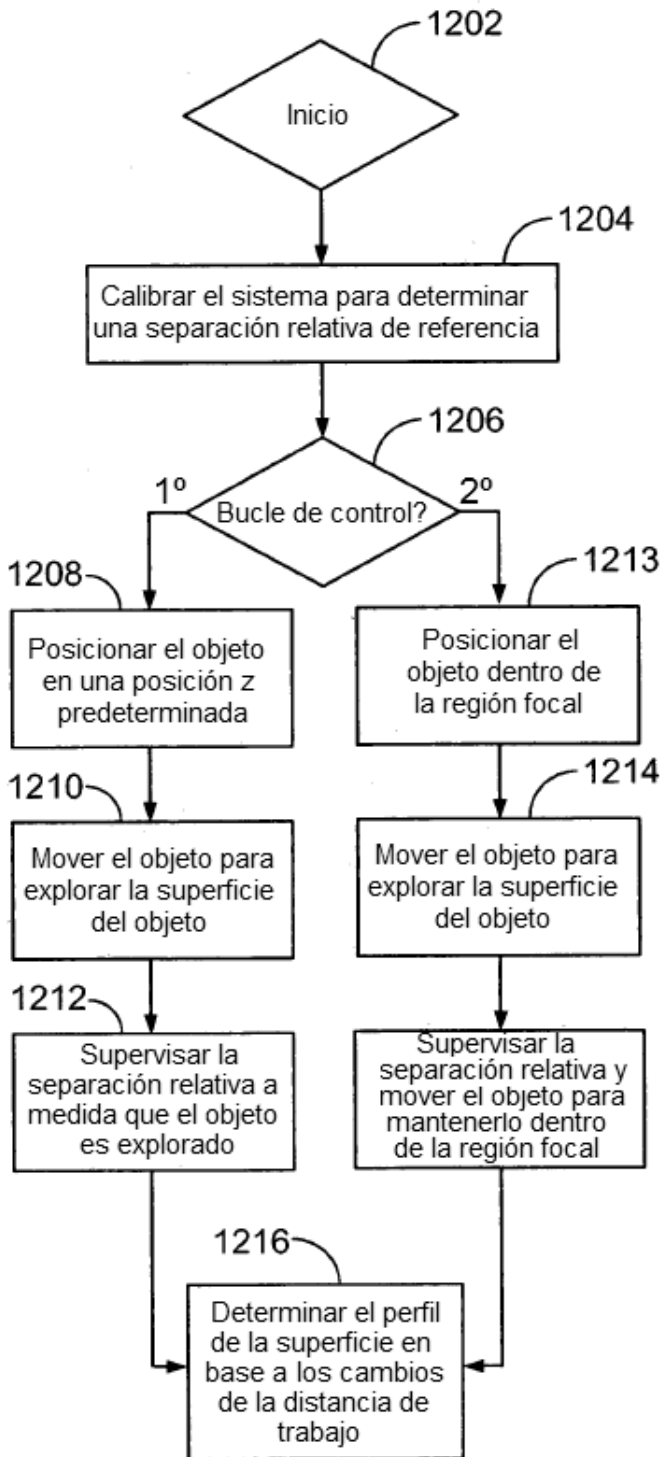


FIG. 27

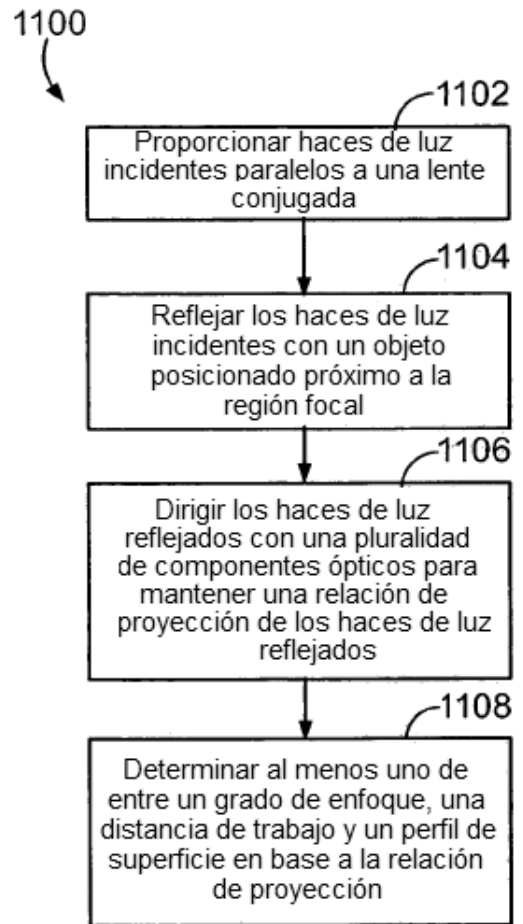


FIG. 28