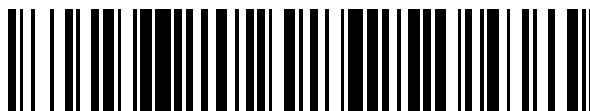


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 064**

51 Int. Cl.:

G01N 27/44 (2006.01)

G01N 27/414 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2011** **PCT/GB2011/052105**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012** **WO12056247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011** **E 11782200 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017** **EP 2633296**

54 Título: **Dispositivo de detección de agentes químicos y método de medición**

30 Prioridad:

28.10.2010 GB 201018224

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

09.01.2018

73 Titular/es:

DNAE GROUP HOLDINGS LIMITED (100.0%)
Ugli Campus Block C, 56 Wood Lane
London W12 7SB, GB

72 Inventor/es:

TOUMAZOU, CHRISTOFER;
LIU, YAN;
GEORGIOU, PANTELIS;
OU, CHUNG PEI y
REED, SAM

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 649 064 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

Dispositivo de detección de agentes químicos y método de medición

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a dispositivos para la detección de agentes químicos. En particular, la invención puede usarse para proporcionar una señal de salida digital dependiente de la concentración de un ion en un fluido. La invención es aplicable a la identificación y secuenciación de ácidos nucleicos.

10

Antecedentes

Las publicaciones previas han divulgado la capacidad de un transistor de efecto campo sensible a iones (ISFET) de detectar agentes químicos próximos a la superficie de detección. Esto puede usarse para determinar la presencia de un analito diana por la detección de productos de una reacción química. En un ejemplo, los ISFET pueden usarse para determinar la identidad de una o más partes de un molde de ácido nucleico detectando el cambio en el pH resultante de la inserción de nucleótidos al final de un ácido nucleico. Normalmente, se liberan iones de hidrógeno (protones) durante la reacción. La potencia de la señal eléctrica del ISFET depende de la cantidad de iones hidrógeno liberados, que se expresa como una señal de salida analógica, que es una señal de voltaje o de corriente.

20

Para matrices a mayor escala de ISFET, tales como las que podrían usarse en secuenciación de ADN, los inventores han apreciado que el procesamiento de estos datos analógicos requiere una enorme energía de computación y un ancho de banda de gigabits/segundo.

25

Además, el método normal requiere circuitería precisa de lectura analógica, y es sensible a los componentes parásitos, y el ruido eléctrico ambiental. Los sistemas analógicos de alta precisión y gran escala limitan la velocidad del procesamiento y la capacidad de integración; restringiendo de ese modo la eficacia de detección y la capacidad de cambiar de escala. Además, la circuitería frontal de interfaz de alto rendimiento consume grandes cantidades de área y energía del sistema, haciendo que el procesamiento de los datos en el chip no sea realista.

30

Los inventores proponen en este documento un novedoso semiconductor y método que aborda una o más de las deficiencias anteriores.

Sumario de la invención

35

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un dispositivo de detección de agentes químicos para medir una concentración de iones de un fluido, comprendiendo el dispositivo un transductor que tiene una primera señal de salida y dispuesto para recibir una entrada eléctrica. El transductor conmuta la primera señal de salida entre un estado ACTIVO e INACTIVO dependiendo de la señal de entrada eléctrica y una señal de entrada química. El dispositivo comprende una superficie de detección de agentes químicos acoplada al transductor dispuesto para recibir una señal de entrada química. Un generador de señales oscila la señal de entrada química para variar el punto de conmutación del transductor y conmutar a primera señal de salida eléctrica ACTIVA durante un primer periodo e INACTIVA durante un segundo periodo donde la concentración de iones del fluido modula una anchura de impulso del primer y/o segundo periodo.

45

El generador de señales puede comprender un electrodo de valoración dispuesto para liberar y adsorber un agente químico, que afecta a una concentración de iones detectada por la superficie de detección de agentes químicos. El generador de señales puede comprender además un controlador para proporcionar una corriente eléctrica oscilante al electrodo de valoración.

50

El transductor puede comprender un primer transistor de un primer tipo conectado a un segundo transistor de un segundo tipo para formar un inversor CMOS. La superficie sensible a agentes químicos puede acoplarse a puertos del primer y segundo transistor. El puerto puede ser un puerto flotante.

55

La primera señal de salida eléctrica puede proporcionarse a uno o más transistores adicionales para formar un circuito lógico.

60

El dispositivo de detección de agentes químicos puede comprender, además, un desmodulador que recibe la primera señal de salida eléctrica, proporcionando el desmodulador una segunda señal de salida digital que representa la magnitud de la señal de entrada química.

El desmodulador puede ser uno de: un desmodulador de fase o convertor de tiempo a digital (TDC).

65

El dispositivo de detección de agentes químicos puede comprender además un codificador conectado a la segunda señal de salida, estando dispuesto el codificador para proporcionar una tercera señal de salida que comprende un código binario de 2 bit.

Preferiblemente, el generador de señales proporciona una forma de onda oscilante que es una de: una onda en dientes de sierra, una onda senoide o una onda triangular.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método de determinación de uno o más componentes de un analito en un fluido usando un dispositivo de detección de agentes químicos de acuerdo con el primer aspecto, y que comprende las etapas de (i) proporcionar el fluido a un transductor químico; (ii) oscilar la señal de entrada química al transductor para conmutar una primera señal de salida eléctrica entre un estado ACTIVO e INACTIVO, donde una concentración de iones del fluido modula una anchura de impulso del estado ACTIVO o INACTIVO de la primera señal de salida; (iii) combinar un reactivo específico de analito con el fluido, mediante lo cual se producen iones si el reactivo reacciona con el analito en el fluido; (iv) oscilar una o más señales de entrada química al transductor para conmutar una segunda señal de salida eléctrica entre un estado ACTIVO e INACTIVO, donde la concentración de iones del fluido modula una anchura de impulso del estado ACTIVO o INACTIVO de la segunda señal de salida; (v) comparar la primera y segunda señal de salida para cuantificar un cambio en la concentración de iones del fluido; y (vi) comparar el cambio en la concentración de iones con un umbral para determinar si el reactivo ha reaccionado con el analito para determinar un componente del analito.

El método puede comprender además desmodular la primera y segunda señal de salida modulada para proporcionar una primera y segunda señal de salida digital que representa una concentración de iones y después comparar la primera y segunda señal de salida digital para cuantificar un cambio en la concentración de iones del fluido.

El método también puede comprender además eliminar el reactivo existente del fluido después de (iv). De hecho, también se prefiere que se repitan al menos (ii) a (vi) para determinar componentes adicionales del analito.

El analito es preferiblemente un molde de ácido nucleico a secuenciar y el reactivo es un tipo conocido de nucleótido. Se prefiere, por lo tanto, que la concentración de iones cambie dependiendo de si el nucleótido se inserta en el molde de ácido nucleico.

El cambio en la concentración de iones se correlaciona de forma ideal con la cantidad de bases nucleotídicas insertadas en el molde de ácido nucleico.

El codificador puede proporcionar un código binario de 2 bit que representa el tipo de nucleótido insertado.

Por tanto, en un aspecto adicional, se proporciona una matriz de dispositivos de detección de agentes químicos analizados anteriormente. La matriz puede comprender un multiplexor conectado a cada dispositivo para seleccionar la primera señal de salida a desmodular. Preferiblemente, la matriz es de dispositivos de detección de agentes químicos donde dicho transductor comprende un primer transistor de un primer tipo conectado a un segundo transistor de un segundo tipo para formar un inversor CMOS. Preferiblemente, dicha matriz comprende un multiplexor conectado a cada uno de dichos segundos transistores para activar o desactivar los dispositivos individuales. La matriz puede comprender además un procesador CDMA para codificar la señal de salida de cada dispositivo, posibilitando preferiblemente que dichas señales de salida se transmitan en un único canal.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones específicas de la invención se describirán ahora mediante ejemplos solamente con referencia a las figuras adjuntas, en que:

la figura 1 es un diagrama de bloques de un sistema de una realización preferida;

la figura 2 muestra cuatro disposiciones esquemáticas de transductores;

la figura 3 es un esquema de un circuito de lectura;

la figura 4 muestra gráficos de señales de salida de reacciones de ácidos nucleicos; y

la figura 5 muestra gráficos de señales de entrada y salida para un sistema que tiene una entrada química oscilante.

Descripción detallada

En un sistema que comprende la invención, normalmente habrá un sustrato semiconductor que aloja el detector y el procesamiento de señales, revestido por un sustrato que contiene canales fluidicos y una o más cámaras. Las cámaras contienen un fluido que tiene una concentración de iones a medir. La concentración de iones puede ser constante o puede ser cambiante. El cambio puede ser un resultado de una reacción química que libera o absorbe los iones. El límite de detección de dicho sistema está gobernado por a) la cantidad de tampón en el fluido que oculta los cambios en la concentración de iones y b) las características eléctricas del transistor que requiere que las cargas iónicas creen un campo eléctrico para permitir que la corriente eléctrica fluya y se detecte. Estos pueden observarse como umbrales a exceder. En la presente invención, se proporciona una señal oscilante controlada al sistema, que en combinación con la señal química/iónica excede uno o los dos umbrales para proporcionar una señal de salida detectable. El efecto de la señal controlada se sustrae de la señal de salida para determinar el efecto de la contribución de la señal química. Oscilando la señal controlada, el efecto neto a lo largo del tiempo sobre el

sistema es cero. La señal oscilante idealmente se varía de forma continua durante una parte del periodo de modo que pueda determinarse el punto en el que se cruza el umbral.

En una realización, la señal oscilante es una señal química proporcionada al fluido para cambiar la concentración de iones dentro del tampón. En otra realización, la señal oscilante es una señal eléctrica proporcionada al transductor del detector para cambiar el punto de funcionamiento eléctrico. Se prevén combinaciones de estas realizaciones y están dentro del alcance de la invención-

En dicho sistema, puede considerarse que la señal química modula la señal de salida y lo hace de una forma eficaz para el procesamiento de datos. De forma ideal, la concentración química se convierte en una señal digital a procesarse adicionalmente. El procesamiento de esta señal puede realizarse en soporte físico o programa informático.

Oscilación eléctrica (no de acuerdo con la presente invención)

Se muestra un diagrama de bloques de un sistema a modo de ejemplo en la figura 1. Una muestra de fluido que contiene una concentración de un analito (incluyendo la concentración cero donde el analito está ausente de la muestra), está en contacto con una superficie de detección de agentes químicos de un ISFET que convierte la concentración del analito en una señal eléctrica analógica. Un transductor convierte la señal química en una señal analógica. El transductor se conecta a una salida de señales oscilantes. La señal química y la señal oscilante se combina para producir una señal de salida oscilante. Si el transductor comprende un ISFET que forma parte de un inversor CMOS, el transductor se activará y desactivará para producir una señal de salida de impulsos como se muestra. La señal química analógica contribuye a modular la señal de salida de modo que los desplazamientos de fase o las anchuras de impulso cambien. Este cambio representa la concentración química. Entonces un convertidor de tiempo a digital o desmodulador de fase descodifica la señal de impulsos y produce una señal digital. La contribución de la señal de entrada oscilante puede deducirse para que quede la contribución química neta. Estas señales pueden preprocesarse y almacenarse en la memoria. El conversor de tiempo a digital puede ser de los tipos descritos en:

Jianjun Yu *et al.*, 12-Bit Vernier Ring Time-to-Digital Converter in 0,13 μ m CMOS Technology, IEEE JOURNAL OF SOLID-STATE CIRCUITS, vol. 45, n.º 4, abril de 2010; o
Gordon W. Roberts, A Brief Introduction to Time-to-Digital Digital-to-Time Converters, IEEE TRANSACTIONS ON CIRCUITS AND SYSTEMS II: EXPRESS BRIEFS, vol. 57, n.º 3, marzo de 2010.

Como se analiza adicionalmente a continuación, las señales pueden representar una serie de reacción de incorporación de nucleótidos de una hebra de ADN fragmentada, en cuyo caso las señales se procesan adicionalmente para secuenciar el ADN completo ubicando las unidades del algoritmo.

En una realización, representada en la figura 2a, una capa de detección de agentes químicos 23 se acopla a un puerto flotante 20 compartido por dos transistores (24 y 25) dispuesto en un inversor. Una salida 22 se conecta a los desagües. El voltaje en el puerto tendrá el efecto de activar un transistor y desactivar el otro de modo que la salida sea digital de forma inherente. Para una referencia adicional sobre esta disposición y funcionamiento véase la solicitud PCT/IB2011/002376. Pueden ampliarse estrategias de dispositivo adicionales a 2(b) o 2(c) usando modulación de entrada en masa o 2(d) usando pseudológica CMOS.

Conectando un generador de señales a un terminal de un transistor, el transistor puede polarizarse de modo que la salida sea de una forma predeterminada para posibilitar que una señal química module la salida según se desee. La señal oscilante puede proporcionarse por un generador de señales en el sustrato semiconductor acoplado de forma capacitiva al puerto de un transistor. Por ejemplo, una señal oscilante del generador de señales podría polarizar eléctricamente el transistor para activarse y desactivarse durante periodos establecidos, con cualquier señal química que se agregue a la polarización para modular esos periodos. Normalmente, el voltaje de la oscilación variará de forma continua entre V_{ss} y V_{dd} . Por ejemplo, la señal puede variar de 0 V a 3,3 V. Se prefieren formas de onda en dientes de sierra, sinusoides o triangulares. La frecuencia de la señal oscilante está dictaminada por factores tales como la frecuencia de exploración de la matriz, el intervalo de tiempo de una reacción química que se está observando y la resolución requerida para que la señal de salida digital detecte un cambio en la concentración de iones.

El inversor ISFET puede estar accionado por una señal común o individual a una frecuencia específica, y la fase de señal de salida se modulará por la concentración de iones hidrógeno u otros iones diana. La señal de salida, que esencialmente se transforma en una señal digital modulada química, simplifica drásticamente los bloques de lectura y procesamiento, y es inmune a la mayoría del ruido eléctrico.

El número de transductores y cámaras dependerá de la aplicación, pero en realizaciones preferidas, habrá una matriz de más de 10, más de 100, más de 1000, más de 10 000, más de 100 000 o más de 1 000 000. En aplicaciones se requieren más transductores y el tamaño de la cámara normalmente será más pequeño. En realizaciones preferidas el volumen de la cámara es de menos de 1 ml, menos de 10 μ l, menos de 100 nl, menos de

30 nl, menos de 1 nl o menos de 100 pl.

También puede incorporarse una técnica de acceso múltiple por división de código (CDMA) al sistema para codificar los datos de cada píxel del transductor en una matriz de transductores, que permite que todos los datos de píxeles se envíen a un único canal.

Debido a su sistema de lectura simplificado, los métodos y dispositivos de la invención pueden implementarse ampliamente en diferentes tecnologías, tales como ISFET de vidrio específico o un ISFET basado en CMOS. Con fines de integración a gran escala, los ISFET basados en CMOS son preferibles y se describen a continuación para explicar adicionalmente la implementación.

En contraste con la realización de la figura 2(a), la señal oscilante puede conectarse a la masa como se muestra en la figura 2(b). la figura 2(c) muestra una tercera realización de una fila de dispositivos, donde la superficie de detección de agentes químicos está acoplada a un único FET y el segundo FET en el inversor se conmuta ACTIVO e INACTIVO por una señal de selección de fila 26. Para una matriz bidimensional de transductores, es deseable la realización mostrada en la figura 2(d).

En la figura 2(d), un único píxel comprende un transistor de detección, un transistor de paso y un transistor de selección. El transistor de selección puede usarse para controlar la salida final 22 en una única fila o columna. Cualquiera del control de selección de fila 26 o el control de selección de columna 27 puede conectarse a la señal oscilante. Como la señal de salida será digital, el tamaño del transistor puede reducirse en escala adicionalmente hasta submicrométrica, y limitarse por la configuración química únicamente. En cualquiera de estas configuraciones, la pérdida de señal y la distorsión es insignificante ya que se usa salida digital.

Todos los píxeles del transductor pueden compartir un tampón y una lectura frontal. Sin embargo, para acelerar adicionalmente el procesamiento, los transductores en una fila (o columna) pueden compartir un canal de lectura. En cada canal de lectura, los impulsos digitales se tamponan usando un inversor digital (o tampón de bit). La figura 3 muestra un sistema contador para la lectura de la señal de impulsos modulada por fase y la salida de una secuencia digital.

La salida de un conversor de tiempo a digital se truncará a una longitud corta que representa el cambio de la señal química. Esta configuración puede reducir los datos manipulados y la memoria requerida. Por ejemplo, la salida completa, que normalmente podría tener una resolución de 12 bits, se reducirá a 4 bits y se almacenará en la memoria. La línea basal se tratará como una señal común y se almacenará también. Por lo tanto, para cada píxel, los datos máximos requeridos son los tiempos de recuento basales de 4 bits más 10 bits de señal de modo común.

Aplicación a la detección e identificación de ácidos nucleicos

En el campo del ensayo genético, es deseable identificar uno o más nucleótidos de un ácido nucleico (tal como ADN y ARN). Normalmente una única hebra de ácido nucleico se hibrida con una sonda hasta o incluyendo un punto en el ácido nucleico a identificar. Los nucleótidos quedarán incorporados en el extremo 3' de la sonda para prolongar la cadena. Esta reacción de incorporación ha demostrado liberar iones de hidrógeno que son detectables por un ISFET con una superficie de detección tratada adecuadamente. Por ejemplo, la superficie puede ser nitrato de silicio, dióxido de silicio, óxido de tantalio u otros que han demostrado tener sensibilidad a los iones de hidrógeno.

Un nucleótido únicamente quedará incorporado si es complementario al nucleótido opuesto. Correlacionando el compuesto químico conocido añadido (por ejemplo, el tipo de nucleótido dATP, dNTP, dTTP, dGTP o sonda específica de alelo) con un cambio (o ausencia del mismo) en la señal de salida, puede identificarse un nucleótido en un punto de interés en el ácido nucleico. Los detalles de dicha aplicación e implementación se han descrito en la solicitud de patente US11/625844 y las patentes US7686929 y US7888015.

Secuenciación

Como una extensión a la identificación de una única base nucleotídica en un ácido nucleico, es deseable identificar una secuencia de decenas a cientos de bases nucleotídicas.

En un método conocido como método de pistola de tiro, una cadena completa de ADN se corta en trozos pequeños, y se copia para aumentar la redundancia de detección. Los trozos se dividen entre una matriz de píxeles de detección. Por lo tanto, cada dato de píxeles representa una copia de un pequeño trozo de ADN. Identificar el solapamiento de las secuencias de bases, en otras palabras, la similitud de datos en la memoria proporciona la secuencia de bases de ADN completa. Esta comparación puede implementarse por lógica digital, es decir, XOR, AND, NOR, NAND, etc. Un bloque de procesamiento digital puede concatenar la secuencia basada en los resultados de comparación. El procesamiento puede realizarse en paralelo con la función de detección, que produce un retorno de ubicación en la parte previa al proceso, para reducir la complejidad de computación y las necesidades de memoria.

Resultados

Los resultados de simulación basados en un ADN de 6 bases de longitud se muestran en la figura 4, donde los gráficos muestran (a) el orden de instrucción de base y la prolongación de base en cada uno de cuatro detectores sobre el periodo de reacción completo (16 segundos) y (b) la señal de referencia oscilante y las señales de salida moduladas para cada detector sobre una única reacción (2 segundos).

Una simulación a modo de ejemplo de un método de secuenciación se describe a continuación y se muestra en la figura 4. Los parámetros de configuración y las salidas se dan en la siguiente tabla que muestra los resultados simplificados del procesamiento. Un ácido nucleico a identificar (TGACCC) se copia y corta para proporcionar cuatro fragmentos (fragmento 1, 2, 3, 4) con un fragmento colocado en una cámara, teniendo cada cámara un detector (detector 1, 2, 3, 4). Normalmente habría millones de copias idénticas de un fragmento dado en una cámara. Una sonda se adhiere a cada fragmento hasta, aunque sin incluir, las bases mostradas. La sonda no se muestra por simplicidad de comprensión.

El orden de los nucleótidos añadidos (el orden de instrucción de bases) es dATP, dCTP, dTTP, y dGTP (A, C, T, G), que se repite hasta que cada fragmento sea ampliado completamente. El fluido se ajusta inicialmente a pH 7 y se vuelve a establecer a pH 7 después de añadir cada base.

Cada 2 segundos en este caso, se añadirá una nueva base a cada cámara en el orden dado anteriormente. La prolongación se producirá si la base añadida es complementaria al fragmento en la base opuesta para liberar iones de hidrógeno. Para cada prolongación de bases, el hidrógeno liberado inducirá una bajada de pH específica, en nuestro caso -0,2 pH por base prolongada. Este pH se reflejará directamente por la señal de salida con una anchura modulada o fase que se correlaciona con el cambio de pH (figura 4(b)). Obsérvese, en el caso de que se use un inversor, la prolongación de más bases, que da lugar a mayor liberación de iones, reduce el periodo ACTIVO de la señal de salida.

La señal de entrada oscilante al detector es una onda triangular como se muestra en la figura 4(b), que tiene una frecuencia mayor que la tasa de adición de bases, preferiblemente mayor que la tasa del cambio más pequeño a detectar.

La cantidad de cambio de pH puede extraerse de esta señal eliminando la anchura de impulso inicial (es decir pH 7). Esto se convierte al número de bases que se prolongarán dividiendo el cambio de pH por la tasa de cambio por base (0,2 pH/base en nuestro caso). Véase la salida del detector en la figura 4(a). En realidad, el cambio de pH no es lineal para cada base prolongada ni el cambio es instantáneo y estable durante la reacción.

Correlacionando la adición de la base conocida con el recuento de prolongación, puede identificarse la secuencia de cada fragmento. La base de cada fragmento puede representarse por un código binario de 2 bit proporcionado por un codificador (por ejemplo, 00=A, 01=T, 10=G, 11=C). Finalmente, los fragmentos identificados se vuelven a ensamblar usando técnicas de identificación conocidas (no mostradas):

	Molde de ácido nucleico	T	G	A	C	C	C		
	Orden de instrucción de BASE	A	C	T	G	Repetición			
	Fragmento 1	T	G	A	C				
	Fragmento 2	G	A	C	C				
	Fragmento 3	A	C	C	C				
	Fragmento 4	G	A	C	C				
	Recuento de prolongación								
	Detector 1	0	1	1	0	1	0	0	1
	Detector 2	0	0	1	0	1	0	0	2
	Detector 3	1	0	0	3	0	0	0	0
	Detector 4	0	0	1	0	1	0	0	2

Por ejemplo, durante un periodo de 4 segundos de adición de bases, el cambio de pH a partir de una reacción de prolongación puede durar 1 segundo. Para medir el cambio, capturando el pico y la anchura del cambio de pH, el pH se muestrea 10 veces durante el periodo de 1 segundo. La anchura de los periodos ACTIVOS variará sobre la ventana de reacción de 4 segundos. La cuantificación de la prolongación de bases puede implicar un algoritmo complejo que busca la anchura de impulsos mínima, la anchura de impulsos promedio, la suma de anchuras de impulso, etc.

Puede observarse que la secuencia de salida puede derivarse fácilmente a partir de este esquema.

Es ventajoso de las realizaciones preferidas de un sistema:

- 5 - usando una nueva configuración de ISFET, el recuento total del transistor para un único píxel de detección puede reducirse a dos (incluyendo transistor de selección),
- no se necesita circuitería de procesamiento analógica.

10 La salida es inmune al tiempo de conversión y la mayoría del ruido eléctrico inducido por el circuito de procesamiento digital.

El tamaño del transistor puede reducirse adicionalmente ya que se adopta lógica digital y puede ignorarse un mal acoplamiento del transistor.

15 Los bloques de procesamiento y de memoria pueden integrarse en un único chip.

Como toda la detección está sincronizada, la secuenciación y la comparación pueden activarse de forma precisa para todos los píxeles. La secuenciación puede realizarse de forma simultánea con la reacción, reduciendo drásticamente el tiempo de procesamiento y mejorando la precisión del procesamiento.

20 En una realización, la señal de referencia se vuelve a establecer antes de la etapa de inserción de cada nucleótido para compensar cualquier concentración de iones de fondo (por ejemplo, la concentración que queda de la etapa de inserción previa). El restablecimiento de la señal de referencia junto con la señal química de fondo, por tanto, produce una señal de salida de referencia previa a inserción constante, representando cualquier modulación posterior a la señal de salida el cambio de concentración debido a la etapa de inserción de nucleótidos en curso. Además de secuenciar un ácido nucleico, el dispositivo puede usarse para identificar otros agentes químicos. Por ejemplo, puede identificarse una molécula compleja que tiene varios elementos identificables de tipos variables usando una reacción por etapas (o repetida) con reactivos específicos de analito. La salida digital identificará el tipo exacto de la molécula.

30 **Oscilación química** (de acuerdo con la presente invención)

Como se analiza anteriormente, en una realización, la entrada química al sistema puede variarse por una señal química controlada de modo que la concentración inicial de iones actúa modulando la señal de salida. La señal química combinada puede arrastrarse a través de un intervalo para examinar a) la concentración de iones dentro del tampón y b) examinar el punto de funcionamiento eléctrico del transistor (subumbral, lineal, saturación). El primero es útil cuando la concentración inicial de iones está dentro de la capacidad del tampón, de modo que cualquier cambio pequeño se ocultará por el tampón. El último puede manejarse como se describe anteriormente con un inversor para crear un impulso de salida cuya anchura se modula por la concentración inicial de iones. Los dos efectos pueden combinarse de modo que añadir un agente de valoración mueve el punto de funcionamiento de la concentración de iones más allá de la capacidad del tampón y también cruza un punto de conmutación del inversor.

45 El efecto se demuestra en la figura 5. En el gráfico 5(a), se añade una cantidad controlada de agente de valoración al fluido durante un primer periodo y se retira durante un segundo periodo. El efecto químico neto sobre el sistema es, por tanto, cero. En el gráfico 5(b), se representa el pH de dos casos durante los mismos periodos. En el primer caso (línea sólida), la concentración de iones de hidrógeno es pequeña en comparación con la capacidad tamponante y por tanto se tarda mucho tiempo antes de que haya un cambio detectable del pH. En el segundo caso (línea discontinua), la concentración de iones de hidrógeno es grande en comparación con la capacidad tamponante y por tanto tarda poco tiempo antes de que haya un cambio detectable del pH. Como la concentración de iones excede la capacidad tamponante, la tasa de cambio de pH por cantidad de agente de valoración añadido aumenta. Esto se observa como una pendiente más pronunciada después de las líneas horizontales del tampón.

La concentración inicial de iones puede medirse por el tiempo (cantidad de agente de valoración añadido) hasta que la pendiente alcanza una pendiente umbral o el cambio de pH excede un umbral. Esto es claramente una relación inversa entre el tiempo y la concentración. La relación puede determinarse por un modelo del sistema químico o determinarse empíricamente. La relación puede almacenarse como una tabla de búsqueda en la memoria.

60 El pH en el gráfico 5(b) podría usarse para producir una señal de salida analógica del ISFET a detectarse y medirse. También es posible formar un conmutador sensible a iones como se describe anteriormente, donde se disponen dos FET como un inversor polarizado para conmutar cuando la concentración de iones excede un umbral (identificado como la línea horizontal superior en la figura 5(b)). La salida, por tanto, será ACTIVA o INACTIVA, donde el periodo ACTIVO depende de la concentración inicial de iones como se muestra en la figura 5(c).

65 La reacción de valoración es lenta de forma natural y por tanto el periodo de oscilación en las realizaciones preferidas es mayor de 2 segundos, preferiblemente mayor de 5 segundos, 10 segundos o 30 segundos. Sin embargo, el periodo no debe ser tan largo como para pasar por alto cambios en la concentración de iones o

ralentizar el tiempo de detección. Por tanto, en realizaciones preferidas, el periodo de oscilación es de menos de 200 segundos, preferiblemente de menos de 100 segundos, 60 segundos o 50 segundos.

Un umbral puede alcanzarse cuando la concentración de iones valorados (T) más los iones iniciales (I) es mayor que la capacidad tamponante (B).

En casos en los que tiene que detectarse un cambio en la concentración de iones, la concentración inicial de iones se determina en un primer momento usando las etapas analizadas anteriormente e ilustradas en la figura 5. Las etapas se repiten una segunda vez para determinar si se necesita más o menos agente de valoración para alcanzar el umbral.

El umbral se alcanza en el momento 1 cuando:

$$T1 + I1 > B;$$

El umbral se alcanza en el momento 2 cuando:

$$T2 + I2 > B;$$

y, por tanto (independientemente de la capacidad tamponante (que puede ser desconocida)):

$$(I1 - I2) = \Delta I = T2 - T1$$

Por tanto, el cambio en la concentración inicial de iones se conoce a partir de la cantidad de valoración requerida en cada momento para alcanzar el umbral.

En casos en los que la concentración inicial de iones tiene que medirse solamente una vez, la valoración puede ser unidireccional, de modo que el agente de valoración se añade o retira en un primer periodo, pero el efecto no se invierte en un segundo periodo. Para medir la concentración inicial absoluta de iones, es necesario conocer la capacidad tamponante del fluido y la cantidad de agente de valoración añadido para exceder la capacidad de alcanzar un umbral (por ejemplo, pendiente o cambio):

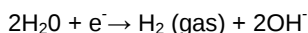
$$\text{es decir, } B - T = I.$$

En cualquier caso, el electrodo de valoración puede manejarse para añadir o liberar agentes químicos, que son agentes químicos que afectan a la concentración de iones a detectar. El efecto puede ser aumentar o disminuir la concentración de iones desde una concentración inicial.

El agente de valoración añadido no tiene que ser una cantidad predeterminada, sino que en su lugar puede añadirse hasta que uno de los umbrales se alcance. En este caso, se calcula la cantidad añadida.

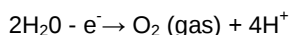
La valoración puede conseguirse exponiendo un electrodo de valoración al fluido. El electrodo se conecta a un controlador que proporciona una cantidad controlada de corriente eléctrica. El cálculo de la integral de la corriente en el tiempo produce una cantidad conocida de carga, que es proporcional a la cantidad de agente de valoración liberado o adsorbido al electrodo. El electrodo de valoración puede ser del tipo descrito en B. van der Schoot *et al.*, Titration-on-a-chip, chemical sensor-actuator systems from idea to commercial product, *Sensors and Actuators B* 105 (2005) 88-95.

La reacción de valoración en un electrodo con una carga negativa puede expresarse como:



que tiene el efecto de elevar el pH.

La reacción de valoración en un electrodo con una carga positiva puede expresarse como:



que tiene el efecto de bajar el pH.

Aunque la invención se ha descrito en términos de realizaciones preferidas expuestas anteriormente, debe entenderse que estas realizaciones son únicamente ilustrativas y que las reivindicaciones no están limitadas a esas realizaciones. Los expertos en la materia serán capaces de hacer modificaciones y alternativas en vista de la divulgación, que se contemplan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, pueden hacerse referencias a conexiones directa o indirectamente, según lo apropiado. Cada característica divulgada o ilustrada en la presente memoria descriptiva puede incorporarse en la invención, ya sea en solitario o en cualquier combinación

apropiada con otra característica cualquiera divulgada o ilustrada en este documento.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de detección de agentes químicos para medir una concentración de iones de un fluido, comprendiendo el dispositivo:
 - un transductor para proporcionar una primera señal de salida eléctrica y dispuesto para recibir una señal de entrada eléctrica, conmutando el transductor la primera señal de salida eléctrica entre unos estados ACTIVO e INACTIVO dependiendo de la señal de entrada eléctrica y una señal de entrada química;
 - una superficie de detección de agentes químicos acoplada al transductor para recibir la señal de entrada química; y
 - un generador de señales para oscilar la señal de entrada química para variar el punto de conmutación del transductor y conmutar la primera señal de salida eléctrica ACTIVA durante un primer periodo e INACTIVA durante un segundo periodo, en donde la concentración de iones del fluido modula una anchura de impulso del primer y/o el segundo periodos.
2. Un dispositivo de detección de agentes químicos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el generador de señales comprende un electrodo de valoración dispuesto para liberar o adsorber un agente químico.
3. Un dispositivo de detección de agentes químicos de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el generador de señales comprende además un controlador para proporcionar una corriente eléctrica oscilante al electrodo de valoración.
4. Un dispositivo de detección de agentes químicos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho transductor comprende un primer transistor de un primer tipo conectado a un segundo transistor de un segundo tipo para formar un inversor CMOS.
5. Un dispositivo de detección de agentes químicos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende además un desmodulador que recibe la primera señal de entrada eléctrica, proporcionando el desmodulador una segunda señal de salida digital que representa la magnitud de la señal de entrada química.
6. Un dispositivo de detección de agentes químicos de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además un codificador conectado a la segunda señal de salida, estando dispuesto el codificador para proporcionar una tercera señal de salida que comprende un código binario de 2 bit.
7. Una matriz de aparatos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende preferiblemente un multiplexor conectado a cada dispositivo para seleccionar la primera señal de salida que tiene que desmodularse.
8. Un método de determinación de uno o más componentes de un analito en un fluido, y que comprende:
 - (i) proporcionar el fluido a un transductor químico;
 - (ii) oscilar una señal de entrada química al transductor para conmutar una primera señal de salida eléctrica entre unos estados ACTIVO e INACTIVO, en donde una concentración de iones del fluido modula una anchura de impulso del estado ACTIVO o INACTIVO de la primera señal de salida;
 - (iii) combinar un reactivo específico de analito con el fluido, por lo cual se producen iones si el reactivo reacciona con el analito en el fluido;
 - (iv) oscilar una o más señales de entrada química al transductor, que conmuta una segunda señal de salida eléctrica entre unos estados ACTIVO e INACTIVO, en donde la concentración de iones del fluido modula una anchura de impulso del estado ACTIVO o INACTIVO de la segunda señal de salida;
 - (v) comparar la primera y la segunda señales de salida para cuantificar un cambio en la concentración de iones del fluido; y
 - (vi) comparar el cambio en la concentración de iones con un umbral para determinar si el reactivo ha reaccionado con el analito para determinar un componente del analito.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además desmodular la primera y la segunda señales de salida modulada para proporcionar una primera y una segunda señales de salida digitales que representan una concentración de iones y después comparar la primera y la segunda señales de salida digitales para cuantificar un cambio en la concentración de iones del fluido.
10. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, que comprende además retirar el reactivo existente del fluido después de (iv).
11. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 8, 9 o 10, que comprende además repetir de (ii) a (vi) para determinar componentes adicionales del analito.
12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el analito es un molde de ácido nucleico a secuenciar y el reactivo es un tipo conocido de nucleótido, y en donde la concentración de iones

cambia dependiendo de si el nucleótido se inserta en el molde de ácido nucleico.

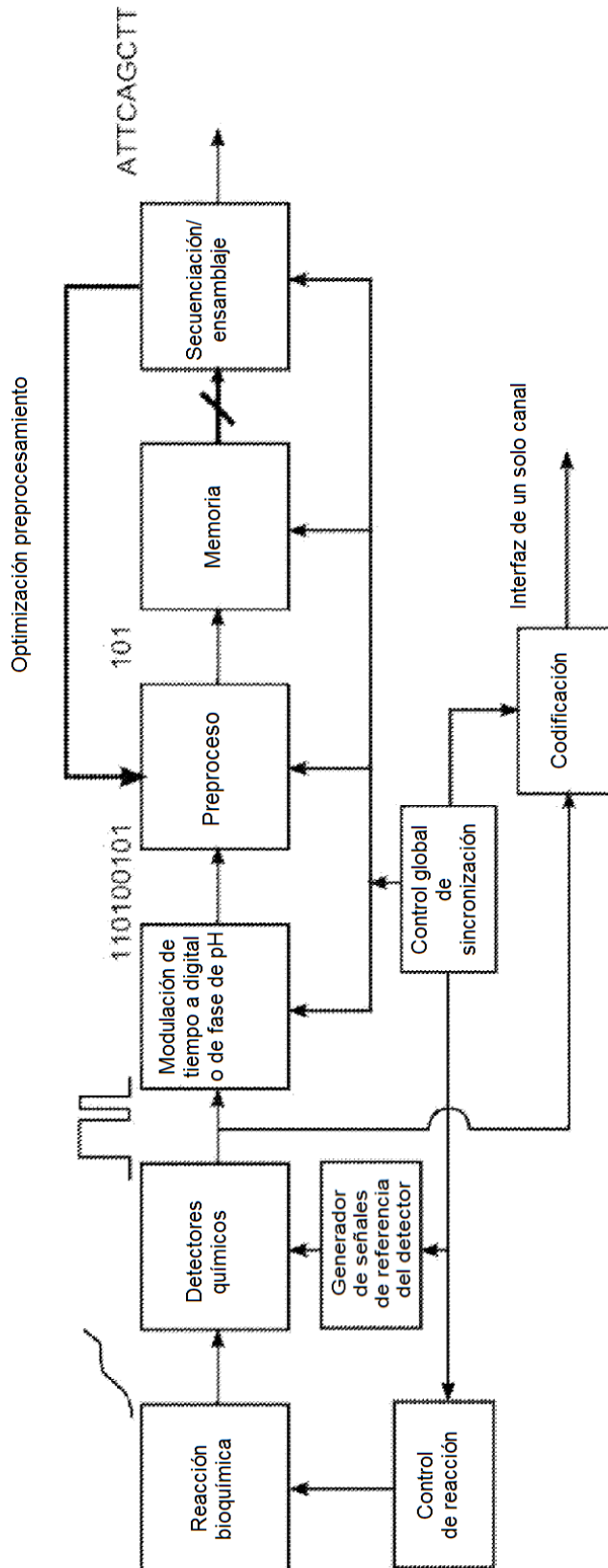


Figura 1

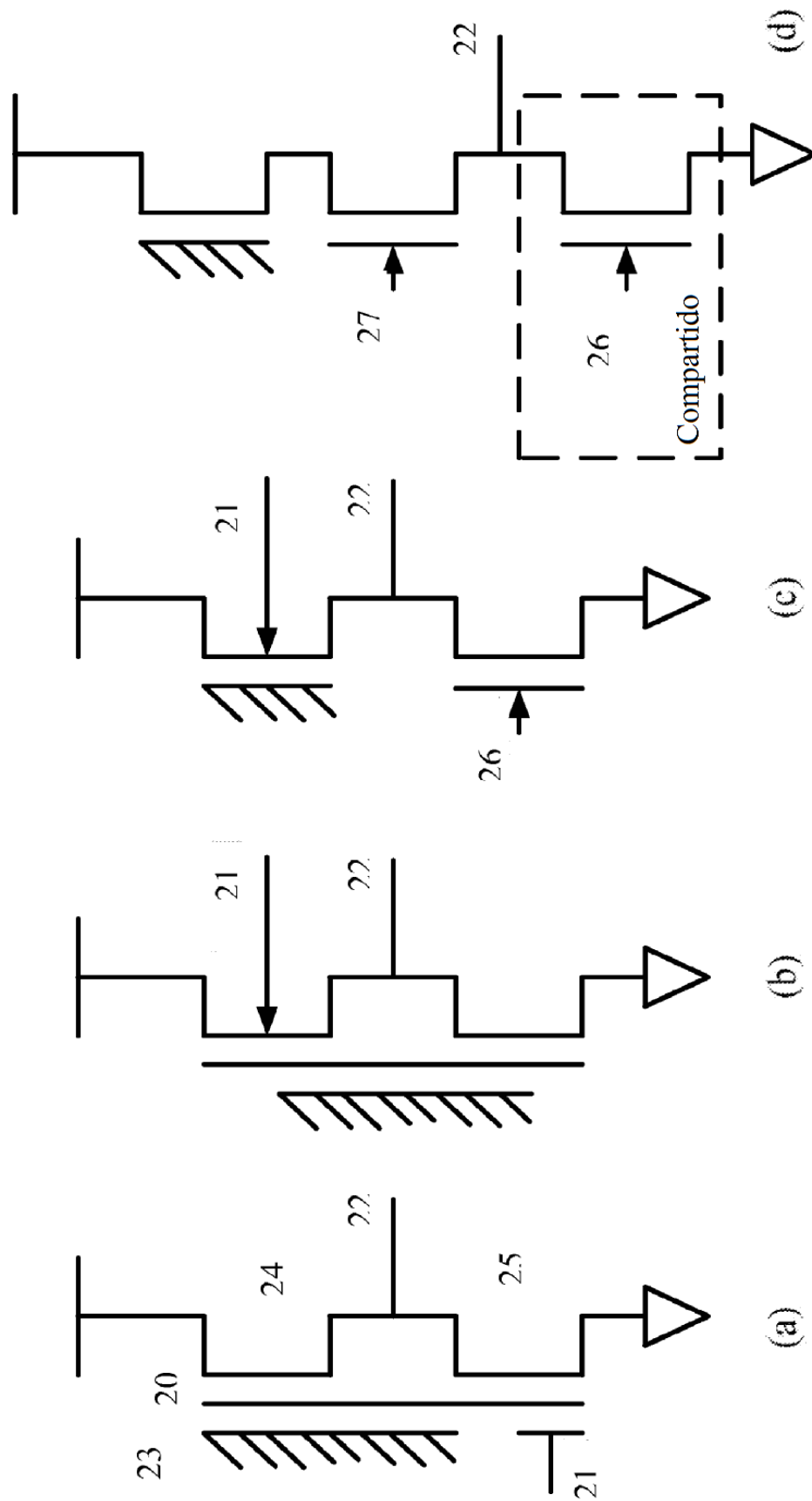


Figura 2

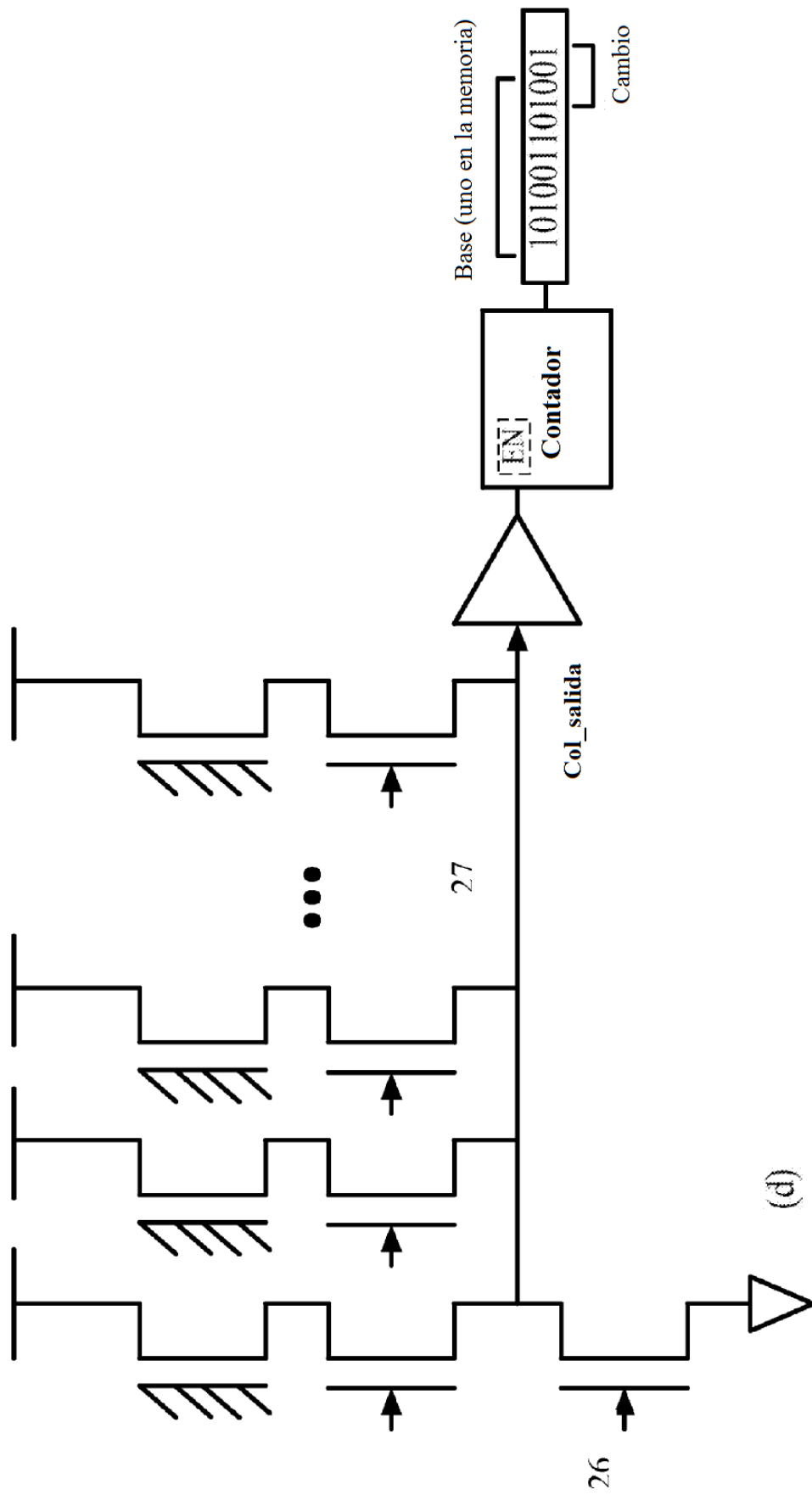


Figura 3

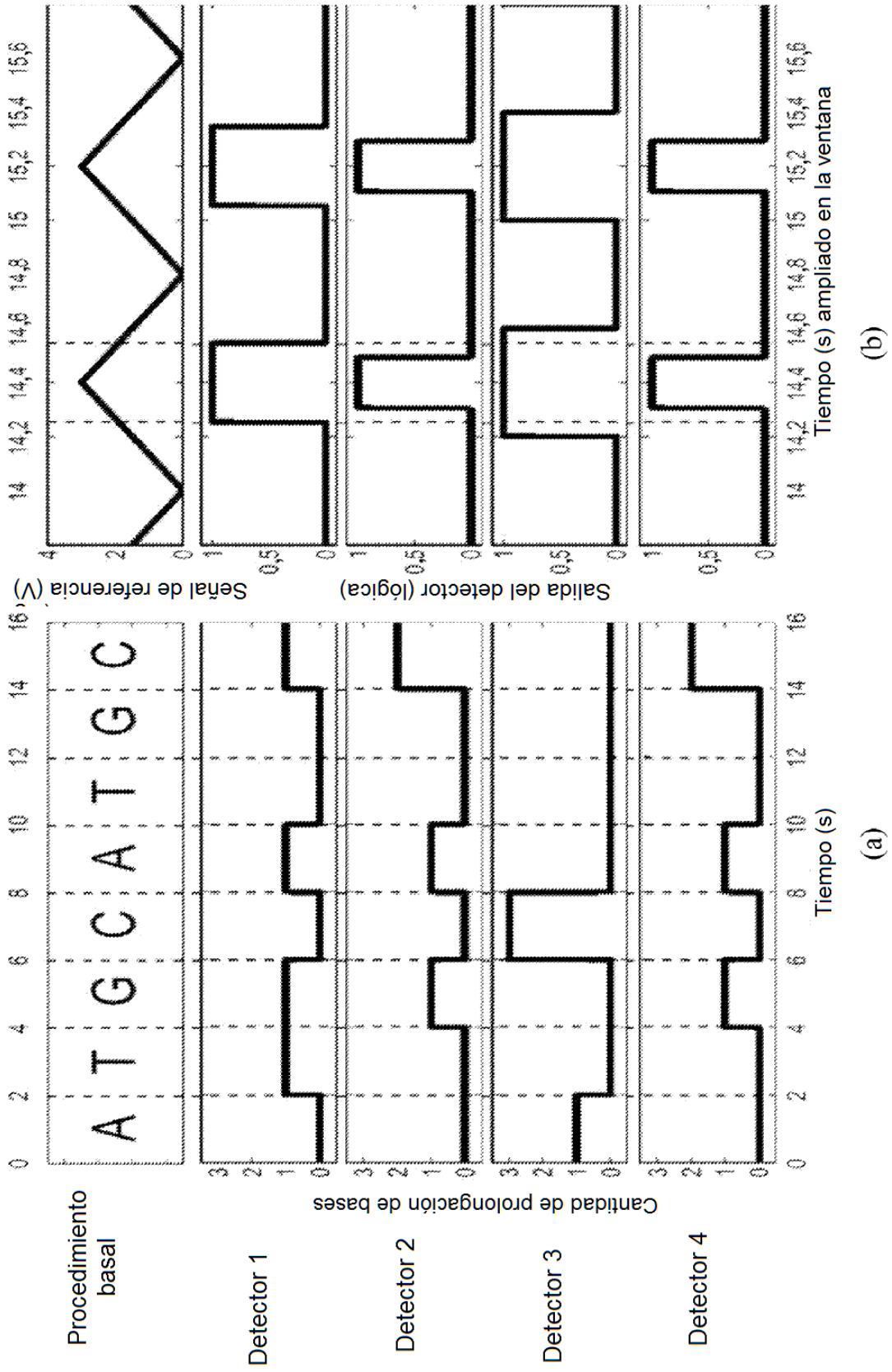


Figura 4

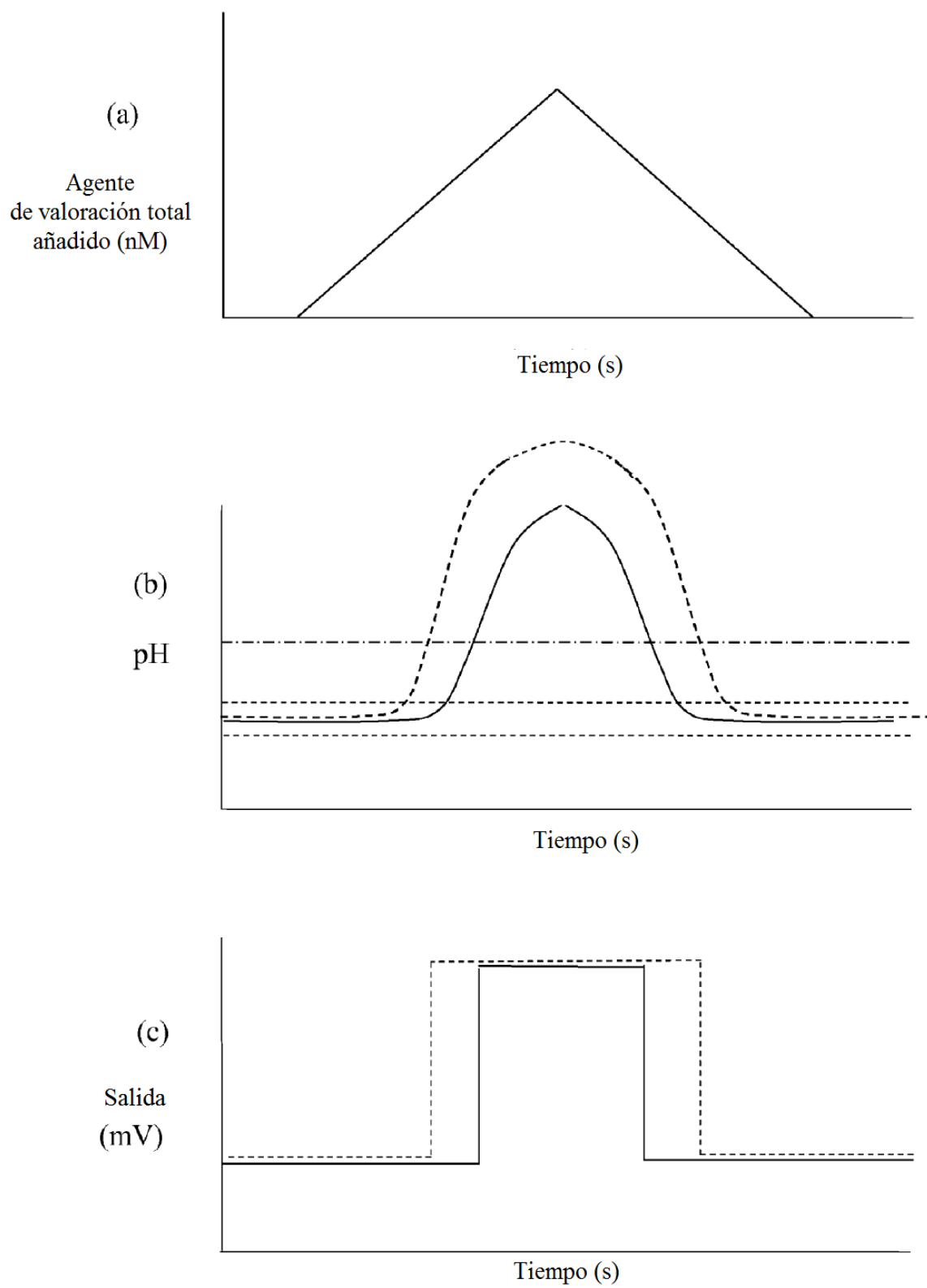


Figura 5