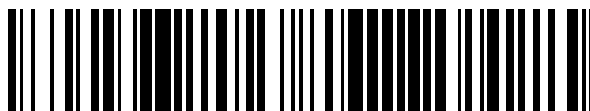


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 047**

51 Int. Cl.:

G06F 19/00 (2008.01)

C12M 1/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2007 PCT/US2007/007991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2007 WO07123744**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2007 E 07754505 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2018622**

54 Título: **Sistemas para análisis de secuencia mediante síntesis**

30 Prioridad:

31.03.2006 US 788248 P
26.04.2006 US 795368 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BANERJEE, SAIBAL;
BARNES, COLIN;
BENSON, KEVIN;
BRIDGHAM, JOHN;
BRYANT, JASON;
BUERMANN, DALE;
ETCHIN, SERGEY;
HO, JONNY;
LEE, XAVIER;
LUNDBERG, PETER;
MAISINGER, KLAUS;
OBRADOVIC, BOJAN;
PRATT, MARK;
RASOLONJATOVO, ISABELLE;
REED, MARK;
RODIGHIERO, CHIARA;
SANKAR, SUBRA;
SCHROTH, GARY;
SIZTO, NING;
SWERDLOW, HAROLD y
VERMAAS, ERIC

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 675 047 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

Sistemas para análisis de secuencia mediante síntesis

Campo de la invención

5 La presente invención hace referencia al campo de la secuenciación de ácidos nucleicos. Más específicamente, la presente invención provee sistemas para secuenciar uno o más polinucleótidos.

Antecedentes de la invención

10 Los métodos mejorados de análisis y secuenciación de ácidos nucleicos han sido beneficiosos para varios avances recientes en la investigación biológica. Por ejemplo, el Proyecto de genoma humano determinó la secuencia completa del genoma humano, lo que se espera que lleve a hallazgos adicionales en campos que abarcan desde el tratamiento de enfermedades a avances científicos básicos. Aunque se ha determinado la secuencia del genoma humano, aún existe una gran cantidad de material genómico para analizar, por ejemplo, la variación genética entre diferentes individuos, tejidos, especies adicionales, etc.

15 Los primeros dispositivos de secuenciación de ADN con base en la separación de fragmentos de longitud diferente se desarrollaron en la década de 1980 y se han comercializado durante varios años. Sin embargo, tal tecnología implica el pasaje de muestras individuales por columnas capilares rellenas con geles de poliacrilamida y, por lo tanto, tiene un rendimiento limitado debido al tiempo que toma el pasaje de cada muestra. Recientemente, se ha informado sobre varias tecnologías de secuenciación de ADN nuevas que se basan en el análisis paralelo masivo de moléculas simples no amplificadas (W000006770; *Proceedings of the National Academy of Sciences LIS. A*, 100, 3960-3964 (2003)) o amplificadas, ya sea en forma de arreglos planos (W09H44151) o en esferas (W004069849; *Nature*, 437, 376-380 (2005); *Science*, 309, 5741, 1728-1732 (2005); *Nat Biotechnol* 6, 630-6344 (2000)).

20 A menudo, la metodología utilizada para analizar la secuencia de los ácidos nucleicos en tales técnicas de secuenciación nuevas se basa en la detección de nucleótidos u oligonucleótidos fluorescentes. Los instrumentos de detección utilizados para leer las señales de fluorescencia en dichos arreglos se suelen basar en epifluorescencia o en microscopía de reflexión interna total, por ejemplo, tal como se describe en W09641011, W000006770 o W002072892. A pesar de que se ha empleado microscopía de reflexión interna total para obtener imágenes de moléculas de ADN tanto simples como amplificadas en superficies, se describe en la presente por primera vez una plataforma de secuenciación de ADN de cuatro colores confiable y robusta (por ejemplo, que comprende sistemas de calefacción, controles de fluidos, iluminación uniforme, control de la forma del haz óptico, un sistema de autofocus y un control total mediante software de todos los componentes).

30 WO 00/053805 describe un método en donde se inmovilizan múltiples moléculas de polimerasa en un soporte sólido. Se introducen una muestra de ácido nucleico y cebadores de oligonucleótidos en una cámara de reacción en una solución amortiguada que contiene los cuatro terminadores de nucleósido trifosfato atrapados y enjaulados. Las polimerasas unidas median la elongación de un ácido nucleico conforme a una plantilla con los terminadores de nucleósido trifosfato enjaulados y etiquetados. Se monitorean los centros de reacción mediante sistemas de microscopio hasta que una mayoría de sitios contiene polimerasa inmovilizada enlazada a una plantilla de ácido nucleico con un terminador de nucleótido enjaulado etiquetado incorporado simple. En la etapa siguiente, se enjuaga la cámara de reacción con un amortiguador de lavado y se determina la incorporación de nucleótido específico para cada centro de reacción activo. El documento indica el uso de un sistema de iluminación para excitar el resto fluorescente mediante reflexión interna total a través de microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRFM).

40 Siguen siendo necesarios dispositivos y sistemas mejores, más robustos y más económicos para la secuenciación rápida y confiable de ácidos nucleicos. La presente invención brinda estos y otros beneficios, lo que resultará evidente al analizar las presentes memoria descriptiva, reivindicaciones y figuras.

Compendio de la invención

45 La invención comprende un sistema configurado para la secuenciación de uno o más polinucleótidos, y el sistema comprende a) una plataforma configurada como soporte de un sustrato sólido con uno o más polinucleótidos unidos a este y b) un sistema de dirección de fluidos para desplazar de forma controlada uno o más reactivos con etiquetas fluorescentes hasta que queden en contacto con los polinucleótidos. El sistema también comprende c) un sistema de control de temperatura para regular una temperatura de al menos uno del sustrato sólido o de los reactivos y d) un sistema de iluminación para excitar las etiquetas fluorescentes mediante reflexión interna total (TIR). El sistema de iluminación comprende al menos un láser de excitación acoplado a través de una fibra óptica multimodal con un índice de refracción que cambia de forma dinámica para obtener una huella de iluminación sustancialmente uniforme. El sistema también comprende e) un componente de detección configurado para estar próximo al sustrato sólido para detectar la fluorescencia producida por la excitación de las etiquetas fluorescentes mediante el sistema de iluminación. Además, el sistema comprende f) un sistema informático acoplado de forma operativa al componente de detección. El sistema informático comprende un conjunto de instrucciones para adquirir imágenes de fluorescencia del componente de detección y determinar una secuencia de polinucleótidos a partir de la

fluorescencia detectada.

5 En algunas de dichas realizaciones, el sustrato sólido se puede desplazar en una dirección distal respecto al componente de detección con el objetivo de que el sistema de control de temperatura regule la temperatura del sustrato sólido. En algunas de dichas realizaciones, el sustrato sólido comprende una celda de flujo con uno o más canales de fluido en los que se unen los polinucleótidos. En algunas de dichas realizaciones, el sustrato sólido es un arreglo de esferas.

10 En algunas de dichas realizaciones, los reactivos comprenden componentes para extender una segunda secuencia complementaria al uno o más polinucleótidos. Opcionalmente, los reactivos son nucleósido trifosfatos etiquetados por fluorescencia. Opcionalmente, los reactivos son oligonucleótidos etiquetados por fluorescencia. En algunas de dichas realizaciones, el sistema de iluminación comprende múltiples láseres de excitación acoplados a través de la fibra óptica multimodal, en donde dicha fibra óptica multimodal se deforma físicamente para obtener la huella de iluminación sustancialmente uniforme. Opcionalmente, la deformación física es consecuencia de compresión o vibración.

15 En algunas de dichas realizaciones, el componente de detección comprende una cámara de CCD o dos cámaras de CCD. En algunas de dichas realizaciones, el componente de detección comprende un mecanismo de autofocus.

20 En algunas de dichas realizaciones, el sistema incluye dos estaciones de fluido para operar en dos celdas de flujo de forma simultánea. En algunas de dichas realizaciones, el sistema de iluminación comprende dos láseres de excitación acoplados a través de un dispositivo de fibra óptica, en donde dichos dos láseres de excitación iluminan al menos parte de una misma área. En algunas de dichas realizaciones, los reactivos incluyen cuatro nucleótidos diferentes con etiquetas fluorescentes respectivas.

El componente de detección también comprende cuatro filtros ópticos adecuados para una emisión de fluorescencia de los cuatro nucleótidos etiquetados por fluorescencia y para la longitud de onda de los láseres.

Estos y otros rasgos de la invención resultarán más evidentes al leer la descripción detallada que se encuentra a continuación junto con las figuras y las reivindicaciones adjuntas.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra una vista general de los componentes principales de un ejemplo de sistema de la invención.

La Figura 2 es una fotografía de un ejemplo de sistema de la invención sin cubierta o chasis exterior.

La Figura 3 es una fotografía de un ejemplo de arreglo de celda de flujo, lente objetivo, láser y fibra óptica en un sistema de la invención.

30 Los paneles A-D de la Figura 4 muestran ejemplos de configuraciones de celdas de flujo.

Los paneles A y B de la Figura 5 ilustran un método para formar una celda de flujo del sistema (Panel A) y un espectro de transmisión de vidrio Foturan (Panel B).

Los paneles A-E de la Figura 6 ilustran un ejemplo de posible método de grabado para construir celdas de flujo en la presente.

35 Los paneles A-C de la Figura 7 presentan ejemplos de diagramas esquemáticos de posibles arreglos o componentes de flujo de fluido del sistema en configuraciones de atracción (Panel A) o empuje (Paneles B y C).

La Figura 8 muestra un ejemplo de componente de calefacción/refrigeración del sistema aislado de otros aspectos de la invención.

40 Los paneles A-D de la Figura 9 presentan diagramas esquemáticos de posibles configuraciones de celdas de flujo y soporte de celda de flujo de la invención.

Los paneles A y B de la Figura 10 presentan fotografías de un ejemplo de realización de la invención que muestran el movimiento del componente de calefacción/refrigeración y el soporte de celda de flujo (Panel A) y un esquema de los componentes de calefacción/refrigeración respecto a otros componentes de un ejemplo de sistema (Panel B).

45 Los paneles A y B de la Figura 11 muestran esquemas que ilustran un ejemplo de marco que incluye los componentes ópticos, de soporte para láser de fibra óptica, de calefacción/refrigeración y de soporte de celda de flujo (A) y un ejemplo de configuración de ajuste de nivelación de celda de flujo (B).

La Figura 12 presenta una imagen de un ejemplo de realización del sistema que muestra el marco y la cubierta del sistema.

50 Las Figuras 13-16 presentan varias configuraciones opcionales de cámaras, fuentes de luz y otros componentes en los sistemas de la presente.

Las Figuras 17-19 muestran varios esquemas de forma y dimensiones de haz de láseres TIRF en varias realizaciones de los sistemas de la presente.

La Figura 20 muestra una realización opcional de un prisma de TIRF a utilizar con los sistemas y dispositivos de la presente.

5 La Figura 21 ilustra la creación de un haz de láser cuadrado al pulir el extremo de una emisión de fibra multimodal.

Los paneles A y B de la Figura 22 ilustran un ejemplo de configuración de filtros y rueda de filtro opcionalmente en varias realizaciones de la presente (A), así como el espectro de dichos filtros respecto a cuatro ejemplos de fluoróforos excitados a las longitudes de onda de láseres (B).

10 La Figura 23 ilustra un ejemplo de diseño 1G nominal de 30X K4 System Ray de los componentes ópticos de un sistema de la invención.

La Figura 24 muestra el rendimiento de obtención de imágenes 30X K4 de un ejemplo de sistema de la invención.

La Figura 25 presenta un diagrama esquemático de un rasgo de autofocus de un ejemplo de sistema de la presente.

Las Figuras 26-27 son fotografías de medidas enfocadas y no enfocadas tomadas por varias realizaciones de los sistemas o dispositivos de la presente.

15 La Figura 28 presenta un diagrama de un haz de láser con autofocus.

La Figura 29 muestra una gráfica de una variedad de cúmulos de ácidos nucleicos detectados en función de una cantidad total de cúmulos y el área de cúmulos mínima, tal como lo detecte una realización de la invención.

Las Figuras 30-32 presentan bosquejos de cúmulos de ácidos nucleicos y su secuenciación con los sistemas o dispositivos de la invención.

20 Los paneles A-D de la Figura 33 muestran los efectos de tres formas diferentes de deformación física de una fibra óptica circular en el haz que emerge de la fibra. El someter la fibra a vibración o compresión hace que la luz que emerge de la fibra sea uniforme durante el tiempo de integración de la imagen.

25 Los paneles A-D de la Figura 34 muestran los efectos de tres formas diferentes de deformación física de una fibra óptica rectangular en el haz que emerge de la fibra. El someter la fibra a vibración o compresión hace que la luz que emerge de la fibra sea uniforme durante el tiempo de integración de la imagen.

Los paneles A-L de la Figura 35 muestran los efectos de varios esquemas de codificación de modo en la luz emergente de múltiples fibras ópticas diferentes.

La Figura 36 muestra un arreglo posible para una realización de sistema de cámara dual de la invención.

30 La Figura 37 muestra un ejemplo de realización de la invención que contiene 2 cámaras para registrar simultáneamente 2 colores en la misma imagen.

La Figura 38 muestra un esquema de una lámina de onda $\lambda/2$.

La Figura 39 muestra un esquema de una lámina de onda $\lambda/2$ modificada que comprende múltiples secciones orientadas de forma diferente.

35 La Figura 40 muestra un bosquejo de un sistema de mezcla modulado con lámina de onda de modo de una realización de la invención.

Los paneles A-D de la Figura 41 son fotografías de un área de huella iluminada a partir de una fibra óptica multimodal y generada por la mezcla de modos ópticos a través del uso de láminas de onda.

Los paneles A y B de la Figura 42 muestran la uniformidad sustancial de un área de huella de láser debido a la mezcla multimodal mediante el uso de láminas de onda.

40 La Figura 43 muestra una realización de soporte de celda de flujo dual de la invención, de forma tal que sea posible llevar a cabo las operaciones químicas en paralelo con el fin de maximizar el tiempo de análisis del instrumento.

Los paneles A—F de la Figura 44 muestran ejemplos de realizaciones de celdas de flujo con flujo inferior, prismas e iluminación TIRF lateral/superior.

La Figura 45 muestra un ejemplo de componente de regulación de temperatura bajo una celda de flujo y un prisma.

45 La Figura 46 muestra un ejemplo de válvula de fluido y ejemplos de colectores (por ejemplo, para utilizar con celdas de flujo con flujo inferior).

La Figura 47 muestra un ejemplo de válvula de fluido de la invención.

Los paneles A y B de la Figura 48 muestran una posible configuración de celda de flujo dual de la invención.

Los paneles A-F de la Figura 49 muestran varios ejemplos de configuraciones de regulación de temperatura inferior que se pueden utilizar con celdas de flujo con flujo inferior de la invención.

5 Descripción detallada

También se discuten en la presente sistemas y dispositivos para la secuenciación de uno o más polinucleótidos. Los sistemas se pueden utilizar para obtener imágenes de los sustratos planos, en donde los sustratos pueden comprender moléculas simples no amplificadas, moléculas simples amplificadas, uno o más conjuntos de esferas ordenadas o varias combinaciones de estos. Cuando se utilizan para secuenciación, los sistemas pueden comprender opcionalmente un sustrato sólido plano con uno o más polinucleótidos en este, por ejemplo, ya sea directamente unidos o unidos a esferas opcionalmente dispuestas en el sustrato; un sistema de dirección de fluidos que desplaza de forma controlada varios reactivos (por ejemplo, amortiguadores, enzimas, oligonucleótidos o nucleótidos etiquetados por fluorescencia, etc.) hasta que queden en contacto con los polinucleótidos; un sistema de control de temperatura que regula la temperatura del sustrato y/o de los reactivos; un sistema óptico para obtener iluminación por reflexión interna total del sustrato con una huella de haz uniforme (en cuyo caso se controla opcionalmente la forma de la huella), una fuente de luz (por ejemplo, una que comprende uno o más láseres) para excitar los restos fluorescentes; un componente de detección (por ejemplo, una cámara de CCD y lentes objetivo, etc.) próximo al sustrato y que captura y detecta fluorescencia del resto o los restos excitados; una computadora conectada al detector, la que tiene conjuntos de instrucciones para controlar los diversos componentes del sistema, adquirir datos de fluorescencia del detector y, opcionalmente, determinar la secuencia del polinucleótido a partir de los datos de fluorescencia. Tal como se discute en la presente, los sustratos se pueden alejar del detector para interactuar con el sistema de control de temperatura, de forma de regular la temperatura del sustrato (por ejemplo, para permitir que las reacciones de polimerasa continúen, etc.). En dichas realizaciones, el sistema puede comprender una plataforma de análisis o una plataforma móvil opcionalmente controlada por computadora. El dispositivo de calefacción puede ser un dispositivo de Peltier controlado por computadora u otro componente de calefacción/refrigeración que se desplaza respecto a la plataforma de análisis o la plataforma se puede desplazar opcionalmente para garantizar que el dispositivo de Peltier se encuentre en contacto con el sustrato. Tal como se discute en la presente, el sustrato puede comprender una celda de flujo. Las celdas de flujo pueden tener uno o más canales de fluido en los que se encuentre el polinucleótido (por ejemplo, en donde los polinucleótidos se unen directamente a la celda de flujo o en donde los polinucleótidos se unen a una o más esferas dispuestas en la celda de flujo) y pueden comprender vidrio, silicio, plástico o varias combinaciones de estos. Los reactivos incluyen componentes para sintetizar una segunda secuencia complementaria al uno o más polinucleótidos. La síntesis se puede llevar a cabo con nucleótidos etiquetados que se pueden agregar individualmente o como una mezcla de nucleótidos, o como oligonucleótidos etiquetados. En el caso de oligonucleótidos etiquetados, es posible determinar la identidad de una o más bases complementarias al oligonucleótido etiquetado. Los nucleótidos etiquetados se pueden encontrar en forma de trifosfatos etiquetados por fluorescencia, los que pueden contener un resto de bloqueo para controlar la adición y garantizar que se agregue un único nucleótido a cada polinucleótido. El fluoróforo se puede unir al resto de bloqueo, el que se puede encontrar en la posición 3' del azúcar, o se puede unir a través de la base de nucleótido a través de un enlazador que se puede escindir opcionalmente con las mismas condiciones que la remoción del resto de bloqueo. Es posible escindir el enlazador y el resto de bloqueo con los mismos reactivos. Tal como se discute en la presente, el sistema de reflexión interna total (TIRF) puede comprender, por ejemplo, una lámpara o un láser. El sistema puede comprender más de un láser de excitación que se puede acoplar a través de un dispositivo de fibra óptica. Tales láseres pueden iluminar al menos parte de la misma área (es decir, con superposición). Los láseres de TIRF de la presente también comprenden opcionalmente un codificador de modo de fibra comprimido mediante accionador piezoeléctrico o modulado por láminas de onda, con agitación y con vibración para producir la intensidad óptica sustancialmente uniforme en toda una huella de iluminación del láser. Se describen en la presente varios mecanismos para controlar la intensidad y la uniformidad de iluminación. También es posible emplear la forma de la fibra para controlar la forma de la huella de iluminación. En las diversas realizaciones de la presente, el componente de detección puede comprender uno o más lentes objetivo, lentes de tubo adicionales, un sistema de autofocus que ajusta ya sea la posición de la plataforma y/o la posición de los lentes objetivo para garantizar que el sustrato se mantenga en foco, filtros ópticos adecuados para transmitir la longitud de onda de emisión de los fluoróforos y bloquear la luz de la fuente de excitación, y un sistema para registrar la emisión de fluorescencia de los fluoróforos, por ejemplo, un dispositivo de carga acoplada (CCD) o una cámara similar.

La presente invención comprende sistemas para secuenciar uno o más polinucleótidos, por ejemplo, a partir de arreglos de ADN de molécula simple amplificada mediante clonación en celdas de flujo o a partir de una arreglo de esferas inmovilizadas. Los sistemas de la presente son opcionalmente útiles, por ejemplo, en la secuenciación genómica comparativa (tal como para genotipado, descubrimiento de SNP, secuenciación de extremo SAC, mapeo de punto de ruptura de cromosoma, arreglo de secuencia de genoma completo), rastreo de expresión génica, análisis de secuencia de microARN, epigenómica (por ejemplo, con mapeo de sitio con hipersensibilidad a DNasa 1 de mapeo de metilación o inmunoprecipitación de cromatina), caracterización de biblioteca de expresión antifágica y antiaptamérica. Los sistemas de la presente comprenden varias combinaciones de aspectos o dispositivos informáticos, ópticos, mecánicos, fluidos, térmicos y eléctricos que se describen de forma más detallada más

adelante. La invención se describe en sentido general en la reivindicación independiente 1.

En resumen, los aspectos generales de la invención se bosquejan en la Figura 1, la que ilustra un ejemplo de configuración de obtención de imágenes mediante TIRF de una realización de diseño con retroiluminación. Tal como se puede ver en la Figura 1, el dispositivo o módulo de administración de fluidos 100 dirige el flujo de reactivos (por ejemplo, nucleótidos fluorescentes, amortiguadores, enzimas, reactivos de escisión, etc.) a una celda de flujo 110 y una válvula de descarte 120 (y a través de estas). En realizaciones particulares, la celda de flujo comprende cúmulos de secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, de alrededor de 200-1000 bases de longitud) a secuenciar que se unen de forma opcional al sustrato de la celda de flujo, así como opcionalmente otros componentes. La celda de flujo también puede comprender un arreglo de esferas, cada una de las cuales contiene opcionalmente múltiples copias de una única secuencia. La preparación de dichas esferas se puede llevar a cabo según una variedad de técnicas, por ejemplo, tal como se describe en USPN 6 172 218 o WO04069849 (*Bead emulsion nucleic acid amplification*).

El sistema también comprende un accionador de estación de temperatura 130 y un componente de calefacción/refrigeración 135 que puede regular opcionalmente la temperatura de las condiciones de los fluidos en la celda de flujo. Tal como se explica más adelante, varias realizaciones pueden comprender configuraciones diferentes de los componentes de calefacción/refrigeración. Se monitorea la celda de flujo y se hace seguimiento de la secuenciación mediante el sistema de cámara 140 (por ejemplo, una cámara de CCD) que puede interactuar con varios filtros en el arreglo de codificación de filtro 145, lente objetivo 142 y enfoque láser o arreglo de enfoque láser 150. El dispositivo láser 160 (por ejemplo, un láser de excitación en un arreglo que opcionalmente comprende múltiples láseres) actúa de forma de iluminar reacciones de secuenciación fluorescentes en la celda de flujo mediante iluminación láser a través de fibra óptica 161 (lo que opcionalmente puede comprender uno o más lentes para volver a obtener imágenes, un soporte de fibra óptica, etc. La realización ilustrada también presenta una lámpara de baja potencia 165, espejo 180 y dicroica inversa 185. Remitirse al texto a continuación. De manera adicional, la plataforma de soporte 170 permite la alineación y el desplazamiento correctos de la celda de flujo, el accionador de temperatura, la cámara, etc. respecto a los diversos componentes de la invención. El componente de enfoque (eje z) 175 también puede favorecer la manipulación y la ubicación de varios componentes (por ejemplo, un lente objetivo). Tales componentes se organizan opcionalmente en un marco y/o se encuentran dentro de una estructura de cubierta. Se observará que las ilustraciones de la presente ilustran ejemplos de realizaciones y no se deben tomar necesariamente como taxativas. Por lo tanto, por ejemplo, realizaciones diferentes pueden comprender la ubicación diferente de componentes uno respecto a otro (por ejemplo, la realización A comprende un componente de calefacción/refrigeración tal como en la Figura 1, al tiempo que la realización B comprende un componente de calefacción/refrigeración debajo de su celda de flujo, etc.).

Definiciones

Tal como se utilizan en la presente, «polinucleótido» y «ácido nucleico» hacen referencia a ácido desoxirribonucleico (ADN), pero el experto en la técnica reconocerá que los sistemas y dispositivos de la presente también se pueden utilizar con ácido ribonucleico (ARN) cuando sea adecuado. Se debería entender que los términos incluyen, como equivalentes, análogos ya sea de ADN o ARN a partir de análogos de nucleótidos. Los términos o expresiones tal como se utilizan en la presente también comprenden ADNc que es ADN complementario, o una copia, producido a partir de una plantilla de ARN, por ejemplo, mediante la acción de transcriptasa inversa.

Las moléculas de polinucleótido de cadena simple secuenciadas por los sistemas y dispositivos de la presente se pueden haber originado en forma de cadena simple como ADN o ARN, o en forma de ADN de doble cadena (ADNdc) (por ejemplo, fragmentos de ADN genómico, productos de amplificación y PCR, y similares). Por lo tanto, un polinucleótido de cadena simple puede ser la cadena sentido o antisentido de un dúplex de polinucleótidos. Se conocen en la técnica métodos de preparación de moléculas de polinucleótido de cadena simple adecuadas para uso en el método de la invención con técnicas estándares. En general, la secuencia precisa de las moléculas de polinucleótido primario no es importante para la invención y se puede conocer o no. Las moléculas de polinucleótido de cadena simple pueden representar moléculas de ADN genómico (por ejemplo, ADN genómico humano) que incluyen tanto secuencias de intrón como de exón (secuencia codificante), así como secuencias reguladoras no codificantes, tales como secuencias promotoras y potenciadoras.

En determinadas realizaciones, el ácido nucleico a secuenciar mediante el uso de la presente invención se inmoviliza en un sustrato (por ejemplo, un sustrato en una celda de flujo o una o más esferas en un sustrato tal como una celda de flujo, etc.). Tal como se utiliza en la presente, se pretende que el término «inmovilizado» abarque la unión covalente o no covalente, directa o indirecta, a menos que se indique lo contrario de forma explícita o mediante el contexto. En determinadas realizaciones de la invención, se puede preferir la unión covalente, pero, en general, lo que se requiere es que las moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos) permanezcan inmóviles o unidas al soporte en condiciones en las que se pretende usar el soporte, por ejemplo, en aplicaciones que requieren la secuenciación de ácidos nucleicos.

Tal como se usa en la presente, la expresión «soporte sólido» (o «sustrato» en determinados usos) hace referencia a cualquier arreglo o sustrato inerte al que se pueden unir ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, superficies de vidrio, superficies de plástico, látex, dextrano, superficies de poliestireno, superficies de polipropileno, geles de

poliacrilamida, superficies de oro y obleas de silicio. A efectos descriptivos, el soporte sólido puede ser una superficie de vidrio (por ejemplo, la superficie plana de un canal de celda de flujo). A efectos descriptivos, el soporte sólido puede comprender un arreglo o sustrato inerte que se «funcionalizó», por ejemplo, mediante la aplicación de una capa o revestimiento de un material intermedio que comprende grupos reactivos que permiten la unión covalente a moléculas tales como polinucleótidos. A modo de ejemplo no taxativo, dichos soportes pueden incluir hidrogeles de poliacrilamida en un sustrato inerte tal como vidrio. Las moléculas (polinucleótidos) se pueden enlazar de forma covalente directa al material intermedio (por ejemplo, el hidrogel), pero el material intermedio se puede enlazar de forma no covalente al sustrato o arreglo (por ejemplo, el sustrato de vidrio). Por consiguiente, se debe interpretar que la unión covalente a un soporte sólido comprende este tipo de arreglo.

10 Descripción general del sistema

Tal como se indicó anteriormente, la presente invención comprende sistemas y dispositivos novedosos para la secuenciación de ácidos nucleicos. Como resultará evidente para los expertos en la técnica, de acuerdo con el contexto, las referencias en la presente a una secuencia de ácido nucleico particular también pueden hacer referencia a moléculas de ácido nucleico que comprenden tal secuencia de ácido nucleico. La secuenciación de un fragmento diana significa que se establece una lectura del orden cronológico de las bases. No es necesario que las bases leídas sean contiguas, aunque es preferible, ni es necesario secuenciar cada base del fragmento completo durante la secuenciación. La secuenciación se puede llevar a cabo con cualquier técnica de secuenciación adecuada, en donde los nucleótidos u oligonucleótidos se agregan de forma sucesiva a un grupo hidroxilo 3' libre, lo que genera la síntesis de una cadena de polinucleótidos en dirección 5' a 3'. Preferiblemente, la naturaleza del nucleótido agregado se determina luego de cada adición de nucleótido. Las técnicas de secuenciación que emplean secuenciación mediante ligadura en donde no se secuencia cada base contigua y las técnicas tales como la secuenciación paralela masiva característica (MPSS) en la que se eliminan, en lugar de agregar, bases a las cadenas en la superficie también se pueden utilizar con los sistemas y dispositivos de la invención.

En determinadas realizaciones, la presente invención utiliza secuenciación mediante síntesis (SBS). En SBS, se utilizan cuatro nucleótidos modificados etiquetados por fluorescencia para determinar la secuencia de cúmulos densos de ADN amplificado (posiblemente, millones de cúmulos) presentes en la superficie de un sustrato (por ejemplo, una celda de flujo). Los inventores y otros empleados han descrito varios aspectos adicionales respecto a métodos y procedimientos de SBS que se pueden utilizar con los sistemas y dispositivos de la presente. Vea, por ejemplo, W004018497, W004018493 y US7057026 (nucleótidos), W005024010 y W006120433 (polimerasas), W005065814 (técnicas de unión a la superficie) y WO 9844151, W006064199 y W007010251.

A efectos descriptivos, las celdas de flujo que contienen las muestras de ácido nucleico para secuenciación se colocan en el soporte de celda de flujo adecuado. Las muestras para secuenciación se pueden encontrar en forma de moléculas simples, moléculas simples amplificadas en forma de cúmulos o esferas que comprenden moléculas de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos se preparan de forma tal que comprenden un cebador oligonucleótido adyacente a una secuencia diana desconocida. Para iniciar el primer ciclo de secuenciación SBS, el subsistema de flujo de fluido (del que se describen varias realizaciones en la presente) provoca el flujo de uno o más nucleótidos etiquetados de forma diferente y ADN polimerasa, etc., hacia el interior o a través de la celda de flujo. Es posible agregar ya sea un único nucleótido a la vez o diseñar los nucleótidos utilizados en el procedimiento de secuenciación especialmente para que posean una propiedad de terminación reversible, lo que permite que cada ciclo de la reacción de secuenciación se produzca de forma simultánea en presencia de los cuatro nucleótidos etiquetados (A, C, T, G). En el caso de que los cuatro nucleótidos se mezclen, la polimerasa es capaz de seleccionar la base correcta a incorporar y cada secuencia se extiende una única base. En tales métodos de uso de los sistemas de la invención, la competencia natural entre las cuatro alternativas lleva a una mayor precisión que si únicamente un nucleótido se encuentra presente en la mezcla de reacción (donde, por consiguiente, la mayoría de las secuencias no se expone al nucleótido correcto). Se trata a las secuencias en las que se repite una base particular una tras otra (por ejemplo, homopolímeros) como a cualquier otra secuencia y con precisión elevada.

El subsistema de flujo de fluido también provoca el flujo de los reactivos adecuados para remover el extremo 3' bloqueado (si correspondiera) y el fluoróforo de cada base incorporada. El sustrato se puede exponer ya sea a una segunda ronda de los cuatro nucleótidos bloqueados o, de forma opcional, a una segunda ronda con un nucleótido individual diferente. Entonces, se repiten dichos ciclos y se lee la secuencia de cada cúmulo en los múltiples ciclos químicos. El aspecto informático de la presente invención puede alinear opcionalmente los datos de secuencia recopilados a partir de cada molécula, cúmulo o esfera individual para determinar la secuencia de polímeros más extensos, etc. De manera alternativa, es posible llevar a cabo el procesamiento de imágenes y la alineación en una computadora separada.

Los componentes de calefacción/refrigeración del sistema regulan las condiciones de reacción en los canales de la celda de flujo y las áreas o recipientes de almacenamiento de reactivos (y, opcionalmente, la cámara, dispositivos ópticos y/u otros componentes), mientras que los componentes de flujo de fluido hacen posible que la superficie de sustrato se exponga a reactivos adecuados para incorporación (por ejemplo, los nucleótidos etiquetados por fluorescencia de forma adecuada a incorporar), al tiempo que se eliminan mediante enjuague los reactivos no incorporados. Una plataforma móvil opcional sobre la que se coloca la celda de flujo permite orientar de forma adecuada la celda de flujo para la excitación por láser (u otra luz) del sustrato y, opcionalmente, desplazarla

respecto a un lente objetivo para que sea posible la lectura de áreas diferentes del sustrato. De manera adicional, otros componentes del sistema también son opcionalmente móviles o ajustables (por ejemplo, la cámara, el lente objetivo, el componente de calefacción/refrigeración, etc.). Durante la excitación con láser, el componente de cámara capta la imagen o ubicación de la fluorescencia emitida desde los ácidos nucleicos en el sustrato, de forma que se registra en el componente informático la identidad de la primera base para cada molécula, cúmulo o esfera individual.

La Figura 2 muestra una fotografía de un ejemplo de arreglo de un sistema de la invención. Tal como se puede observar, es posible dividir el sistema en varios grupos básicos, por ejemplo, el área 200 que comprende el almacenamiento de reactivos y fluidos (lo que incluye bombas y motores, o similares, para producir y regular el flujo de fluido, componentes de calefacción/refrigeración para temperaturas de reactivo adecuadas, etc.), el área 210 que comprende la celda de flujo y detección (lo que incluye una o más cámaras o dispositivos similares, uno o más láseres u otras fuentes lumínicas, uno o más filtros ópticos y lentes adecuados, o un accionador de control de temperatura, por ejemplo, con componentes de calefacción/refrigeración de Peltier para controlar las condiciones de temperatura de la celda de flujo, una plataforma de presentación móvil y motores que la controlan para ubicar correctamente los diversos dispositivos o componentes en el sistema) y el área 220 que comprende un módulo informático (lo que incluye una memoria y una interfaz para usuario, tal como un panel de visualización y un teclado, etc.).

La Figura 3 muestra una fotografía de una celda de flujo (celda de flujo 300) en un ejemplo de sistema. Se ubica un láser acoplado a través de fibra óptica 320 para iluminar la celda de flujo (la que contiene las muestras de ácido nucleico a secuenciar), mientras que un componente de lente objetivo (componente 310) capta y monitorea las diversas emisiones fluorescentes una vez que un láser u otra luz ilumina los fluoróforos. También como se puede ver en la Figura 3, se hace fluir los reactivos a través de la celda de flujo y a través de uno o más tubos (tubos 330) que se conectan con el almacenamiento de reactivo adecuado, etc. La celda de flujo en la Figura 3 se coloca en un soporte de celda de flujo 340 (que, a su vez, se coloca sobre el área de presentación móvil 350). El soporte de celda de flujo mantiene la celda de flujo fija en la posición adecuada respecto al láser, el prisma (que dirige la iluminación láser a la superficie de obtención de imágenes) y el sistema de cámaras mientras que se produce la secuenciación. A continuación, se exponen otras celdas de flujo y configuraciones de celdas de flujo.

Las diversas realizaciones de la presente invención exhiben varios rasgos novedosos (nuevamente, se observará que no todos los rasgos se encuentran necesariamente presentes en todas las realizaciones, a menos que se indique específicamente). Por ejemplo, los sistemas de la presente pueden utilizar dos láseres de excitación acoplados a través de un dispositivo de fibra óptica para garantizar que iluminen la misma área (es decir, que las áreas iluminadas, o huellas, de los láseres se superpongan). De manera adicional, la presente invención puede contener una fibra modulada con láminas de onda, con agitación o comprimida (codificador de modo), de forma que se uniformice la intensidad óptica de un haz multimodal en toda la huella de iluminación. Es posible ajustar la forma de la fibra, por ejemplo, para que sea cuadrada o rectangular, para que la forma de la iluminación corresponda a la forma del dispositivo de recopilación de datos (por ejemplo, un CCD con píxeles cuadrados). Además, en determinadas realizaciones, un único láser excita dos fluoróforos, uno con un filtro de emisión estrecho cercano a la longitud de onda y uno con un filtro de emisión de banda más ancha a longitud de onda mayor. Tal arreglo normaliza las intensidades relativas de los tintes (con los mismos filtros de ancho de banda, el tinte más lejano a la longitud de onda del láser sería mucho más débil). Las realizaciones de la presente también pueden comprender una plataforma móvil para que la reacción química (la que requiere calefacción y refrigeración) se pueda producir en el mismo instrumento, pero fuera del tren óptico. A menudo, los sistemas de la presente también comprenden un sistema de autofocus que permite obtener imágenes de forma automática de muchos mosaicos y contiene un sistema de fluido para llevar a cambio modificaciones de fluidos en línea. Opcionalmente, cada uno de los componentes individuales del sistema o dispositivo (por ejemplo, fuente lumínica, cámara, etc.) puede tener su propio suministro o fuente de energía, o todo se puede accionar opcionalmente mediante una fuente. Tal como se observará, aunque los componentes de la presente se describen a menudo aislados o en relación únicamente a uno o dos componentes más, los diversos componentes en las realizaciones suelen estar conectados de forma operativa y/o funcional y actúan en conjunto en los sistemas o dispositivos de la presente.

50 Celdas de flujo

A efectos descriptivos, los sistemas de la presente comprenden uno o más sustratos en los que se enlazan, se unen o se asocian los ácidos nucleicos a secuenciar. Vea, por ejemplo, WO 9844151 o W00246456. El sustrato se encuentra en un canal u otra área como parte de una celda de flujo. Las celdas de flujo utilizadas pueden comprender millones de cúmulos de ácidos nucleicos individuales, por ejemplo, alrededor de 2-8 millones de cúmulos por canal. Cada uno de tales cúmulos puede tener lecturas de extensiones de al menos 25 bases para secuenciación de ADN y 20 bases para análisis de expresión génica. Los sistemas de la presente pueden generar mil millones de bases (gigabase) de secuencia por operación (por ejemplo, 5 millones de cúmulos de ácidos nucleicos por canal, 8 canales por celda de flujo, 25 bases por polinucleótido).

A efectos descriptivos, las Figuras 4A y 4B muestran una celda de flujo. Tal como se puede ver, la celda de flujo 400 comprende una capa base 410 (por ejemplo, un vidrio de borosilicato de 1000 μm de profundidad), una capa de canal 420 (por ejemplo, de silicio grabado de 100 pm de profundidad) superpuesta en la capa base y una capa de

cubierta o superior 430 (por ejemplo, de 300 μm de profundidad). Cuando las capas se disponen juntas, se forman canales cerrados con entradas o salidas en cualquiera de los extremos a través de la cubierta. Tal como resultará evidente a partir de la descripción que se encuentra más adelante, algunas celdas de flujo pueden comprender aberturas para los canales en la parte inferior de la celda de flujo.

- 5 Opcionalmente, es posible construir la capa con canales mediante métodos fotolitográficos estándares que son conocidos por los expertos en la técnica. Un método tal que se puede utilizar en la presente invención implica la exposición de una capa de 100 μm de silicio y el grabado del canal expuesto con grabado iónico reactivo profundo o grabado húmedo.

10 Se observará que, aunque se encuentran en la presente configuraciones de celda de flujo particulares, tales configuraciones no se deberían interpretar como limitantes. Por lo tanto, por ejemplo, varias celdas de flujo de la presente pueden comprender cantidades diferentes de canales (por ejemplo, un canal, 2 canales o más, 4 canales o más, o 6, 8, 10, 16 o más canales, etc.). De manera adicional, varias celdas de flujo pueden comprender canales de profundidades y/o anchos diferentes (tanto diferentes entre canales en celdas de flujo diferentes y diferentes entre canales en la misma celda de flujo). Por ejemplo, aunque los canales formados en la celda en la Figura 4B tienen 100 μm de profundidad, otras celdas de flujo pueden comprender opcionalmente canales de mayor profundidad (por ejemplo, 500 μm) o menor profundidad (por ejemplo, 50 μm). Se ilustran ejemplos adicionales de celdas de flujo en las Figuras 4C y 4D (por ejemplo, una celda de flujo con canales amplios, tales como los canales 440 en la Figura 4C, con dos canales con 8 puertos de entrada y salida (puertos 445 - 8 de entrada y 8 de salida) para mantener la uniformidad de flujo y una pared central, tal como la pared 450, para soporte estructural adicional, o una celda de flujo con canales desfasados, tales como los 16 canales desfasados (canales 480), etc.). Es posible diseñar las celdas de flujo para maximizar la recolección de fluorescencia de la superficie iluminada y obtener imágenes limitadas por difracción. Por ejemplo, en el diseño ilustrado en la figura 4C, la luz ingresa al canal a través de una capa inferior 460 de 1000 μm de espesor, la que puede ser de vidrio de borosilicato, silicio fusionado u otro material descrito en la presente, y la luz emitida viaja a través de 100 μm de profundidad de solución acuosa en el canal y 300 μm de profundidad de material de capa superior 470. Sin embargo, en algunas celdas de flujo, el espesor de la capa superior puede ser menor de 300 μm para prevenir aberraciones esféricas y para obtener imágenes de un punto limitado por difracción. Por ejemplo, el espesor de la capa superior puede ser de alrededor de 170 μm para uso con un sistema óptico limitado por difracción estándar. Opcionalmente, se puede diseñar el objetivo a medida, por ejemplo, tal como se describe en la presente, para utilizar la capa superior de mayor espesor sin sufrir las aberraciones esféricas.

35 A efectos descriptivos, las celdas de flujo se pueden crear a partir de una variedad de materiales posibles o con estos. Por ejemplo, las celdas de flujo pueden comprender vidrio fotosensible, tal como Foturan® (Mikroglas, Mainz, Alemania) o Fotoform® (Hoya, Tokio, Japón), que se puede producir y manipular según sea necesario. Otros materiales posibles pueden incluir plásticos tales como copolímeros de olefina cíclica (por ejemplo, Topas® (Ticona, Florence, KY) o Zeonor® (Zeon Chemicals, Louisville, KY)) que tienen excelentes propiedades ópticas y pueden resistir temperaturas elevadas si fuera necesario (por ejemplo, hasta 100°C). Tal como resultará evidente a partir de la Figura 4, las celdas de flujo pueden comprender una variedad de materiales diferentes en la misma celda. Por lo tanto, la capa base, las paredes de los canales y la capa superior o de cubierta pueden, opcionalmente, ser de materiales diferentes.

40 Aunque el ejemplo en la Figura 4B muestra una celda de flujo que comprende 3 capas, otras celdas de flujo pueden comprender 2 capas, por ejemplo, una capa base con canales grabados, cortados o formados en ella y una capa superior, etc. De manera adicional, otras celdas de flujo pueden tener una única capa que comprende el canal de flujo grabado, cortado o formado de otra manera en esta.

45 Las celdas de flujo pueden comprender Foturan®. Foturan es un vidrio fotosensible que se puede estructurar para varios fines. Esta combina varias propiedades de vidrio deseadas (por ejemplo, transparencia, dureza, resistencia química y térmica, etc.) y la capacidad para lograr estructuras muy finas con tolerancias elevadas y relaciones de aspecto elevadas (profundidad de orificio/ancho de orificio). Usualmente, las estructuras más pequeñas posibles con Foturan® son, por ejemplo, de 25 μm con una aspereza de 1 μm .

50 La Figura 5A es un diagrama esquemático de una posible forma para determinar el patrón de una celda de flujo (por ejemplo, una que comprende Foturan®). En primer lugar, se enmascara el patrón deseado con las máscaras 500 en la superficie del sustrato 510 que luego se expone a luz UV. En dicha etapa de exposición, el vidrio se expone a luz UV a una longitud de onda de entre 290 y 330 nm. Puede ser posible iluminar espesores de material de hasta 2 mm. Usualmente, una densidad energética de aproximadamente 20 J/cm² es suficiente para estructurar una placa de Foturan® de 1 mm de espesor. Durante la etapa de exposición UV, los átomos de plata u otros átomos contaminados se combinan en las áreas iluminadas (áreas 520). Luego, durante un tratamiento térmico entre 500°C y 600°C, el vidrio se cristaliza alrededor de los átomos de plata en el área 520. Finalmente, cuando se graban con una solución de ácido fluorhídrico al 10 % a temperatura ambiente (grabado anisotrópico), las regiones cristalinas tienen una tasa de grabado hasta 20 veces mayor que las regiones vítreas, lo que produce los canales 530. Si se agregan grabado ultrasónico o grabado por pulverización al grabado químico húmedo, las estructuras resultantes presentan una relación de aspecto elevada. La Figura 5B muestra un espectro de transmisión de una muestra de vidrio Foturan (d = 1 mm).

Los paneles A a E de la Figura 6 muestran un ejemplo de proceso de grabado para producir una celda de flujo de muestra tal como se usa en la presente. En la Figura 6A, los canales 600 (tal como se ven en una vista de extremo) y los orificios 605 (tal como se ve en una vista de extremo) se exponen o se graban en la capa 630. La capa 630 es la capa superior de una celda de flujo de dos capas tal como se puede ver en la Figura 6E (con la capa inferior 620). Es posible grabar los orificios (en los que fluidos o reactivos ingresan en los canales de la celda de flujo) y los canales en la capa 630 mediante un proceso tridimensional tal como los disponibles de Invenios (Santa Barbara, CA). La capa superior 630 puede comprender Foturan, el que, tal como se describe, se puede grabar con luz UV. Cuando se expone a luz UV, Foturan cambia de color y se vuelve ópticamente opaco (o pseudoopaco). Por lo tanto, en la Figura 6B, se enmascaró la capa 630 y se expuso a luz para producir áreas oscurecidas 610 en la capa (de forma similar al enmascaramiento en la Figura 5A, pero sin grabado adicional). Tales áreas ópticamente opacas pueden ayudar a bloquear luz con orientación errónea, dispersión de luz u otros reflejos no deseables que, de lo contrario, podrían afectar la calidad de la lectura de secuencia de la presente. A efectos descriptivos, se deposita opcionalmente una capa delgada (por ejemplo, 100-500 nm) de un metal, tal como cromo o níquel, entre las capas de la celda de flujo (por ejemplo, entre las capas superior e inferior en la Figura 6E) para ayudar a bloquear la dispersión de luz no deseada. Las Figuras 6C y 6D ilustran el acoplamiento de la capa inferior 620 con la capa de canales 630 y la Figura 6E muestra una vista de corte de estas.

A efectos descriptivos, las capas de las celdas de flujo se unen entre sí en una variedad de formas diferentes. Por ejemplo, las capas se pueden unir mediante adhesivos, enlaces (por ejemplo, térmicos, químicos, etc.) y/o métodos mecánicos. Los expertos en la técnica conocerán diversos métodos y técnicas para unir varias capas de vidrio, plástico o silicio entre sí.

Nuevamente, aunque en la presente se describen diseños y construcciones de celdas de flujo particulares, no se deben interpretar tales descripciones como taxativas. Otras celdas de flujo pueden comprender materiales y diseños diferentes a los incluidos en la presente y/o se pueden crear mediante técnicas de grabado o corte diferentes u otros métodos de creación diferentes a aquellos descritos en la presente.

Flujo de fluido

En las diversas realizaciones de la presente, los reactivos, amortiguadores, etc. que se utilizan en la secuenciación de los ácidos nucleicos se regulan y se suministran mediante un aspecto o subsistema de flujo de fluido. Las Figuras 7A-C presentan diagramas generales de ejemplos de arreglos de flujo de fluido de la invención configurados en configuraciones para empuje unidireccional, atracción en ocho direcciones y atracción unidireccional, respectivamente. En general, el subsistema de flujo de fluido transporta los reactivos adecuados (por ejemplo, enzimas, amortiguadores, tintes, nucleótidos, etc.) a la velocidad adecuada y, opcionalmente, a la temperatura adecuada desde las áreas de almacenamiento de reactivo (por ejemplo, botellas u otros recipientes para almacenamiento) a través de la celda de flujo y, opcionalmente, a un área de recepción de desechos.

El aspecto de flujo de fluido se controla opcionalmente por computadora y puede controlar opcionalmente la temperatura de los diversos componentes reactivos. Por ejemplo, opcionalmente, se mantienen determinados componentes a temperaturas bajas, tales como 4°C +/- 1°C (por ejemplo, en el caso de soluciones que contienen enzimas), mientras que otros reactivos se mantienen opcionalmente a temperaturas elevadas (por ejemplo, amortiguadores que fluirán a través de la celda de flujo cuando se produzca una reacción enzimática particular a la temperatura elevada).

En algunas realizaciones, se mezclan opcionalmente varias soluciones antes de que fluyan a través de la celda de flujo (por ejemplo, un amortiguador concentrado mezclado con un diluyente, nucleótidos adecuados, etc.). El aspecto de flujo de fluido de la invención también controla opcionalmente tal mezcla y regulación. Es beneficioso que la distancia entre los fluidos mezclados y la celda de flujo se minimice en varias realizaciones. Por consiguiente, es posible colocar la bomba posteriormente a la celda de flujo y utilizarla para atraer los reactivos al interior de la celda de flujo (Figura 7B y 7C), en lugar de hacer que la bomba empuje los reactivos al interior de la celda de flujo (tal como en la Figura 7A). Tales configuraciones de atracción significan que cualesquiera materiales atrapados en volúmenes muertos en la bomba no contaminan la celda de flujo. La bomba puede ser una bomba tipo jeringa y se puede configurar para tener una jeringa por canal de flujo para garantizar el flujo uniforme a través de cada canal de la celda de flujo. La bomba puede ser una bomba de 8 direcciones si se desea utilizar una celda de flujo de 8 direcciones, tal como, por ejemplo, una bomba de jeringa de 8 direcciones Kloehn (Kloehn, Las Vegas, NV). En la Figura 7B se muestra un diagrama de flujo de una configuración de atracción de 8 direcciones. En la Figura 7A, los reactivos fluidos se almacenan en recipientes para reactivos 700 (por ejemplo, amortiguadores a temperatura ambiente, amortiguador SSC 5X, amortiguador de enzimología, agua, amortiguador de escisión, etc.) y 710 (por ejemplo, recipientes refrigerados para enzimas, mezclas de enzimas, agua, mezcla de análisis, etc.). La bomba 730 desplaza los fluidos desde los recipientes para reactivos a través de la válvula 740, válvula de desechos/cebado 770 y hacia el interior o a través de la celda de flujo 760.

En la Figura 7B, los reactivos fluidos se almacenan en recipientes para reactivos 702 (por ejemplo, amortiguadores a temperatura ambiente similares a los anteriormente enumerados) y 703 (por ejemplo, recipientes refrigerados para enzimas, etc. similares a los anteriormente mencionados) vinculados mediante la válvula para reactivos 701. Los expertos en la técnica conocen válvulas multidireccionales (tales como las válvulas para reactivos) utilizadas para

5 permitir el acceso controlado desde o hacia múltiples líneas o recipientes. La válvula para reactivo se vincula con la celda de flujo 705 a través de una válvula de cebado opcional (o válvula de desechos) 704 conectada a una bomba de cebado opcional 706. Opcionalmente, la bomba de cebado puede extraer reactivos de los recipientes a través de la tubería para que estén prontos para su uso en la celda de flujo. Por lo tanto, se evitarán reactivos a temperatura equivocada sin circulación (por ejemplo, debido a estar estacionados dentro de la tubería), etc. Cuando la bomba de cebado realiza la extracción, se deriva el flujo saliente al área de desecho. Durante acciones no de cebado, es posible atraer los reactivos a través de la celda de flujo con una bomba de 8 canales 707 que se conecta a un depósito de desechos 708.

10 En cualquier realización (empuje o atracción), las configuraciones para fluidos pueden comprender tubos de absorción o similares que se extienden hacia el interior de varios recipientes para reactivos con el fin de extraer los reactivos de los recipientes. La Figura 7C muestra una bomba con un único canal, en lugar de una bomba de 8 canales. La bomba con un único canal 726 también puede actuar como la bomba de cebado opcional y, por lo tanto, la bomba de cebado o válvula de desechos 723 se puede conectar directamente a la bomba 726 a través de una derivación 725. El arreglo de los componentes es similar en esta realización al de la Figura 7B. Por lo tanto, comprende recipientes para reactivos 721 y 722, una válvula de selección multidireccional 720, una celda de flujo 724, etc.

15 Cualquiera de una variedad de tipos de bombas (por ejemplo, de desplazamiento positivo/negativo, de vacío, peristálticas, etc.), tales como una bomba Encynova® 2-1 (Encynova, Greeley, CO) o una bomba de jeringa Kloehn® V3 (Kloehn, Las Vegas, NV), puede guiar opcionalmente el flujo de fluido en sí mismo. Nuevamente, se observará que no se debe interpretar la mención específica de bombas particulares, etc. en la presente como necesariamente limitante y varias realizaciones pueden comprender bombas y/o tipos de bombas diferentes a los mencionados en la presente. En determinadas realizaciones, la tasa de suministro de fluido es de alrededor de 50 μL a alrededor de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ (por ejemplo, +/- 2 μL controlada) para los 8 canales. En la configuración de atracción en 8 direcciones, el flujo puede ser de 10-100 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{canal}$ conforme al proceso. En algunas realizaciones, el volumen máximo de reactivos de nucleótidos requerido para la secuenciación de un polinucleótido de 25 bases es de alrededor de 12 mL.

20 Independientemente del tipo de bomba que se utilice en la presente, los reactivos se transportan opcionalmente desde sus áreas de almacenamiento a la celda de flujo a través de tubería. Tal tubería, tal como PTFE, se puede seleccionar para, por ejemplo, minimizar la interacción con los reactivos. El diámetro de la tubería puede variar entre realizaciones (y/u opcionalmente entre áreas de almacenamiento de reactivos diferentes), pero se puede seleccionar, por ejemplo, con base en el deseo de reducir el volumen muerto o la cantidad de fluido remanente en las líneas. Asimismo, el tamaño de la tubería puede variar opcionalmente entre áreas de una vía de flujo. Por ejemplo, el tamaño de la tubería de un área de almacenamiento de reactivos puede tener un diámetro diferente al del tubo de la bomba a la celda de flujo, etc.

30 El subsistema de flujo de fluido de la invención también puede controlar la velocidad de flujo de los reactivos implicados. Opcionalmente, la velocidad de flujo se puede ajustar para cada vía de flujo (por ejemplo, algunas vías de flujo pueden proceder a velocidades de flujo mayores que otras, se pueden invertir las velocidades de flujo, canales diferentes pueden recibir flujos de reactivos diferentes o tener flujos de reactivos en momentos diferentes, etc.). La velocidad de flujo se puede fijar junto con el diámetro de tubo para cada vía de flujo con el fin de tener el volumen adecuado de reactivo, etc., en la celda de flujo en un momento dado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la tubería a través de la que fluyen los reactivos tiene un ID de 0,3 mm, 0,5 mm o 1,0 mm, al tiempo que la velocidad de flujo es de 480 $\mu\text{L}/\text{min}$ o 120 $\mu\text{L}/\text{min}$. En algunas realizaciones, la velocidad de flujo se equilibra opcionalmente para optimizar las reacciones de interés. Un flujo elevado puede despejar de forma eficiente las líneas y minimizar el tiempo dedicado al cambio de reactivos en un volumen de celda de flujo dado, pero también puede provocar un nivel mayor de flujo de corte en la superficie de sustrato y puede generar un mayor problema con pérdidas o burbujas. En algunas realizaciones, una velocidad de flujo usual para la introducción de reactivos puede ser de 15 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{canal}$.

40 Además, se puede equipar el sistema con sensores de presión que detectan e informan automáticamente rasgos del rendimiento de fluidos del sistema, tal como pérdidas, obstrucciones y volúmenes de flujo. Tales sensores de presión o flujo pueden ser útiles para el mantenimiento de instrumentos y la resolución de problemas. Uno o más componentes informáticos, por ejemplo, tal como se describe más adelante, pueden controlar el sistema de fluidos. Se observará que las configuraciones de flujo de fluido en las diversas realizaciones de la invención pueden variar, por ejemplo, en lo que respecta a la cantidad de recipientes para reactivos, composición, diámetro o extensión de la tubería, tipos de bombas y válvulas de selección, etc.

55 Calefacción/refrigeración

60 En algunas realizaciones, los sistemas de la presente comprenden un componente de control de calefacción/refrigeración con capacidad de calefacción/refrigeración, por ejemplo, mediante dispositivos de Peltier, etc. Opcionalmente, es posible calentar los diversos componentes de la presente (por ejemplo, la celda de flujo y sus contenidos) mediante un elemento de calefacción resistivo y enfriarlos mediante convección para crear condiciones de reacción por encima de la temperatura ambiente. Dichos componentes de calefacción/refrigeración pueden

controlar la temperatura de las celdas de flujo (y los fluidos en su interior) durante las diversas reacciones necesarias en la secuenciación mediante síntesis. Se muestra en la Figura 8 un ejemplo de sistema de control de temperatura de celda de flujo (aislado de los demás componentes del sistema). En la Figura 8, se ilustra un ventilador de Peltier 800 respecto a un disipador térmico 810 y un componente de calefacción Peltier 820. Opcionalmente, el componente de calefacción/refrigeración se puede ubicar y/o mover respecto a los demás componentes del sistema (por ejemplo, la celda de flujo y el soporte de la celda de flujo, etc.). Por lo tanto, es posible colocar el componente de calefacción/refrigeración en el lugar necesario (por ejemplo, para elevar la temperatura de los reactivos en la celda de flujo para permitir la actividad enzimática, etc.) y alejarlo cuando no es necesario. De manera adicional y/o alternativa, se puede mover la celda de flujo o soporte de celda de flujo opcionalmente respecto al componente de calefacción/refrigeración. Veá las Figuras 10A y 10B más adelante. En varias realizaciones, los elementos de control de temperatura controlan la temperatura de la celda de flujo, por ejemplo, de alrededor de 20°C a alrededor de 60°C o cualquier otra temperatura o rango de temperatura según sea necesario para que las reacciones se produzcan en los sistemas o dispositivos. Se puede ajustar la temperatura del elemento de calefacción para controlar la temperatura de la celda de flujo y los reactivos en esta. Cuando la celda de flujo se expone a un flujo de reactivos refrigerados, la temperatura del elemento de calefacción puede ser mayor que la temperatura deseada en la superficie de la celda de flujo. Por ejemplo, se puede configurar el elemento de calefacción a 55°C para obtener una temperatura de celda de flujo de 45°C.

Los expertos en la técnica conocen los dispositivos de Peltier utilizados para controlar la temperatura (los que se pueden usar opcionalmente en los sistemas de la presente). Nuevamente, se observará que se mencionan determinados dispositivos de calefacción/refrigeración en la presente, los que no se deben interpretar como necesariamente limitantes. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la presente invención opcionalmente comprende dispositivos de calefacción/refrigeración diferentes a dispositivos de Peltier. En realizaciones usuales, independientemente del tipo de dispositivo, el componente informático (vea más adelante) controla opcionalmente el dispositivo de calefacción/refrigeración (por ejemplo, en términos de temperatura, tiempo a temperaturas particulares, movimiento del componente y/o movimiento de otros dispositivos, tales como el soporte de celda de flujo para el componente de calefacción/refrigeración).

En algunas realizaciones, elementos de calefacción/refrigeración adicionales pueden regular opcionalmente la temperatura de otros componentes además de la celda de flujo o como alternativa a esta. Por ejemplo, los componentes de calefacción/refrigeración puede regular opcionalmente la temperatura de la cámara, los depósitos de reactivos, los que se pueden enfriar, por ejemplo, a 4°C, para extender la vida útil de los reactivos durante operaciones de secuenciación largas, la temperatura de la atmósfera dentro del instrumento, etc.

Múltiples celdas de flujo y enfoques de calefacción/refrigeración y TIRF alternativos

En determinadas realizaciones de la presente, los sistemas o dispositivos pueden comprender enfoques adicionales de configuración de celda de flujo, iluminación mediante TIRF, configuraciones de calefacción/refrigeración de las celdas de flujo y de cómo se mantienen o se estabilizan las celdas de flujo en el dispositivo. Aunque es posible emplear opcionalmente estos enfoques en conjunto en determinadas realizaciones, se observará que es posible emplear cada uno en cualquier combinación, por ejemplo, entre sí, con cualesquiera otros enfoques descritos en la presente, etc.

A efectos descriptivos, las celdas de flujo de la presente pueden ser celdas de flujo con flujo inferior. Por lo tanto, en oposición a las celdas de flujo, por ejemplo, tal como se muestra en las Figuras 4, 6 y 9 en las que las celdas de flujo se fijan y el flujo de fluido ingresa desde la parte superior de la celda de flujo, algunas celdas de flujo pueden comprender configuraciones que permiten el ingreso de flujo de fluido desde el fondo de la celda de flujo. Dichas celdas de flujo inferiores pueden tener construcción y composiciones similares a las celdas de flujo con flujo superior. Las celdas de flujo con flujo inferior pueden comprender menos volumen muerto de fluido (y utilizar más de la extensión del canal completo que las celdas de flujo con flujo superior, por ejemplo, dado que los extremos de las celdas de flujo no se cubren con abrazaderas/colectores, etc.). Veá, por ejemplo, las Figuras 44- 49.

Opcionalmente, se pueden mantener las celdas de flujo con flujo inferior en el soporte de celda de flujo mediante vacío en lugar de abrazaderas. Por lo tanto, un vacío puede mantener la celda de flujo en la posición correcta en el dispositivo para iluminación y obtención de imágenes correctas. Cf, Figuras 44-49 y Figura 9. Por lo tanto, a efectos descriptivos, uno o más dispositivos de creación de vacío para crear un vacío (o vacío parcial, etc.) para mantener la celda de flujo y/o prisma en el soporte de celda de flujo, plataforma XY, etc.

Se muestran varios ejemplos de colectores de soporte de celda de flujo en la Figura 46 que se pueden utilizar con celdas de flujo con flujo inferior. Tal como se puede ver, se dirigen los fluidos que fluyen hacia el interior, a través o hacia el exterior de la celda de flujo a través de varios tubos ramificados en los colectores desde o hacia canales específicos en la celda de flujo. Nuevamente, tales realizaciones pueden opcionalmente no obstruir nada (o sustancialmente nada) de la superficie superior de la celda de flujo que puede interferir con la iluminación o la obtención de imágenes de la extensión total de los canales. La Figura 47 ilustra un ejemplo de válvula de fluido. Tal válvula no tiene partes móviles o vibraciones y tiene un volumen muerto bajo. En tales arreglos, cada botella o recipiente para reactivos puede tener una válvula de apertura/cierre. Luego de extraer un fluido, se puede inyectar aire antes de cerrar la válvula del depósito, de forma de forzar una válvula de espacio para aire entre los reactivos.

En caso de un cierre del sistema, se pueden devolver reactivos refrigerados a sus depósitos y todos los reactivos. Además, se puede agregar una bomba de inyección a la bomba de empuje/atracción (por ejemplo, una bomba Kloehn).

5 Otro enfoque de iluminación puede comprender iluminación descendente. Tal enfoque descendente puede ser útil cuando se utiliza en conjunto con prensado con vacío (y control de temperatura inferior). Opcionalmente, la iluminación desde la parte inferior (por ejemplo, tal como en la Figura 1, etc.) puede ser problemática en configuraciones con prensado con vacío y control de temperatura inferior debido a que tales realizaciones a menudo emplean el espacio debajo de la celda de flujo. Tal como se puede ver en la Figura 44, la iluminación descendente o lateral ilumina desde arriba el prisma 4401 sobre el que se encuentra la celda de flujo 4402 (y, opcionalmente, se fija en el lugar mediante vacío). Además, tal arreglo puede ayudar a evitar que la celda de flujo se arquee, cuya presentación puede favorecer el autofocus y la obtención de imágenes de campo plano y puede ayudar en la configuración con múltiples celdas de flujo con lecturas simultáneas, etc. También se muestra la incidencia de la iluminación con láser 4400 en el prisma en la Figura 44, al igual que el espejo 4405 y el colector o conector de fluidos 4404.

15 La Figura 45 muestra otro enfoque de control termodinámico de una celda de flujo (y los reactivos y las reacciones en esta). La Figura 45 muestra un ejemplo de realización de un dispositivo con temperatura controlada inferior. En algunas de dichas realizaciones, el aspecto puede comprender una mesada refrigerada con agua que puede ayudar a garantizar la estabilidad dimensional durante ciclos de lectura y temperatura de amortiguador de análisis controlada. Una placa térmica se puede extender más allá del prisma y la celda de flujo y debajo de los colectores para, opcionalmente, el control de temperatura uniforme. Opcionalmente, es posible precalentar los fluidos cuando pasan a través del colector de entrada. Además, una respuesta de temperatura de RTD se puede insertar en la parte superior del prisma para garantizar que la celda de flujo se encuentre a la temperatura configurada deseada y que se minimicen los efectos de resistencia térmica del prisma.

20 Se muestran configuraciones con múltiples celdas de flujo en un soporte de celda de flujo en la Figura 48. Tal como se puede ver, es posible cargar hasta cuatro celdas de flujo en el soporte en la Figura 48A (o dos celdas de flujo de doble ancho, por ejemplo, cada una con 18-20 canales). Los dispositivos de Peltier u otros dispositivos similares se pueden encontrar debajo de las celdas de flujo y, opcionalmente, se pueden refrigerar con agua mediante el aspecto de mesada de soporte (la que, opcionalmente, se puede mantener a temperatura ambiente).

Soporte de celda de flujo y plataforma

30 Se controlan y se garantizan la ubicación y el movimiento de la celda de flujo (y, por lo tanto, los ácidos nucleicos a secuenciar), por ejemplo, mediante una plataforma móvil en la que se ubican la celda de flujo y el soporte de celda de flujo (u otro sustrato). Tal plataforma móvil puede, opcionalmente, permitir el movimiento de la celda de flujo respecto a la iluminación láser y el lente objetivo para la lectura de reacciones de secuenciación en los canales. Si se deseara, es posible refrigerar activamente la plataforma de análisis u otros componentes durante el ciclo de análisis para controlar la temperatura del sustrato durante los ciclos de obtención de imágenes.

35 Los paneles A a D de la Figura 9 muestran diagramas esquemáticos de un ejemplo de soporte de celda de flujo del sistema actual. La Figura 9A muestra el soporte de celda de flujo 900 antes de que se coloque una celda de flujo sobre este. Tal como se puede observar, el soporte comprende abrazaderas ajustables 910 (opcionalmente accionadas por resortes) para fijar de forma segura la celda de flujo al soporte y, opcionalmente, uno o más colectores (por ejemplo, opcionalmente en las abrazaderas) para conectar de forma fluida los canales de la celda de flujo al resto del sistema de fluidos. Un colector se puede conectar individualmente a cada uno de los canales en paralelo. De manera alternativa, un colector puede conectar los canales de forma que se conecten mediante una única línea de entrada que se divide para fluir en paralelo a cada canal o se puede configurar como una configuración de serpentina para producir un único flujo de fluido. Tal colector se puede configurar para contener una única división 1-8 o puede comprender un divisor binario, en donde cada canal de fluido se divide solamente en 2 para obtener una división de 1-2-4-8 con el fin de obtener un flujo más uniforme a lo largo de los 8 canales. En la configuración de atracción en 8 direcciones, el colector de salida desde la celda de flujo puede comprender 8 puertos individuales, cada uno conectado a un barril de una bomba de jeringa de 8 direcciones, al tiempo que el colector de entrada puede contener un único tubo de entrada para reducir la extensión de tubo necesaria para llenar la celda de flujo. El colector de entrada puede contener un divisor 1-8 o un divisor 1-2-4-8 binario para dividir el flujo de forma equitativa en cada uno de los 8 canales. La Figura 9B también muestra la presencia de un prisma ajustable 920 que se puede elevar o hacer descender opcionalmente para ponerlo en contacto con el lado inferior de la celda de flujo. El prisma se usa en conjunto con los láseres en la actividad de TIRF. En realizaciones particulares, se coloca aceite (por ejemplo, aceite de inmersión tal como el disponible de Cargille, n.º de catálogo 19 750 o similar) entre el prisma y la celda de flujo en una capa uniforme y continua para generar reflexión interna total en la capa de aire entre el prisma y el vidrio de la celda de flujo. La Figura 9C muestra la ubicación de la celda de flujo 930 en el soporte y el prisma, y la Figura 9D muestra la celda de flujo fijada al soporte de celda de flujo con la introducción de una agarradera/abrazadera 940 para fijar las abrazaderas y la celda de flujo.

60 La celda de flujo y el soporte de celda de flujo se pueden ubicar sobre una plataforma o plataforma móvil. Opcionalmente, tal plataforma se puede ajustar opcionalmente a lo largo de los ejes X, Y y Z. Esto hace posible

ajustar la ubicación y altura con precisión de la celda de flujo respecto a los láseres, cámara, lentes ópticos, etc. y permite mantener la superficie de la celda de flujo en foco respecto al dispositivo para obtener imágenes. Asimismo, la plataforma móvil puede permitir opcionalmente el desplazamiento de la celda de flujo en ambas direcciones entre el componente de calefacción/refrigeración y los componentes láser/ópticos (es decir, para permitir las reacciones enzimáticas cuando se calienta y para cuantificar el resultado de tales reacciones con los componentes láser/cámara). La Figura 10 muestra fotografías que ilustran el movimiento de la celda de flujo 1020 y el soporte de celda de flujo 1010 entre el elemento de calefacción/refrigeración (imagen a la izquierda) y los elementos láser/cámaras (imagen a la derecha). Por lo tanto, los componentes x e y pueden permitir el movimiento lateral (por ejemplo, decenas de centímetros) de la celda de flujo, al tiempo que se puede ajustar la altura (por ejemplo, decenas de centímetros) verticalmente para permitir el enfoque de las imágenes. De manera alternativa, la plataforma también puede ser simplemente una plataforma XY sin configuración vertical y el lente objetivo se puede ajustar en el plano Z para garantizar que se mantenga el enfoque. Se observará que los elementos de calefacción/refrigeración también son opcionalmente móviles, por ejemplo, para acercarse más a la celda de flujo, etc. Cf., la imagen a la izquierda de la Figura 10 (dispositivo de calefacción/refrigeración elevado) y la imagen a la derecha de la Figura 10 (dispositivo de calefacción/refrigeración que se acerca a la celda de flujo).

La Figura 10A muestra una fotografía del instrumento antes de la etapa de calentamiento y durante esta. El dispositivo de Peltier 1000 (el que comprende un ventilador 1001, un disipador térmico 1002 y una unidad de calefacción 1003) se desplaza en dirección vertical para ponerse en contacto con la celda de flujo 1020 y el soporte de celda de flujo 1010 colocado en la plataforma XY 1050. Se introducen reactivos en la celda de flujo a través del tubo 1040. La celda de flujo se puede desplazar a una posición ubicada bajo la cámara 1030 para obtener imágenes. En la Figura 10B se ilustra una representación esquemática del dispositivo en la ubicación para obtener imágenes, en la que el dispositivo de Peltier 1070 se encuentra en posición elevada (con el ventilador 1071, disipador térmico 1072 y el dispositivo de calefacción 1073), la celda de flujo 1085 y la plataforma 1086 se ubican junto al soporte de fibra óptica 1090 y debajo del lente objetivo 1080. El soporte de fibra óptica se conecta a la plataforma Z 1075, la que también controla la altura del lente objetivo 1080. Se fija la celda de flujo en el soporte de celda de flujo mediante el colector/agarradera 1095.

De manera adicional, se observará que los diversos componentes de la presente, por ejemplo, componentes láser, componentes de calefacción/refrigeración, etc., se disponen usualmente en una estructura, chasis o marco y, opcionalmente, se encierran dentro de una cubierta que cubre total o parcialmente el instrumento. La configuración particular de tal marco y/o cubierta puede variar opcionalmente en realizaciones diferentes con base, por ejemplo, en los componentes particulares, su tamaño, etc. En realizaciones usuales, sin embargo, el marco mantiene seguros los diversos componentes y en la ubicación y la orientación adecuadas, al tiempo que opcionalmente favorecen el desplazamiento de los componentes cuando es necesario. El marco debería ser lo suficientemente rígido para evitar vibraciones en el instrumento y los diversos componentes. Por ejemplo, el movimiento puede impedir el codificador de modo y se puede aislar por vibración de la plataforma para evitar la agitación de la celda de flujo durante la obtención de imágenes. La Figura 11A muestra un esquema que ilustra un ejemplo de estructura que da soporte a la cámara (1100), componentes de calefacción/refrigeración 1110 (cf., Figura 8), la celda de flujo y el soporte de celda de flujo, y la plataforma móvil 1120. Aspectos adicionales de marco y soporte que ayudan a unir los varios componentes y aspectos del dispositivo o sistema incluyen varios puntos o ubicaciones de fijación y alineación que se pueden ver en la Figura 11B, la que muestra el cojinete de deslizamiento para ajuste vertical de la pieza láser 1165 y el componente de ajuste de nivelación de la celda de flujo 1175. Se pueden ver otros marcos y cubierta, lo que incluye cubiertas externas (carcasas) para la cubierta, en la Figura 12 junto con un monitor para computadora 1201.

Excitación y observación

Se realiza un seguimiento de la incorporación de bases de ácidos nucleicos específicas con sus fluorescencias específicas mediante excitación con láser y observación con cámara. La iluminación se lleva a cabo con reflexión interna total (TIR) que comprende un componente láser. Se entenderá que «láser TIRF», «sistema de láser TIRF», «láser TIR» y otra terminología similar en la presente hace referencia a un sistema o instrumento de detección con base en TIRF (fluorescencia de reflexión interna total), por ejemplo, láseres u otros tipos de excitación no láser de fuentes tales como lámparas LED, de halógeno y xenón (las cuales se incluyen todas en la presente descripción de TIRF, láser TIRE, sistema de láser TIRF, etc.). Por lo tanto, un láser TIRF es un láser que se utiliza con un sistema de TIRF, mientras que un sistema de láser TIRF es un sistema de TIRF que utiliza un láser, etc. Sin embargo, se debería entender que los sistemas TIRF de la presente (incluso cuando se describen en términos de uso de láser, etc.) incluyen aquellos instrumentos o sistemas de TIRF que comprenden fuentes de excitación no láser. Los expertos en la técnica conocerán aspectos diferentes de sistemas de TIRF y su uso general. En varias realizaciones, el componente de cámara comprende una cámara de CCD. En algunas realizaciones, el láser comprende láseres semiconductores y/o de estado sólido de 50 mW a 500 mW individualmente modulados duales acoplados a un prisma de TIRF, opcionalmente con longitudes de onda de excitación de 532 nm y 660 nm. El láser se puede acoplar en el instrumento mediante una fibra óptica para ayudar a garantizar que las huellas de los dos láseres se enfoquen en la misma área del sustrato (es decir, se superpongan).

Codificación de modo

Usualmente, se desea que el área en donde los láseres u otras fuentes de excitación iluminan la muestra (se hace referencia al área de iluminación como la huella) sea espacialmente plana y uniforme. Los sistemas o dispositivos de la presente se benefician de las propiedades de fibras multimodales que permiten la propagación de todos los modos ópticos a través de sus núcleos con prácticamente la misma amplitud para producir una huella de iluminación de perfil plano desde el láser en la superficie de sustrato iluminada (por ejemplo, la superficie de una celda de flujo), etc. Sin embargo, la cantidad finita de modos presentes en dichas fibras puede interferir de forma constructiva y destructiva entre estos y producir mínimos y máximos locales en el perfil de intensidad del láser (u otra luz). Vea, por ejemplo, las Figuras 33A y 34A que muestran mínimos y máximos producidos por la emisión no corregida de fibras multimodales. Con el fin de mejorar dicho problema, se produce una huella sustancialmente uniforme con codificación de modo dinámica mediante el cambio constante del índice de refracción en el haz de iluminación, por ejemplo, mediante la modulación del haz con una lámina de onda o mediante agitación, constricción o compresión de una o más áreas de una fibra que porta el haz de iluminación. Por lo tanto, se producen una emisión plana sustancialmente uniforme (es decir, una huella de excitación/iluminación sustancialmente uniforme desde una fuente de luz o láser) mediante la codificación dinámica de los modos en un haz de iluminación, por ejemplo, mediante la contracción/compresión de una fibra que porta el haz en una o más áreas en su extensión. Las Figuras 33 y 34 resumen varias realizaciones de codificación de modo, tal como se describe en la presente. Remitirse al texto a continuación.

Codificación de modo dinámica y configuración de haces con poca pérdida

En determinadas realizaciones, los dispositivos de la presente comprenden componentes para producir una iluminación plana, por ejemplo, una iluminación uniforme o sustancialmente uniforme en una huella de iluminación particular, tal como se ve en la Figura 35. Tales realizaciones comprenden uno o más aspectos que modifican de forma dinámica el índice de refracción en el medio que transmite la iluminación (por ejemplo, una fibra) en uno o más nodos. Por ejemplo, una fibra se puede comprimir en varias ubicaciones a lo largo de su extensión para inducir índice de refracción que cambia de forma continua. Tal compresión de la fibra, por ejemplo, una fibra con salto de índice, se puede utilizar para codificar espacial o temporalmente los modos en la fibra para provocar suficiente superposición durante un período de integración deseado de la iluminación emitida. Tal como se explica en la presente (vea más adelante) también se puede agitar, rotar, hacer vibrar o deformar físicamente de otra forma la fibra para cambiar la vía óptica a través de la fibra.

En general, la codificación dinámica de los modos en las fibras hace posible lograr una iluminación espacialmente uniforme en un período de integración mínimo definido por el usuario. Esto evita la interferencia de modos de propagación de luz monocromática en fibras multimodales, lo que produciría patrones de luz y oscuridad en el haz resultante. Opcionalmente, es suficiente que estos modos desaparezcan durante el período de integración mínimo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las longitudes de vías relativas de dichos modos en el haz de iluminación varían rápidamente con la introducción de variaciones de índice y curvatura variable en función de tiempo en la fibra, por ejemplo, mediante medios mecánicos.

Se observará que, opcionalmente, se pueden variar múltiples parámetros de la codificación de modo dinámica o pueden comprender una gama de configuraciones diferentes. Sin embargo, en general, la codificación de modo dinámica comprende uno o más aspectos o componentes utilizados para cambiar de forma dinámica el índice de refracción de un haz de iluminación con el fin de compensar una huella de iluminación final. Aunque muchos conceptos ópticos de refracción existentes requieren un haz gaussiano de entrada y, a menudo, los conceptos ópticos de difracción existentes dependen de la longitud de onda, la presente realización no requiere una entrada de haz gaussiano y es independiente de la longitud de onda.

Se desea un campo iluminado de manera uniforme para la excitación (medida de las reacciones de secuenciación, etc. Por lo tanto, los patrones de luz y oscuridad asimétricos producidos por la interferencia de modos de propagación de luz monocromática en una fibra multimodal suelen no ser deseables. La compensación de la emisión de luz sobre una huella de iluminación (durante un período de tiempo de observación, tal como el tiempo captado por una cámara durante una obtención de imágenes) para permitir la integración de la luz implica que los patrones de luz y oscuridad «desaparecen» o se compensan y, por lo tanto, la intensidad de excitación observada por cada fluoróforo en la superficie debería ser uniforme.

La codificación de modo dinámica subyacente es la variación constante del índice de refracción en un punto o nodo del haz de luz en función de tiempo (por ejemplo, mediante la compresión física de una fibra durante un período de tiempo), lo que provoca la codificación de la luz y que tome vías diferentes, por lo que compensa la emisión de luz en la huella de iluminación. Por lo tanto, la posición de los mínimos y máximos de interferencia cambia al cambiar el índice de refracción del haz de entrada. Si el índice de refracción cambiara a una frecuencia más rápida que el tiempo de adquisición de imágenes, entonces se podría producir una imagen espacialmente uniforme en la escala de tiempo de la observación.

Se entenderá que no se debe confundir esto con el uso común de «codificación de modo» que más usualmente hace referencia a la aleatorización de un modo o modos de entrada respecto a la emisión. La función deseada de la

presente realización es la de aleatorizar temporal y espacialmente modos, es decir, producir la codificación dinámica.

También se puede emplear la codificación de modo dinámica en conjunto con fibras que comprenden núcleos de formas particulares para lograr una forma de haz con iluminación uniforme. Por ejemplo, la compresión de una fibra con un núcleo cuadrado producirá un haz cuadrado con iluminación uniforme. Se puede dar forma al haz a lo largo del eje particular para producir una forma rectangular u oval, y la imagen de dicho haz es cuadrada o circular cuando incide en la superficie para obtener imágenes. Vea las Figuras 17-18. Por ejemplo, los haces rectangulares se pueden generar a partir de fibras ópticas, tal como se ilustra en la Figura 34.

La Figura 35 muestra la emisión óptica de una variedad de láseres, fibras y aspectos de codificación de modo diferentes, etc. Durante la operación del dispositivo, se obtuvieron nuevas imágenes de los extremos de las fibras en un perfilador de haces. La Figura 35 muestra el efecto de la codificación de modos dinámica (es decir, mediante la manipulación de las fibras en uno o más nodos, por ejemplo, con accionadores piezoeléctricos) mediante la comparación de las imágenes de láseres a longitudes de onda diferentes (por ejemplo, 532 nm y 550 nm) y tiempos de láser (estado sólido y diodo) en conjunto con dispositivos de forma de haz diferentes (dos versiones de rectángulos y un círculo) al ilustrar la emisión cuando se activa la codificación de modo dinámica contra la emisión de luz cuando la codificación de modo no se encuentra activada para cada tipo de láser, etc.

En el sistema tal como se reivindica, el índice de refracción se modifica de forma dinámica para obtener una huella de iluminación sustancialmente uniforme. La variación dinámica del índice de refracción provoca la superposición de los modos en el período de tiempo de integración deseado. El índice de refracción se modifica constantemente en una o más ubicaciones (nodo). Por ejemplo, se comprime constantemente una fibra que transmite la iluminación en un punto con un grado variable de intensidad (por ejemplo, de sin compresión a compresión máxima y otra vez). Tal compresión puede deformar temporalmente la fibra, de manera que su forma cambie de un círculo a una elipsis a un círculo, etc., lo que, a su vez, cambia el índice de refracción. En cuanto se detiene la compresión, se detiene la codificación de modo.

La eficiencia de la compensación de la emisión de iluminación en una huella depende de la extensión de la captura de imagen, el grado de cambio del índice de refracción, el tipo/potencia de la fuente de luz, etc. Por lo tanto, es una variable que puede controlar el usuario y no se debería tomar necesariamente como limitante. Opcionalmente, el usuario puede controlar el grado de codificación para ajustar con precisión la compensación de la emisión de luz en una huella.

Por lo tanto, el período de tiempo durante el cual se mide la compensación de la emisión de luz es variable, por ejemplo, puede ser el período durante el que se capta una imagen del área iluminada por la emisión de luz (por ejemplo, mosaicos (áreas de captura de imagen específicas) en las celdas de flujo en determinadas realizaciones de secuenciación de la presente). En determinadas realizaciones, el período de tiempo de eficiencia de codificación es equivalente o sustancialmente equivalente al período de exposición para cada imagen captada por una cámara (por ejemplo, la cámara de CCD en realizaciones de secuenciación particulares de la presente). Se observará que tales tiempos de exposición pueden variar entre realizaciones, por ejemplo, de menos de 1 milisegundo a más de 1 hora o más conforme a los requisitos particulares de la modalidad (por ejemplo, al menos 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o más microsegundos; al menos 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o más milisegundos; al menos 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o más segundos, etc.). En el caso de las reacciones de secuenciación descritas en la presente, el tiempo de obtención de imágenes puede ser de 50-500 milisegundos por exposición.

En varias realizaciones, se puede utilizar el dispositivo de codificación de modo dinámica actual puede, independientemente del sistema general con el que se use, con tipos/fuentes de luz diferentes, medios de haz diferentes, formas diferentes para cambiar el índice de refracción, cantidades diferentes de nodos en los que se cambia el índice de refracción, etc.

La iluminación/luz particular utilizada no limita la codificación de modo dinámica. Por lo tanto, por ejemplo, aunque varias realizaciones de la presente emplean opcionalmente láseres de longitud de onda particular (por ejemplo, 532 y/o 660 nm), otras realizaciones pueden emplear iluminación de longitud de onda completamente diferente. Los láseres utilizados con codificación de modo dinámica pueden ser, por ejemplo, láseres IR, láseres de alineación estrecha, láseres de ancho de línea amplios, etc. Nuevamente, aunque se mencionan longitudes de onda de láseres particulares en la presente, no se debe interpretar tal mención como necesariamente limitante. Por supuesto, se observará para cada potencia/tipo de láser diferente utilizado que otros parámetros se ajustan opcionalmente para lograr una iluminación sustancialmente uniforme. Por ejemplo, se cambia la cantidad de nodos en los que se cambia el índice de refracción y/o la tasa de cambio del índice en dichos nodos es opcionalmente diferente para fuentes de luz diferentes para lograr el mismo grado de uniformidad de la huella.

Además, aunque se hace referencia a los ejemplos de la presente en términos de codificación de modo en líneas de fibra óptica, también se emplea codificación de modo dinámico con luz transmitida a través de vidrio, plástico, líneas no de fibra óptica, aire, vacío, etc. Por lo tanto, el medio en el que se transmite la luz no limita la codificación de modo dinámica. En este caso, las diferencias en el medio de transmisión también pueden opcionalmente coincidir con una diferencia en otros aspectos del dispositivo de mezcla de modo necesarios para lograr una emisión sustancialmente uniforme. Por ejemplo, en el caso de luz transmitida a través de aire/vacío (es decir, no contenida

en una fibra, etc.), opcionalmente se cambia o se varía el índice de refracción mediante cambios en la temperatura, en lugar de cualquier cambio mecánico en el medio de transporte.

Opcionalmente, es posible variar el índice de refracción mediante diversas formas. Por ejemplo, tal como se mencionó anteriormente, cuando la luz no se transmite a través de un cable o fibra, sino que atraviesa aire o vacío, el índice de refracción del haz de luz puede variar debido a cambios de temperatura. Por lo tanto, es posible utilizar uno o más dispositivos de calefacción/refrigeración para modificar la temperatura de uno o más nodos del haz de luz para cambiar el índice de refracción. En el caso de haces que se desplazan a través de una fibra o cable, es posible cambiar las propiedades físicas de la fibra para variar el índice de refracción. Por ejemplo, se puede doblar, agitar, retorcer, oprimir, comprimir, tirar o calentar/enfriar en uno o más nodos para cambiar el índice de refracción en dichos puntos. La interacción física con la fibra se puede producir mediante manipulación mecánica (por ejemplo, mediante rodillos, tenazas, etc. y/o mediante accionadores piezoeléctricos que comprimen la fibra (por ejemplo, similares a los disponibles de General Photonics (Chino, CA)), etc.). En general, se puede emplear cualquier medio para variar el índice de refracción.

Además de las formas diferentes para cambiar el índice de refracción, también son opcionalmente variables la tasa de cambio del índice, la cantidad de nodos, etc. Por lo tanto, en realizaciones diferentes, la codificación de modo dinámica puede comprender uno o más nodos (es decir, el área en la que se varía el índice) en un haz de iluminación, y dichos nodos pueden ser fijos o móviles a lo largo del haz de luz. En un sentido general, pero no taxativo, cuanto mayor es la cantidad de nodos, más codificación se produce. De manera similar, en el caso de múltiples nodos, se suele preferir que los cambios en la refracción no se sincronicen entre sí (es decir, se prefiere que la variación del índice de refracción sea aleatoria).

Las Figuras 33-35 muestran ejemplos de codificación de modo con varias formas de fibra y varias fuentes de luz. Tal como se puede ver en las imágenes, se logra una iluminación plana sustancialmente uniforme cuando la codificación de modo dinámica se lleva a cabo con una fibra con vibración o comprimida. Las figuras también ilustran que es posible dar forma a las imágenes mediante el uso de fibras con núcleo con forma determinada. La Figura 33 muestra una emisión de haz no codificado (A) en comparación con emisiones de haces en donde se agitó la fibra, por ejemplo, mediante el uso de MKHI MS de Point Source (Hamble, RU) (B), se sometió a vibración, por ejemplo, con MKIV MS de Point Source (C), o se sometió a compresión, por ejemplo, mediante el uso de uno o más compresores piezoeléctricos (por ejemplo, se comprimieron más de 6 nodos a alrededor de 500-600 Htz por nodo) (D). Todos los resultados que se muestran en la Figura 33 se obtuvieron con los mismos tipos de láser y fibra (por ejemplo, fibra con salto de índice de 15 micrones y un láser de estado sólido de 532 nm). Se ilustran resultados similares en la Figura 34 A-D para una fibra de núcleo rectangular: sin codificación (A), con agitación (B), con vibración (C) o con compresión (D). En la Figura 34, todos los ejemplos se llevaron a cabo con los mismos tipos de láser/fibra. La Figura 35 muestra resultados similares en una variedad de fuentes de láser y procedimientos de codificación diferentes. Por lo tanto, los paneles en la Figura 35 corresponden a: láser de diodo a una longitud de onda de 660 um en una fibra de núcleo rectangular sin codificación de modo (A) y la misma fibra con codificación de modo dinámica (B); un láser de estado sólido a una longitud de onda de 532 um sin codificación de modo (C) y la misma fibra con codificación de modo dinámica (D); un láser de diodo a una longitud de onda de 660 um (un segundo rectangular) sin codificación de modo (E) y la misma fibra con codificación de modo dinámica (F); una segunda fibra rectangular de estado sólido 532 sin mezcla (G) y con codificación de modo dinámica (H); un láser de diodo a 660 um (circular) sin codificación de modo (I) y con codificación de modo dinámica (J); un láser de estado sólido a 532 um sin codificación de modo (K) y con codificación de modo dinámica (L).

Dispositivos de configuración de haces con poca pérdida

En algunas realizaciones de la presente, se utilizan opcionalmente formas de haz específicas, tales como haces de láser cuadrado o rectangular. Dicha iluminación configurada hace posible la exposición y formación de mosaicos eficientes en una superficie, por ejemplo, que comprende una muestra de ácido nucleico, lo que puede generar rendimientos mayores en varios dispositivos de la presente. Esto puede ser beneficioso en casos en los que las imágenes se obtienen con un dispositivo de CCD con píxeles cuadrados, dado que se pueden formar mosaicos de la huella de iluminación y el área de la que se obtienen imágenes para evitar la iluminación, y de fotoblanqueo de áreas fuera del área de captura de imágenes.

En algunas realizaciones de la presente, en lugar de emplear una máscara para configurar el haz y obtener una nueva imagen de la máscara en la superficie de muestra (que, opcionalmente, puede desperdiciar energía fuera de la máscara), el láser se acopla en una fibra de núcleo cuadrado o rectangular (o de otra forma). Por lo tanto, toda la potencia láser disponible se utiliza de forma eficiente para iluminación. La propagación a lo largo de una extensión suficiente de dicha fibra configurada llena el núcleo de forma eficiente para producir la forma de iluminación deseada. Es posible obtener nuevas imágenes del extremo de dicha fibra en una muestra, por ejemplo, un sustrato de celda de flujo. En realizaciones particulares, se suele desear que la obtención de nuevas imágenes de la iluminación de la fibra no perturbe sustancialmente la forma del haz y/o perfil plano logrado mediante la codificación y/o la configuración del haz (o incluso distorsione el haz cuando no se ha codificado o no se ha configurado). Por lo tanto, se seleccionan de forma adecuada aspectos para obtención de nuevas imágenes (por ejemplo, lentes, etc.) para no distorsionar el perfil obtenido y, opcionalmente, para amplificar correctamente la emisión de luz en la celda de flujo, etc. En realizaciones particulares, también se puede seleccionar la obtención de nuevas imágenes

acromática (es decir, capaz de funcionar con luz a cualquier longitud de onda). En algunas realizaciones, también es posible mover los componentes para los que se obtienen nuevas imágenes mediante un movimiento leve para tener el área de iluminación en áreas particulares de la celda de flujo.

5 En tales realizaciones, la condición del haz emitido en la fibra configurada acoplada con la extensión de la fibra puede controlar opcionalmente la uniformidad de iluminación. Opcionalmente, se puede mejorar la uniformidad de la iluminación mediante la codificación dinámica de los modos en la fibra a la que se dio forma. Por ejemplo, mediante la utilización de un dispositivo que comprime de forma continua la fibra de núcleo configurado en varias ubicaciones. Véase *arriba*. Lentes para obtención de imágenes puede manipular opcionalmente las dimensiones del haz suministrado en la superficie de muestra.

10 Las Figuras 34 y 35 muestran los resultados del uso de una fibra óptica de núcleo rectangular. Se obtuvieron nuevas imágenes del extremo de la fibra en un perfilador de haces. La imagen del perfil de haz ilustra el haz rectangular deseada con iluminación uniforme en las dimensiones vertical y horizontal.

15 Los sistemas de configuración de haces y/o de codificación de modo dinámica comprenden componentes para generar y administrar un haz evanescente de longitud de onda intercambiable y sustancialmente uniforme a la superficie inferior de un canal de celda de flujo (u otro sustrato) en un instrumento de lectura de SBS. Tal como resulta evidente, se establece una interfaz entre tales componentes y varios otros módulos/componentes en el sistema de SBS general (por ejemplo, los diversos componentes ópticos descritos anteriormente, etc.) y la pueden controlar o dirigir uno o más componentes informáticos.

20 A pesar de que las realizaciones de configuración de haz y codificación de modo dinámica actuales incluyen sistemas de secuenciación de ácidos nucleicos (por ejemplo, varias configuraciones de secuenciación mediante síntesis, tal como se describe en la presente), y se describen en términos de su interacción con estos, los expertos en la técnica observarán que dichas realizaciones también se pueden aplicar a una amplia gama de otros usos o sistemas. Por lo tanto, se puede incluir la codificación de modo dinámica en una variedad de sistemas que comprenden uno o más aspectos para variar de forma dinámica el índice de refracción de un haz de iluminación para mezclar los modos ópticos de una fibra óptica multimodal con el fin de producir una imagen sustancialmente uniforme o emisión en un marco temporal deseado (por ejemplo, tal como durante el tiempo de captura de imágenes para una cámara o similares). Es posible emplear la codificación de modo dinámica opcionalmente con sistemas tales como aquellos para realizar el seguimiento de fluorescencia en una placa o micromatriz, o similares, es decir, usos que no comprenden el seguimiento de reacciones de secuenciación.

30 Codificación de modo con láminas de onda

35 En varios aspectos de la presente, la invención comprende un sistema para mezclar modos ópticos en una fibra óptica multimodal mediante el uso de láminas de onda. Tales sistemas comprenden una fuente de luz (por ejemplo, un láser) que envía luz a través de una fibra óptica multimodal y, opcionalmente, también a través de al menos una lámina de onda y luego, opcionalmente, a través de lentes para obtener nuevas imágenes, un prisma y en un sustrato (celda de flujo)). Las láminas de onda en dichos sistemas pueden comprender láminas de onda destructivas. En algunas realizaciones, las láminas de onda giran físicamente a varias rpm, mientras que en otras realizaciones, tal como con láminas de onda de cristal líquido, la placa gira y altera la polarización de la luz que atraviesa mediante la variación del voltaje en el cristal líquido. En determinadas realizaciones, la lámina de onda comprende dos secciones o más de retardantes orientados, cada uno de los cuales gira la polarización en direcciones diferentes. En realizaciones usuales, la emisión de luz de la fibra comprende una emisión de luz sustancialmente uniforme en una superficie durante un período de tiempo determinado. En varias realizaciones de la presente, la emisión de luz en las superficies comprende mínimos de intensidad reducidos y máximos de intensidad reducidos en comparación con la emisión de una fibra óptica multimodal que no comprende una o más láminas de onda giratorias.

45 En otros aspectos, la invención comprende métodos para la ecualización de la salida de luz de una fibra óptica multimodal sobre una superficie en un período de tiempo definido al enviar luz de una fuente de luz (por ejemplo, un láser) a través de una fibra óptica multimodal y a través de una o más láminas de onda giratorias. En algunas realizaciones, la salida sobre la superficie comprende reducción de mínimos de intensidad y reducción de máximos de intensidad en comparación con la salida de una fibra óptica multimodal que no comprende una o más láminas de onda giratorias. En algunas realizaciones, las láminas de onda rotan físicamente a varias rpm en la realidad, mientras que en otras realizaciones, tal como sucede con las láminas de onda de cristal líquido, la lámina «rota» y altera la polarización de la luz que la atraviesa al variar el voltaje a través del cristal líquido. En determinadas realizaciones, la lámina de onda comprende dos o más secciones de retardantes, cada una de las cuales rota la polarización en diferentes direcciones.

55 Tal como se utiliza en la presente en algunas realizaciones, una «lámina de onda» (o lámina de retardo, cambiador de fase o similar) hace referencia a un dispositivo óptico que altera la velocidad de los rayos de luz cuando lo atraviesan, de manera que generan una diferencia de fase. Las láminas de onda suelen estar compuestas por un cristal birrefringente. Algunas realizaciones pueden comprender una lámina de onda de cristal líquido.

Tal como se describió anteriormente, en realizaciones particulares que comprenden láser u otra excitación fuente, la iluminación de la muestra (a cuya área de iluminación se hace referencia como la «huella») es espacialmente plana y uniforme. Los instrumentos ópticos de la presente explotan las propiedades de fibras multimodales que hacen posible la propagación de todos los modos ópticos a través de su núcleo con amplitud casi idéntica, lo que produce un perfil plano o rectangular de la huella. Sin embargo, la cantidad finita de modos presentes en dichas fibras pueden interferir de manera constructiva y destructiva entre sí, de forma de producir mínimos y máximos locales en el perfil de intensidad del láser (u otra luz). Algunas realizaciones producen una huella uniforme al agitar físicamente la fibra en un plazo menos extenso que el tiempo de exposición de la cámara que captura las imágenes, lo que promedia los mínimos y las máximas de intensidad, y produce una huella superior plana uniforme. Esta agitación puede requerir un motor de CC desbalanceado que rota y agita la fibra, lo que en algunos casos puede provocar ruidos y vibraciones no deseados que se tienen que amortiguar para evitar causar problemas en la obtención de imágenes. La agitación también puede afectar negativamente la fiabilidad dado que los motores de CC desbalanceados presentan un tiempo promedio entre fallas más corto que los motores balanceados, y puede aumentar el desgaste físico en la fibra. Debido a estos factores, la mezcla de modos en una fibra óptica multimodal sin vibraciones mecánicas y, en algunos casos, sin partes móviles, puede ser beneficiosa al utilizar láminas de onda en algunos casos.

Una realización de la presente invención produce un haz superior plano sustancialmente uniforme (es decir, huella o área de iluminación/excitación) al mezclar los modos de la fibra óptica multimodal mediante el uso de una lámina de onda $\lambda/2$ giratoria (lámina retardante). El contenido espacial de los modos depende del estado de polarización de la luz de entrada. Al tiempo que cambia la polarización, cambia el contenido espacial. Por lo tanto, la posición de mínimos y máximos de interferencia cambia al tiempo que cambia la polarización del haz de entrada. Si se rota la lámina de onda a una frecuencia angular más rápida que el tiempo de adquisición de imágenes, entonces se puede producir una imagen espacialmente uniforme en el plazo de la observación. Por lo tanto, en realizaciones particulares, la lámina de onda completa una o más rotaciones durante un período de tiempo determinado. El período de tiempo es, por ejemplo, uno durante el que se captura una imagen del área iluminada por la salida de luz (por ejemplo, áreas del sustrato de las celdas de flujo en determinadas realizaciones de secuenciación de la presente). Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el período de tiempo es equivalente o sustancialmente equivalente al período de exposición para cada imagen capturada por una cámara (por ejemplo, una cámara CCD en realizaciones de secuenciación particulares de la presente). Se apreciará que dichos tiempos de exposición pueden variar de realización a realización, por ejemplo, de menos de 1 mseg a más de 1 hora o más según los requisitos particulares de la realización (por ejemplo, al menos 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o más μ seg; al menos 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o más mseg; al menos 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 o más segundos, etc.). En el caso de las cámaras utilizadas en la presente, el tiempo de exposición puede ser de 50-500 milisegundos. En determinadas realizaciones, las láminas de onda pueden rotar menos o más que una rotación completa durante el período de tiempo, por lo tanto, en algunas realizaciones, también se puede incluir el *aliasing* [solapamiento].

Si bien es posible lograr la rotación de la polarización de distintas maneras, las realizaciones típicas rotan la lámina de onda. En realizaciones particulares de la presente, se rota una lámina de onda $\lambda/2$ (ver la lámina de onda 3800 en la Figura 38) en una cubierta adecuada mediante un motor de CC adecuado o similar, el que opera a una velocidad lo suficientemente rápida como para que se produzca una imagen espacial y sustancialmente uniforme durante el tiempo de captura de imágenes apropiado. Otras realizaciones comprenden láminas de onda modificadas que consisten en varias secciones de láminas de onda o piezas más pequeñas orientadas, con el eje rápido también orientado, en direcciones diferentes (ver la lámina de onda 3900 en la Figura 39). Dado que las secciones rotan la polarización en cantidades/formas diferentes, puede tener lugar una mezcla mucho más rápida de los modos y, opcionalmente, el motor de CC no rota tan rápido como en las realizaciones con varias secciones. En aun otras realizaciones, se pueden utilizar otros dispositivos, tales como cristales líquidos (tales como, de modo no taxativo, los fabricados por Meadowlark Optics (Frederick, CO)) para rotar la polarización del láser. Con dichos cristales líquidos, es posible rotar la polarización mediante la variación del voltaje en todo el dispositivo.

La Figura 40 muestra un diagrama esquemático que representa un ejemplo de arreglo de una realización de la invención. En la Figura 40, se atenúa la luz polarizada linealmente 4100 (200 mW, 532 nm) del láser en estado sólido bombeado por diodos (4200) mediante el uso de varios filtros OD. La intensidad del haz se controla adicionalmente mediante la lámina de onda $\lambda/2$ 4900 (por ejemplo, Casix, Fuzhou, Fujian, China) y el cubo divisor de haces polarizante 4300 (por ejemplo, Thorlabs, Newton, NJ). En varias realizaciones, no es necesaria la totalidad de la intensidad del láser, por lo tanto, en el ejemplo descrito solo se utiliza alrededor de 0,1 μ W. La rotación de la lámina de onda 4900 hace posible un control preciso de la potencia del láser de entrada al tiempo que la polarización se mantiene fija. Luego, el haz atraviesa una segunda lámina de onda retardante $\lambda/2$ 4400 y se guía mediante dos espejos 4500 y 4600 hacia el objetivo del microscopio 4700 (por ejemplo, Nikon, 20x NA 0,3). El objetivo del microscopio reduce el haz al tamaño requerido para que sea aceptado por la fibra óptica multimodal, 4800, núcleo 200 pm, 0,22 NA (por ejemplo, OZ optics, Ottawa, Canadá). Se coloca el extremo de salida de la fibra en la realización que se muestra directamente en el chip de la cámara CCD 4905 (por ejemplo, Cascade 512, Photometrics, Tucson, AZ). En el ejemplo de realización que se muestra, la cámara se operó en modo de transferencia de marco y se adecuaron las exposiciones de 100 ms para capturar el perfil del haz tal como se explica en la presente.

En varias realizaciones, la presente invención, independientemente del sistema general en el que se utilice, puede comprender láminas de onda diferentes (por ejemplo, diferentes en términos de tipo, colocación, arreglo, construcción, etc.), diferentes espejos y divisores de haz (por ejemplo, diferentes en términos de tipo, ubicación, ángulo, etc.). Por lo tanto, las realizaciones diferentes pueden comprender, por ejemplo, láminas de onda $\lambda/2$, láminas de onda $\lambda/4$ (por ejemplo, cuando la polarización de entrada es circular), las láminas de onda λ/n de otro retardo específico, etc., y pueden comprender al menos 1 lámina de onda, al menos 2 láminas de onda, al menos 3 láminas de onda o al menos 5 o más láminas de onda en varios arreglos. Las láminas de onda de la invención no se encuentran necesariamente limitadas por su construcción. Por lo tanto, en la presente se incluyen láminas de onda de cristal sólido (por ejemplo, cristal de cuarzo o cualquier otra sustancia apropiada) y láminas de onda de cristal líquido.

Si bien la realización actual incluye sistemas de secuenciación de ácidos nucleicos (por ejemplo, varias secuenciaciones mediante configuraciones de síntesis, tal como se describen en la presente), y en este documento se describen con referencia a su interacción con ellos, los expertos en la técnica entenderán que la invención actual también se puede aplicar a una amplia variedad de usos/sistemas distintos. Por lo tanto, las realizaciones pueden incluir sistemas que comprenden una o más láminas de onda (normalmente en rotación) que mezclan los modos ópticos de una fibra óptica multimodal con el fin de producir una salida o imagen espacial y sustancialmente uniforme en un período de tiempo deseado (por ejemplo, tal como durante el tiempo de captura de imágenes para una cámara o similares). Los aspectos actuales de la lámina de onda se pueden utilizar opcionalmente con sistemas, tales como aquellos que rastrean la fluorescencia en una lámina, micromatriz o similar, que no sean una reacción de secuenciación. En consecuencia, los aspectos de la lámina de onda también pueden incluir métodos para generar una salida o imagen sustancialmente uniforme desde una fibra óptica multimodal es un período de tiempo deseado al pasar los modos ópticos de la fibra a través de una o más láminas de onda (habitualmente con rotación y habitualmente con rotación a una velocidad mayor que el tiempo de captura de imágenes o período de tiempo deseado).

En la Figura 41 se ilustran varias imágenes obtenidas a partir de la exposición de una cámara de dichos ejemplos de realizaciones. A partir de una única exposición, las regiones prominentes de píxeles brillantes y oscuros son evidentes en la Figura 41A. Las imágenes brillantes/oscuras resultan de la interferencia constructiva y destructiva de varios modos que se encuentran presentes en la fibra óptica multimodal. La rotación de las láminas de onda resulta en la redistribución espacial de las regiones oscuras y brillantes, tal como se ilustra en la serie de imágenes en la Figura 41B. En dichas Figuras, cada imagen se tomó en una configuración de lámina de onda diferente. Tal como se mencionó anteriormente, si la lámina de onda rota más rápido que el tiempo de adquisición de imágenes, entonces se promedia el perfil espacial y esto resulta en el ajuste uniforme de la imagen. Dicho ajuste uniforme se puede comparar con la obtención de una gran cantidad de imágenes y el realizar un promedio de ellas. Las Figuras 41C y 41D muestran una única imagen con su perfil lineal (41C) y un promedio de 54 imágenes con perfil lineal asociado (41D). La Figura 42 muestra la uniformidad sustancial de la huella producida por el uso de las láminas de onda.

Otros métodos para garantizar que el haz óptico sea uniforme en la huella de obtención de imágenes incluyen el uso de solenoides, la rotación del haz de luz en un campo eléctrico o magnético con celdas Faraday o Pockel, y la obtención de imágenes de la luz nuevamente luego de que atravesase un difusor. El difusor puede ser un difusor holográfico que superpondría ondas de luz que se originen en el extremo de la fibra (si la fibra está acoplada) o en el láser (si no hay fibra presente) de manera que las ondas se superpongan y produzcan la forma de haz requerida. Un ejemplo tal es un difusor con un perfil de intensidad de $\text{sinc}(x)^2$ (sinc es $\text{sen}(x)/x$) lo que transformará un haz gaussiano en un haz rectangular.

Los diversos aspectos de codificación de modos en la presente se pueden controlar/manipular opcionalmente mediante uno o más componentes informáticos y se suelen coordinar/sincronizar con los componentes de iluminación con luz y de detección con luz (normalmente también mediante los aspectos informáticos de la presente).

Dispositivos para detectar la fluorescencia

Existen varios dispositivos para detectar la fluorescencia, por ejemplo, ejemplos de fotodiodos y cámaras, que pueden comprender los componentes de detección/detector de la presente invención. En algunas realizaciones de la presente, el componente de detección puede comprender un sistema de obtención de imágenes óptico con base en CCD de 1 megapíxel, tal como una cámara CCD 1024 x 1024 con iluminación trasera con píxeles de 8 μm , la que a una ampliación de 40x puede opcionalmente obtener una imagen de un área de 0,33 x 0,33 mm por mosaico con un tamaño de punto de láser de 0,5 x 0,5 mm (por ejemplo, un punto cuadrado o un círculo con un diámetro de 0,5 mm o un punto elíptico, etc.). Las cámaras pueden tener opcionalmente más o menos que 1 millón de píxeles, por ejemplo, se puede utilizar una cámara de 4 megapíxeles. En muchas realizaciones, se desea que la velocidad de lectura de la cámara sea tan rápida como sea posible, por ejemplo, la velocidad de transferencia puede ser de 10 MHz o más, por ejemplo, 20 o 30 MHz. En general, más píxeles significa que se pueden obtener imágenes de forma simultánea para una única exposición de un área de superficie más grande y, por lo tanto, de más reacciones de secuenciación. Esto tiene la ventaja de requerir menos desplazamientos de la plataforma y cambios de la rueda de filtro, y ayuda a acelerar la obtención de imágenes. En realizaciones particulares, la cámara CCD/láseres TIRF de la presente son capaces de recabar alrededor de 6400 imágenes para consultar 1600 mosaicos (dado que las

imágenes se pueden realizar opcionalmente en 4 colores diferentes con filtros opcionalmente diferentes en su lugar) por ciclo. En el caso de una CDD de 1 megapíxel, determinadas imágenes pueden contener opcionalmente entre alrededor de 5000 y 50 000 cúmulos de ácido nucleico únicos espaciados de forma aleatoria (es decir, imágenes sobre la superficie de la celda de flujo). La densidad teórica de cúmulos que se pueden resolver por área unitaria (o imagen) depende del tamaño de los cúmulos, tal como se ilustra en la Figura 29 que muestra una imagen de 1mpix de la cantidad de cúmulos detectados en función de la cantidad de cúmulos total y el área de cúmulos mínima. A una velocidad de obtención de imágenes de 2 segundos por mosaico para los cuatro colores, y una densidad de 25 000 cúmulos por mosaico, los sistemas de la presente pueden cuantificar opcionalmente alrededor de 45 millones de características por hora. A una velocidad de obtención de imágenes más rápida, una densidad de cúmulos más elevada, es posible mejorar significativamente la velocidad de obtención de imágenes. Por ejemplo, a una velocidad de lectura máxima de una cámara de 20 MHz, y un cúmulo resuelto cada 20 píxeles, la lectura puede ser de 1 millón de cúmulos por segundo. Es posible configurar el instrumento para que tenga más de una sola cámara. La luz se puede dividir para obtener imágenes de forma simultánea de dos colores en dos cámaras o incluso cuatro colores en cuatro cámaras. Si se utilizan cuatro cámaras en paralelo, es por lo tanto posible secuenciar 1 millón de bases por segundo u 86,4 mil millones de bases por día.

Existen dos formas de dividir las señales ópticas para un sistema de dos cámaras. Si se utilizan dos láseres, puede haber una excitación roja y una excitación verde con la mitad de la luz de emisión dividida hacia cada cámara. De manera alternativa, se pueden utilizar ambos láseres en ambos ciclos de iluminación, y la luz puede atravesar un espejo dicroico adecuado, de manera que envía la luz roja en una dirección, y la luz verde en una dirección diferente, tal como se ilustra en la Figura 36. Dicho sistema previene las pérdidas de señal asociadas a la división del haz, pero significa que dos de los tintes se exponen al láser antes del registro de su intensidad. En algunas realizaciones, el bloqueador de excitación, por ejemplo, tal como se ilustra en la Figura 36, puede comprender un filtro de muesca (por ejemplo 532 y 660 nm). En la Figura 37 se muestra una imagen de un instrumento con dos cámaras de detección 3700 y dos sistemas de fluido 3701 (y dos celdas de flujo 3702).

En la presente, un «mosaico» es funcionalmente equivalente al tamaño de imagen mapeado en la superficie del sustrato. Los mosaicos pueden ser, por ejemplo, de 0,33 mm², 0,5 mm², 1 mm², 2 mm², etc., aunque el tamaño del mosaico dependerá en gran medida de la cantidad y el tamaño de los píxeles en la cámara y el nivel de aumento deseado. Asimismo, se entenderá que el mosaico no tiene que ser del mismo tamaño o la misma forma que la huella de iluminación del láser (u otra fuente de luz), aunque esto puede ser beneficioso si se desea la minimización del fotoblanqueo.

Tal como se estableció anteriormente en las diversas realizaciones de la presente, los sistemas de cámara/láser recogen fluorescencia de 4 tintes fluorescentes distintos (es decir, uno por cada tipo de base de nucleótido agregado a la celda de flujo). Nuevamente, es posible encontrar material adicional sobre otros aspectos y otros conceptos de la secuenciación SBS en las solicitudes en trámite conjunto de los solicitantes, por ejemplo, WO04018497, WO04018493 y US7057026 (nucleótidos), WO05024010 y WO06120433 (polimerasas), WO05065814 (técnicas de unión a la superficie), y WO 9844151, WO06064199 y WO07010251 (secuenciación y preparación de cúmulos).

Las Figuras 1 y 13-16 muestran varias configuraciones posibles de las cámaras y láseres de la presente invención, las que incluyen un diseño con retroiluminación, una configuración de obtención de imágenes mediante TIRF, una configuración de enfoque láser, una configuración de visualización con luz blanca y un diseño con enfoque láser alternativo. La fuente de excitación con luz blanca es opcional y se puede utilizar al igual que los láseres de excitación o en su lugar. La Figura 1 muestra el sistema de diseño con retroiluminación al tiempo que registra una imagen en la configuración de obtención de imágenes mediante TIRF. La configuración en la Figura 1 para la obtención de imágenes mediante TIRF es opcionalmente una configuración del diseño con retroiluminación que se ilustra en la Figura 13. En la Figura 1, se utiliza uno de los dos láseres (en el arreglo de láser 160) para iluminar la muestra (en la celda de flujo 110), y se selecciona solo uno de los cuatro filtros de emisión (en el arreglo de intercambio de filtro 145) para registrar una única longitud de onda de emisión y para cortar cualquier luz de láser desviada. Durante la obtención de imágenes, tanto el láser de foco (150) como la lámpara de luz blanca opcional (165) no iluminan la muestra ya que se encuentran bloqueados con una rejilla o apagados. También se muestran la iluminación láser 101 y la iluminación desde la celda de flujo a través del lente objetivo y la cámara 102. La Figura 13 muestra todos los componentes del sistema en el diseño con retroiluminación pero sin la configuración de obtención de imágenes mediante TIRF específica. Cf. Figuras 1 y 13. Por lo tanto, la Figura 13 ilustra: módulo de suministro de fluido 1300, celda de flujo 1310, válvula de desechos 1320, accionador de temperatura 1330, componente de calefacción/refrigeración (por ejemplo, Peltier) 1335, cámara (por ejemplo, cámara CCD) 1340, lente objetivo 1342, arreglo de intercambio de filtro 1345, arreglo de enfoque láser 1350, arreglo de láseres de excitación 1360, lámpara de baja potencia 1365, plataforma XY de precisión 1370, dispositivo de enfoque (eje z) 1375, espejo 1380, dicroica inversa 1385 y fibra óptica de láser 1390.

La Figura 14 muestra un sistema similar al de la Figura 1, pero en la configuración de enfoque láser donde los láseres de excitación (en el arreglo de láser 1460) y la luz blanca opcional 1465 se encuentran apagados. El enfoque láser 1450 se encuentra encendido e ilumina el sistema, llega al divisor de haces 1485 (por ejemplo, un espejo extraíble 1 % divisor de haces) que dirige un haz apenas visible 1402 por el objetivo para llegar a un pequeño punto de la muestra (en la celda de flujo 1410). La luz dispersa de la muestra regresa por el objetivo (1442) a través de una ranura vacía en el arreglo de intercambio de la rueda de filtro 1445 y las imágenes se obtienen mediante la

cámara CCD 1440. La posición del punto en la cámara se utiliza para garantizar que la muestra se encuentre a la distancia correcta del objetivo y, por lo tanto, la imagen estará en foco. La numeración de los elementos en la Figura 14 es similar a la de los elementos en la Figura 13, pero se enumeran como «14» en lugar de «13», por ejemplo, 1460 corresponde a un elemento similar como 1360, etc. El sistema de autofocus se describe en más detalle a continuación.

La Figura 15 ilustra la configuración de visualización de luz blanca opcional, donde el láser de foco 1550 y los láseres de iluminación 1560 se encuentran apagados. En dicha configuración, la luz blanca de la lámpara de baja potencia 1565 ingresa al sistema como el haz 1503 y las imágenes se obtienen directamente en la cámara. En este caso también, la numeración de los elementos, excepto por el haz 1503, etc., sigue la numeración de las Figuras 13 y 14. La Figura 16 muestra una configuración de foco alternativo donde el sistema contiene la segunda cámara de enfoque 1641, la que puede ser un detector de cuadrante, PSD o detector similar para medir la ubicación del haz disperso reflejado desde la superficie. Esta configuración hace posible el control del foco junto con la recopilación de datos. La longitud de onda del láser de foco es opcionalmente más larga que el filtro de emisión de tinte más rojo.

Las Figuras 17-19 muestran varios esquemas para determinar la forma y las dimensiones del haz en los ensayos de TIRF que se llevan a cabo mediante el uso de los sistemas actuales de la presente, mientras que la Figura 20 exhibe una realización opcional de un prisma de TIRF para su uso con los sistemas de la presente. Por lo tanto, se entenderá que la forma (por ejemplo, redonda, cuadrada, etc.) de los haces de láser y/o de las áreas de obtención de imágenes iluminadas por los haces de láser pueden variar de forma opcional entre las diferentes realizaciones. La Figura 17 muestra las dimensiones y geometrías del haz a medida que sale de la fibra. A efectos de iluminar un círculo en el sustrato, el haz se debe proyectar desde la fibra como una elipse dado que el haz llega a la superficie del sustrato en un ángulo respecto al normal. La vista del borde 1700 del círculo proyectado por la elipse 1730 (por ejemplo, una forma de haz elíptica requerida en la salida de la fibra (la línea central de la fibra a 22° vista desde arriba). El contorno parcial de la cara del prisma 1710 no es a escala y la vista del borde 1720 de la elipsis 1730 se muestra en el eje menor. Asimismo, a efectos de iluminar un cuadrado en el sustrato, el haz se debe proyectar en la superficie como un rectángulo, tal como se ilustra en la Figura 18. En la Figura 18, se muestra el rectángulo 1830. Se requiere una forma de haz elíptica rectangular en la salida de la fibra (la línea central de la fibra a 22° vista desde arriba). La vista del borde 1800 del cuadrado proyectado por el rectángulo 1830 también se indica como el contorno parcial de la cara del prisma 1830 (no a escala) y la vista del borde 1820 de la elipsis rectangular 1830 (eje menor).

Tal como se ilustra en la Figura 19, se diseña el prisma para permitir que el haz de obtención de imágenes llegue a la superficie del sustrato a aproximadamente 68° (respecto al normal) para lograr una reflexión interna total y generar un haz evanescente que excite los fluoróforos en la superficie. Con el fin de controlar la vía del haz a través del prisma y, por lo tanto, mantener la huella de iluminación directamente sobre un lente objetivo fijo al tiempo que se desplaza la celda de flujo, el prisma puede tener una geometría donde el ángulo del prisma respecto a la superficie también sea de 68°, de forma de garantizar que la luz siempre llegue al prisma a 90°. La geometría deseada del prisma se describe de manera más completa en la solicitud WO03062897, y el ejemplo de tamaño y geometría se muestra en la Figura 20, etc.

La forma de haz de los láseres de la presente se puede controlar opcionalmente mediante el pulido del extremo de salida de la fibra multimodal a efectos de crear, por ejemplo, un haz cuadrado. Ver, por ejemplo, la Figura 21. La Figura 21 muestra los resultados de imágenes obtenidas del haz por dicho pulido. En otras realizaciones, el haz es opcionalmente redondo. En algunos casos, las propiedades del haz pueden ser un perfil gaussiano con las siguientes propiedades: un tamaño de imagen nominal de 0,17 mm de radio, un tamaño de punto máximo de 0,25 mm de radio y 0,32 mm como el punto luego del cual efectivamente no hay intensidad del láser. En determinadas realizaciones, la intensidad del haz es mayor de 90 % de intensidad máxima en todas las posiciones en el tamaño de imagen nominal; 80% de intensidad máxima en todas las posiciones en el tamaño de punto máximo, y no más de 1 % de intensidad máxima fuera del radio de 0,32. En varias realizaciones (en ausencia de un codificador de modos dinámico), la intensidad en cualquier punto no varía en más de 5 % RMS en el período de tiempo de 1s-1h y la variación en la potencia del láser total (integrada) no es más de 3 % RMS con medición durante 24 horas.

Sistemas de iluminación

En los dispositivos se puede utilizar una variedad de sistemas de iluminación de acuerdo con la presente invención. Los sistemas de iluminación pueden comprender lámparas y/o láseres. Los sistemas pueden contener uno o más láseres de iluminación de diferentes longitudes de onda. Por ejemplo, los sistemas de la presente pueden contener dos láseres de 532 nm y 660 nm, aunque también se pueden utilizar láseres con otras longitudes de onda. De manera adicional, en diversas realizaciones, los láseres en los sistemas de la presente se controlan por temperatura activamente hasta 0,1°C, tienen modulación de TTL para el diodo láser de 660 nm con tiempo de aumento menor de 100 ms; tienen rejillas manuales integradas para la modulación rápida del láser de 532 nm, tienen elementos ópticos que dan forma al haz para garantizar que se mantenga la relación de aspecto de haz óptima en la interfaz del instrumento para maximizar la relación señal respecto a ruido, tienen codificador de modos integrado para reducir las ondas en la salida de la fibra multimodal, y tienen generación de calor mínima. Se utilizan las rejillas y la modulación de TTL para garantizar que la iluminación solo ocurra sobre la superficie de la muestra mientras que la cámara registra las imágenes. La iluminación de fluoróforos puede provocar fotoblanqueo y, por lo tanto, la exposición de sustratos al láser se suele minimizar cuando no es necesario, en especial antes del registro de las imágenes.

Las Figuras 22A y B proveen varios arreglos de rueda de filtro de determinadas realizaciones para su uso con varias configuraciones ópticas. El uso de un sistema de excitación de dos láseres para detectar cuatro fluoróforos significa que dos de los fluoróforos se excitan más allá de su longitud de onda de absorción máxima, tal como se ilustra en la figura 22B. Si los filtros de emisión utilizados en los cuatro canales tenían el mismo ancho de banda, entonces los dos fluoróforos más cercanos a los láseres de 532 y 660 nm serían significativamente más brillantes que los dos fluoróforos excitados más allá de los láseres. Sin embargo, es posible anular este factor al cambiar el ancho de banda de los filtros. Por ejemplo, tal como se ilustra en la figura 22B, en el caso del láser de 532 nm, ambos tintes que absorben a, por ejemplo, 530 y 560 nm, se pueden excitar mediante el láser de 532. El uso de un filtro estrecho cercano al láser, por ejemplo, un 560/20 que deja pasar la luz del 550-570 nm solo permite que pase la luz del tinte de 532 nm. El uso de un filtro con paso de banda más ancho más allá del láser, por ejemplo, un 610/75 que deja pasar la luz a través del 572 nm al 647 nm, deja pasar la luz de ambos fluoróforos. La intensidad del fluoróforo de 532 a través del filtro 560/20 es similar a la intensidad del fluoróforo de 560 a través del filtro 610/75. Por lo tanto, es posible distinguir claramente los dos fluoróforos con un único láser y dos filtros de emisión.

El efecto no es específico de la longitud de onda y se puede llevar a cabo con cualquier longitud de onda de excitación. Por lo tanto, se puede lograr el mismo efecto con el láser rojo. Es posible distinguir dos fluoróforos que absorben a 650 nm y 680 nm con un filtro estrecho cercano al láser (por ejemplo, un 682/22), y un filtro más ancho más alejado, por ejemplo, un paso largo de 700. Nuevamente, las intensidades de los dos tintes a través de sus filtros respectivos son similares, mientras que se reduce mucho la señal del tinte de 680 en el filtro 682/22. Ambos tintes emiten en el canal de paso largo de 700, pero es posible determinar claramente las señales debido al nivel diferente de emisión en el filtro estrecho. Se pueden utilizar la adaptación de las longitudes de onda del láser, las selecciones de fluoróforos y los anchos de banda del filtro para obtener un conjunto de cuatro fluoróforos con cualquier cantidad de longitudes de onda, y se pueden normalizar las intensidades de la emisión a través de cada canal con el ancho de banda de los filtros para controlar cuánta luz se transmite.

La Figura 23 muestra un diseño nominal para una realización del trazado de rayos del sistema de 30x, mientras que la Figura 24 muestra el rendimiento de la obtención de imágenes de 30x. El rendimiento de la obtención de imágenes del sistema depende de la amplificación del lente objetivo y los demás lentes en el sistema. Una amplificación más pequeña permitirá que se obtengan imágenes de un área del sustrato más grande, pero a un costo de resolución de cúmulos muy estrechamente comprimidos y del brillo de cada cúmulo. Una amplificación preferida se encuentra opcionalmente entre 10X-40X, por ejemplo, 20X o 30X. El objetivo se puede diseñar específicamente para permitir que se capture la obtención de imágenes limitada por difracción cuando se observan objetos de fluorescencia a través de geometría no estándar (por ejemplo, sustratos de cristal más grueso) y, por lo tanto, se elimina la anomalía esférica que de otro modo estaría presente. El lente objetivo se puede conectar al dispositivo de detección a través de un lente de tubo adicional.

Sistema de autofocus

En realizaciones particulares, los sistemas de la presente pueden comprender componentes para auxiliar en el enfoque apropiado para la obtención de imágenes de cúmulos. En general, en realizaciones particulares de la presente, en una configuración de autofocus, un haz de láser de autofocus ilumina una muestra a través de un lente objetivo, se refleja desde la superficie de la celda de flujo, regresa al lente y luego a la cámara, de forma de generar un punto en la imagen. Cuando el objetivo se desplaza hacia arriba/hacia abajo con una muestra fija, los centroides del punto se alinean alrededor de una línea recta en la imagen (curva de calibración). El desplazamiento de «dr» a lo largo de esta línea de calibración es proporcional al cambio «d(z-zf)» en la distancia entre el objetivo y el plano focal. En muchas realizaciones, antes de la operación, el software establece la orientación de la línea de calibración (su pendiente) y la «sensibilidad»: dz/dr (nm/píxel). Esto se logra al tomar 21 imágenes con la etapa de 1000 nm en dirección z alrededor de la posición de foco que se establece visualmente. El software también puede requerir las coordenadas de píxeles x, y del punto cuando la muestra se encuentra en foco: x_f , y_f , esto se determina a partir de la primera imagen en foco (central) del conjunto de las 21 imágenes de calibración. Por ejemplo, los dispositivos de la presente comprenden opcionalmente un objetivo con función de autofocus que logra una resolución de 100 nm montado con un desplazamiento de eje Z de hasta 50 mm. El lente objetivo se puede desplazar opcionalmente de forma vertical con respecto al sustrato y el láser de iluminación se puede acoplar al desplazamiento de eje Z de manera que las entradas de iluminación también se desplacen respecto al sustrato. En el caso de las realizaciones con capacidad de autofocus, un haz de autofocus se envía opcionalmente a lo largo del borde del lente objetivo del microscopio (opcionalmente, tan lejos del eje como sea posible con el fin de corresponder a la sensibilidad máxima). El haz de autofocus puede proceder de los láseres de iluminación o de una fuente independiente que es opcionalmente una longitud de onda diferente al láser de iluminación, por ejemplo, de 488 nm, 630 nm o un láser infrarrojo de 700 nm o más rojo. Luego, el haz reflejado se monitorea opcionalmente ya sea mediante una celda cuadrupolar o mediante la filtración a través de un divisor de haces dicróicos en la cámara de obtención de imágenes por fluorescencia. En dichas realizaciones, el lente y la cámara son opcionalmente los mismos a los utilizados en el instrumento (por ejemplo, lente de 20X). Previamente se han descrito sistemas de autofocus similares que se incluyen opcionalmente en los sistemas y dispositivos actuales, por ejemplo, en WO03060589.

Con aspectos de autofocus particulares en la presente, al tiempo que el plano de obtención de imágenes se desplaza con respecto al lente objetivo, el haz de monitoreo reflejado también se desplaza opcionalmente de forma lateral (es decir, la línea punteada es el plano en foco mientras que la línea continua representa un plano fuera de foco, lo que

genera un cambio lateral en el haz detectado en la Figura 25). El espejo dicrónico elegido en tales realizaciones suele ser uno que refleja el haz de autofocus. La pequeña filtración que se transmite realmente (c.a. <5 %) es más que adecuada para observarse en una cámara CCD sin filtro de emisión en la vía de emisión. La Figura 26 exhibe fotografías de la muestra tanto de imágenes fuera de foco como en foco donde el punto se observa en la cámara de obtención de imágenes. Las imágenes inferiores muestran el punto de autofocus detectado en la cámara de obtención de imágenes. El punto también se puede observar en un detector independiente, tal como se ilustra en la Figura 27.

En las realizaciones que comprenden aspectos de autofocus, el componente informático comprende opcionalmente un algoritmo de autofocus. Dichos algoritmos ayudan opcionalmente en la determinación del foco correcto (por ejemplo, al monitorear las mediciones anteriores y realizar ajustes en consecuencia). Se puede hacer que el punto de autofocus se desplace de manera 1D, por ejemplo, solo en la dirección y en lugar de x e y, de forma de simplificar el procedimiento. Se asume que la posición del foco del lente objetivo se desplaza en la dirección z.

La primera etapa en algunas realizaciones del análisis de autofocus es una «función de respuesta a la configuración» donde las posiciones del punto de autofocus (y_1, y_2, \dots, y_n) se miden en la cámara de obtención de imágenes para varias posiciones del lente objetivo (z_1, z_2, \dots, z_n). Normalmente, 5 posiciones son adecuadas. En la Figura 27 se muestra un análisis con solo 3 posiciones. El desplazamiento del punto reflejado se muestra como imagen obtenida en una cámara de fluorescencia en los paneles inferiores. Para cada plano Z existe una posición y asociada del punto reflejado (centroide) en la cámara. Estos cinco puntos de datos (z_1, y_1), (z_2, y_2), (z_3, y_3), (z_4, y_4), (z_5, y_5) se pueden describir mediante una línea.

Ecuación 1

$$z = my_0 + c$$

Los valores m y c se obtienen de los puntos de datos de ajustes de cuadrados mínimos como:

Ecuación 2

$$c = \frac{\sum z \cdot \sum y^2 - \sum y \cdot \sum (yz)}{5 \sum y^2 - (\sum y)^2}$$

Ecuación 3

$$m = \frac{5 \cdot \sum (yz) - \sum y \cdot \sum z}{5 \sum y^2 - (\sum y)^2}$$

Ecuación 4

$$y_0 = -\frac{c}{m}$$

Por lo tanto, de los 5 puntos de datos, se determinan los valores de c , m e y_0 que dan una función de respuesta conocida.

La siguiente etapa en dichas realizaciones del análisis de autofocus comprende «calcular C nueva (para la posición fuera de foco)», en donde c es constante para cada posición, es decir, no cambia para una posición fuera de foco o en foco. Sin embargo, sí cambia para posiciones diferentes. Por lo tanto, a medida que la plataforma se desplaza a una posición nueva, se calcula *nuevaC* a partir de los valores Z e y modificados como:

Ecuación 5

$$nuevaC = Z_{medida} - m \cdot y_{medida}$$

La tercera etapa en el proceso es utilizar C nueva para el cálculo de la posición Z requerida ($nuevaZ$) para obtener la posición y en foco (y_0). Se sabe que:

Ecuación 6

$$nuevaC = nuevaZ - m \cdot y_0$$

Por lo tanto, Ecuación 7:

$$nuevaZ = nuevaC + m.y_0$$

M e y_0 se miden de la etapa 1 (una vez por chip), $nuevaC$ se mide de la etapa 2 (cada posición). Por lo tanto, se puede calcular $nuevaZ$.

5 Otro aspecto en componentes en autofocus de la invención comprende requisitos de estabilidad del señalador láser. A efectos de evaluar cuánto se puede tolerar el error de puntero en el láser de autofocus, uno puede observar el objetivo como un lente delgado simple con la longitud focal adecuada, tal como se ilustra en el dibujo exagerado en la Figura 28.

10 Luego, la geometría y simple produce que el ángulo Φ que haría que el haz de láser con autofocus aparezca desplazado en un píxel se encuentre simplemente en (Δ/F) que es aproximadamente Δ/F para ángulos pequeños.

15 Para un objetivo de 20X (con la combinación de lente de tubo y lente de relé presente en algunas realizaciones), el tamaño del píxel es de aproximadamente 0,3 μm . La longitud focal de ese lente es de 10 mm. Por lo tanto, el ángulo de error que corresponde a 1 píxel es de aproximadamente 30 μrad . Algunas realizaciones del sistema tienen su autofocus configurado para una sensibilidad de desplazamiento de alrededor de 4 píxeles del punto de láser con autofocus por micrón de desplazamiento z .

Si se asume que es posible tolerar 0,5 μm de error de foco (que corresponde a un desplazamiento de dos píxeles en la posición del punto de láser), se observa que el cambio más grande del puntero que se puede tolerar en el caso del láser de autofocus es de 60 μrad .

20 A efectos de cumplir con ese tipo de requisito de estabilidad a variaciones de temperatura ambiente normales, es muy recomendable utilizar un láser de fibra ópticamente acoplado. Salvo que un láser en estado sólido sea controlado por temperatura de forma muy cuidadosa, será difícil mantener este tipo de precisión de puntero en un rango de especificación de temperatura ambiente (por ejemplo, 20-30°C).

A efectos de proveer información y teoría adicional respecto a los algoritmos de seguimiento de foco, a continuación, se provee un ejemplo más detallado para poner en práctica el sistema de autofocus.

25 La primera etapa en algunas realizaciones del procedimiento de seguimiento de foco es para obtener la imagen del punto de láser con autofocus en un dispositivo de obtención de imágenes, el cual puede ser la cámara de obtención de imágenes. Los datos de este punto primario se extraen en dos pasos, un primer paso grueso que determina la posición y el tamaño aproximados del punto, seguido de un segundo paso fino que determina los límites del punto correctamente antes de determinar el COL (centro de luz) y otras características del punto. El análisis del primer paso se puede llevar a cabo en 5 etapas: (1) la imagen de 16 bits se convierte en una imagen de 8 bits, con el máximo de la imagen fijado en 255, el mínimo de la imagen fijado en 0, y todos los demás valores en la escala de grises linealmente entre ellos; (2) se calcula la calidad de fotografía de la imagen. La calidad de fotografía se define como el promedio de la autocorrelación normalizada de la imagen con sí misma con desplazamientos de píxeles unitarios a la izquierda y píxeles unitarios hacia abajo. Si la imagen tiene ruido, entonces, dado que el ruido no se correlaciona consigo mismo, esta medición será baja; (3) a continuación, esta imagen se ubica en el umbral de 128. Todo por encima de este valor se considerará como primer plano, mientras que todo por debajo de este valor se considerará el fondo. A partir de la escala de grises 255 (es decir, los puntos de interés), la región crece para encontrar los 8 componentes de primer plano conectados; (4) de todos estos componentes de primer plano candidatos, se elige el componente con el brillo promedio más elevado como «el» componente que especifica la posición y el tamaño aproximados del punto primario; y (5) se calcula el cuadro delimitador de este componente.

45 El segundo análisis de paso (fino) se lleva a cabo en tres etapas: (1) la subimagen que corresponde a dos veces el área del cuadro delimitador se corta de la imagen en escala de grises de 8 bits. Esto hace que la población de píxeles del primer plano y del fondo sean aproximadamente iguales, de forma de hacer que sea más fácil funcionar de forma confiable para las técnicas de umbral con base en el histograma de la imagen estándar; (2) se calcula el histograma de la subimagen y se determina el «mejor» umbral en escala de grises que separa el primer plano del fondo. El umbral utilizado se denomina «umbral de Otsu» (ver *IEEE Trans. Systems, Man, and Cybernetics*, tomo 9, págs. 62-66, 1979, o *Computer and Robot Vision*, tomo 1. Addison-Wesley, 1992); y (3) la imagen se coloca en un umbral en el umbral de Otsu y se determinan los 8 componentes de primer plano conectados. Este es el blob del punto primario en el que se lleva a cabo cada extracción de característica posterior.

50 Se puede llevar a cabo un paso adicional para extraer la posición del punto secundario. Se pueden realizar cuatro etapas para llevar a cabo dicho paso adicional: (1) la imagen de 8 bits (del primer paso) se coloca en un umbral bajo de 16; (2) cabe destacar que en este umbral más bajo, aumenta la cantidad de píxeles (área) del componente de punto primario. Se registra esta área del punto primario y se utiliza para determinar qué tan ajustado o difuso es; (3) el componente (de tamaño suficiente) más cercano en distancia al componente de punto primario se identifica como el punto secundario; (4) se registra el centroide geométrico del punto secundario.

Determinación del centro de luz

A efectos de determinar el centro de luz (COL) para el enfoque automático, se indica (\bar{x}, \bar{y}) como el centro de luz del punto primario. Luego, esto se calcula para el blob del punto primario como:

$$\bar{x} = \frac{\sum g_i x_i}{\sum g_i} \quad y \quad \bar{y} = \frac{\sum g_i y_i}{\sum g_i},$$

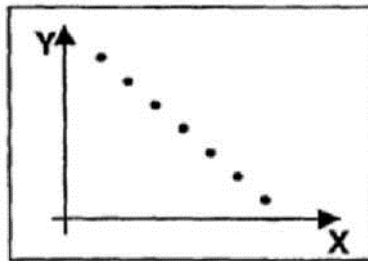
- 5 donde la sumatoria toma todos los píxeles i en el blob con coordenadas con base en la imagen (x_i, y_i) y escala de grises g_i (por encima del umbral).

Otras características del punto

- 10 Además de la calidad fotográfica y el centro de luz, la lista de características calculadas para el blob del punto primario incluye el área, la cual es una medición de qué tan difuso (no ajustado) es el blob primario. Esto se configura en el área (conteo en píxeles) del blob primario en el umbral inferior dividido por su área en el umbral de Otsu. Otras características calculadas incluyen volumen (el brillo promedio, por encima del umbral, X área del blob primario); brillo promedio, que es la suma de los valores grises de los píxeles en el blob dividido por su área; y brillo máximo:valor gris máximo.

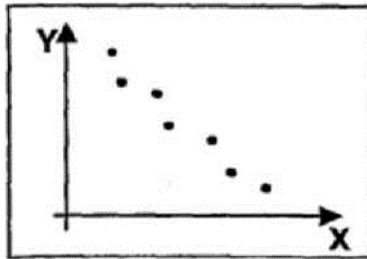
- 15 Luego, los datos extraídos se pueden utilizar para calibrar los 2 focos y, de esa manera, determinar cuánto desplazar el objetivo con el fin de que la imagen quede en foco. El resumen del procedimiento de calibración es el siguiente: (1) se realiza la calibración para el foco Z (con ayuda del usuario) al inicio de cada operación; (2) al inicio de la calibración, el usuario se asegura de que la imagen se encuentre en foco, es decir, en el plano focal. Por lo tanto, ellos configuran el punto de foco Z, Z_f ; (3) esta realización de autofocus depende del aporte del usuario y de las coordenadas del punto de láser de autofocus en una imagen; (4) a medida que cambia z durante el proceso de calibración, el punto se desplaza en proporción lineal con el cambio de z a lo largo de una línea.
- 20

El procedimiento algorítmico de calibración inicia con una secuencia de centro de luces (x, y) extraída de la secuencia de imágenes de punto de autofocus adquiridas a medida que cambia z. De manera ideal, cuando estos puntos se grafican, deberían seguir una línea recta, como se observa a continuación.



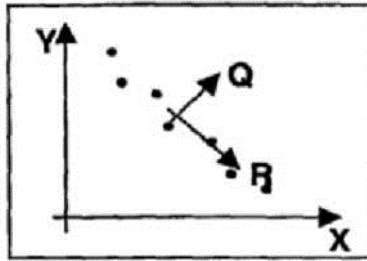
Un centro ideal de secuencia de luz

- 25 Desafortunadamente, debido a varias fuentes de ruido, tanto físicos como informáticos, los puntos se desplazan de la línea recta ideal, tal como se muestra:



Un centro real de secuencia de luz

Por lo tanto, se lleva a cabo un análisis de componente principal XY (ver, por ejemplo, LT. Jolliffe, *Principal Component Analysis*, 2.^a ed. Springer Series in Statistics, 2002) con base en la regresión entre X e Y, lo que lleva a un nuevo sistema de coordenadas R y Q, tal como se muestra:

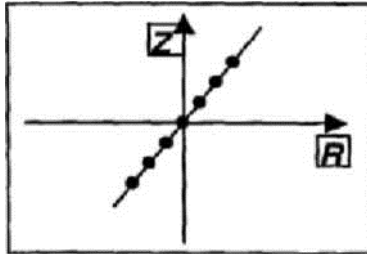


El espacio de coordenadas (R, Q)

Cabe destacar que: (1) el origen del sistema (R, Q) se encuentra en el centro de la masa de los puntos (x, y); (2) una mejor línea de ajuste (componente principal) define el eje R; y (3) la línea ortogonal respecto al eje R define el eje Q. El modelo requiere correlación elevada entre X e Y. Los valores de coordenada Q, por lo tanto, se pueden considerar como errores «residuales» de la mejor línea de ajuste, la idea es eliminar estos residuos y corregir las observaciones.

5

Por último, dado que el modelo requiere una relación lineal entre las coordenadas espaciales y los valores z (tal como se ilustró), se realiza una regresión lineal entre r y z para determinar los coeficientes de esta línea:



La relación lineal R-Z

Además, el seguimiento del autofocus puede implicar varios entrenamientos de motores de regresión.

10 Entrenamiento del motor de regresión PCA XY

<i>Entrada:</i>	Una secuencia de centro de luces (x, y) extraída de la secuencia de imágenes de punto de autofocus adquiridas a medida que cambia z.
<i>Salida:</i>	Los coeficientes de regresión del PCA, es decir, transformación en el espacio de coordenadas (R, Q).
<i>Descripción:</i>	Llevar a cabo el análisis del componente principal y guardar los coeficientes. Asimismo, dada la posición de centroide del punto secundario, determinar si se encuentra a la izquierda o a la derecha del punto primario a lo largo del eje principal.

Entrenamiento del motor de regresión lineal RZ

<i>Entrada:</i>	Las coordenadas r obtenidas de la regresión del PCA, los valores z correspondientes, y el punto de foco Z, Z _f .
<i>Salida:</i>	Los coeficientes de regresión lineal que relacionan (z-z _f) con r.
<i>Descripción:</i>	Llevar a cabo el análisis de regresión lineal y guardar los coeficientes.

Entrenamiento del detector atípico

15 Se utiliza un esquema de detección atípico para advertir sobre la presencia de una burbuja o para señalar un problema con la rueda de filtro.

Entrada:	Las coordenadas q obtenidas de la regresión del PCA, junto con las características del punto para cada punto en la secuencia de calibración, se utilizan para entrenar un clasificador a detectar puntos atípicos.
Salida:	Configuraciones internas del detector atípico.
Descripción:	Para cada característica φ , el promedio μ_φ y la desviación estándar σ_φ se calculan a partir de los puntos utilizados durante la calibración. La idea general es que un punto se declararía un punto atípico si la característica φ se encuentra fuera de los límites de $\mu_\varphi \pm 3 \sigma_\varphi$. Sin embargo, en la puesta en práctica actual, solo las características de volumen y área se utilizan de esta manera, de hecho, solo los límites superiores se utilizan actualmente para estas dos características. Se establecen límites especiales para invalidar estos valores tanto para la calidad fotográfica como la característica de residuo q . Para la calidad fotográfica, se utiliza un límite inferior. Para el residuo, se utiliza un límite superior.

Operación del sistema de autofocus

- 5 Una operación comienza desde una imagen del punto de láser de autofocus y utiliza los coeficientes de las transformaciones aprendidas durante el proceso de calibración para realizar el mejor estimado para el desplazamiento de z requerido para quedar en foco.

Entrada:	Una imagen del punto de láser de autofocus.
Salida:	$(z-z_f)$ para quedar en foco. También se provee la recomendación de si desplazarse o no en función de la detección atípica.
Descripción:	<p>Deriva el mejor estimado de $(z-z_f)$ con:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. El algoritmo de extracción del punto. 2. Los coeficientes de regresión XY con base en PCA. 3. Los coeficientes de regresión RZ lineales. <p>En una puesta en práctica, el esquema de detección atípico permite un desplazamiento únicamente en el caso de un residuo q grande. En el caso de calidad de fotografía baja, volumen elevado o área elevada, se recomienda el no desplazamiento.</p> <p>Si durante períodos extensos de no desplazamiento de z, tal como puede ser el desencadenado por los contaminantes/burbujas grandes en la celda de flujo, la superficie de la celda de flujo cambia lo suficiente como para hacer que el punto secundario ocurra localmente en todos los aspectos con relación al punto primario visto en calibración, dicho algoritmo se acoplaría a dicho punto durante el resto del ciclo aunque la contaminación/burbuja dejaran de existir en el interior de la celda de flujo. A efectos de recuperarse de dicho problema, se pueden seguir los siguientes pasos: en caso de que un desplazamiento sea recomendado, se puede llevar a cabo una verificación adicional para ver si existe un punto secundario en la dirección opuesta a donde el entrenamiento dice que debería estar. Si es así, entonces un desplazamiento puede ser recomendado para esta mutación con los coeficientes de la regresión XY con base en PCA y la regresión RZ lineal.</p>

Computadora

- 10 Tal como se observó anteriormente, los diversos componentes del presente sistema se acoplan a un procesador o una computadora programados de forma adecuada y que funcionan para indicar la operación de estos instrumentos de acuerdo con instrucciones de entrada preprogramadas o del usuario, recibir datos e información desde estos instrumentos, e interpretar, manipular e informar sobre esta información al usuario. Como tal, la computadora se suele encontrar acoplada de forma adecuada a estos instrumentos/componentes (por ejemplo, que incluyen un convertidor de analógico a digital o de digital a analógico).

- 15 La computadora incluye opcionalmente el software apropiado para recibir instrucciones del usuario, ya sea en la forma de entrada del usuario en campos de parámetros configurados, por ejemplo, en un GUI, o en la forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo, preprogramadas para una diversidad de operaciones específicas diferentes (por ejemplo, autofocus, secuenciación SBS. Luego, el software convierte estas instrucciones en lenguaje apropiado para indicar la operación correcta para llevar a cabo la operación deseada (por ejemplo, de dirección de fluido y transporte, autofocus, etc.).

Por ejemplo, la computadora se utiliza opcionalmente para dirigir un componente de flujo de fluido con el fin de controlar el flujo de fluido, por ejemplo, a través de una variedad de tuberías. Opcionalmente, el componente de flujo de fluido dirige el desplazamiento de los amortiguadores, nucleótidos, enzimas, etc. apropiados, hacia el interior y a través de la celda de flujo.

- 5 Opcionalmente, la computadora también recibe los datos de uno o más sensores/detectores incluidos en el sistema e interpreta los datos, ya sea que los provee en un formato que el usuario comprende o usa esos datos para iniciar más instrucciones del controlador, de acuerdo con la programación, por ejemplo, tal como en el monitoreo y el control de velocidades de flujo, temperaturas, y similares.

10 En la presente invención, la computadora suele incluir software para el monitoreo y el control de materiales en las celdas de flujo. De manera adicional, el software se utiliza opcionalmente para controlar la excitación de las etiquetas fluorescentes y monitorear las emisiones resultantes. La computadora también suele proveer instrucciones, por ejemplo, al componente de calefacción/refrigeración y el sistema de autofocus, etc.

15 Cualquier controlador o computadora incluye opcionalmente un monitor que suele ser una pantalla con tubo de rayos catódicos (CRT), una pantalla de panel plano (por ejemplo, una pantalla de cristal líquido de matriz activa, pantalla de cristal líquido) o similares. Los datos producidos a partir de los sistemas actuales, por ejemplo, los resultados de la secuencia de ácido nucleico, se visualizan de forma opcional en formato electrónico en el monitor. De manera adicional, los datos, por ejemplo, los perfiles de emisión de luz de los arreglos de ácido nucleico u otros datos recopilados del sistema, se pueden emitir en formato impreso. Los datos, ya sea en formato impreso o electrónico (por ejemplo, tal como se visualizan en un monitor), se pueden encontrar en diversos o múltiples formatos, por ejemplo, curvas, histogramas, series numéricas, tablas, gráficas y similares.

20 El circuito de computadora se suele ubicar en una caja que incluye, por ejemplo, varios chips de circuito integrado, tales como un microprocesador, memoria y circuitos de interfaz. La caja también incluye, opcionalmente, una unidad de disco duro, una unidad de disquete, una unidad extraíble de alta capacidad tal como un CD-ROM grabable, y otros elementos periféricos comunes. Los dispositivos de entrada, tales como el teclado o el mouse, proporcionan opcionalmente entrada desde un usuario y selección del usuario de las secuencias a ser comparadas o de otro modo manipuladas en el sistema informático pertinente.

Ejemplos de uso y variación de componente

30 Los sistemas SBS de la presente, en muchas realizaciones, comprenden subsistemas de obtención de imágenes y excitación con base en láser CCD/TIRF que pueden tomar imágenes de millones de cúmulos de ácido nucleico por muestra (normalmente en una celda de flujo) y que pueden detectar cada uno de los cuatro tintes fluorescentes (uno para cada una de las cuatro bases). Los componentes químicos de SBS, por ejemplo, nucleótidos, WO04018497, WO04018493 y US7057026, polimerasas, WO05024010 y WO06120433, técnicas de unión a la superficie, WO05065814, preparación y secuenciación del cúmulo, WO 9844151, WO06064199 y WO07010251, son compatibles con los componentes de celda de flujo canalizados de la presente, etc. Los aspectos del sistema de análisis de datos o computadora del sistema son opcionalmente capaces de procesar miles de imágenes por hora en información de secuencia.

40 A modo de resumen, en ejemplos particulares de secuenciación mediante SBS, el ADN genómico se fragmenta de forma aleatoria, tiene un casquete en el extremo con secuencias conocidas, y se une de forma covalente a un sustrato (tal como el canal en una celda de flujo), por ejemplo, mediante hibridación con un cebador covalente. A partir de dicha unión de ADN, se genera un arreglo de cúmulos de ácido nucleico, tal como se describe en WO9844141 y WO07010251. El análisis de SBS (por ejemplo, con los sistemas y dispositivos de la presente) puede generar una serie de imágenes de los cúmulos, las que luego se pueden procesar para leer la secuencia de los ácidos nucleicos en cada cúmulo que luego se pueden alinear en función de una secuencia de referencia para determinar las diferencias entre secuencias, una secuencia general más extensa o similares. Los algoritmos para el alineamiento de lecturas cortas de ácidos nucleicos se describen en WO05068089.

45 Tal como se describe anteriormente, cada ciclo de secuenciación incluirá una ronda de incorporación en la cadena de ácido nucleico en crecimiento. Dicho ciclo se suele llevar a cabo mediante una adición de los cuatro dNTP, cada uno modificado de forma que se pueda identificar cada base mediante un fluoróforo único. De manera adicional, los trifosfatos se modifican en la posición 3', de manera que se controla la extensión y no más de una sola base se puede agregar a cada molécula en cada ciclo. El concepto genérico de realizar cúmulos amplificados a partir de una única molécula de plantilla en un arreglo aleatoria, y la secuenciación posterior de dicho arreglo, se muestra en las Figuras 30-32, las que ilustran esquemáticamente varios aspectos de los procedimientos de secuenciación y métodos que llevan a cabo los sistemas de la presente. Por ejemplo, se presentan las etapas generales básicas de formación de cúmulos de ácido nucleico, los arreglos de cúmulos producidos (y una comparación de dichos arreglos de cúmulos con un arreglo más «tradicional») y un esquema de la metodología de secuenciación. La Figura 30 muestra los esquemas básicos de la creación de cúmulos de ácido nucleico y su secuenciación, mientras que la Figura 31 compara la densidad de ácido nucleico entre un arreglo (a la izquierda) y en un sustrato de cúmulo de ácido nucleico, tal como aquellos capaces de ser utilizados con los sistemas/dispositivos de la invención (a la derecha). La Figura 32 provee un dibujo que resume el procedimiento de secuenciación SBS, por ejemplo, tal como

lo llevan a cabo las realizaciones de la invención.

Tras la etapa de incorporación en donde un nucleótido etiquetado con fluorescencia se une al ácido nucleico de los miembros de los cúmulos a través de un enlazador escindible, se lavan los canales de la celda de flujo con el subsistema de flujo de fluido a efectos de eliminar cualquier nucleósido y enzima no incorporado.

5 A continuación, el sistema lleva a cabo una etapa de lectura, con la cual se registra la identidad de las etiquetas individuales (lectura como un grupo en cada cúmulo) incorporadas en la etapa de incorporación con microscopía óptica y se observa la base correspondiente incorporada. El sistema de secuenciación puede leer los cuatro fluoróforos diferentes con dos láseres en longitudes de onda distintas a través de la microscopía de reflexión interna total (TIRF) y cuatro filtros de emisión distintos en partes del espectro diferentes. Las imágenes se registran en una
10 cámara CCD y se informan en el módulo de computadora acoplado.

Luego de que se lee la incorporación específica, una etapa de desprotección elimina el bloque y resto etiquetado del ADN unido a la superficie. La desprotección permite la repetición de la incorporación anterior y de las etapas de lectura hasta que se obtienen ciclos suficientes de información para ubicar exclusivamente la secuencia de cada cúmulo de ácido nucleico (presente en la celda de flujo) en su contexto genómico. Por ejemplo, en el caso del
15 genoma humano, este será de >16 ciclos, por ejemplo, alrededor de 25-50 ciclos. Las imágenes se pueden almacenar fuera de línea o se pueden procesar en tiempo real, de manera que las bases individuales se lean durante el proceso de secuenciación. El procesamiento de imágenes provee una base de datos de una lectura de secuencia de cada cúmulo, donde cada cúmulo deriva de una posición aleatoria en alguna parte de la totalidad de la muestra (por ejemplo, un genoma). Por lo tanto, durante el transcurso del procedimiento, se suele construir una base
20 de datos de millones de lecturas de secuencia que cubren cada parte del genoma. Dicha base de datos se puede comparar, por ejemplo, con una base de datos de cada secuencia derivada de una secuencia de referencia, etc. En diversas realizaciones, el análisis de imágenes, la determinación de secuencias y/o el alineamiento de secuencias se llevan a cabo opcionalmente «fuera de línea», luego de la captura de imágenes fluorescentes. Dichos procedimientos también se llevan a cabo de forma opcional mediante una computadora independiente de la que se encuentra presente en los sistemas actuales.
25

Tal como se mencionó en la presente, la presente invención puede variar entre realizaciones (por ejemplo, en cantidad y tipo de componentes o subsistemas). Por ejemplo, en una realización de la invención (realización «b»), los componentes pueden comprender: láseres de iluminación (utilizados para excitar los fluoróforos en las reacciones de secuenciación) de 532 y 660 nm cada uno con potencia de 75 mW (u opcionalmente más) que se proyectan como un círculo de 0,5 mm en el fondo del canal en una celda de flujo; un prisma TIR de vidrio (68 grados o 71 grados); una celda de flujo de vidrio con canales que tienen un área de 1x61 mm y 8 canales con una profundidad de 100 µm (se pueden utilizar 39x1 mm o acceder a estos para la observación); un lente objetivo en el componente de la cámara que comprende una Nikon Plan Apo 20x, 0,75 NA (corregida para el espesor del vidrio); filtros de emisión que comprenden el filtro de paso de banda de 557±11 nm, 615±40 nm, 684±11 nm y 740±50nm (u
30 opcionalmente, filtros tales como los ilustrados o similares a aquellos ilustrados en la Figura 22); relé óptico que comprende un adaptador Navitar 1,33x para una amplificación neta de alrededor de 23x, o un lente de tubo no amplificado; y una cámara CCD digital que comprende una cámara de 1 mpíx o 1K Photometries Cascade, con píxeles de 8 µm de tamaño, y una velocidad de lectura de 10 MHz, y un objetivo de microscopio de amplificación 20x con 0,75 NA (apertura numérica). La realización «b» de Cascade puede proveer una realización neta de campo de
35 0,35 mm con resolución óptica de aproximadamente 0,8 µm (algo mayor que el límite de difracción).
40

Dichas realizaciones de 1 megapíxel pueden iluminar un círculo de 0,5 mm y detectar un cuadrado de 0,35 mm en su interior. La celda de flujo en dichas realizaciones puede tener un total de 156 mosaicos no superpuestos en un canal o más. Los cúmulos se pueden encontrar en el orden de 1 µm. El NA del microscopio puede proveer opcionalmente un PSF de aproximadamente 0,6 µm a 700 nm. Por lo tanto, un cúmulo «típico» adquiere un diámetro aparente de aproximadamente 1,2 µm. En el plano de la imagen, 1 píxel representa aproximadamente 0,35 µm, así que un cúmulo típico tendría alrededor de 3,5 píxeles de diámetro. El área de un cúmulo es de alrededor de 9,25 píxeles. La distribución de Poisson de objetos con área de 10 píxeles en una CCD de 1 mpíxel muestra que un máximo de alrededor de 38 000 objetos no se superpondrán, tal como se ilustra en la Figura 29. La Figura 29 provee un ejemplo de rendimiento de información de un ejemplo de configuración de un sistema de la invención. La
45 cantidad de cúmulos detectados es en función de la cantidad total de cúmulos y el área de cúmulos mínima.
50

En el caso de los ejemplos de realizaciones «b», el límite de resolución (mediante el uso del criterio de Rayleigh) es de alrededor de 0,6 µm y los cúmulos son de alrededor de 1 µm para un tamaño aparente de alrededor de 1,2 µm. Los píxeles se mapean a alrededor de 0,35 µm en el plano de la imagen, así que un cúmulo es de alrededor de 3,5 píxeles a lo ancho y alrededor de 10 píxeles en el área. En el caso de cúmulos distribuidos de forma aleatoria, la cantidad máxima de cúmulos no confundidos en la cámara de 1 mpíx será de alrededor de 38 000 en un mosaico cuadrado de 0,35 mm, las celdas de flujo «b» admiten 250 mosaicos de iluminación no superpuestos por canal para un total de 1200 mosaicos por celda de flujo. Esto es 45,6 M bases por ciclo y alrededor de 1 GBase en una operación de 25 ciclos. La superposición de la iluminación y la compresión estrecha de los mosaicos significan que se pueden obtener imágenes de 200 mosaicos por canal y, por lo tanto, 1600 por celda de flujo.
55
60

Para el rendimiento del subsistema de iluminación «b», las longitudes de onda láser son: longitud de onda láser verde de 532 nm; potencia del láser verde de opcionalmente 75 mW; longitud de onda láser rojo de 660 nm; potencia del láser rojo de opcionalmente 75 mW; diámetro de haz de TIRF proyectado de 0,5 mm; y variación permitida a través del haz de 20 %.

5 En otra realización (realización «g»), el sistema de la invención puede comprender: láseres de iluminación de 532 y 660 nm, cada uno con una potencia de 500 mW (proyectado idealmente como un cuadrado de 0,5 mm), un prisma de vidrio TIR (68 grados); una celda de flujo de vidrio con 8 canales de 100 μm de profundidad y un área de 1 x 61 mm con 50 mm utilizables; un lente objetivo que comprende una Nikon Plan Fluor 40x, collar ajustable 0,6 NA, o 40x personalizado, 0,75 NA corregido para una celda de flujo SBS; filtros de emisión que comprenden filtros de paso de banda de 557 \pm 11 nm, 615 \pm 40 nm, 684 \pm 11 nm y 740 \pm 50 nm; óptica de imagen que comprende un doblete acromático de 150 mm para la amplificación del sistema de 30x; y una cámara CCD digital que comprende una cámara Photometrics CoolSNAP K4, 2048 por 2048 píxeles, 4 mpíx, tamaño del píxel 7,4 μm , lectura a 20 MHz. Dicha realización puede proveer un rendimiento neto de campo de 0,5 mm con menos de 0,7 μm de límite de difracción. Puede comprender un lente de relé de 0,75x para un sistema de amplificación de 30x totales.

10 En algunas de dichas realizaciones «g», se desea que un cuadrado de 0,5 mm se ilumine de forma uniforme y que el mismo cuadrado de 0,5 mm sea detectado (2048 x 7,4 / 30 000). Los cúmulos en las celdas de flujo en la presente pueden ser tan pequeños como 0,5 μm . PSF a 700 nm es de aproximadamente 0,7 μm . Por lo tanto, los cúmulos aparecen como de 0,86 μm , donde 1 píxel representa 0,25 μm . El cúmulo típico, por lo tanto, es de 3,5 píxeles y el área de un cúmulo es de 9,25 píxeles. Una CCD de 4 mpíxeles provee un máximo de alrededor de 135 000 cúmulos no sobrepuestos detectables por mosaico.

15 La huella de iluminación es cuatro veces más grande, lo cual quiere decir que se necesita un incremento en 4 veces de las potencias del láser para obtener el mismo nivel de señal en el mismo tiempo de exposición. Para minimizar los tiempos de exposición, la potencia del láser se puede incrementar más. Por lo tanto, dicho sistema es capaz de generar 2 mil millones de bases de secuencia por experimento, si se utilizan los siguientes parámetros: Objetivo con apertura numérica 0,8; amplificación de 20x; cámara de 4 mpíxel; mosaicos de iluminación de 760 μm x 760 μm ; 1 carril de obtención de imágenes por canal de flujo; 48 mosaicos por carril; 8 canales por chip; cúmulos de tamaño promedio de 0,7 μm ; y longitud de lectura de 40 bases. Por lo tanto, rendimiento total = 8 canales x 48 mosaicos x 135 000 cúmulos/mosaico x 40 ciclos = 2,07 mil millones de bases (G).

20 El aumento del tamaño de la celda de flujo para aumentar la cantidad de mosaicos de los que se obtienen imágenes, la densidad de los cúmulos o la longitud de lectura, permitirá mejoras en la cantidad de bases generadas por celda de flujo. Es posible montar dos o cuatro cámaras en paralelo para obtener un sistema con dos o cuatro veces el rendimiento. En las Figuras 36 y 37 se muestra una configuración de dos cámaras. Es posible reducir el tiempo de análisis mediante el uso de técnicas tales como la integración con retraso de tiempo (TDI), lo que significa que la superficie se analiza de forma continua en lugar de obtener imágenes en mosaicos discretos. El instrumento se puede configurar para que lleve a cabo múltiples etapas del proceso químico con múltiples sistemas de fluido acoplados a un único sistema óptico. En el único sistema de proceso químico, el sistema óptico no obtiene imágenes cuando tienen lugar las etapas del proceso químico. Si las partes del proceso químico u obtención de imágenes del ciclo tienen extensiones similares, entonces durante 50 % del tiempo, el instrumento no registra ningún dato. Si se acelera más la parte de análisis del sistema, entonces un porcentaje aún mayor del tiempo de operación experimental se destina a realizar los procesos químicos. Esto puede disminuir si el sistema se configura de manera que múltiples celdas de flujo sean procesadas de forma simultánea, con una celda de flujo siempre sometida a la obtención de imágenes. Las representaciones esquemáticas de un portador de celda de flujo dual se ilustran en la Figura 43.

25 Si bien el sistema tal como se describe se muestra con la iluminación desde abajo y el objetivo en la parte superior, el sistema tal como se ilustra se puede invertir para iluminar desde la parte superior y tener el sistema de detección debajo. Véase anteriormente. La calefacción y la iluminación se pueden llevar a cabo de cualquier lado del sustrato, de manera que la calefacción del lado inferior y la iluminación del lado superior también se encuentren comprendidas por el alcance de la invención. La operación de sistemas comprendidos por el alcance de la invención se describe adicionalmente en los siguientes métodos generales.

30 Ejemplos para el uso del sistema en la secuenciación

Los siguientes son ejemplos de técnicas generales y similares (por ejemplo, para la formación de cúmulos de ácido nucleico) que se pueden poner en uso con los sistemas de la invención. Se entenderá que dichas descripciones y ejemplos no son necesariamente limitantes en cuanto a los sistemas actuales y su uso salvo que esto se establezca específicamente. Los métodos para formar y secuenciar cúmulos de ácido nucleico se describen en su totalidad en la solicitud de patente WO07010251, pero algunos elementos de estos protocolos se resumen a continuación.

Preparación de sustratos y formación de cúmulos de ácido nucleico

Recubrimiento de acrilamida de los chips de vidrio

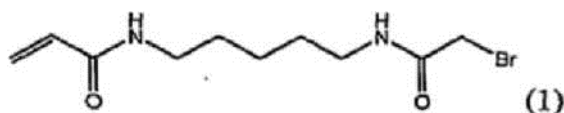
Los soportes sólidos utilizados para el acoplamiento del ácido nucleico a ser secuenciado son opcionalmente chips de vidrio de 8 canales, tal como los provistos por Silex Microsystems (Suecia). Sin embargo, las condiciones y los procedimientos experimentales también se pueden aplicar fácilmente a otros soportes sólidos. En algunas realizaciones, los chips se lavaron de la siguiente manera: Decon puro durante 30 minutos, milliQ H₂O durante 30 minutos, NaOH 1N durante 15 minutos, milliQ H₂O durante 30 minutos, FIC1 0,1N durante 15 minutos, milliQ H₂O durante 30 minutos. La preparación de la solución de polímero conllevó:

Para 10 ml de mezcla de polimerización al 2 %,

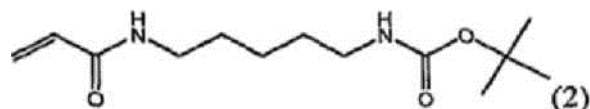
- 10 ml de solución de acrilamida al 2 % en milliQ H₂O;
- 165 μ l de una solución de 100mg/ml 1N-(5-bromoacetamidilpentil) acrilamida (BRAPA) en DMF (23,5 mg en 235 μ l de DMF);
- 11.5 μ l de TEMED; y,
- 100 μ l de una solución de 50 mg/ml de persulfato de potasio en milliQ H₂O (20 mg en 400 μ l de H₂O).

En dichas realizaciones, la solución de 10 ml de acrilamida se desgasificó en primer lugar con argón durante 15 minutos. Las soluciones de BRAPA, TEMED y persulfato de potasio se agregaron de forma sucesiva a la solución de acrilamida. Luego, la mezcla se mezcló en vórtex y se utilizó inmediatamente. Luego, la polimerización se llevó a cabo durante 1h 30 a temperatura ambiente. Después, los canales se lavaron con milliQ H₂O durante 30 minutos y se rellenaron con solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,1 M para su almacenamiento hasta que sea necesario.

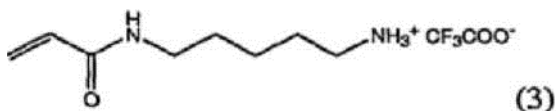
Síntesis de N-(5-bromoacetamidilpentil)acrilamida (BRAPA)



Se obtuvo ácido sulfónico N-Boc-1,5-diaminopentano tolueno de Novabiochem. El cloruro de bromoacetilo y el cloruro de acrililo se obtuvieron de Fluka. Todos los demás reactivos fueron productos Aldrich.



Se agregó cloruro de acrililo (1,13 ml, 1 eq) a una suspensión agitada de ácido sulfónico de N-Boc-1,5-diaminopentano tolueno (5,2 g, 13,88 mmol) y trietilamina (4,83 ml, 2,5 eq) en THF (120 ml) a 0°C a través de un embudo de adición con eculización de presión en el transcurso de una hora. Luego, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y el avance de la reacción se verificó mediante TLC (éter de petróleo: acetato de etilo, 1:1). Luego de dos horas, se filtraron las sales formadas durante la reacción y el filtrado se evaporó hasta la sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (éter de petróleo puro seguido de un gradiente de acetato de etilo hasta 60 %) para proporcionar 2,56 g (9,98 mmol, 71 %) del producto 2 como un sólido beige. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) : 1,20-1,22 (m, 2H, CH₂), 1,29-1,43 (m, 13H; tBu, 2xCH₂), 2,86 (q, 2H, J = 6,8 Hz y 12,9 Hz, CH₂), 3,07 (q, 2H, J = 6,8 Hz y 12,9 Hz, CH₂), 5,53 (dd, 1H, J = 2,3 Hz y 10,1 Hz, CH), 6,05 (dd, 1H, J = 2,3 Hz y 17,2 Hz, CH), 6,20 (dd, 1H, J = 10,1 Hz y 17,2Hz, CH), 6,77 (t, 1H, J = 5,3 Hz, NH), 8,04 (bs, 1H, NH). Masa (electrospray+) calculada para C₁₃H₂₄N₂O₃ 256, se observó 279 (256+Na⁺).



Se disolvió el producto 2 (2,56g, 10 mmol) en ácido trifluoroacético:diclorometano (1:9, 100 ml) y se agitó a temperatura ambiente. El progreso de la reacción se monitoreó mediante TLC (diclorometano: metanol 9:1). Al completarse, la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad, el residuo se co-evaporó tres veces con tolueno y luego se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (diclorometano puro seguido de un gradiente de metanol hasta 20 %). Se obtuvo el producto 3 como un polvo blanco (2,43 g, 9 mmol, 90 %). ¹H NMR (400 MHz, D₂O): 1,29-1,40 (m, 2H, CH₂), 1,52 (quint., 2H, J = Hz, CH₂), 1,61 (quint., 2H, J = 7,7 Hz, CH₂), 2,92 (t, 2H, J = 7,6 Hz, CH₂), 3,21 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₂), 5,68 (dd, 1H, J = 1,5 Hz y 10,1 Hz, CH), 6,10 (dd, 1H, J = 1,5 Hz y 17,2 Hz, CH), 6,20 (dd, 1H, J = 10,1 Hz y 17,2 Hz, CH). Masa (electrospray+) calculada para C₈H₁₆N₂O 156, se observó 179 (L56+Na⁺).

Se agregó cloruro de bromoacetilo (2,07 ml, 1,1eq) a una suspensión del producto 3 (6,12 g, 22,64 mmol) y trietilamina (6,94 ml, 2,2 eq) en THF (120 ml), a través de un embudo de adición con eculización de presión, en el transcurso de una hora y a -60°C (baño de hielo seco e isopropanol en un vaso Dewar). Luego, la mezcla de

reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y la reacción completa se verificó mediante TLC (diclorometano:metanol, 9:1) al día siguiente. Se filtraron las sales formadas durante la reacción y la mezcla de reacción se evaporó hasta la sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía (diclorometano puro seguido de un gradiente de metanol hasta 5 %).

- 5 Se obtuvieron 3,2 g (11,55 mmol, 51 %) del producto 1 (BRAPA) como un polvo blanco. Una recristalización adicional que se llevó a cabo en éter de petróleo:acetato de etilo proporcionó 3 g del producto 1. ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) : 1,21-1,30 (m, 2H, CH₂), 1,34-1,48 (m, 4H, 2xCH₂), 3,02-3,12 (m, 4H, 2xCH₂), 3,81 (s, 2H, CH₂), 5,56 (d, 1H, J = 9,85 Hz, CH), 6,07 (d, 1H, J = 16,9 Hz, CH), 6,20 (dd, 1H, J = 10,1 Hz y 16,9 Hz, CH), 8,07 (bs, 1H, NH), 8,27 (bs, 1H, NH). Masa (electrospray+) calculada para C₁₀H₁₇BrN₂O₂ 276 o 278, se observó 279 (278+H⁺), 299 (276+Na⁺).

El proceso de formación del cúmulo

Fluidos

- 15 En el caso de todas las etapas del fluido durante el proceso de formación del cúmulo, se utiliza opcionalmente una bomba peristáltica Ismatec IPC equipada con tubería Ismatec Ref 070534-051 (naranja/amarilla, diámetro interno de 0,51 mm). La bomba se inserta en dirección hacia delante (retirando los fluidos). Se instala una placa de desechos para recoger solución usada en la salida de la tubería de la bomba peristáltica. Durante cada etapa del proceso, se distribuyen las diferentes soluciones utilizadas en 8 tiras del microtubo del tubo con 1 tubo por tubería de entrada del chip a efectos de monitorear el bombeo correcto de las soluciones en cada canal. El volumen requerido por canal se especifica en cada etapa.

- 20 Control térmico

- 25 Con el fin de hacer posible la incubación a temperaturas diferentes durante el proceso de formación de cúmulos, el chip Silex se coloca en la parte superior de un termociclador MJ-Research. El chip se coloca en la parte superior de un bloque de cobre hecho a medida, el que se acopla al bloque de calefacción plano del termociclador. El chip se encuentra cubierto con un pequeño bloque Perspex y se mantiene en su lugar con cinta adhesiva. Tanto la bomba como el termociclador son controlados por secuencias de comandos informáticos que hacen que el usuario cambie soluciones entre cada etapa.

Injerto de cebadores en la superficie del chip recubierto por SFA

- 30 Un chip recubierto por SFA se coloca en un termociclador MJ-Research modificado y se acopla a una bomba peristáltica, tal como se describe anteriormente. La mezcla de injertos que consiste en 0,5 μM de un cebador directo y 0,5 μM de un cebador inverso en solución amortiguadora de fosfato 10 mM (pH 7,0) se bombea al interior de los canales del chip a una velocidad de flujo de 60 μl/min durante 75 segundos a 20°C. Luego, el termociclador se calienta hasta 51,6°C, y el chip se incuba a esta temperatura durante 1 hora. Durante este tiempo, la mezcla de injertos se somete a 18 ciclos de bombeo: la mezcla de injertos se bombea a 15 μl/min durante 20 segundos, luego la solución se bombea hacia adelante y hacia atrás (5 segundos hacia adelante a 15 μl/min, luego 5 segundos hacia atrás a 15 μl/min) durante 180 segundos. Luego de 18 ciclos de bombeo, el chip se lava mediante bombeo en 5x SSC/5 mM EDTA a 15 μl/min durante 300 segundos a 51,6°C. Luego, el termociclador se enfría hasta 20°C.

Hibridación de plantilla de ADN

- 40 Las plantillas de ADN a ser hibridadas al chip injertado se diluyen a la concentración requerida (actualmente, 0,5-2 μM) en 5x SSC/Tween 0,1 %. El ADN diluido se calienta en un bloque de calefacción a 100°C durante 5 minutos para desnaturalizar el ADN de cadena doble en cadenas simples adecuadas para la hibridación. Luego, el ADN se refrigera en el momento de forma inmediata en un baño de hielo/agua durante 3 minutos. Se giran brevemente los tubos que contienen el ADN en una centrífuga para recoger cualquier condensación y luego se transfiere a una tira de 8 tubos refrigerada previamente y se utiliza de inmediato.

- 45 El chip injertado que se mencionó anteriormente es cebado al bombear 5x SSC/Tween 0,1 % a 60 μl/min durante 75 segundos a 20°C. Luego, se calienta el termociclador hasta 98,5°C, y el ADN desnaturalizado se bombea a 15 μl/min durante 300 segundos. Se pone en uso una bomba adicional a 100 μl/min durante 10 segundos para eliminar las burbujas formadas al calentar la mezcla de hibridación. Luego, la temperatura se mantiene a 98,5°C durante 30 segundos, antes de enfriarse lentamente hasta 40,2°C en 19,5 minutos. El chip luego se lava mediante bombeo 0,3x SSC/Tween 0,1 % a 15 μl/min durante 300 segundos a 40,2°C. Luego se corre la secuencia de comandos sin interrupciones hasta la siguiente etapa.

Amplificación

- 55 Las moléculas de plantilla hibridada se amplifican mediante la unión de una reacción en cadena de la polimerasa con los cebadores injertados y una polimerasa termoestable. El amortiguador de amplificación que consiste en Tris 10 mM (pH 9,0), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, betaína 1 M y DMSO 1,3% se bombea en el chip a 15 μl/min durante 200 segundos a 40,2°C. Luego, la mezcla de amplificación del amortiguador mencionado anteriormente

complementado con dNTP 200 μ M y 25 U/ml de Taq polimerasa se bombea a 60 μ l/min durante 75 segundos a 40,2°C. Luego, el termociclador se calienta hasta 74°C y se mantiene a esta temperatura durante 90 segundos. Esta etapa hace posible la extensión de los cebadores unidos a la superficie con los que se hibridan las cadenas de la plantilla de ADN. Luego, el termociclador lleva a cabo 50 ciclos de amplificación mediante el calentamiento hasta 98,5°C durante 45 segundos (desnaturalización de cadenas unidas), 58°C durante 90 segundos (hibridación de cadenas con cebadores de la superficie) y 74°C durante 90 segundos (extensión del cebador). Al finalizar cada incubación a 98,5°C, se bombea una mezcla fresca de PCR en los canales del chip a 15 μ l/min durante 10 segundos. Así como provee reactivos frescos para cada ciclo de la PCR, esta etapa también remueve las cadenas de ADN y cebadores que se han desacoplado de la superficie y que podrían llevar a la contaminación entre los cúmulos. Al finalizar el termociclado, el chip se enfría hasta 20°C. Luego, el chip se lava al bombear 0,3x SSC/0,1 % Tween a 15 μ l/min durante 300 segundos a 74°C. El termociclador luego se enfría hasta 20°C.

Linealización

La mezcla de linealización que consiste en periodato de sodio 0,1 M y etanolamina 0,1 M se bombea en el chip a 15 μ l/min durante 1 hora a 20°C. Luego el chip se lava mediante bombeo en agua a 15 μ l/min durante 300 segundos a 20°C.

Bloqueo (opcional)

Esta etapa utiliza la transferasa terminal para incorporar un didesoxinucleótido en los extremos de OH en 3' libres de cadenas de ADN (tanto cebadores injertados como moléculas de cúmulo amplificado).

La solución amortiguadora de bloqueo que consiste en acetato de potasio 50 mM, Tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreitól 1 mM (pH 7,9) y 250 μ M de CoC12 se bombea en el chip a 15 μ l/min durante 200 segundos a 20°C. Luego, la mezcla de bloqueo de la solución amortiguadora mencionada anteriormente complementada con 2,4 μ M de ddNTP y 250 U/ml de transferasa terminal se bombea a 15 μ l/min durante 300 segundos a 37,7°C. El termociclador se mantiene a 37,7°C durante 30 minutos, mientras que la mezcla de bloqueo se bombea en el chip a 15 μ l/min durante 20 segundos cada 3 minutos. Luego del bloqueo, el chip se lava al bombear 0,3x SSC/Tween 0,1 % a 15 μ l/min durante 300 segundos a 20°C.

Desnaturalización de cúmulos e hibridación de cebador de secuenciación

Esta etapa utiliza NaOH para desnaturalizar y lavar una de las cadenas de los cúmulos amplificados, linealizados y bloqueados. Luego de un lavado para eliminar el NaOH, se hibrida el cebador de secuenciación con las cadenas simples que quedan en la superficie.

Luego del bloqueo, se desnaturaliza el ADN de cadena doble en los cúmulos al bombear NaOH 0,1N a 15 μ l/min durante 300 segundos a 20°C. El chip luego se lava al bombear TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) a 15 μ l/min durante 300 segundos a 20°C. El cebador de secuenciación se diluye a 0,5 μ M en 5x SSC/Tween 0,1 %, y se bombea en los canales a 15 μ l/min durante 300 segundos a 20°C. El termociclador luego se calienta hasta 60°C y se mantiene a esta temperatura durante 15 minutos. Luego, el termociclador se enfría hasta 40,2°C y el chip se lava al bombear 0,3x SSC/Tween 0,1 % a 15 μ l/min durante 300 segundos.

En ese momento, los cúmulos están preparados para la enzimología de secuenciación del primer ciclo, por ejemplo, con los sistemas y los dispositivos de la presente invención.

La secuencia de ADN utilizada en este proceso fue una monoplantilla de secuencia simple de 400 bases con extremos complementarios a los cebadores injertados. El ADN dúplex se desnaturalizó tal como se describe anteriormente.

Injertos de cebadores

Los cebadores suelen ser oligonucleótidos de 5-fosforotioato que incorporan cualquier secuencia específica o modificación necesaria para la escisión. Sus secuencias y proveedores varían de acuerdo con el experimento en el que se usarán y, en este caso, eran complementarias a los extremos en 5' del dúplex de plantilla.

Secuenciación de cúmulos linealizados

Los cúmulos amplificados contenían un enlace diol en uno de los cebadores injertados. Los enlaces diol se pueden introducir al incluir un enlace adecuado en uno de los cebadores utilizados para la amplificación de fase sólida.

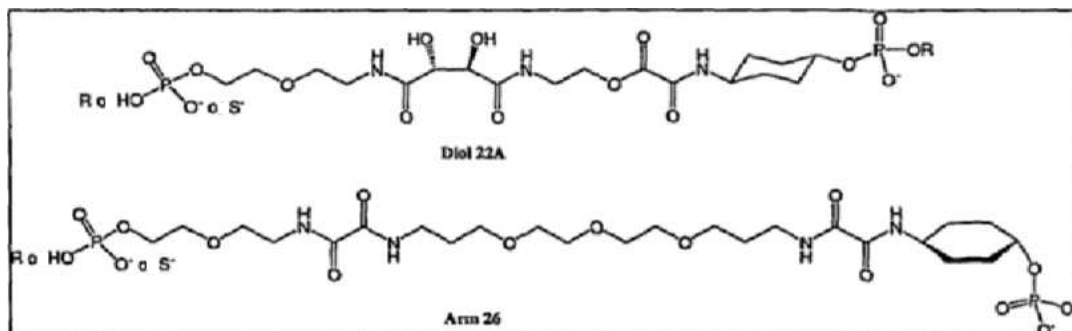
Los cebadores adecuados que incluyen cualquier secuencia específica de la plantilla deseada se pueden producir mediante técnicas estándar de síntesis de ADN automática con componentes disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Fidelity Systems Inc., ATD).

Un cebador que contiene diol escindible tendría normalmente la siguiente estructura:

5'-fosforotioato-arm 26-diol 22A-secuencia-3' OH.

En donde «secuencia» representa una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con la plantilla a ser amplificada.

Las estructuras de los componentes de arm26 y diol22A (de Fidelity Systems Inc, MD, EUA) son las siguientes:



- 5 Los productos que contienen dichos enlaces diol se pueden escindir con periodato, tal como se describió anteriormente, y los polinucleótidos de cadena simple resultantes se hibridan tal como se describió anteriormente.

Ciclos de secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo con nucleótidos modificados preparados tal como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004/018493, y etiquetados con cuatro fluoróforos distintos disponibles comercialmente (Molecular Probes Inc.).

- 10 Se utilizó una enzima de la 9^ªN polimerasa con mutación (una exo-variante que incluye la mutación triple L408Y/Y409A/P410V y C223S) para las etapas de incorporación de nucleótidos.

La mezcla de incorporación, la solución amortiguadora de incorporación (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgSO₄ 6 mM, EDTA 1 mM, 0,05 % (v/v) Tween-20, NaCl 50 mM) además de YAV exo- C223S 110 nM, y 1 μM cada uno de los cuatro nucleótidos etiquetados, se aplicó a las plantillas en cúmulos y se calentó hasta 45°C.

- 15 Las plantillas se mantuvieron a 45°C durante 30 minutos, se enfriaron hasta 20°C y se lavaron con solución amortiguadora de incorporación, luego con 5x SSC/Tween 20 0,05 % . Luego, las plantillas se expusieron a solución amortiguadora para la obtención de imágenes (Tris 100 mM pH7,0, NaCl 30 mM, Tween 20 0,05 %, ascorbato de sodio 50 mM, recién disuelto).

Las plantillas se analizaron en 4 colores a temperatura ambiente.

- 20 Luego, las plantillas se expusieron a ciclos de secuenciación de escisión e incorporación de la siguiente manera:

Escisión

Cebador con solución amortiguadora de escisión (Tris 0,1 M pH 7,4, NaCl 0,1 M y Tween 20 0,05 %). Calentar hasta 60°C

Tratar los cúmulos con mezcla de escisión (TCEP 100 mM en solución amortiguadora de escisión).

- 25 Esperar un total de 15 minutos además de bombear solución amortiguadora fresca cada 4 minutos,

Enfriar hasta 20°C.

Lavar con solución amortiguadora de enzimología.

Lavar con 5X SSC/Tween 20 0,05 %.

Cebador con solución amortiguadora para la obtención de imágenes.

- 30 Analizar en 4 colores a temperatura ambiente

Incorporación

Cebadora con solución amortiguadora de incorporación. Calentar hasta 60°C.

Tratar con mezcla de incorporación. Esperar un total de 15 minutos además de bombear mezcla de incorporación fresca cada 4 minutos,

- 35 Enfriar hasta 20°C.

ES 2 675 047 T3

Lavar con solución amortiguadora de incorporación.

Lavar con 5X SSC/Tween 20 0,05 %.

Cebador con solución amortiguadora para la obtención de imágenes.

Analizar en 4 colores a temperatura ambiente

- 5 Repetir el proceso de incorporación y escisión durante tantos ciclos como sea necesario. Los nucleótidos incorporados se detectaron con el aparato de obtención de imágenes por fluorescencia descrito anteriormente.

De manera alternativa, la celda de flujo se puede secuenciar de forma completamente automática, con la primera incorporación realizada en este instrumento, tal como se describe a continuación.

- 10 Luego de configurar la celda de flujo en el colector del instrumento, las plantillas se pueden exponer a los ciclos de secuenciación descritos a continuación: incorporación de primera base, obtención de imágenes luego escisión alternante, obtención de imágenes e incorporación, etapas de obtención de imágenes para tantos ciclos de secuenciación como sea necesario.

Incorporación de primera base

Bompear 1000 ul de solución amortiguadora de incorporación a temperatura ambiente

- 15 Fijar la temperatura a 55°C y mantenerla

Esperar durante 2 minutos

Bompear 600 ul de mezcla de incorporación

Esperar durante 4 minutos

Bompear 200 ul de mezcla de incorporación

- 20 Esperar durante 4 minutos

Bompear 200 ul de mezcla de incorporación

Esperar durante 4 minutos

Fijar la temperatura a 22°C

Esperar durante 2 minutos

- 25 Bompear 600 ul de solución amortiguadora de incorporación

Bompear 600 ul de solución amortiguadora de sal elevada

Bompear 800 ul de mezcla de análisis

Detener refrigeración activa

Etapas de obtención de imágenes

- 30 Escisión

Bompear 1000 ul de solución amortiguadora de escisión a temperatura ambiente

Fijar la temperatura a 55°C y mantenerla

Esperar durante 2 minutos

Bompear 600 ul de mezcla de escisión

- 35 Esperar durante 4 minutos

Bompear 200 ul de mezcla de escisión

Esperar durante 4 minutos

Bompear 200 ul de mezcla de escisión

Esperar durante 4 minutos

Bombear 600 ul de solución amortiguadora de incorporación

Bombear 600 ul de solución amortiguadora de sal elevada

Bombear 800 ul de mezcla de análisis

Detener refrigeración activa

5 Etapa de obtención de imágenes

Incorporación

Bombear 1000 ul de solución amortiguadora de incorporación a temperatura ambiente

Fijar la temperatura a 55°C y mantenerla

Esperar durante 2 minutos

10 Bombear 600 ul de mezcla de incorporación

Esperar durante 4 minutos

Bombear 200 ul de mezcla de incorporación

Esperar durante 4 minutos

Bombear 200 ul de mezcla de incorporación

15 Esperar durante 4 minutos

Fijar la temperatura a 22°C y mantenerla

Esperar durante 2 minutos

Bombear 600 ul de solución amortiguadora de incorporación

Bombear 600 ul de solución amortiguadora de sal elevada

20 Bombear 800 ul de mezcla de análisis

Detener refrigeración activa.

Se registró cada mosaico de cada chip para el proceso no completamente automático mencionado anteriormente en cada uno de los cuatro colores que corresponden a los nucleótidos etiquetados. Las imágenes se analizaron para elegir el color más brillante para cada cúmulo y este análisis de intensidad de la imagen se utilizó para identificar la base para cada cúmulo en cada ciclo. Las imágenes de cada ciclo se colocaron para obtener la secuencia que corresponde a cada cúmulo. Al conocerse la secuencia de cada cúmulo, y ser la misma para cada cúmulo en el experimento precedente, se podrían analizar las tasas de error (es decir, los cúmulos no identificados como la secuencia correcta) para cada ciclo de incorporación de nucleótidos. Las tasas de error fueron menos de 1 % para los primeros 20 ciclos del experimento, lo que quiere decir que la secuencia conocida de la monoplantilla se identificó correctamente.

30

REIVINDICACIONES

1. sistema configurado para secuenciar uno o más polinucleótidos que comprende:
- a) plataforma configurada para contener un sustrato sólido que tiene uno o más polinucleótidos unidos a este;
- 5 b) sistema de dirección de fluido para poner, de manera que se pueda controlar, uno o más reactivos que tengan etiquetas fluorescentes en contacto con los polinucleótidos;
- c) sistema de control de temperatura para regular una temperatura de al menos uno del sustrato sólido o de los reactivos;
- d) sistema de iluminación para excitar las etiquetas fluorescentes a través de reflexión interna total (TIR) que
10 comprende al menos un láser de excitación acoplado a través de una fibra óptica multimodal con un índice de refracción que cambia de forma dinámica para obtener una huella de iluminación sustancialmente uniforme;
- e) componente de detección configurado para aproximarse al soporte sólido para detectar la fluorescencia producida por la excitación de las etiquetas fluorescentes mediante el sistema de iluminación;
- f) sistema informático acoplado de forma operativa al componente de detección en donde el sistema
15 informático comprende un conjunto de instrucciones para adquirir imágenes de fluorescencia del componente de detección y determinar una secuencia de polinucleótidos a partir de la fluorescencia detectada.
2. El sistema de la reivindicación 1, en donde el sustrato sólido se puede desplazar en una dirección distal al componente de detección con el objetivo de que el sistema de control de temperatura regule la temperatura del sustrato sólido.
3. El sistema de la reivindicación 1, en donde el sustrato sólido comprende una celda de flujo con uno o más
20 canales de fluido en los que se unen los polinucleótidos.
4. El sistema según la reivindicación 1, en donde dicho sustrato sólido es un arreglo de esferas.
5. El sistema de la reivindicación 1, en donde los reactivos comprenden componentes para extender una segunda secuencia complementaria a uno o más polinucleótidos.
6. El sistema según la reivindicación 5, en donde dichos reactivos son nucleósido trifosfatos etiquetados por
25 fluorescencia.
7. El sistema según la reivindicación 5, en donde dichos reactivos son oligonucleótidos etiquetados por fluorescencia.
8. El sistema de la reivindicación 1, en donde el sistema de iluminación comprende múltiples láseres de
30 excitación acoplados a través de la fibra óptica multimodal, en donde dicha fibra óptica multimodal se deforma físicamente para obtener la huella de iluminación sustancialmente uniforme.
9. El sistema según la reivindicación 8, en donde dicha deformación física es consecuencia de compresión o vibración.
10. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente de detección comprende una cámara CCD.
11. El sistema de la reivindicación 1, en donde dicho componente de detección comprende dos cámaras CCD.
- 35 12. El sistema de la reivindicación 1, en donde el componente de detección comprende un mecanismo de autofocus.
13. El sistema de la reivindicación 1 que comprende dos estaciones de fluido para operar en dos celdas de flujo de forma simultánea.
- 40 14. El sistema de la reivindicación 1, en donde el sistema de iluminación comprende dos láseres de excitación acoplados a través de un dispositivo de fibra óptica, en donde dichos dos láseres de excitación iluminan al menos parte de una misma área.
15. El sistema de la reivindicación 11, en donde los reactivos incluyen cuatro nucleótidos diferentes con
45 etiquetas fluorescentes respectivas, el componente de detección también comprende cuatro filtros ópticos adecuados para una emisión de fluorescencia de los cuatro nucleótidos etiquetados por fluorescencia y para la longitud de onda de la luz de los láseres.

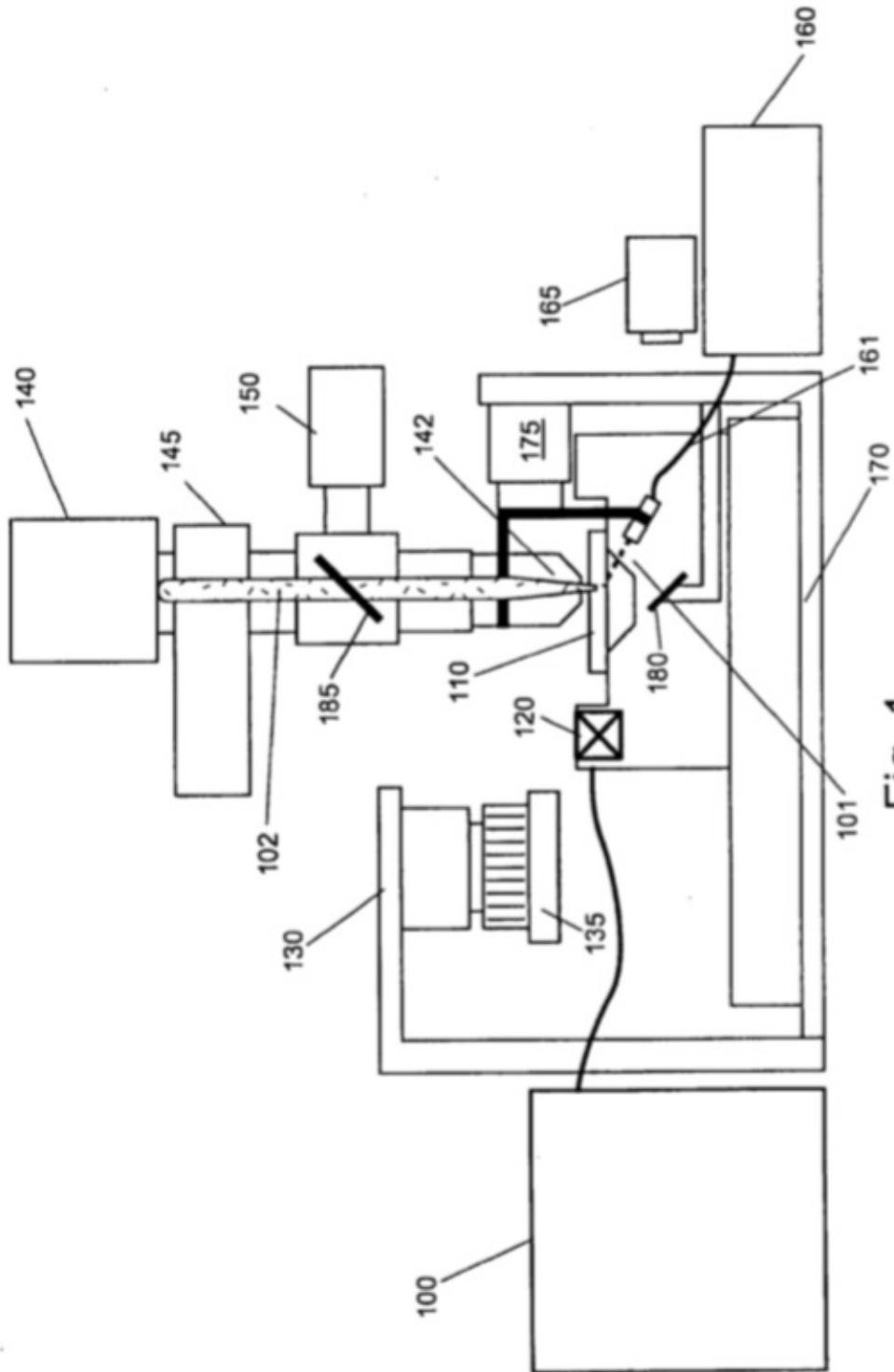


Fig. 1

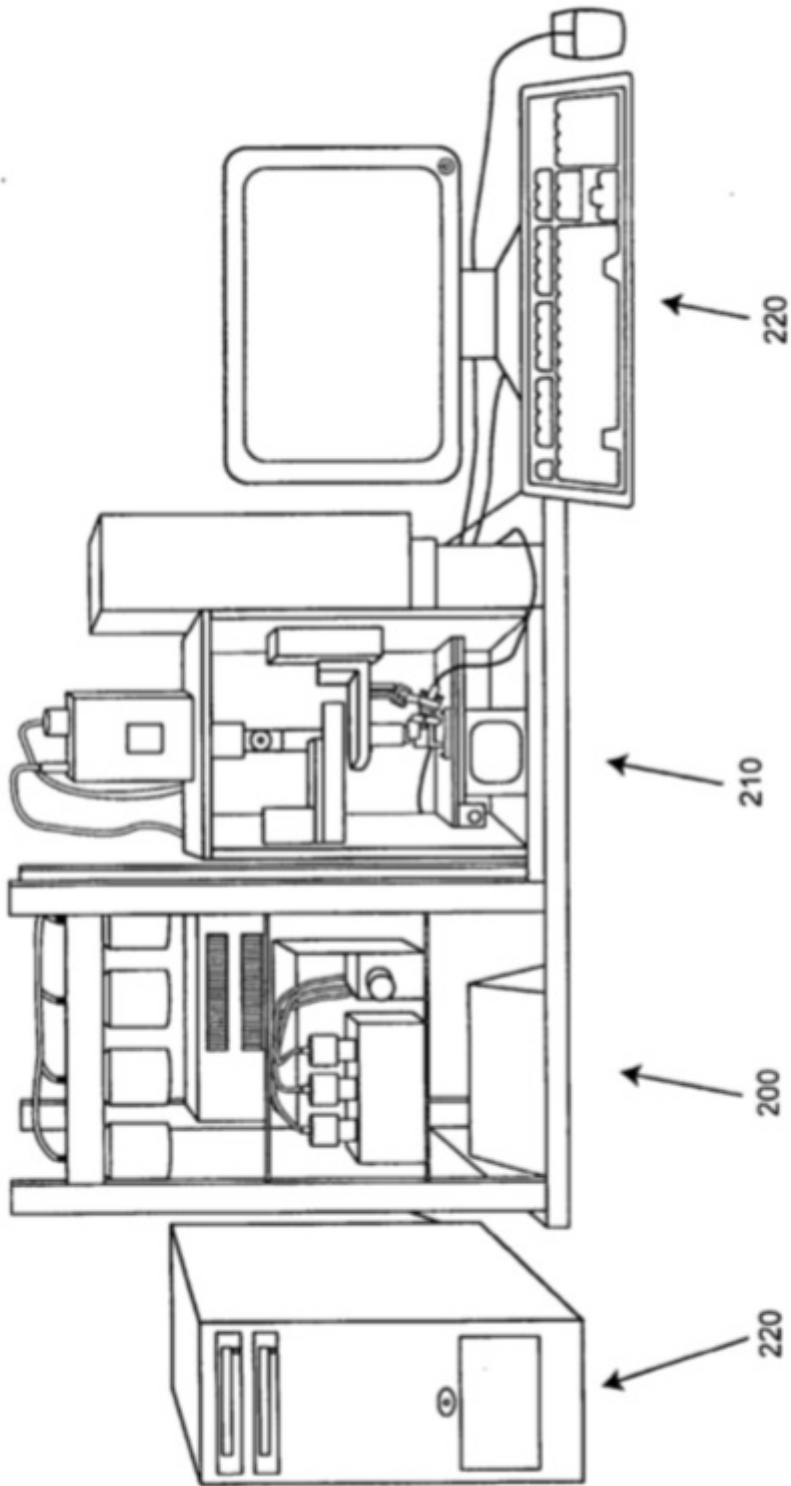


Fig. 2

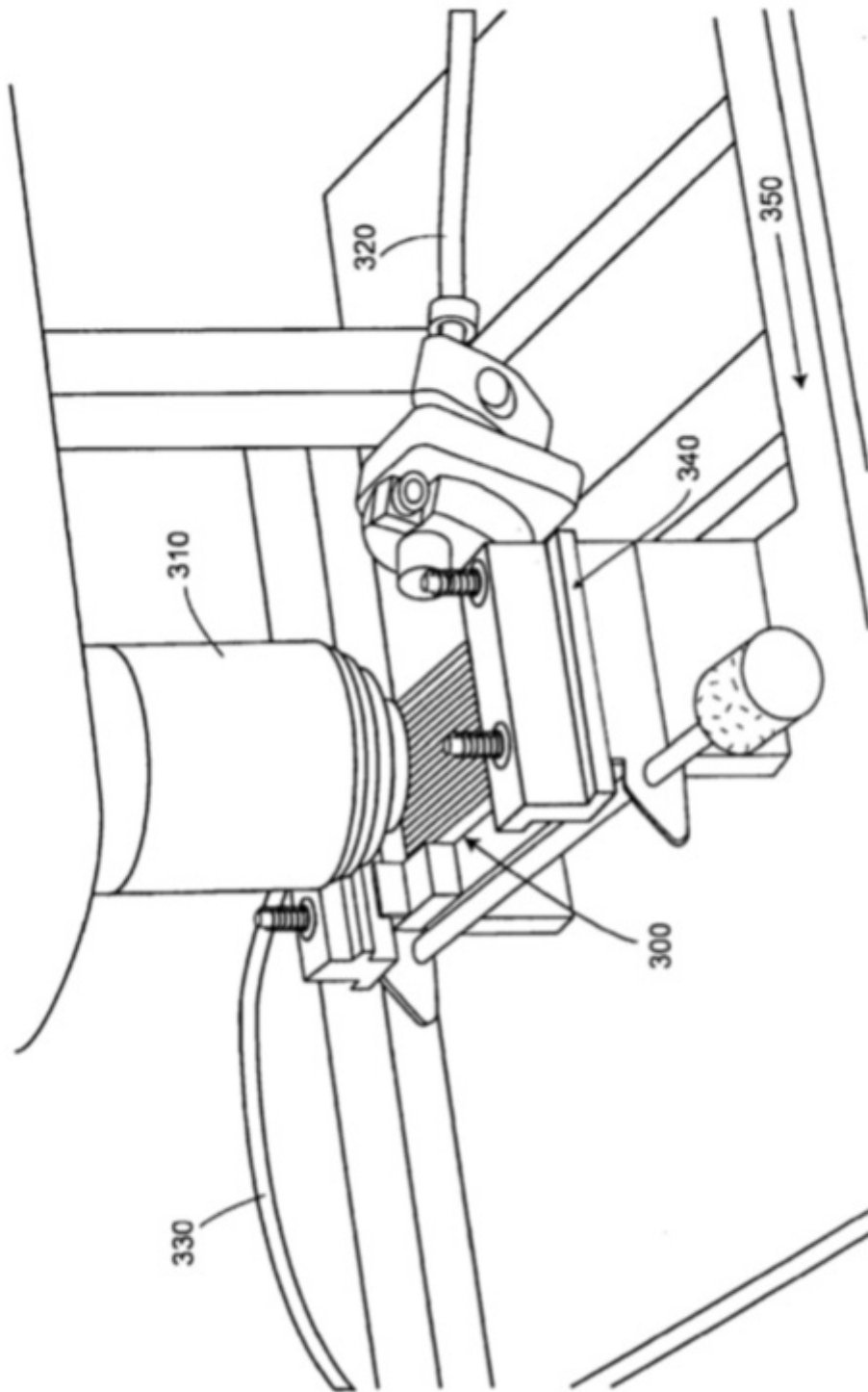


Fig. 3

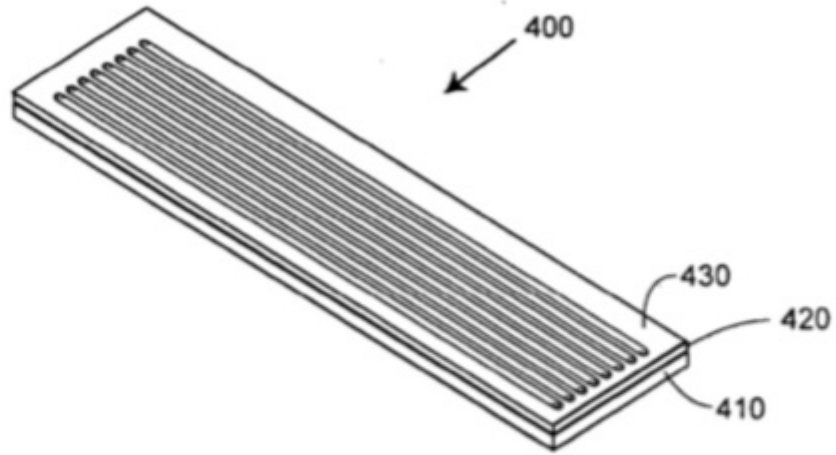


Fig. 4A

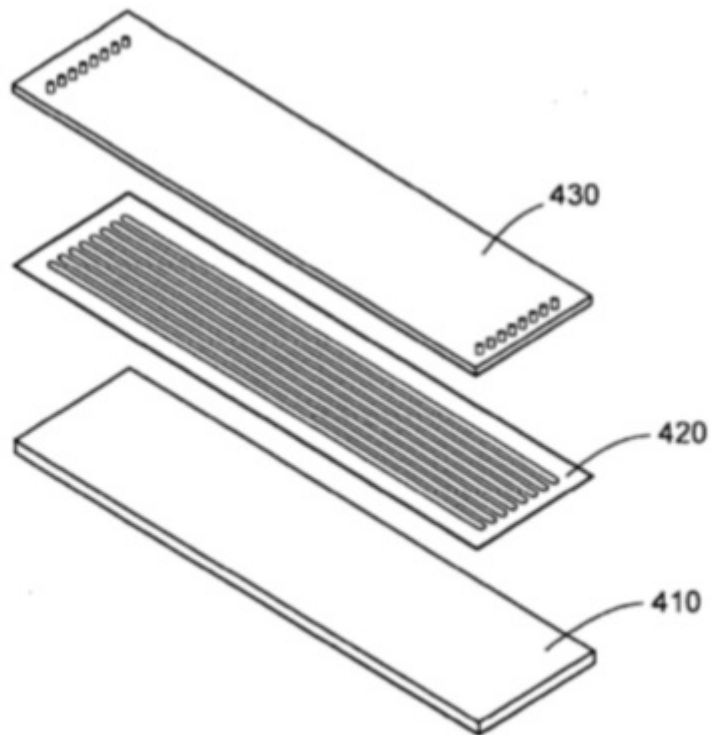


Fig. 4B

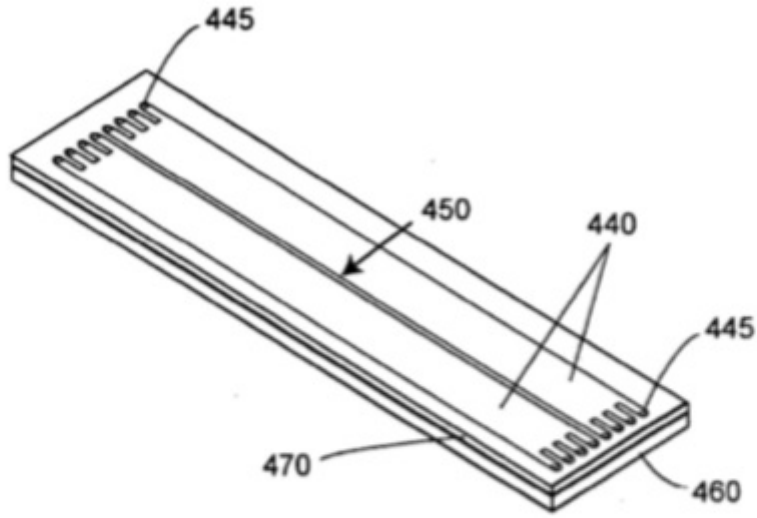


Fig. 4C

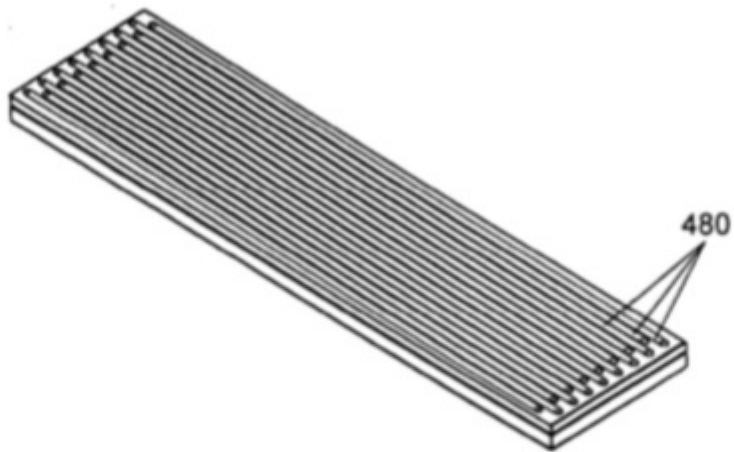


Fig. 4D

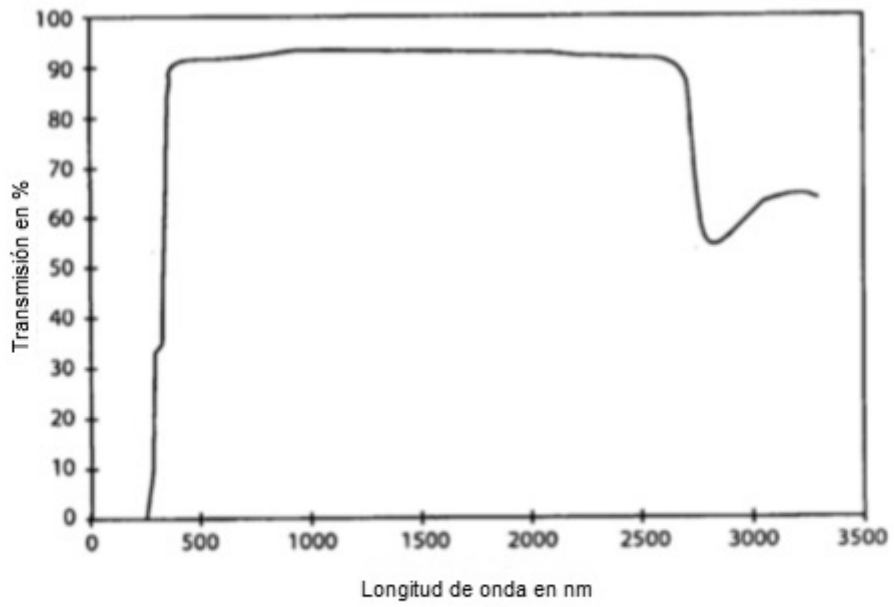
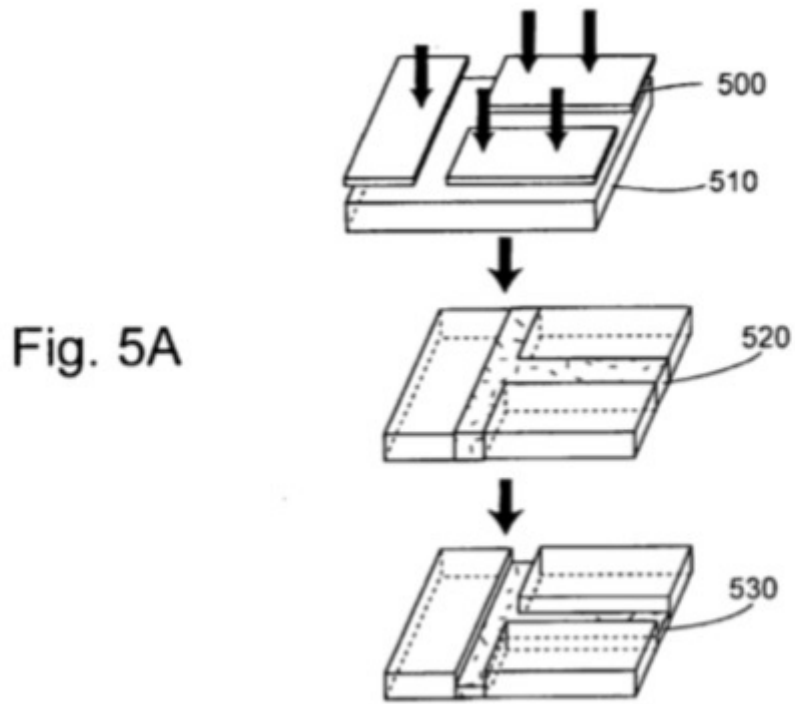


Fig. 5B

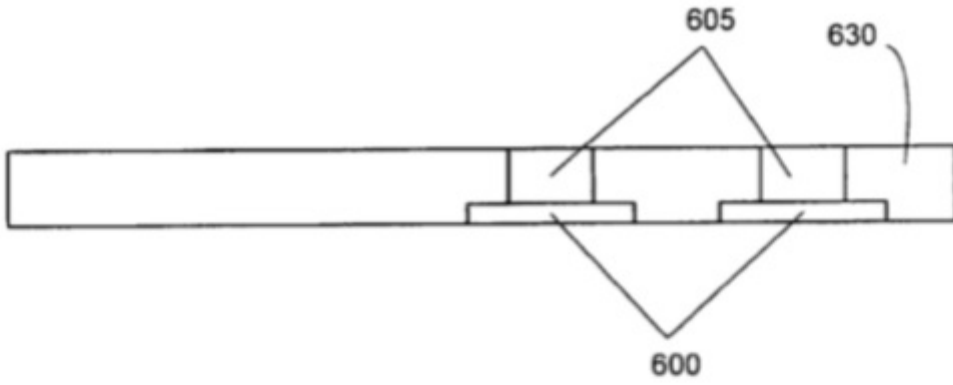


Fig. 6A

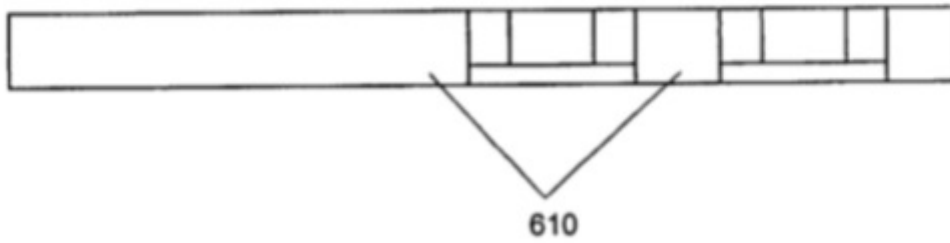


Fig. 6B

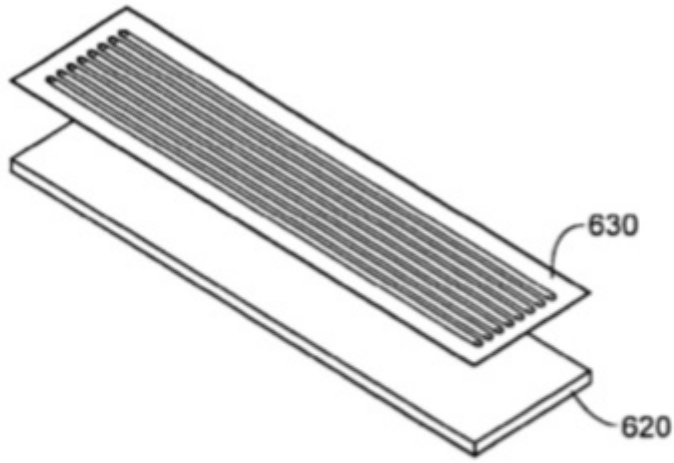


Fig. 6C

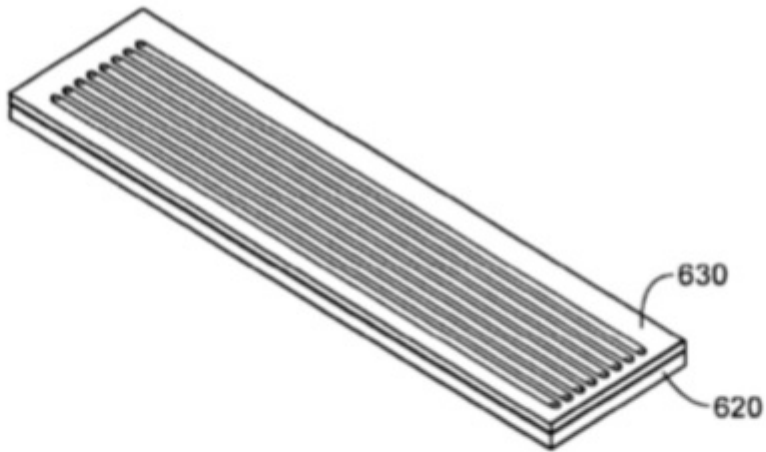


Fig. 6D

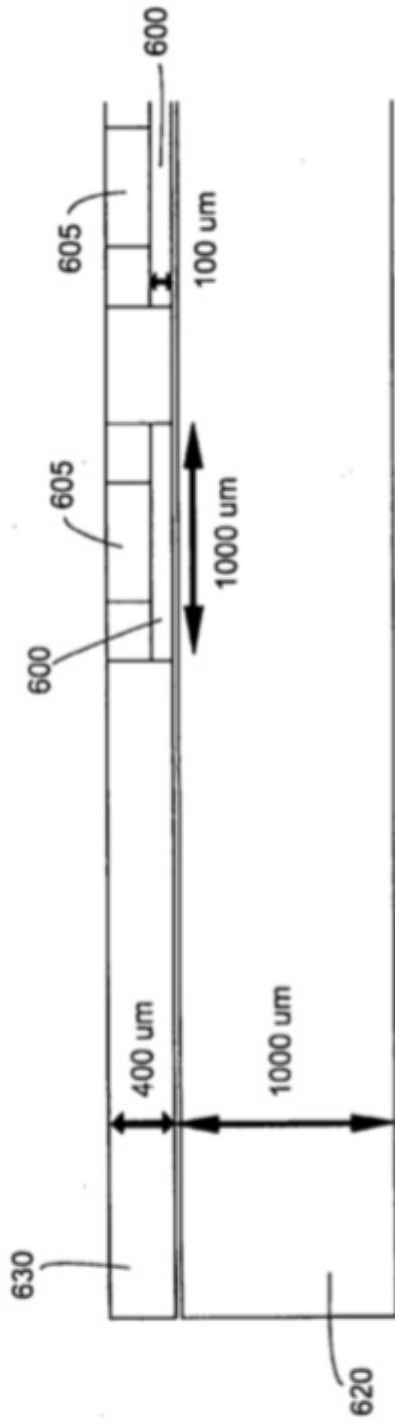


Fig. 6E

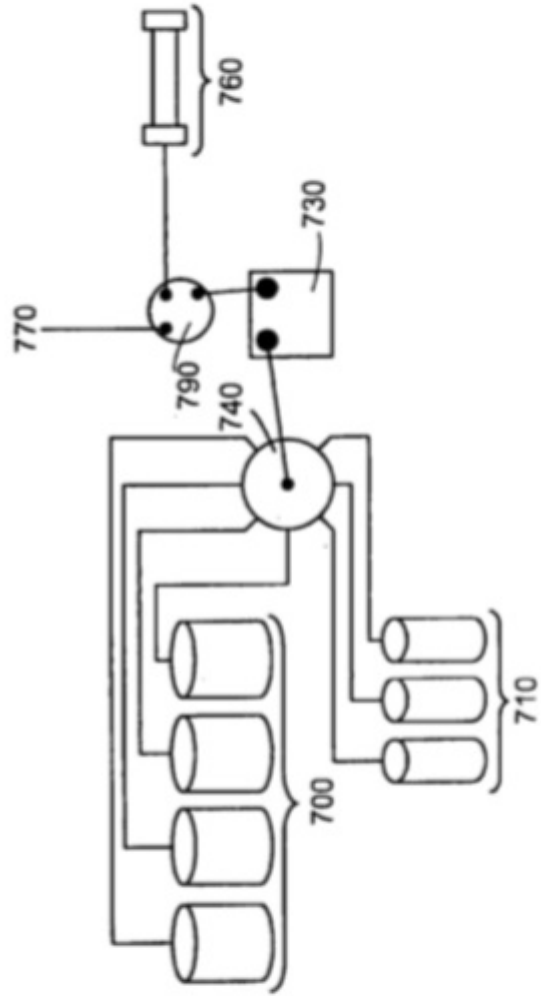


Fig. 7A

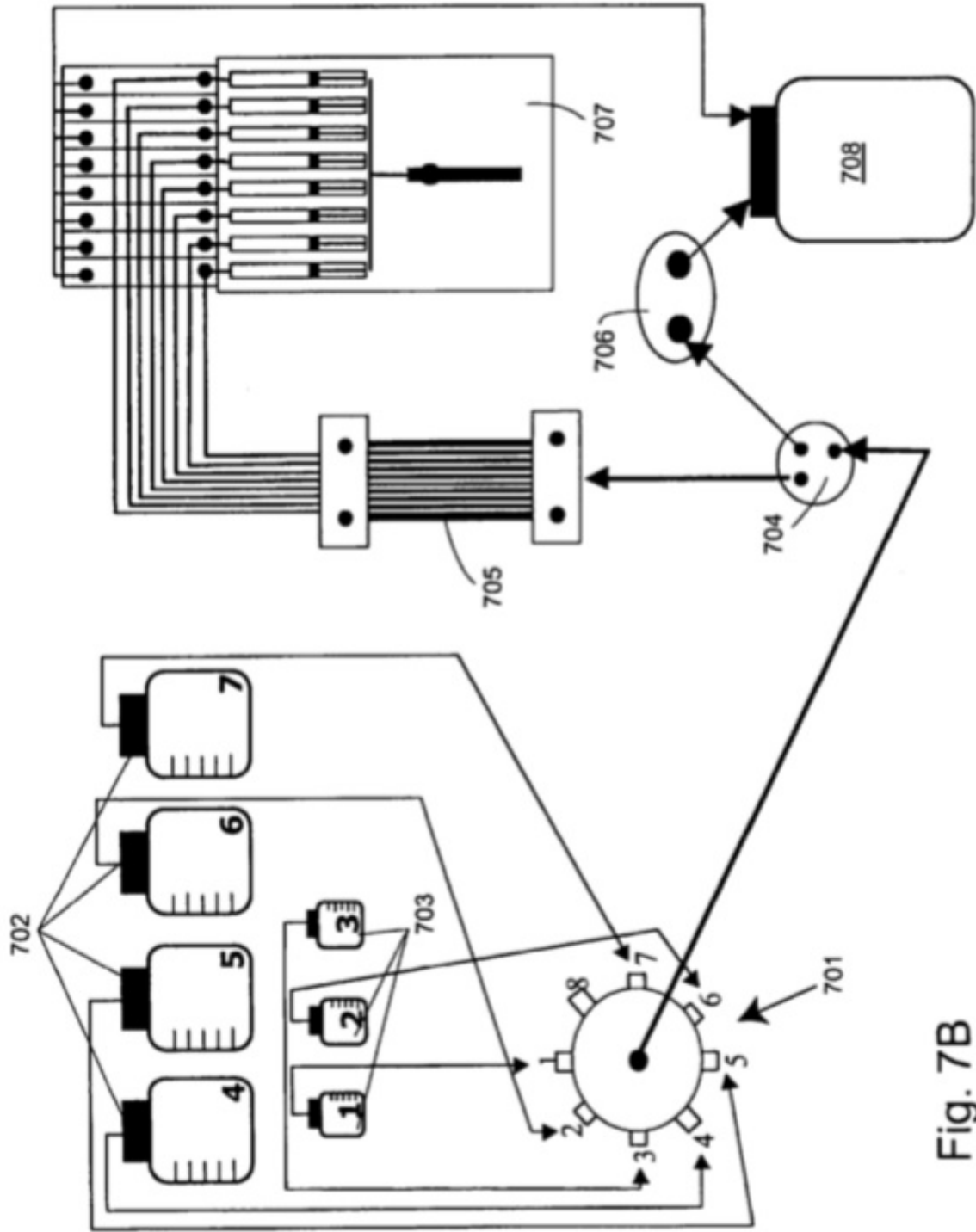


Fig. 7B

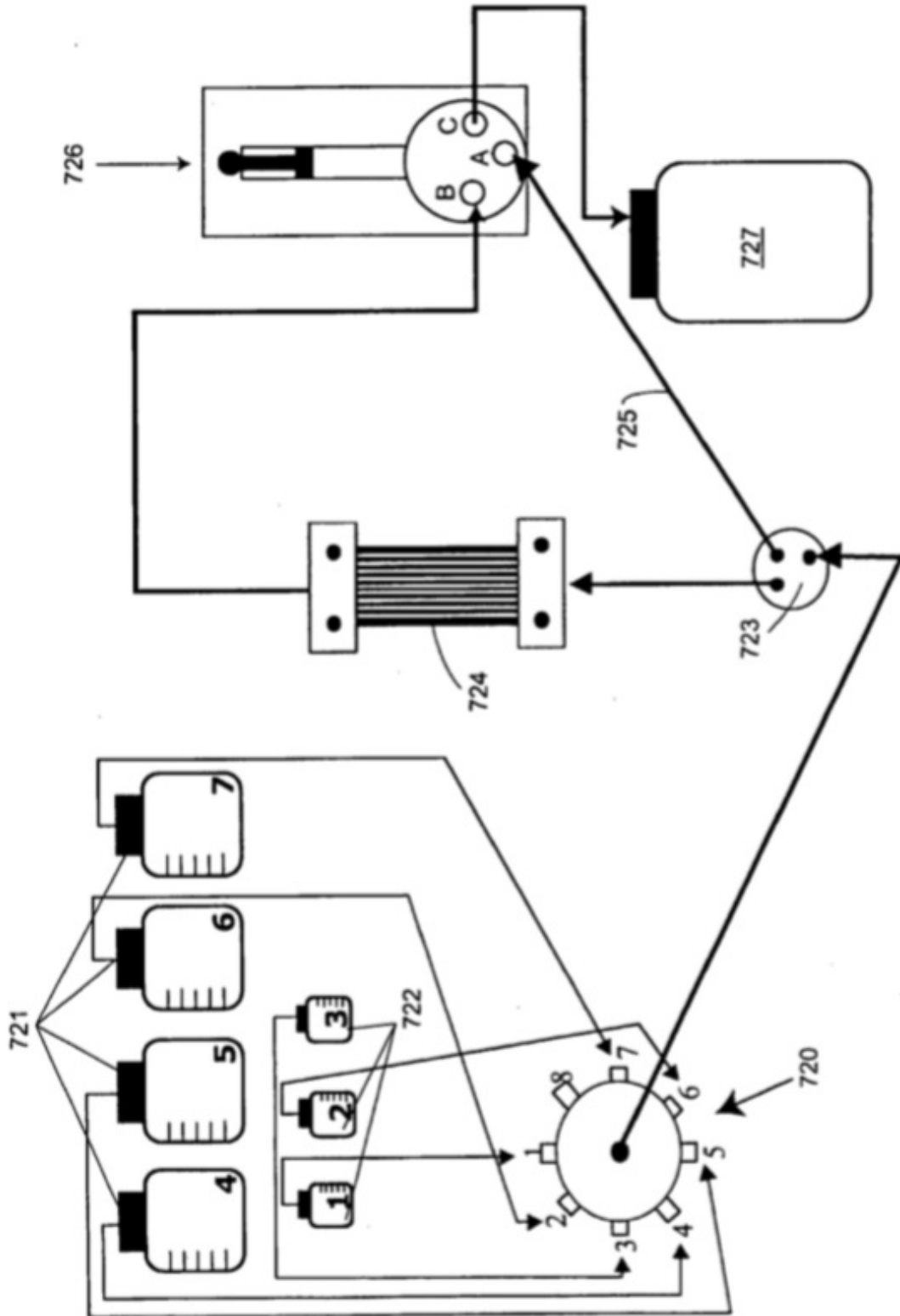


Fig. 7C

Fig. 8

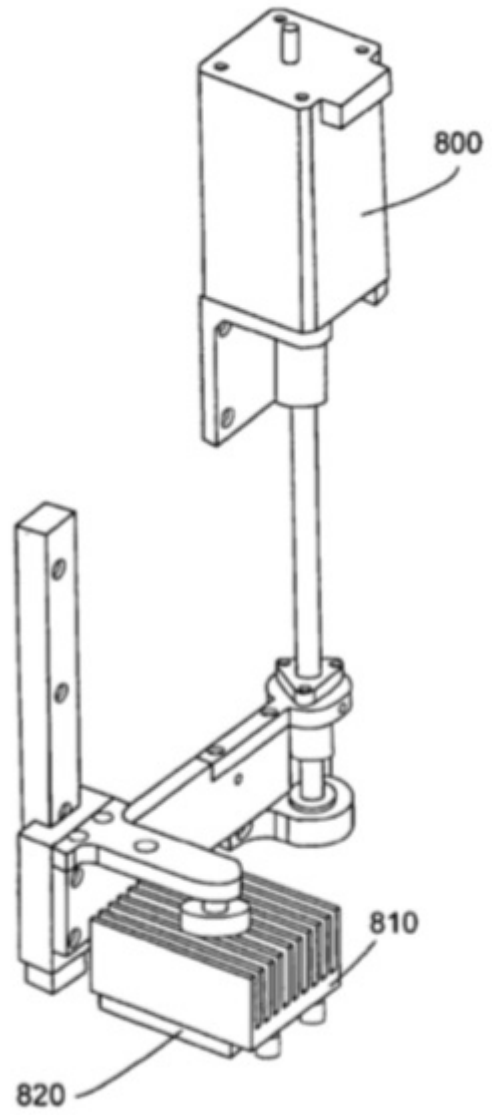
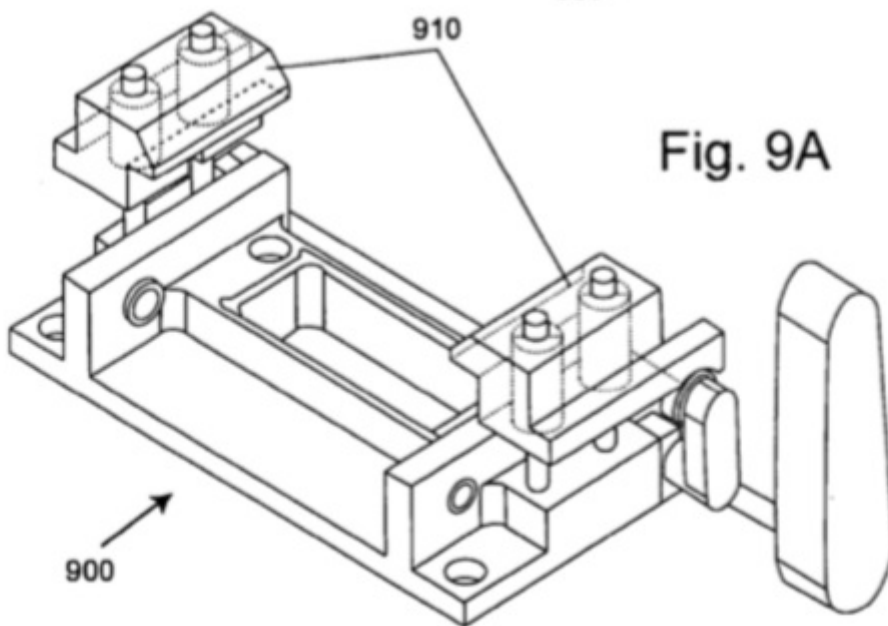


Fig. 9A



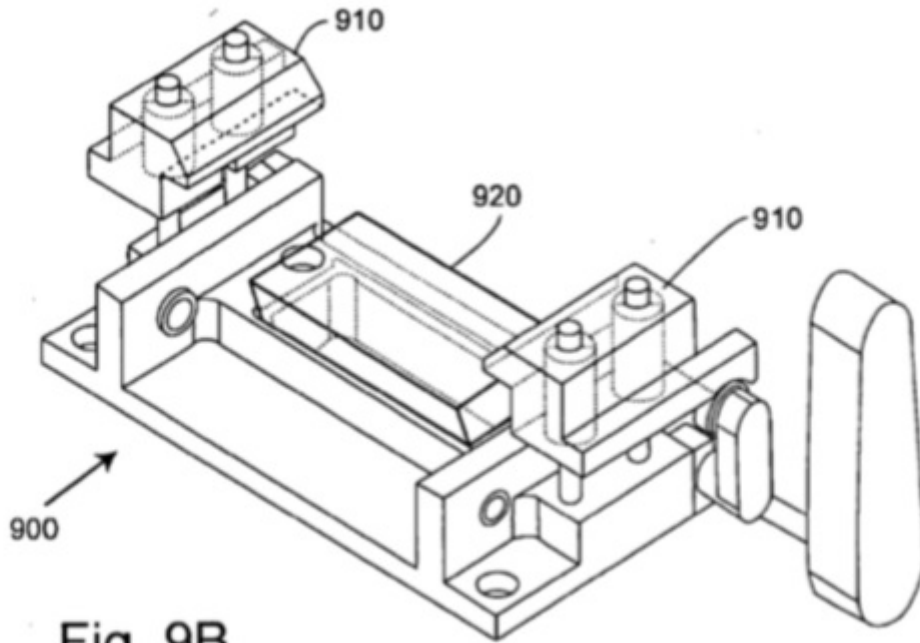


Fig. 9B

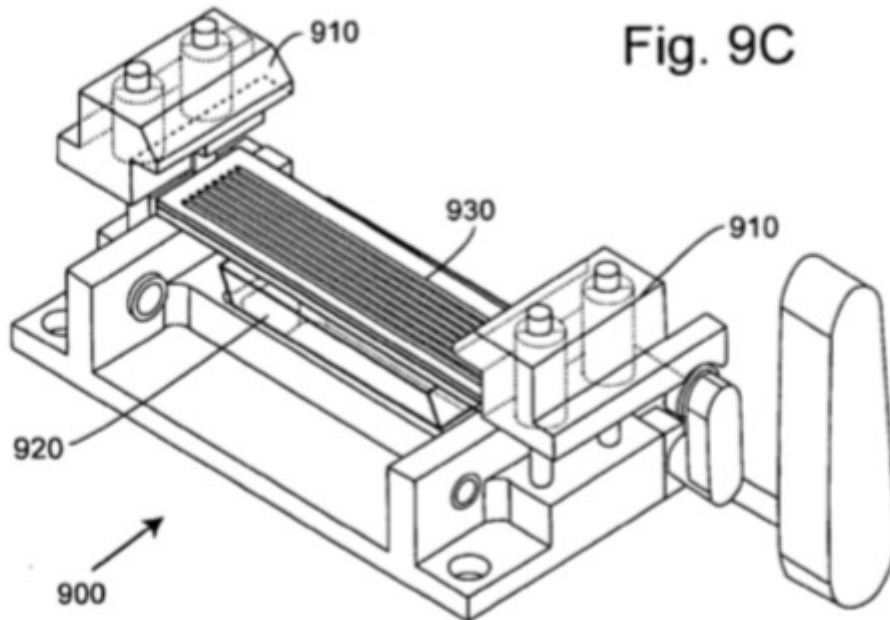


Fig. 9C

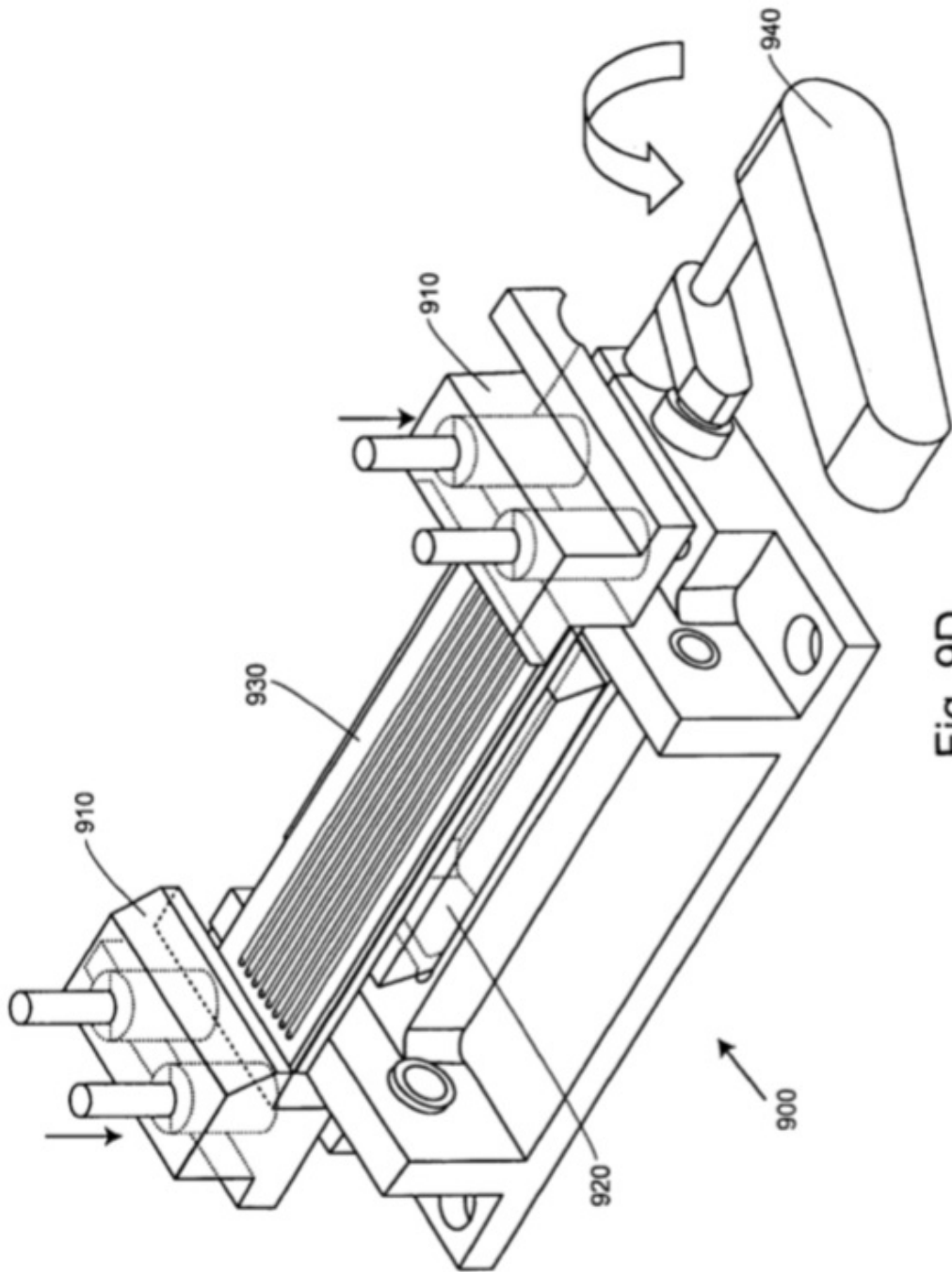


Fig. 9D

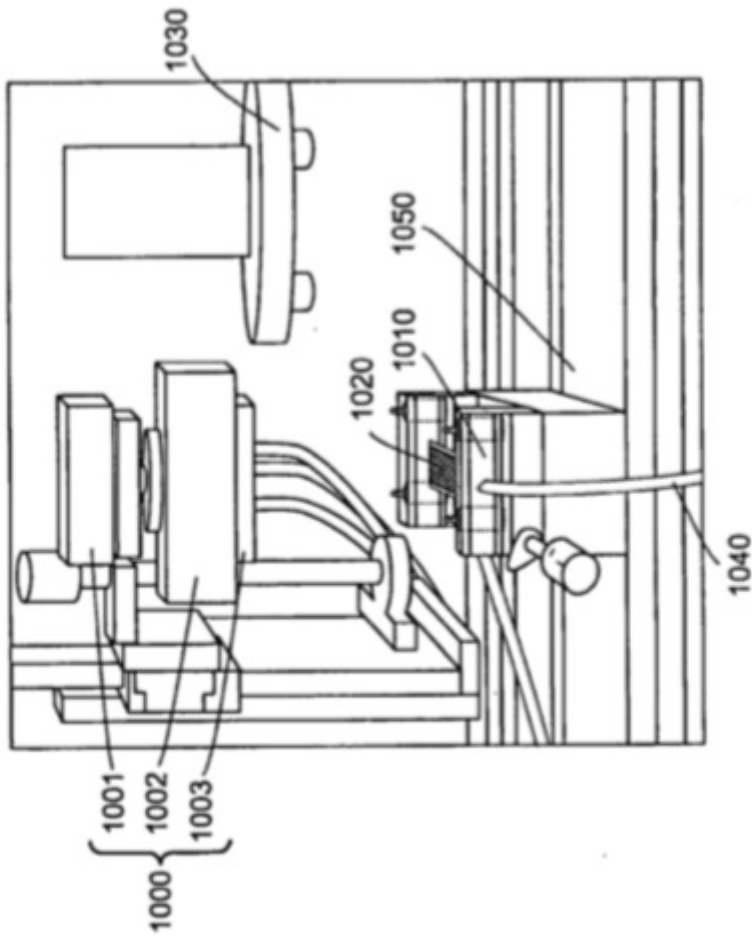
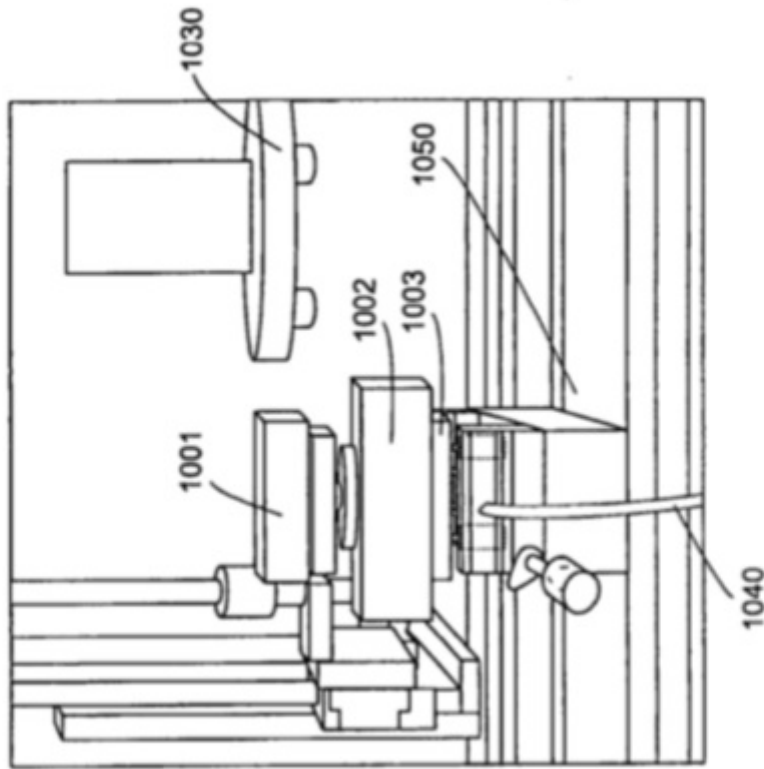


Fig. 10A

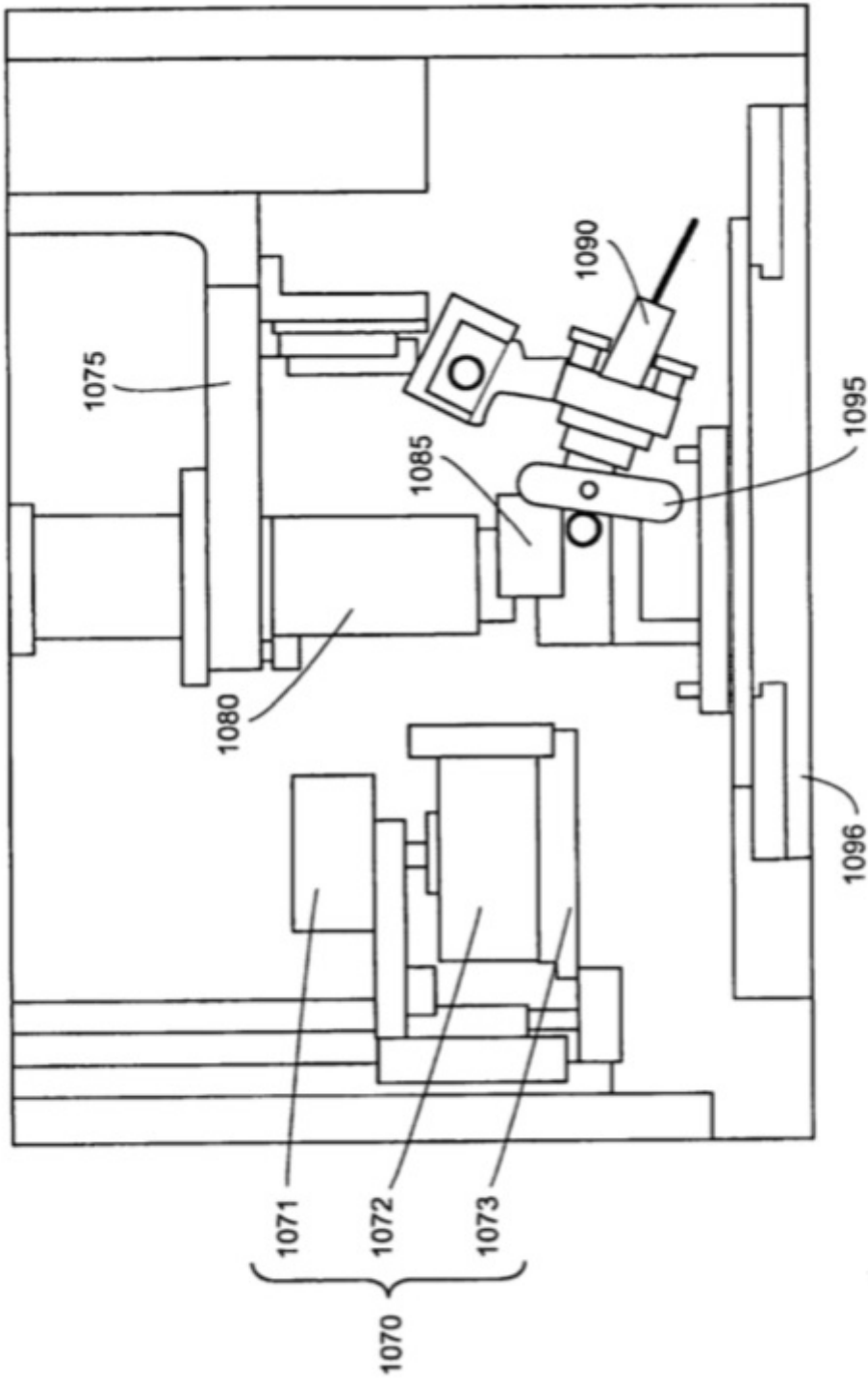


Fig. 10B

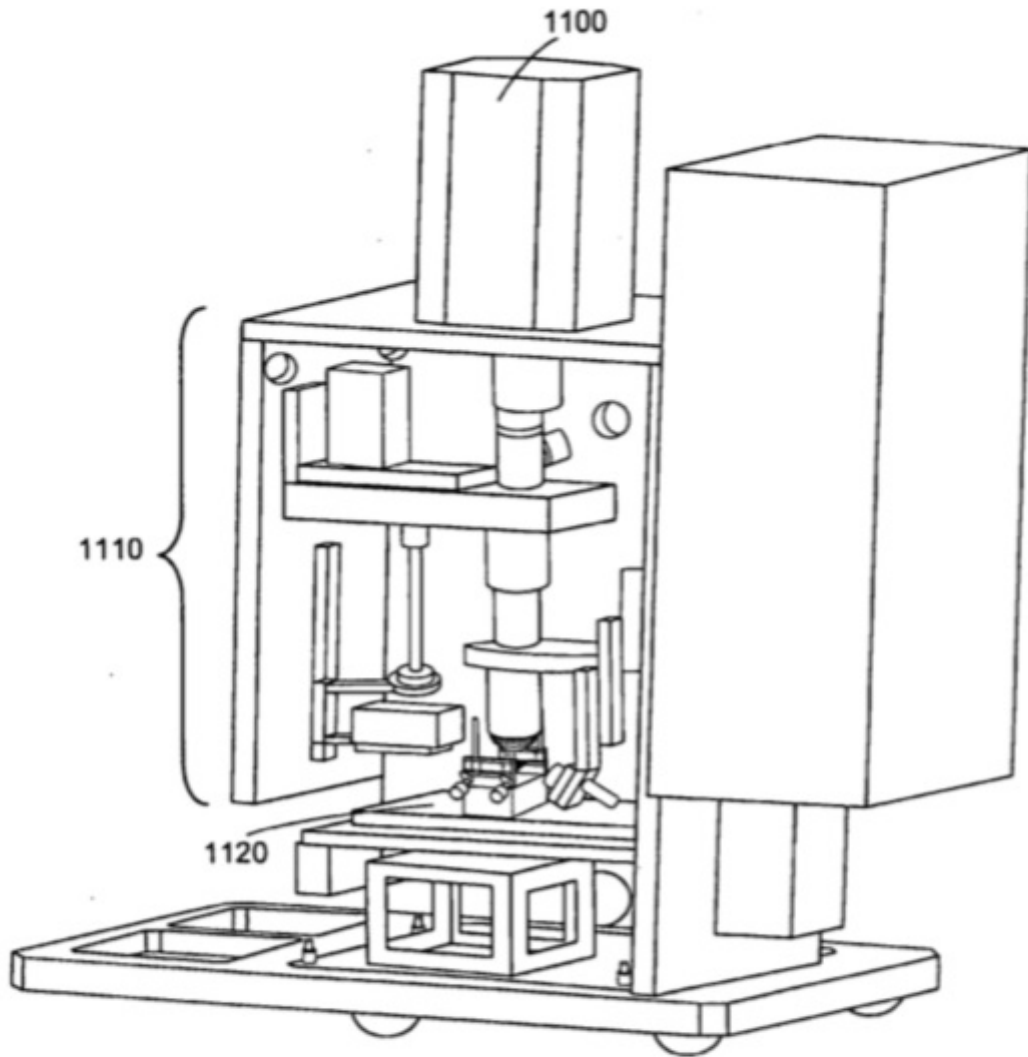


Fig. 11A

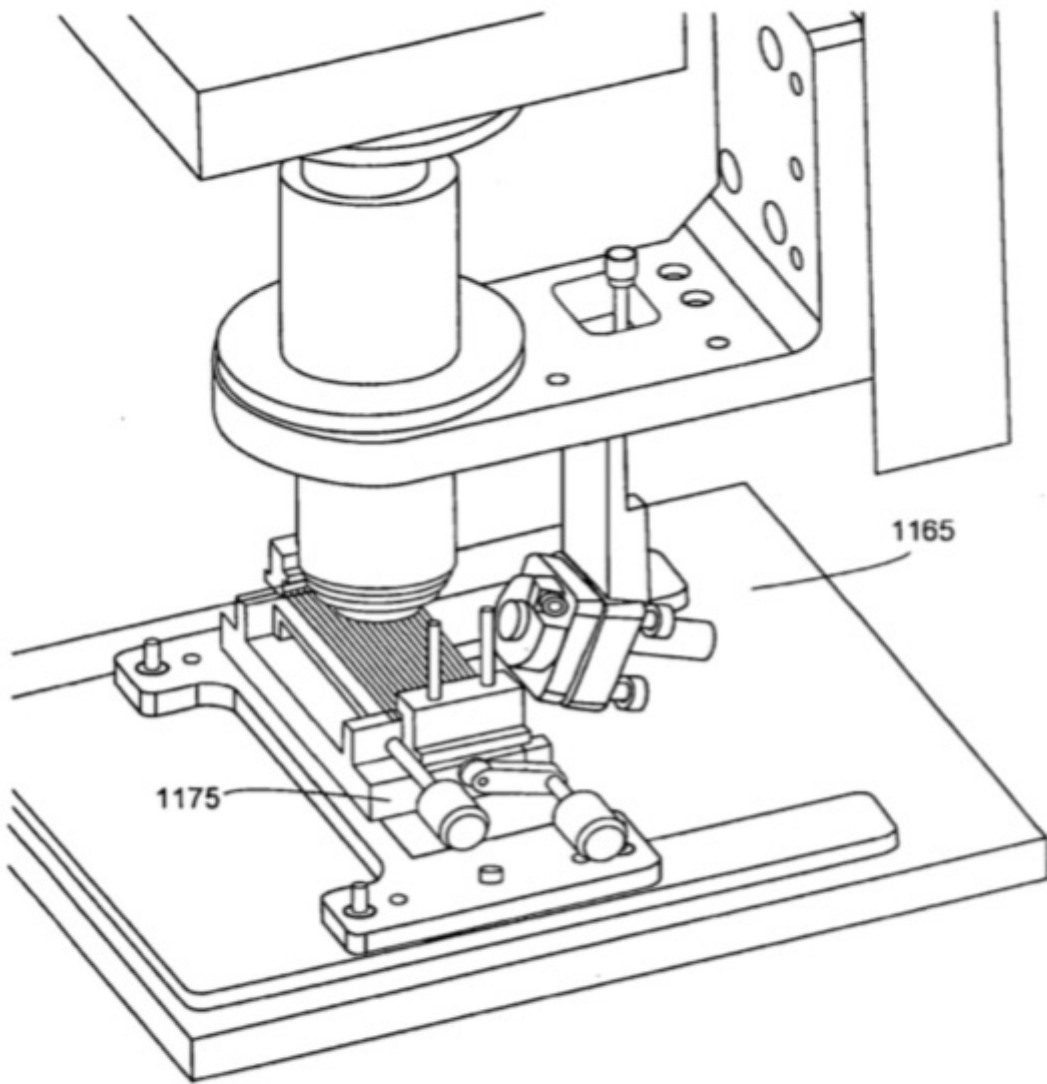


Fig. 11B

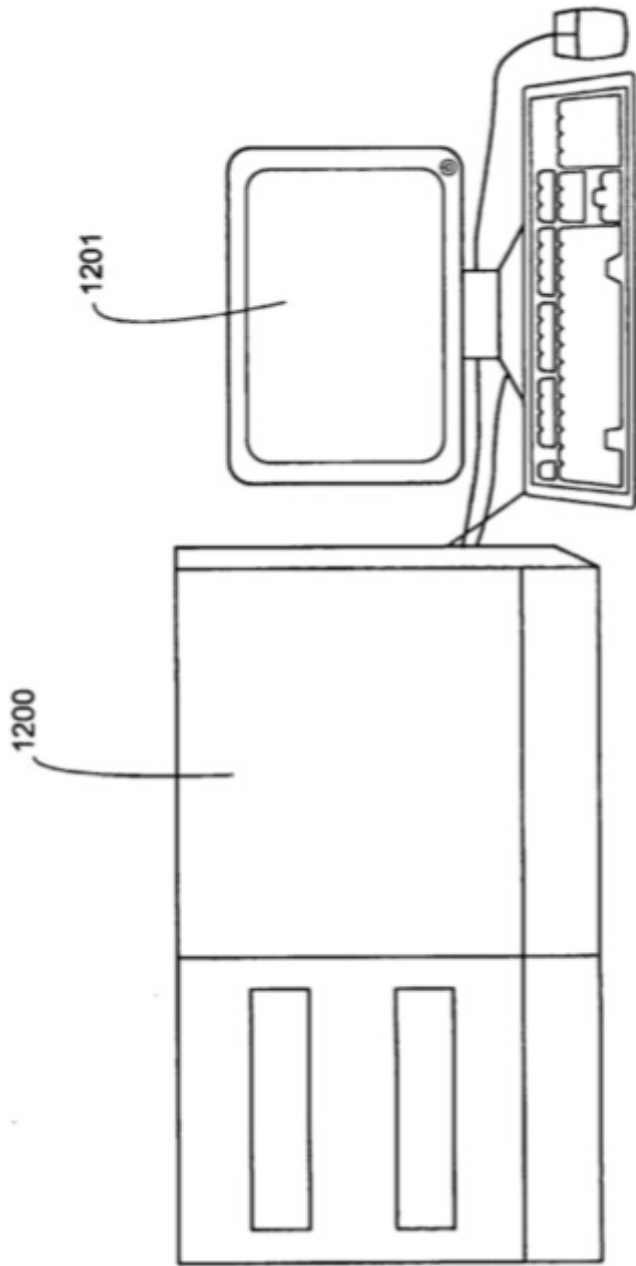


Fig. 12

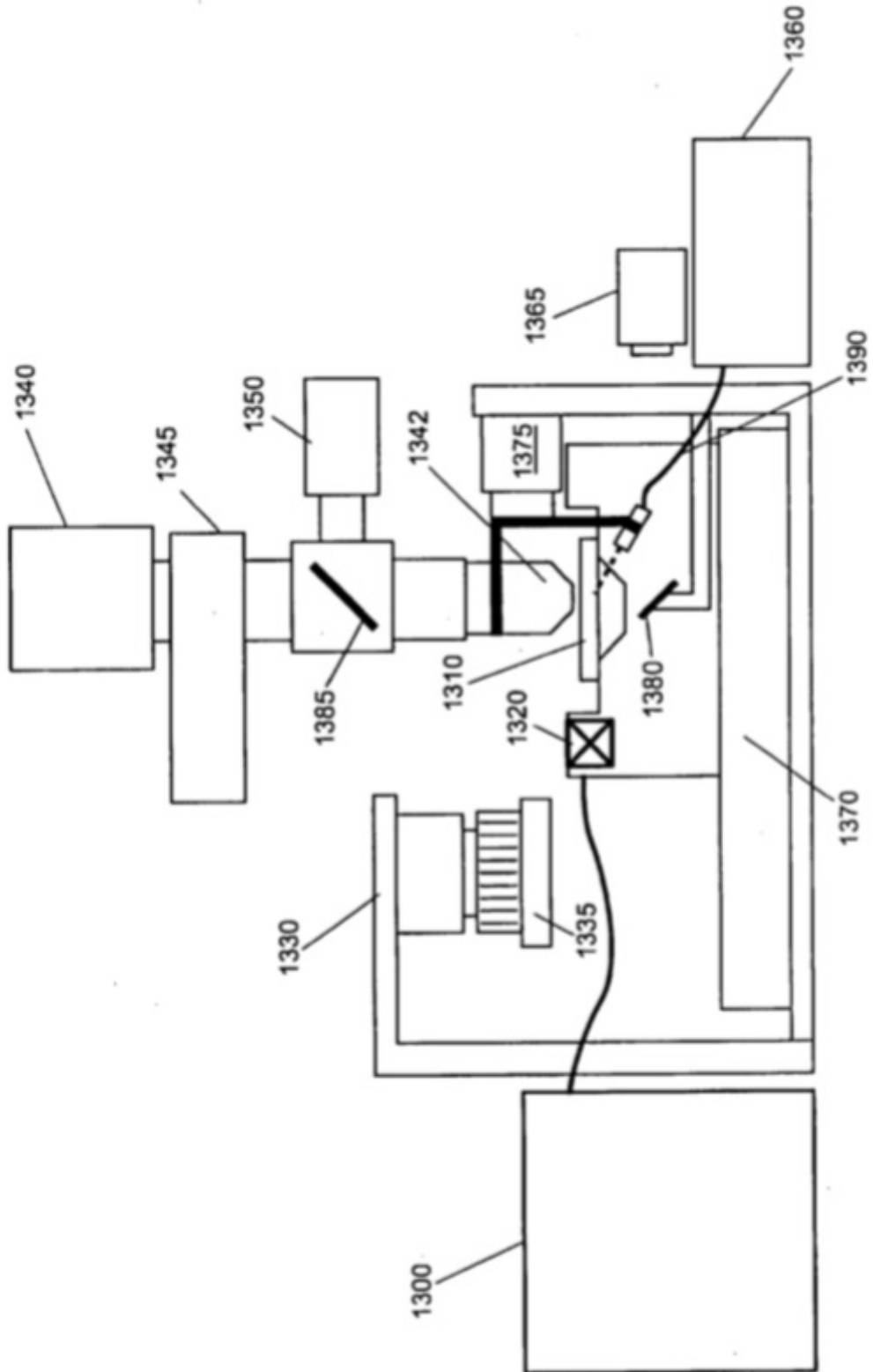


Fig. 13

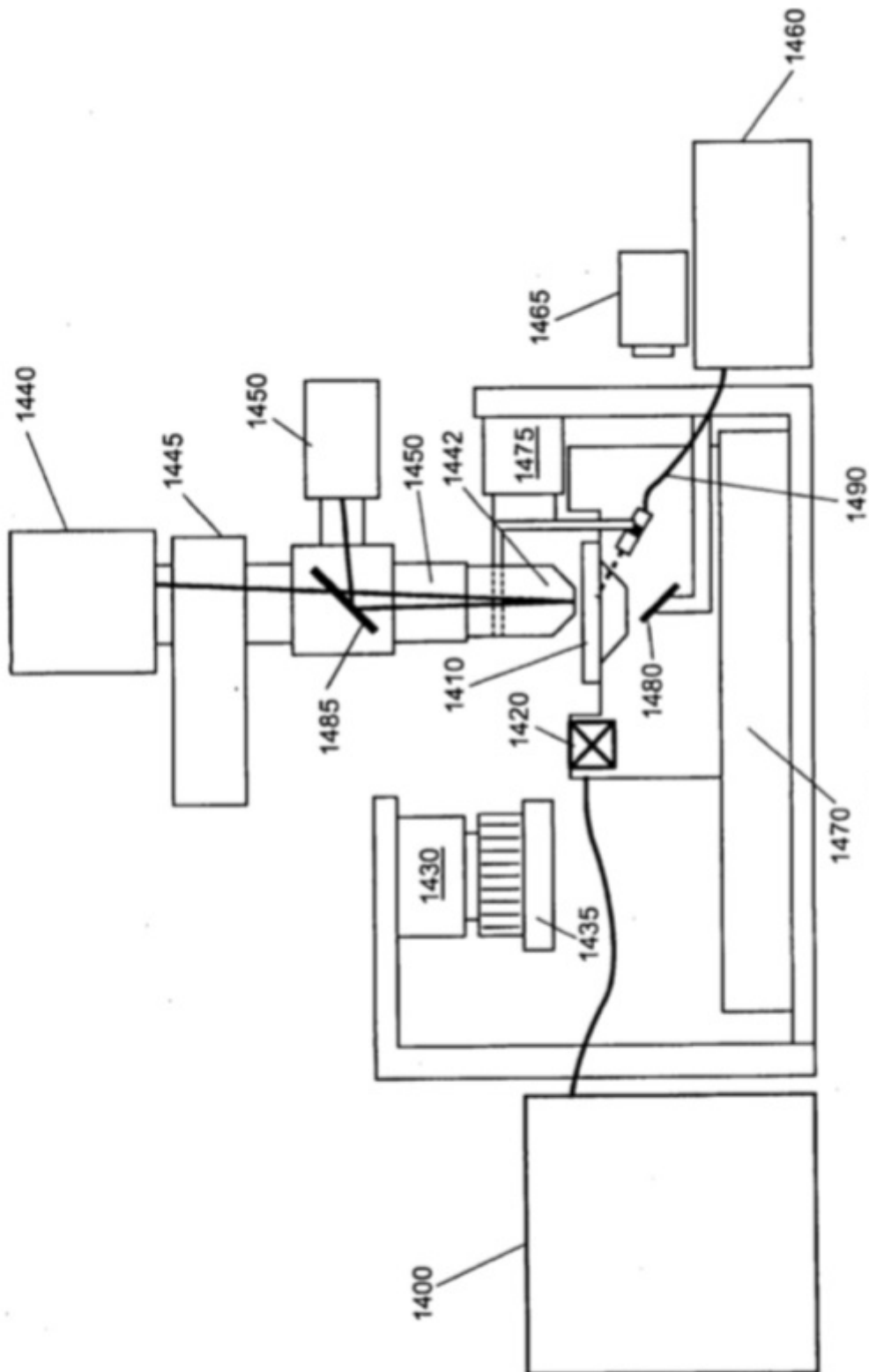


Fig. 14

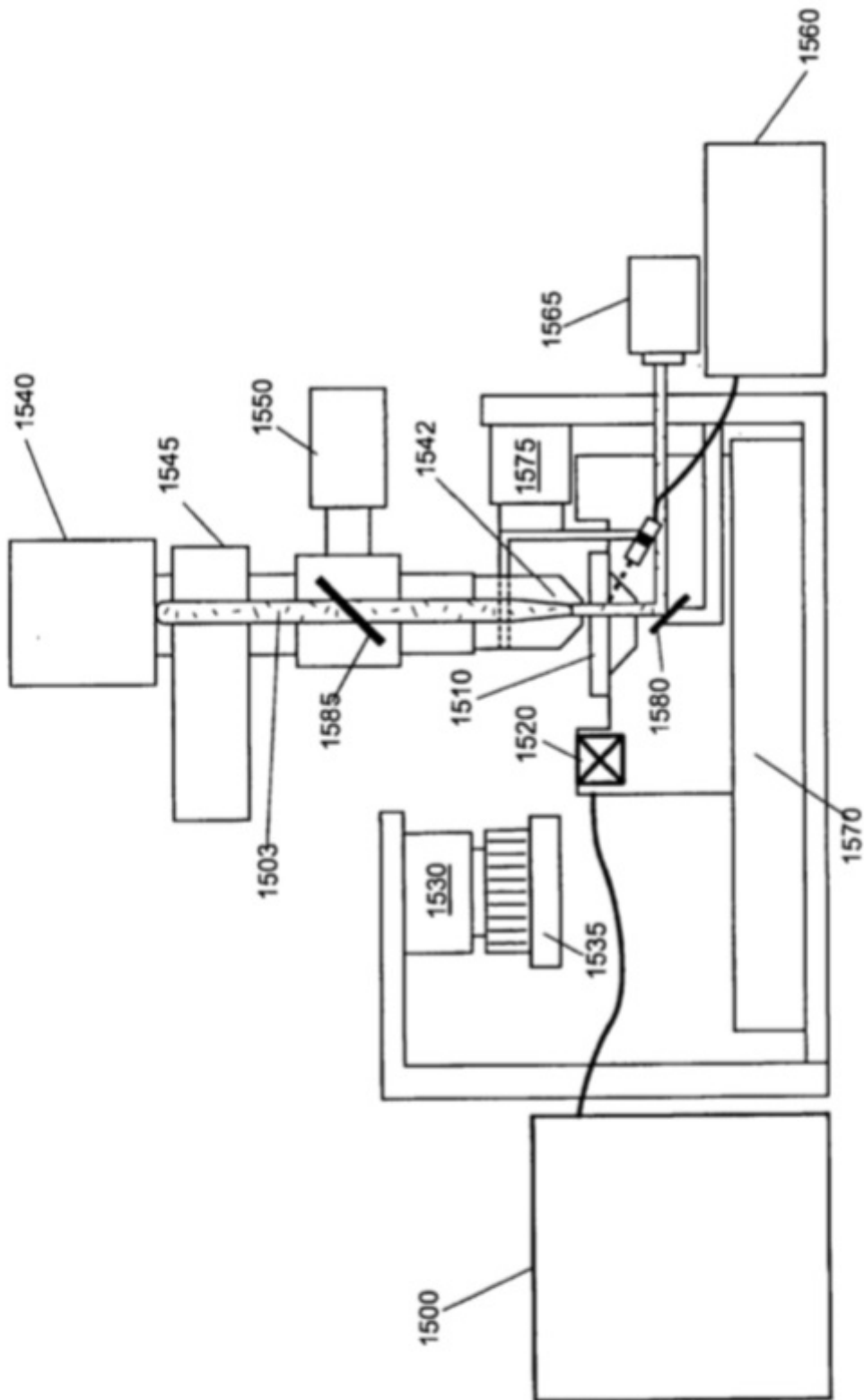


Fig. 15

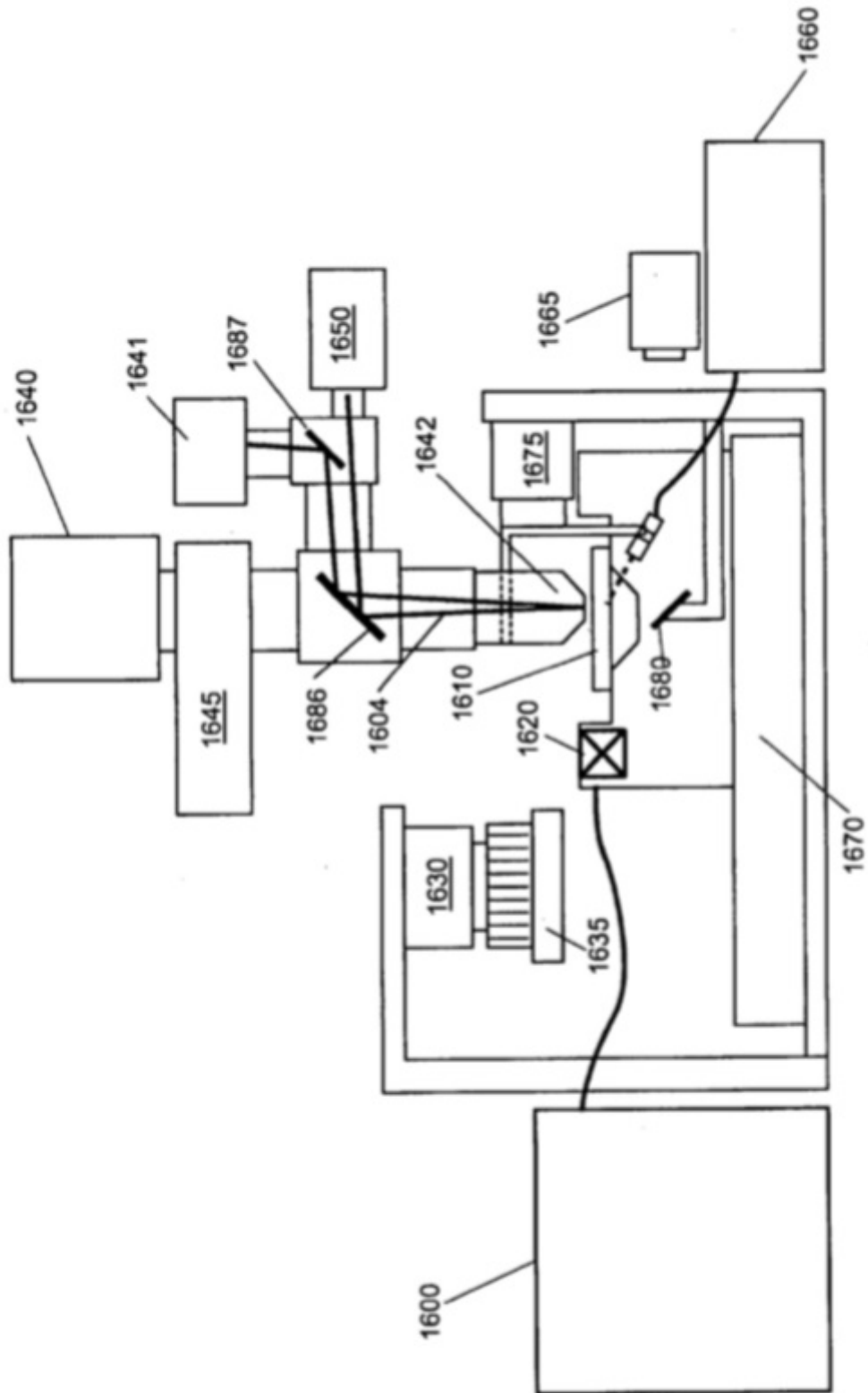
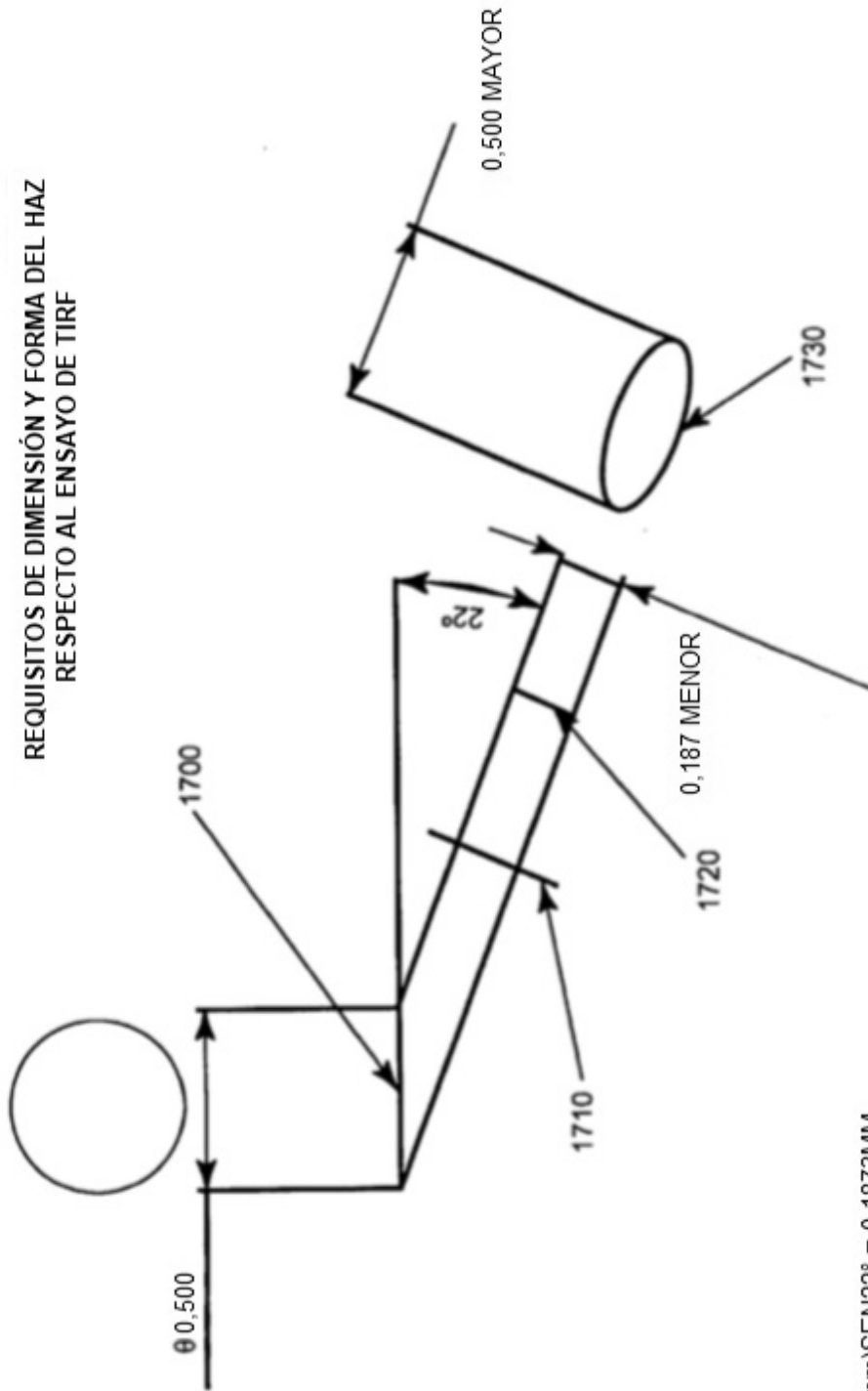


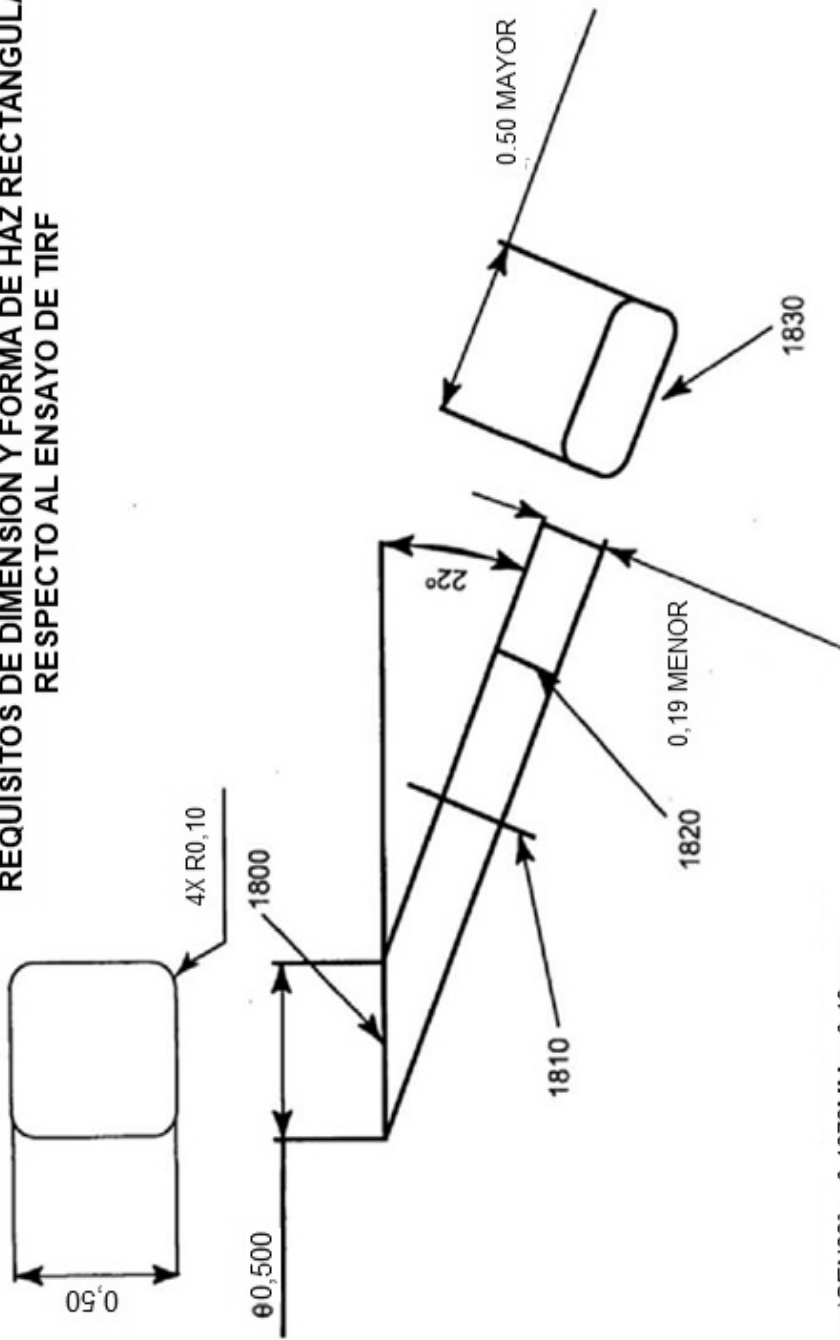
Fig. 16



(0,5mm)SEN22° = 0,1873MM
 RELACIÓN DE ASPECTO=0,5mm/0,187mm/2,67
 o 1/2,68=0,375 (si se prefiere)

Fig. 17

REQUISITOS DE DIMENSIÓN Y FORMA DE HAZ RECTANGULAR
RESPECTO AL ENSAYO DE TIRF



(0,5mm)SEN22° = 0,1873MM = 0,19 mm
RELACION DE ASPECTO=0,5mm/0,19mm=2,63
0 1/2,63=0,38 (si se prefirere)

Fig. 18

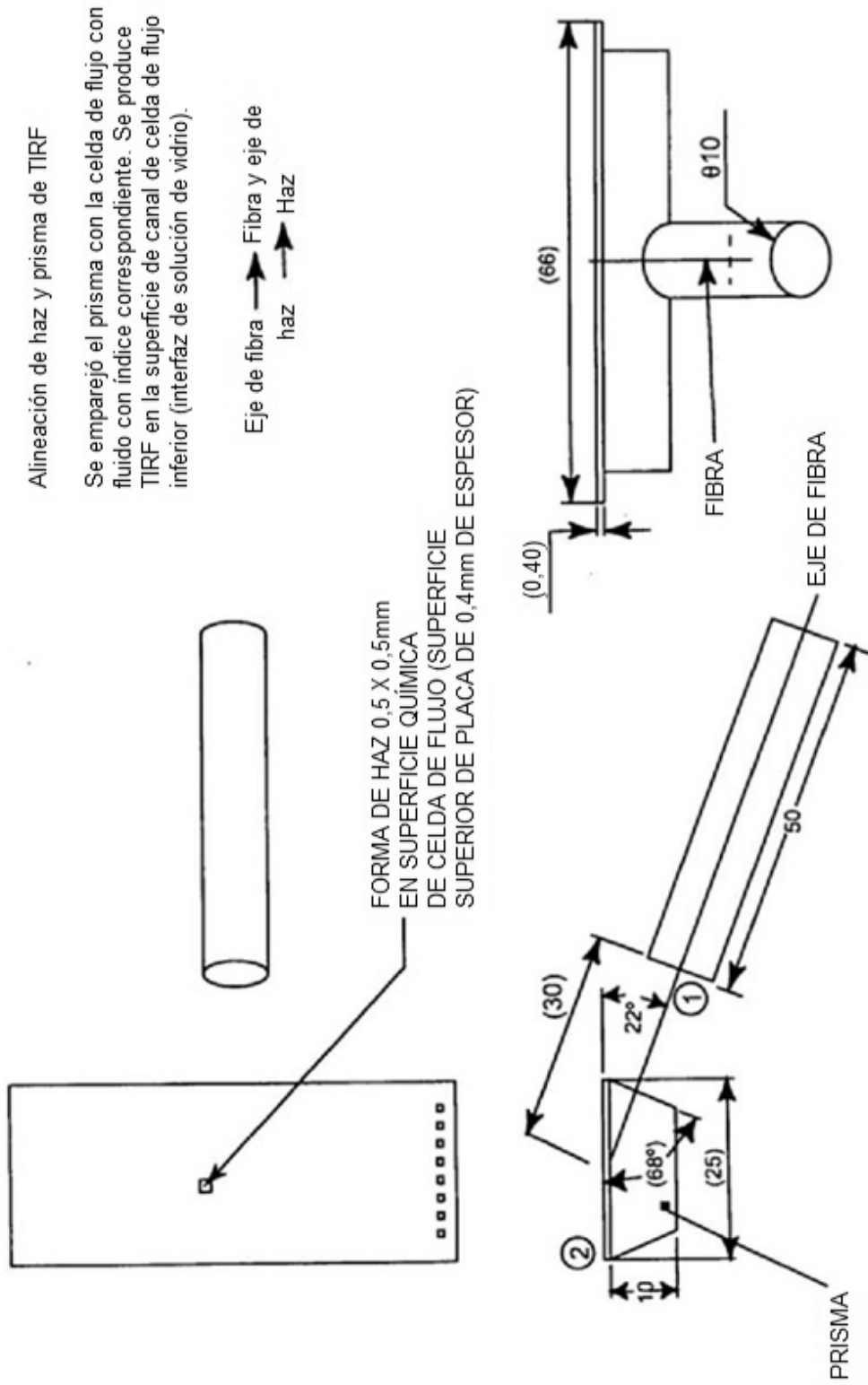


Fig. 19

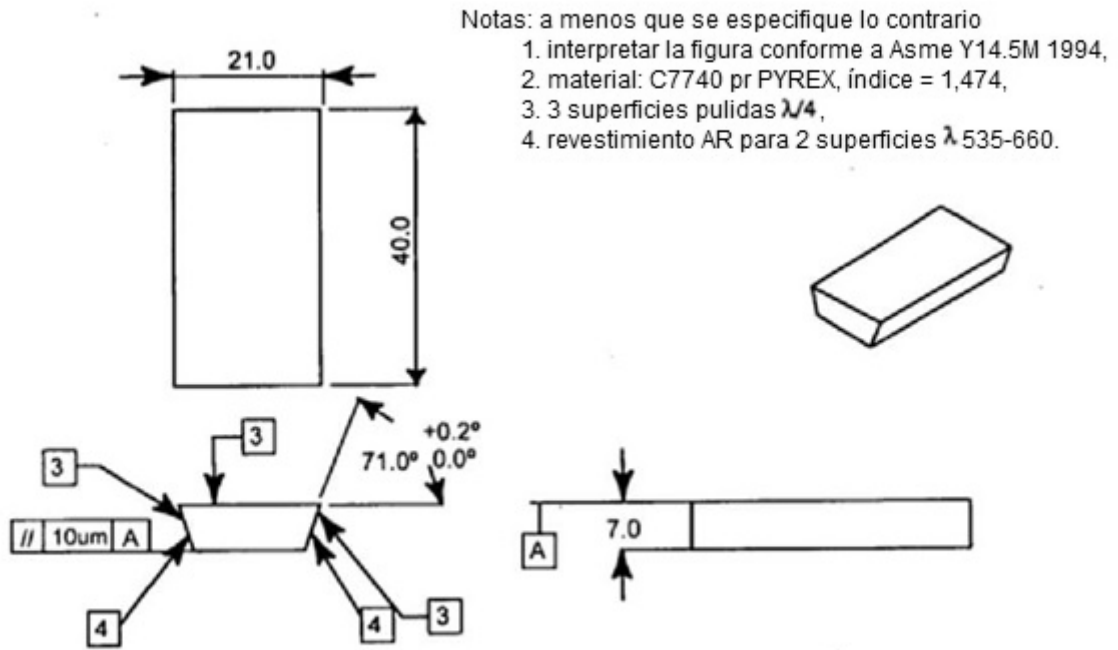


Fig. 20

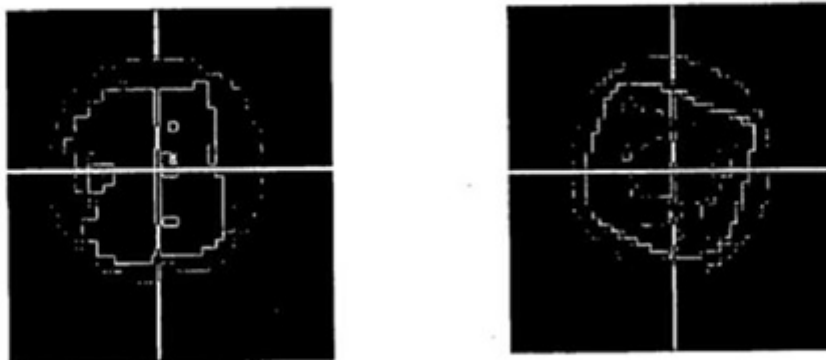


Fig. 21

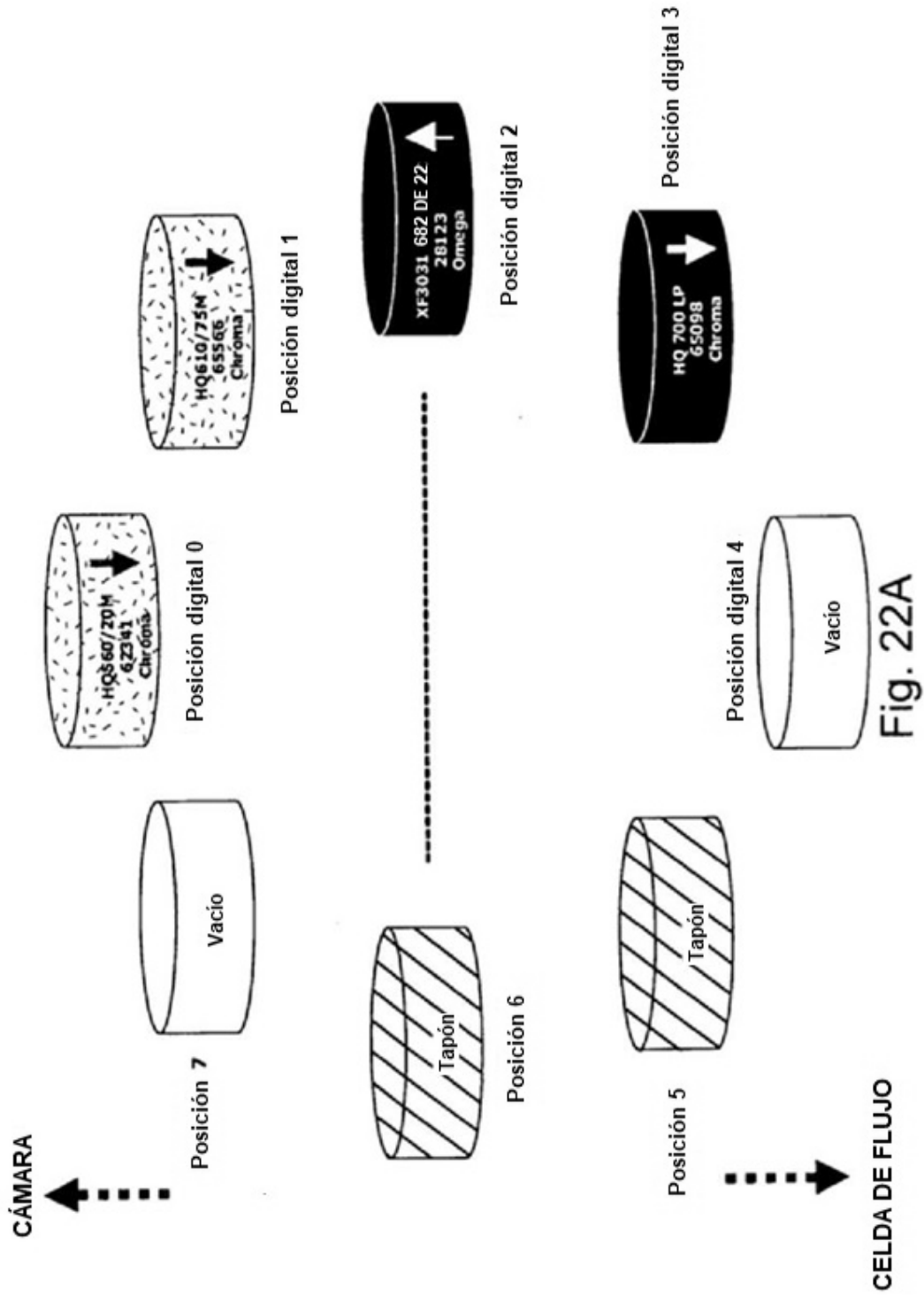


Fig. 22A

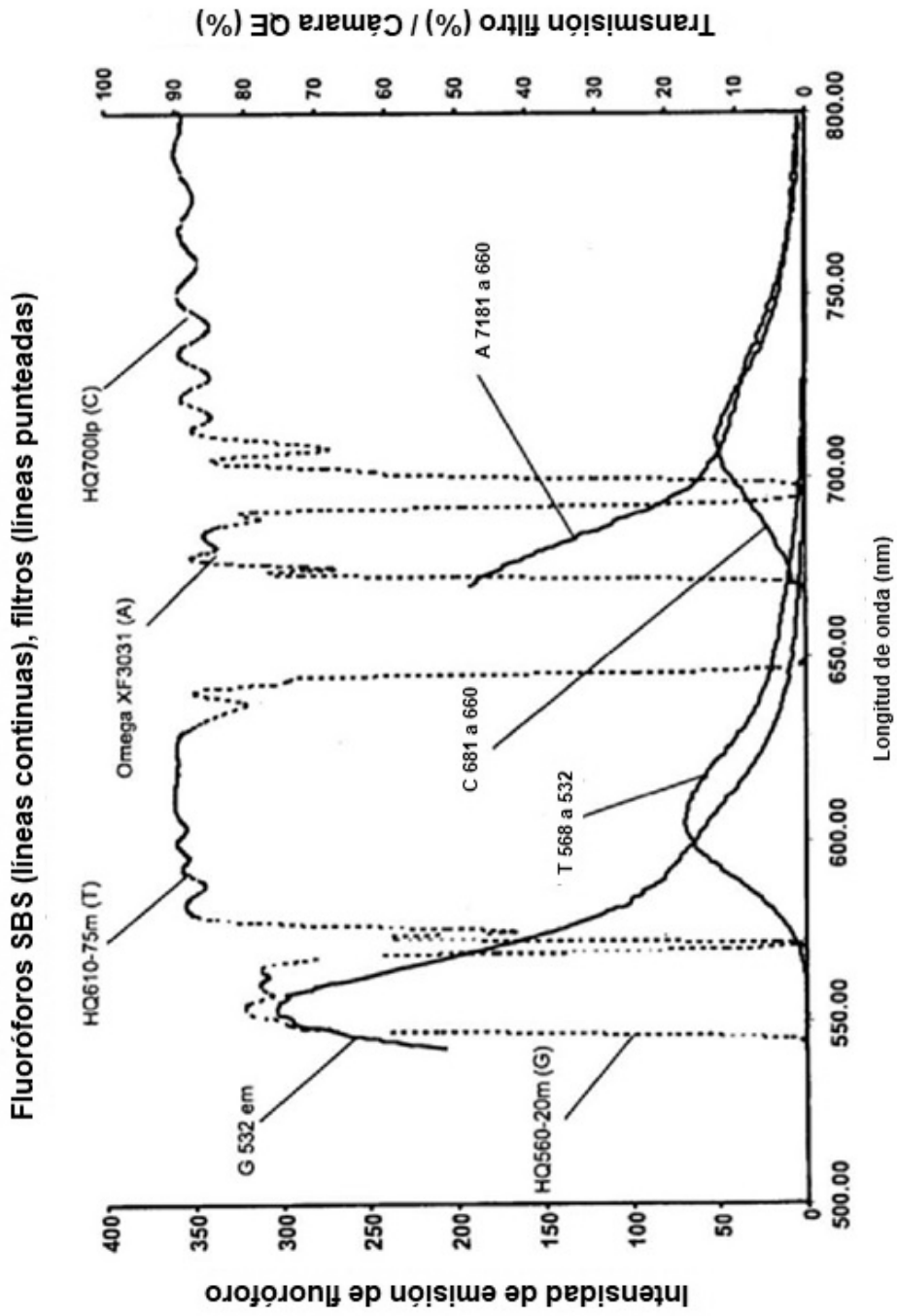


Fig. 22B

Diseño 1G nominal
Seguimiento de rayos del sistema K4 30X

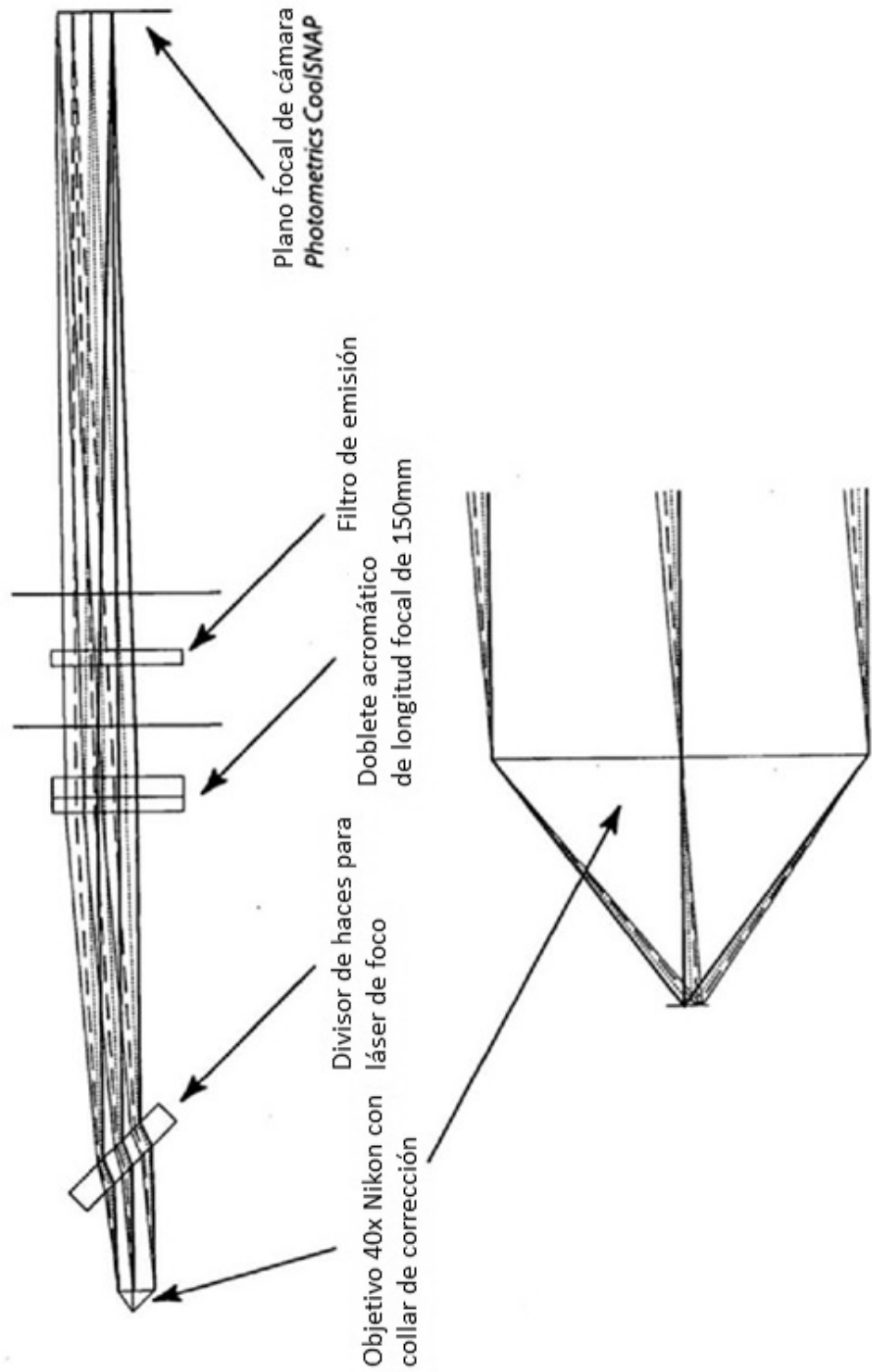


Fig. 23

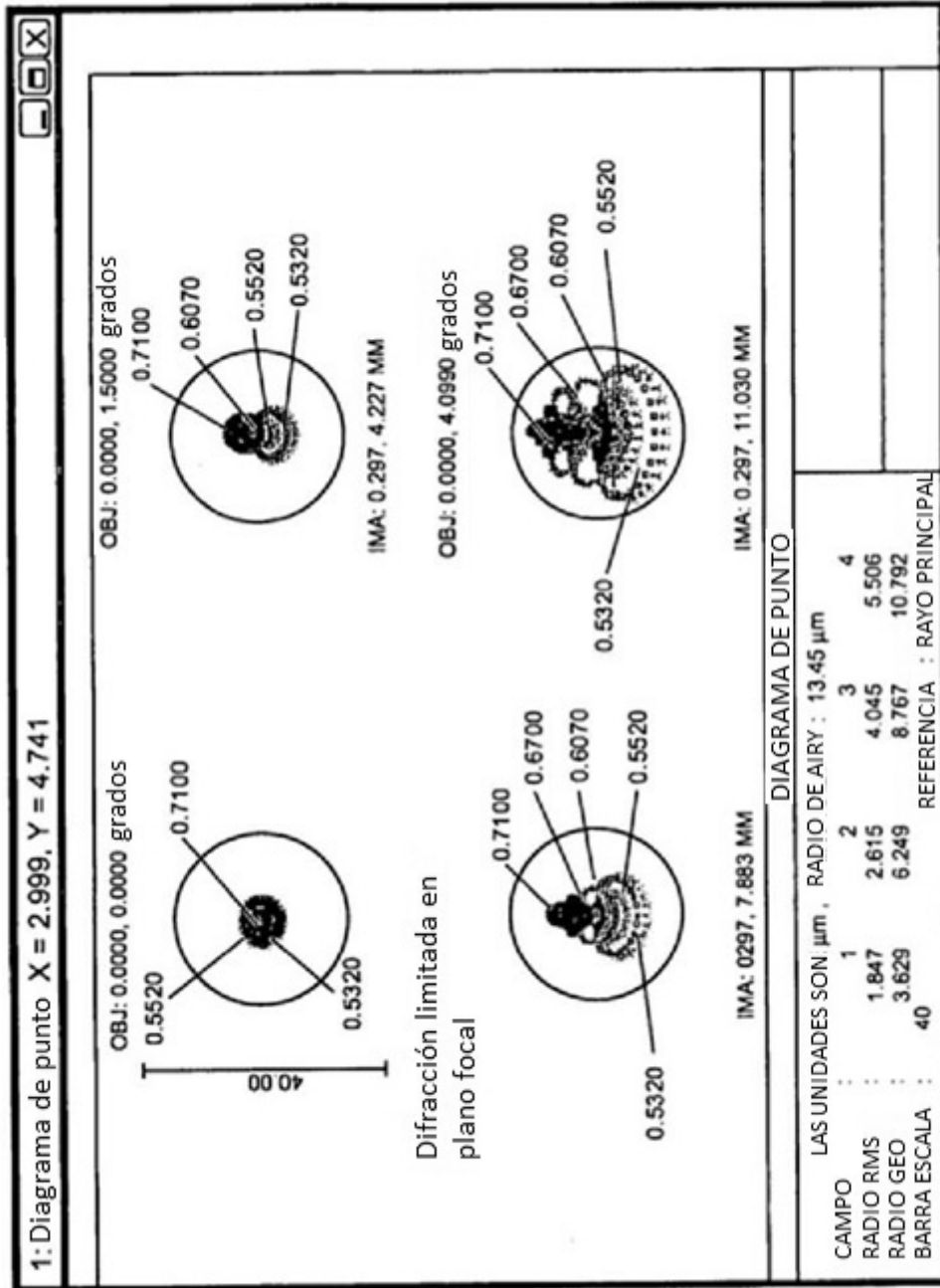


Fig. 24

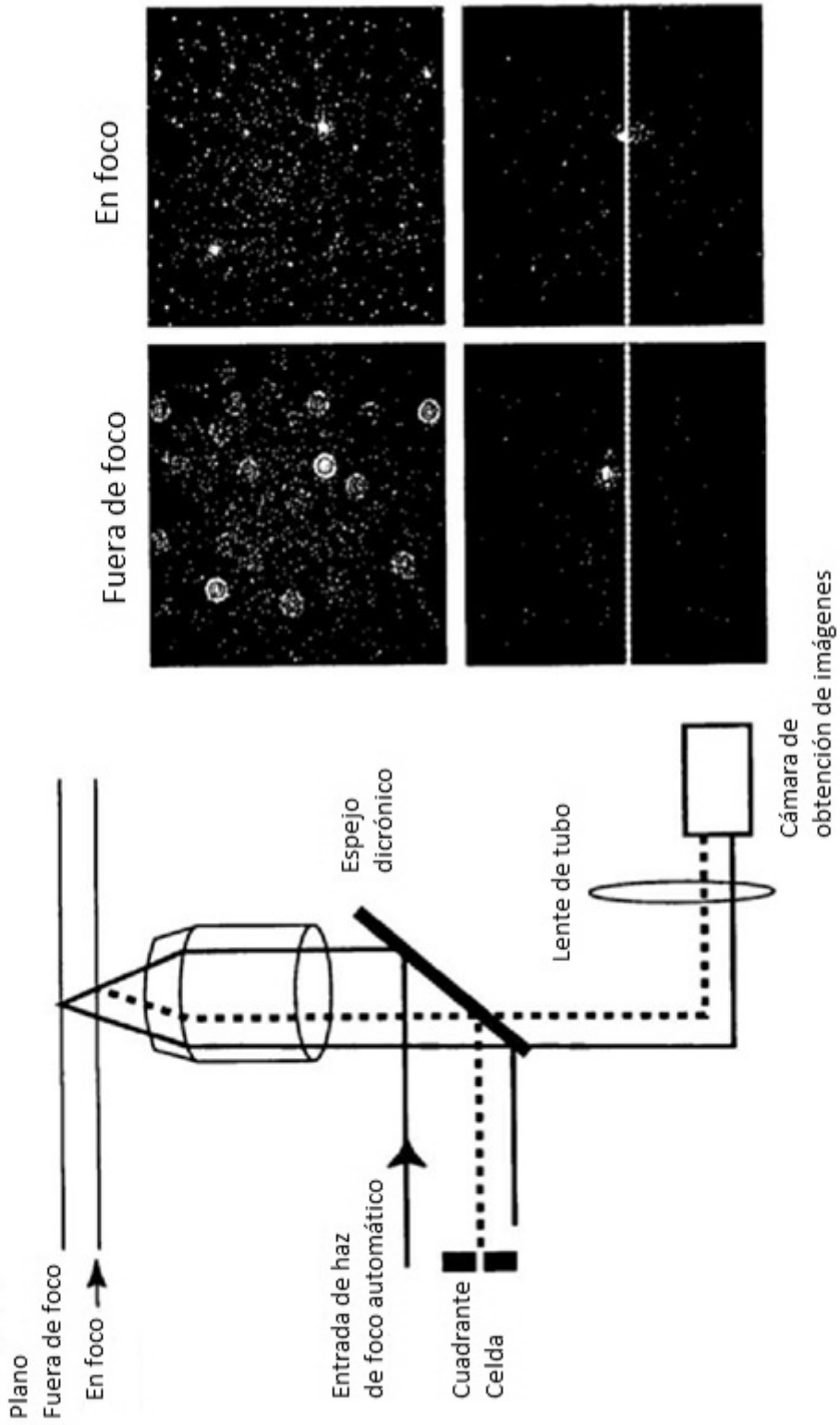


Fig. 26

Fig. 25

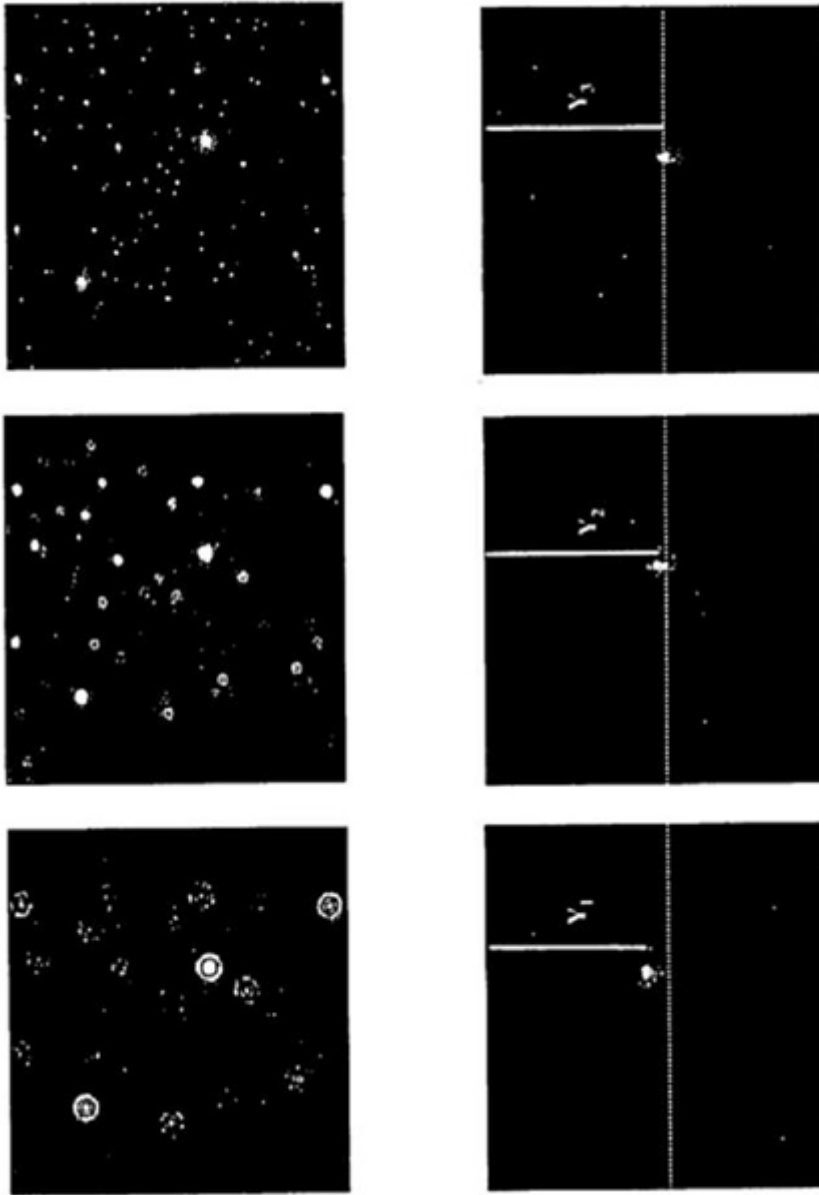


Fig. 27

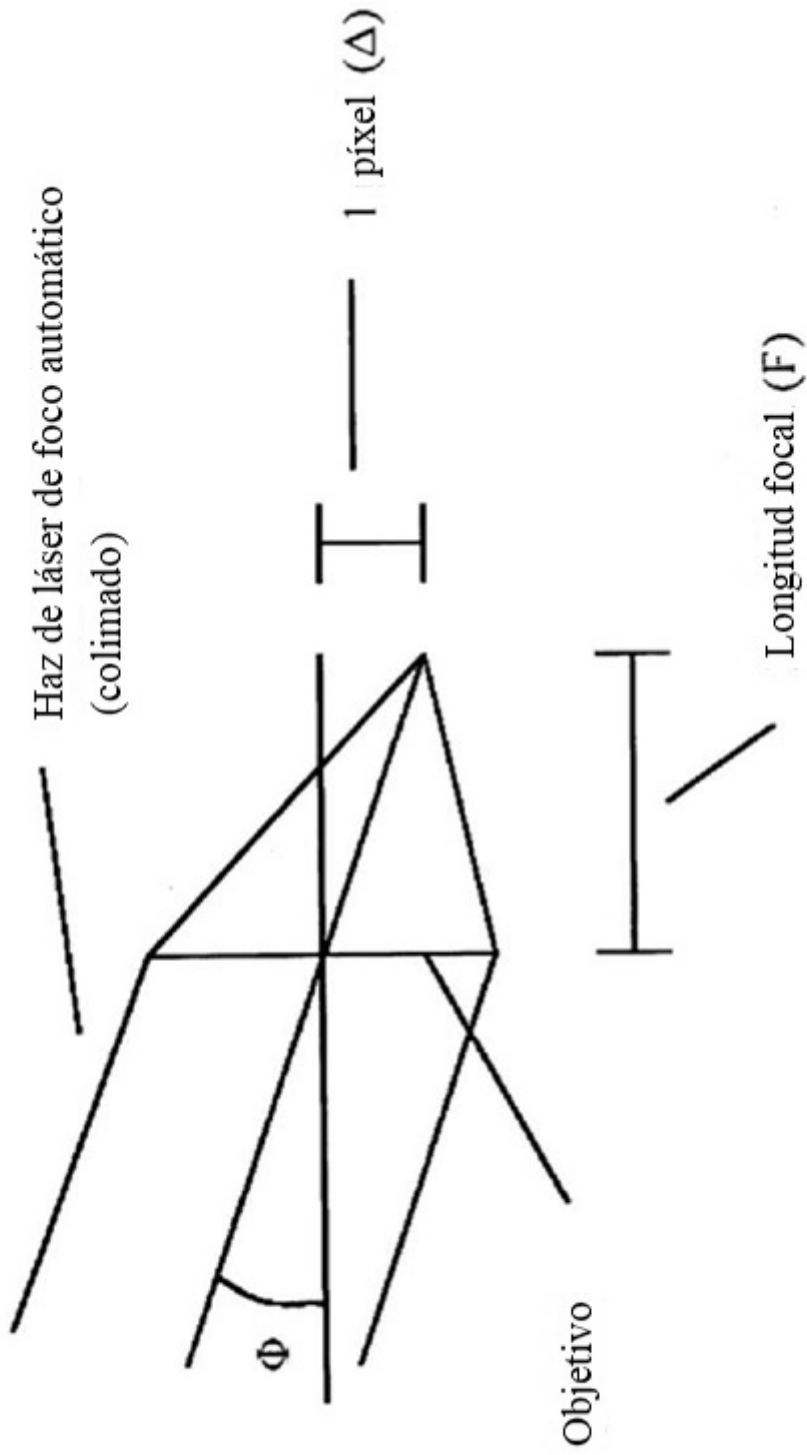
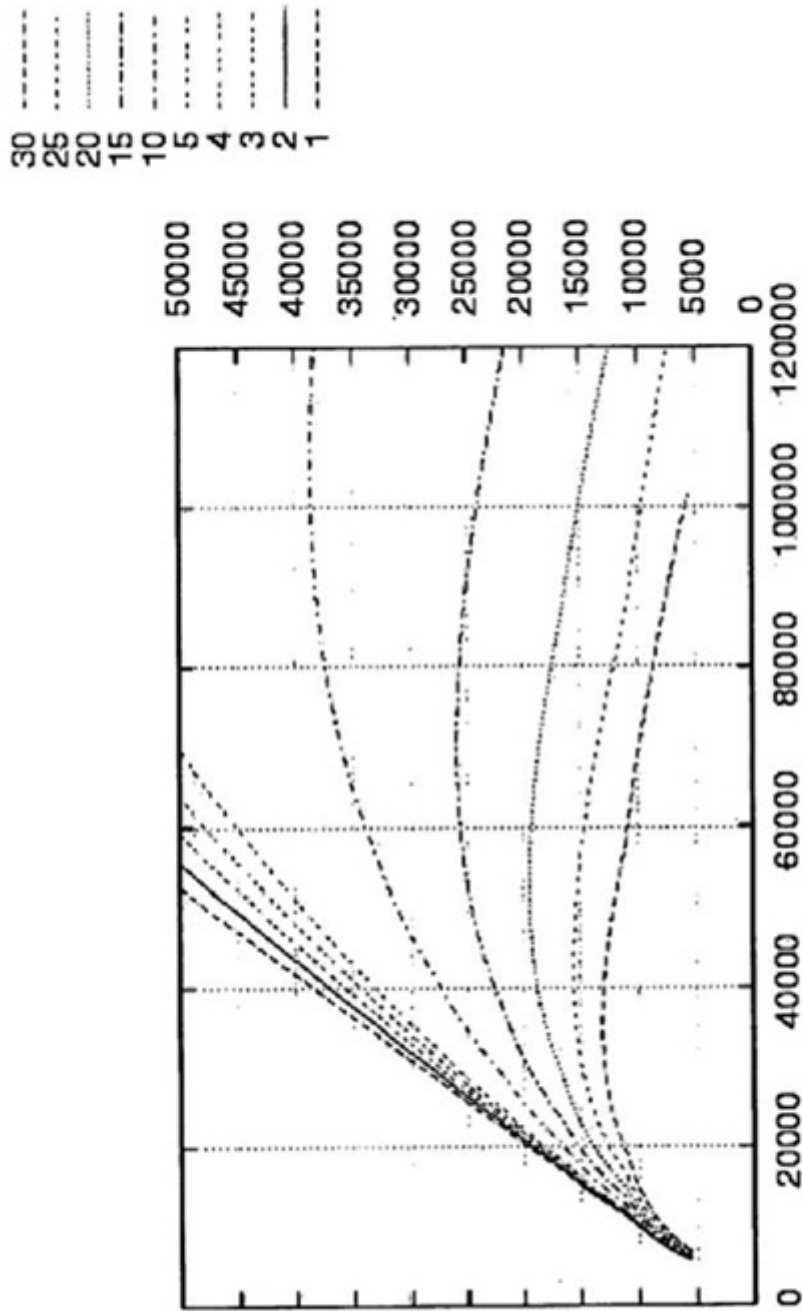


Fig. 28



Cantidad total de cúmulos por imagen

Fig. 29

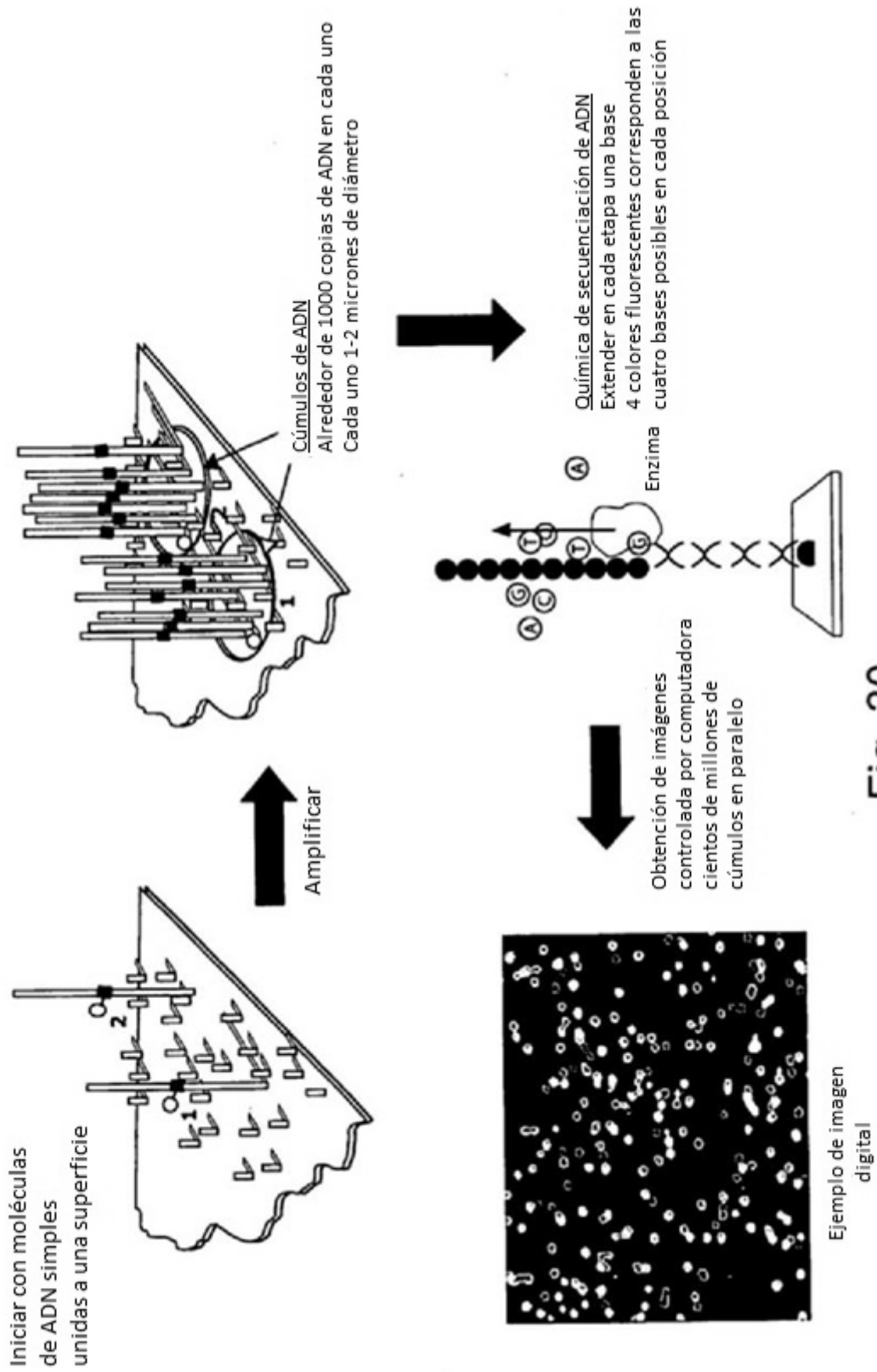
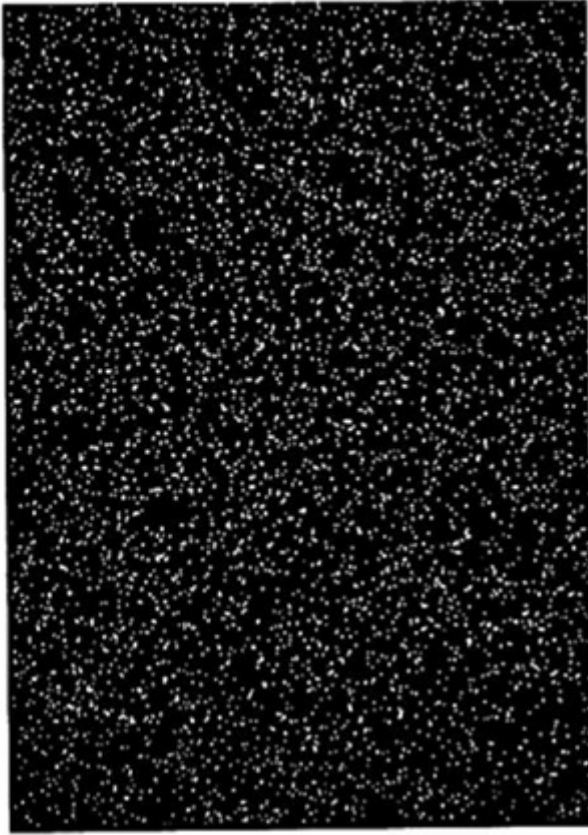
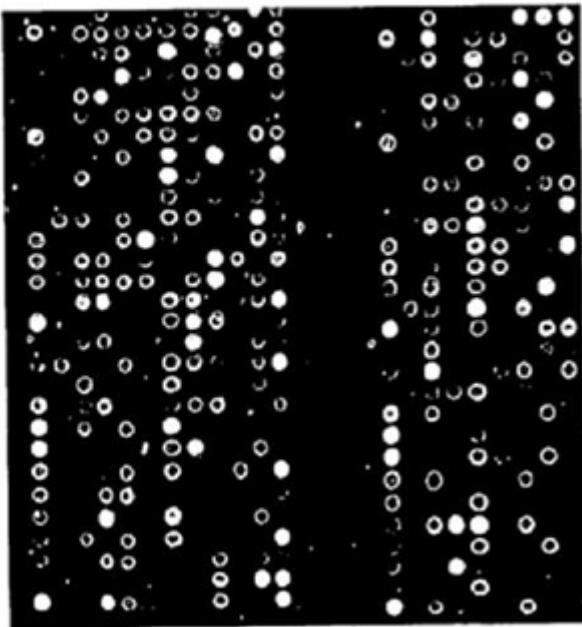


Fig. 30



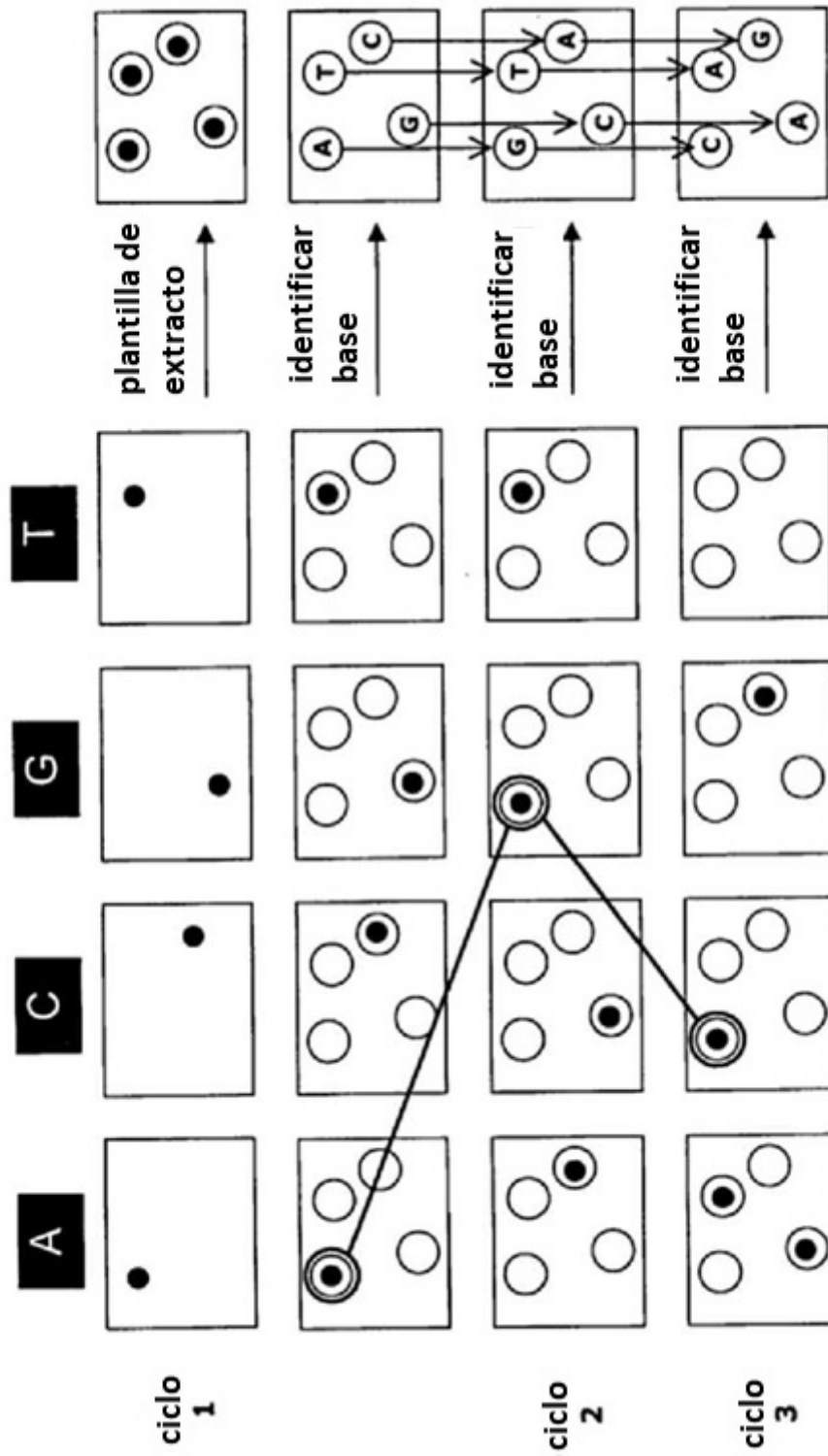
$10^7-10^8/\text{cm}^2$



$10^4-10^5/\text{cm}^2$

Fig. 31

Determinación de secuencias a partir de imágenes de cuatro colores



Las secuencias son AGC..., GCA..., TTA..., CAG...

Fig. 32

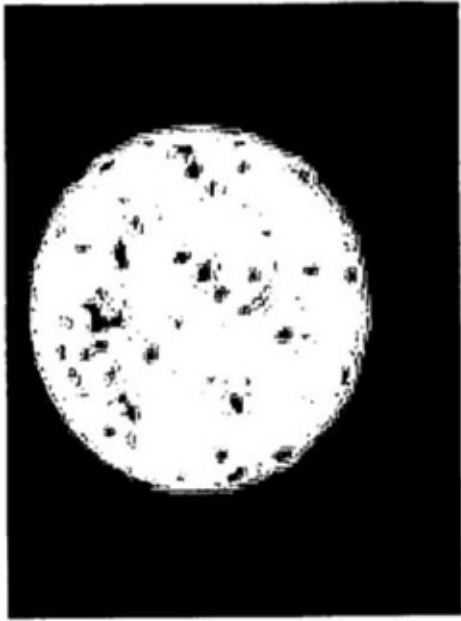


Fig. 33B

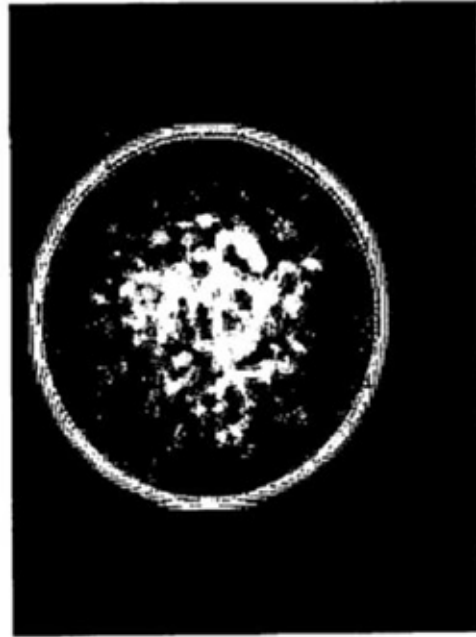


Fig. 33D

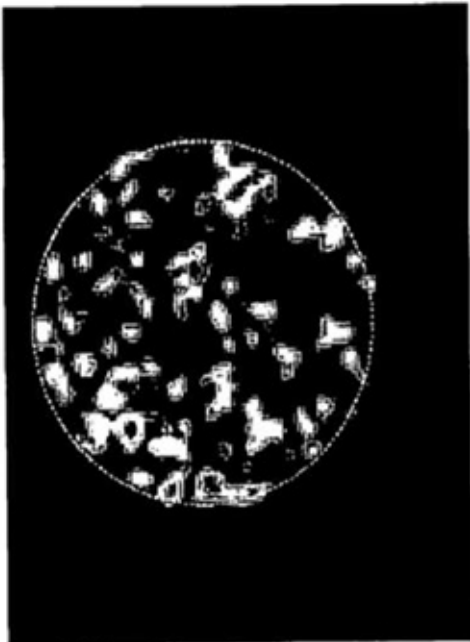


Fig. 33A

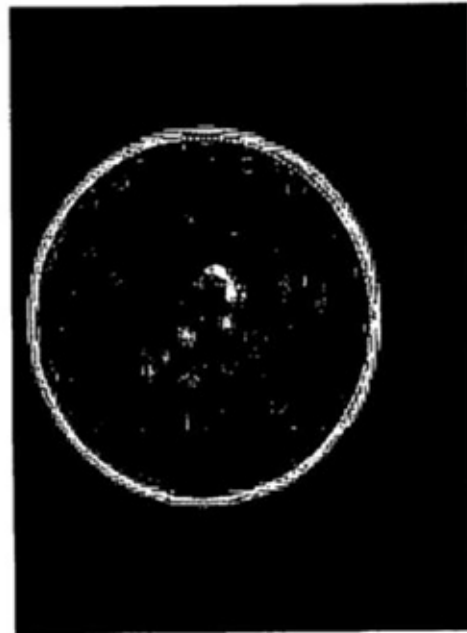


Fig. 33C

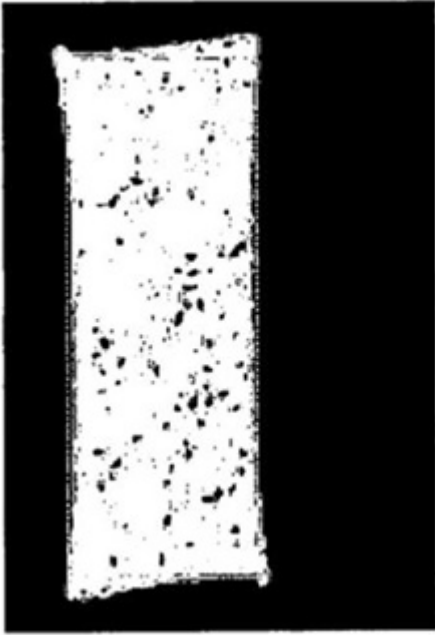


Fig. 34B

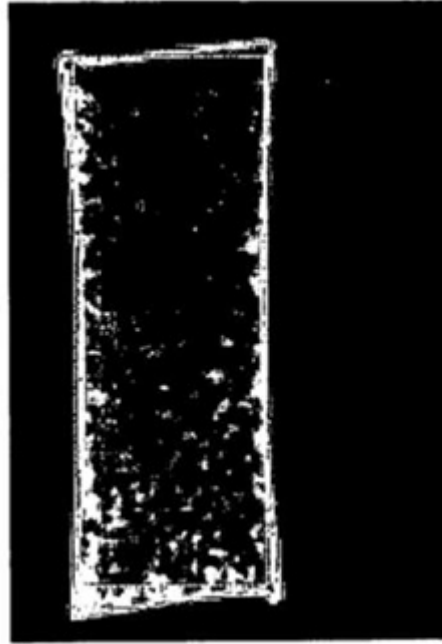


Fig. 34D

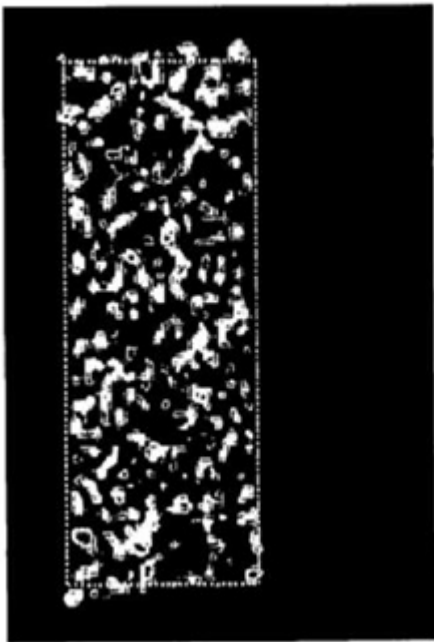


Fig. 34A

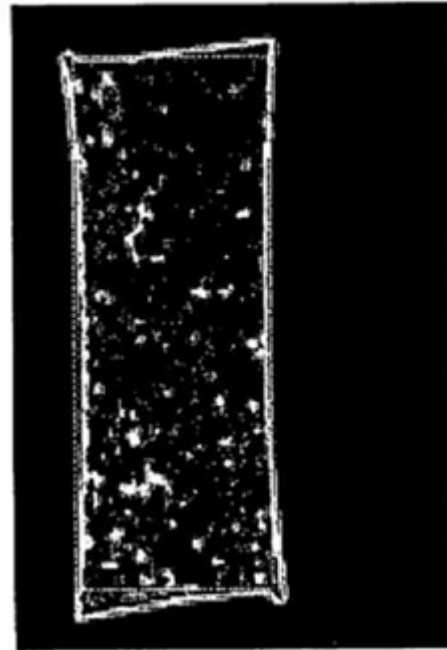


Fig. 34C

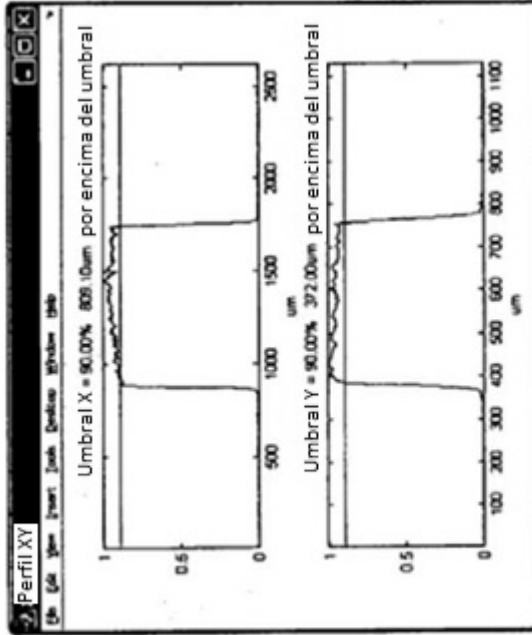


Fig. 35B

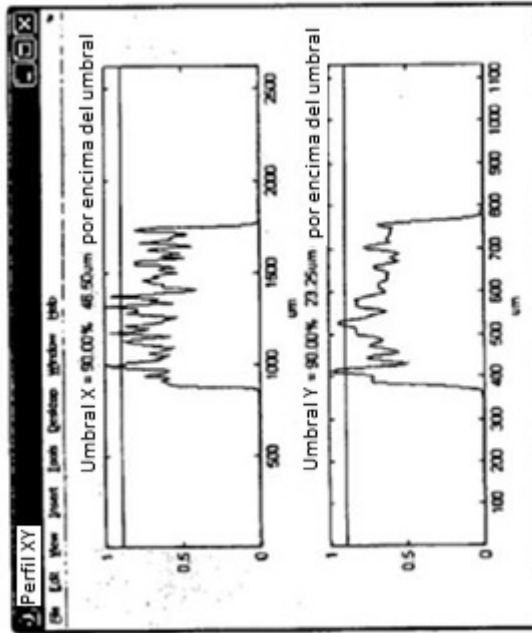
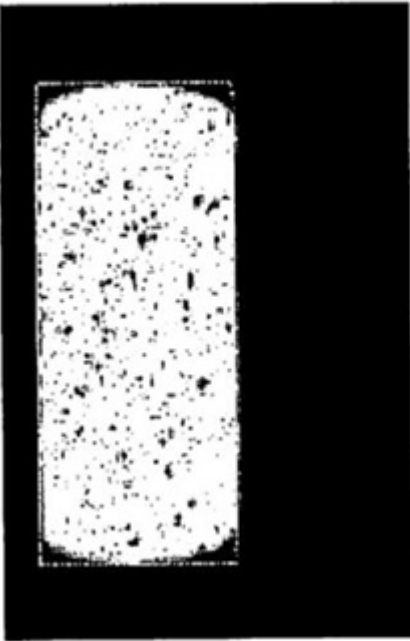


Fig. 35A

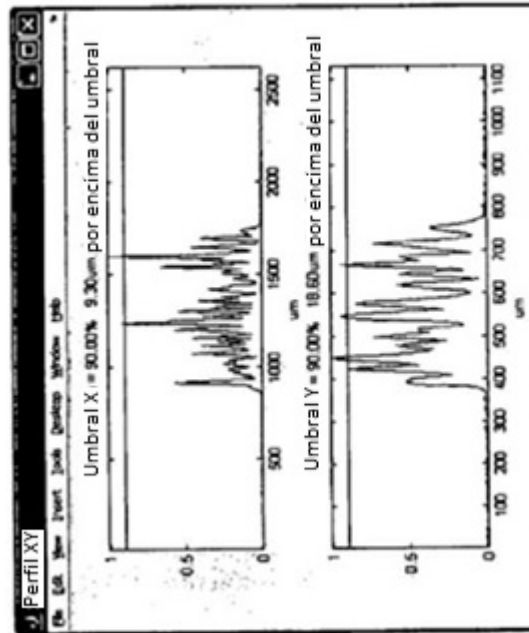
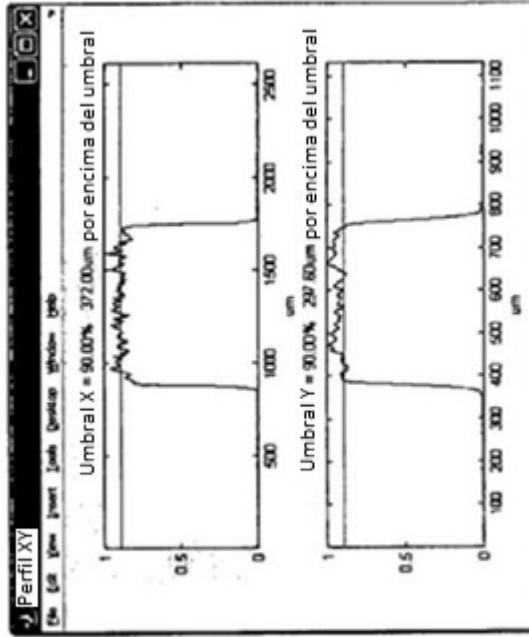
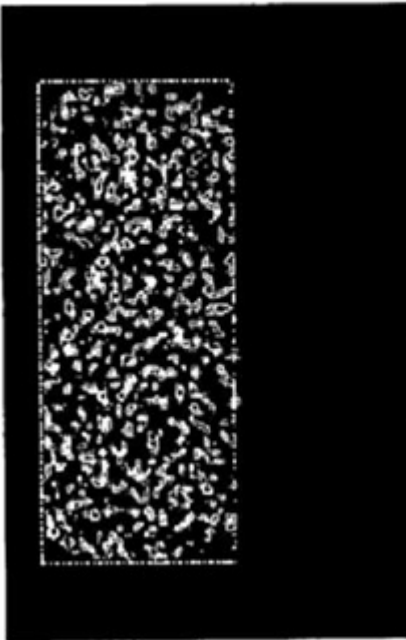


Fig. 35D

Fig. 35C

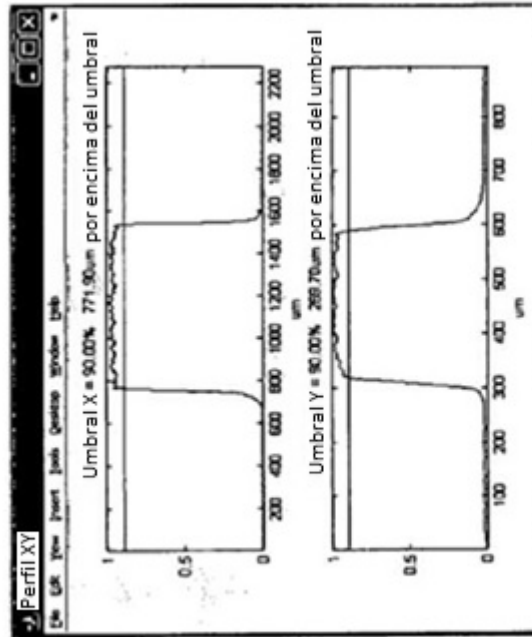
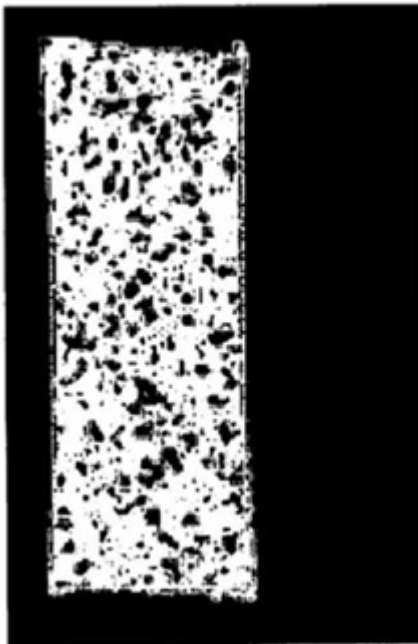


Fig. 35F

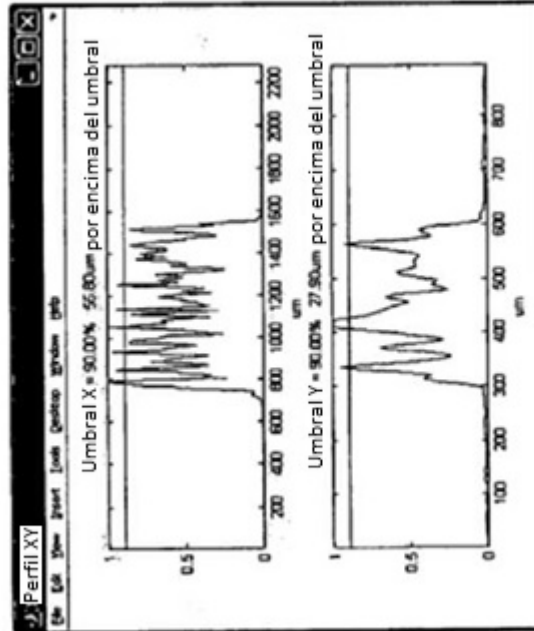


Fig. 35E

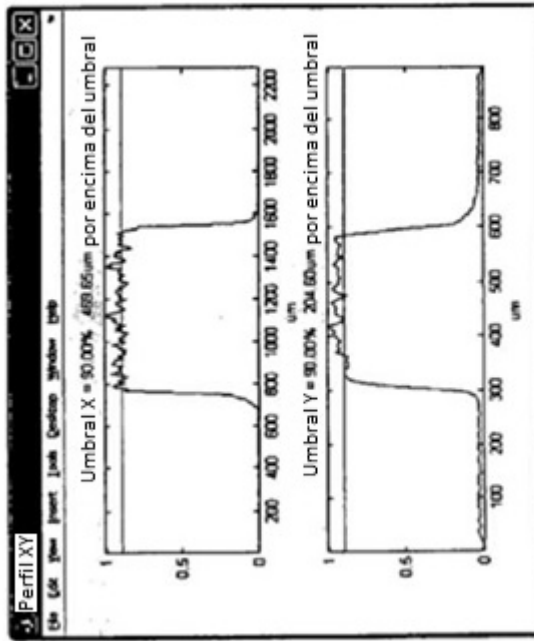
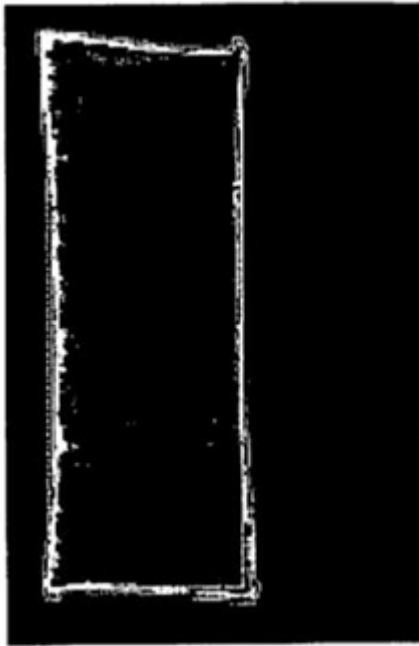


Fig. 35H

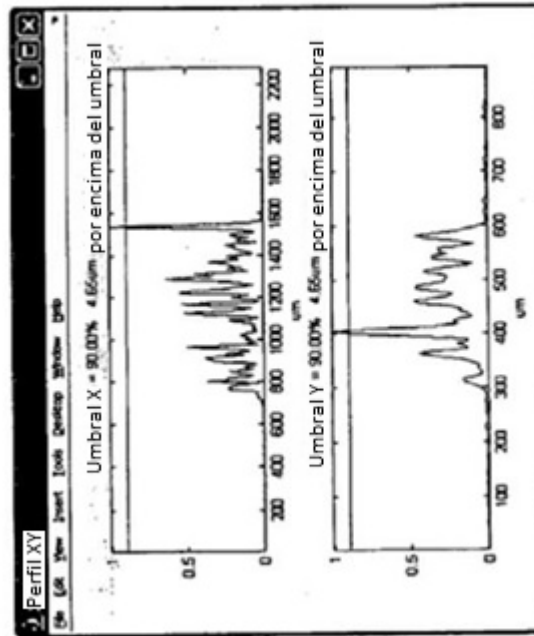
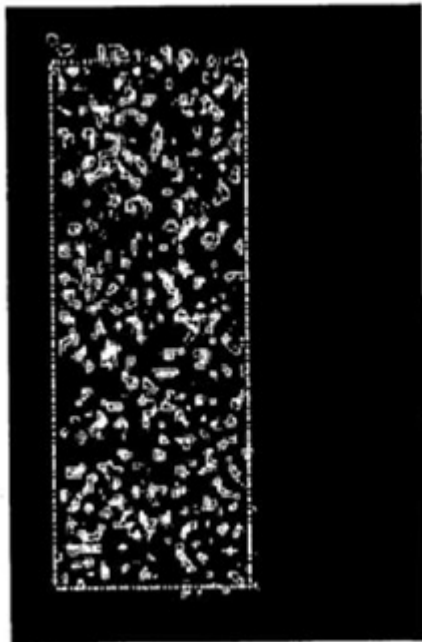


Fig. 35G

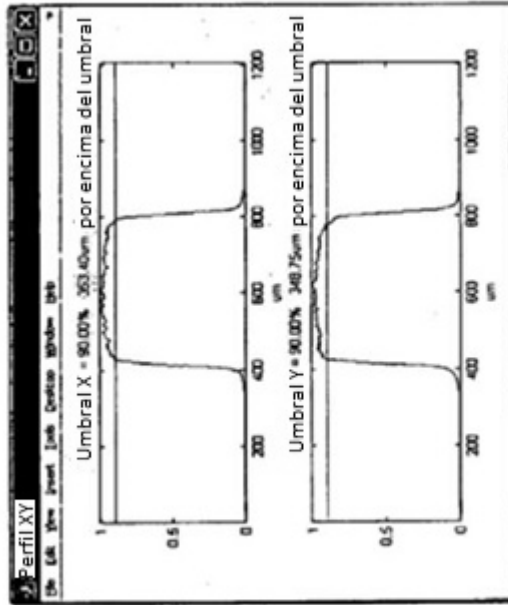
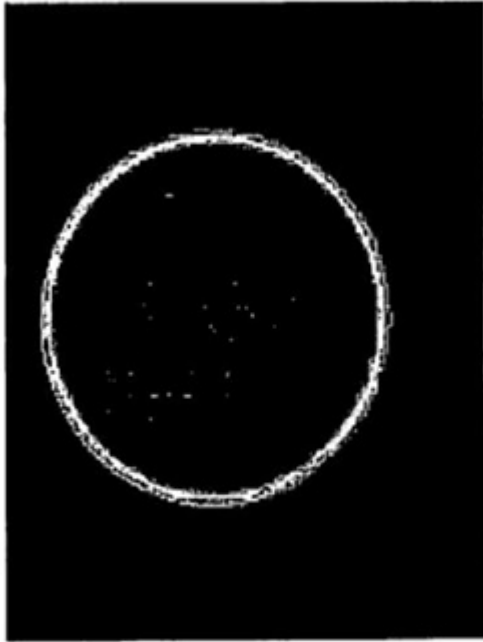


Fig. 35J

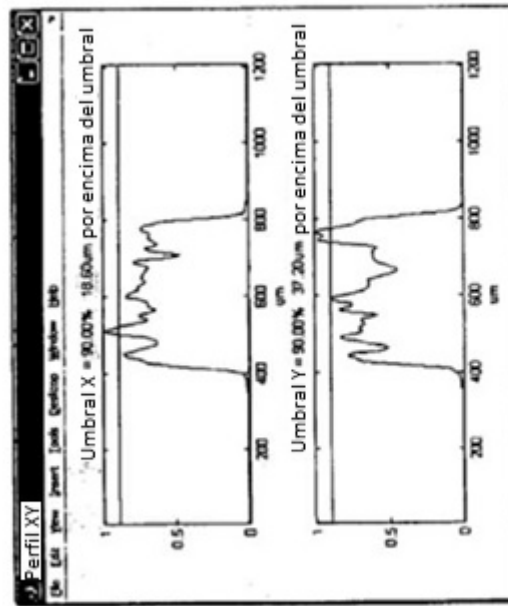
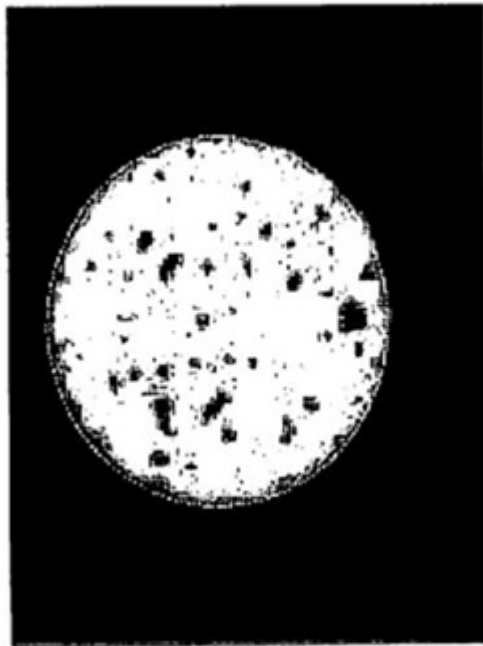


Fig. 35I

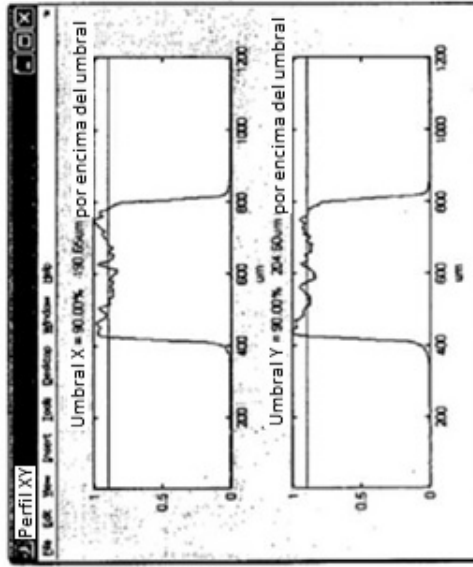
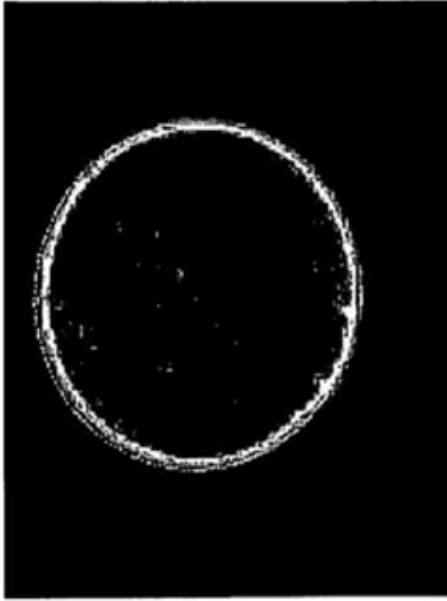


Fig. 35L

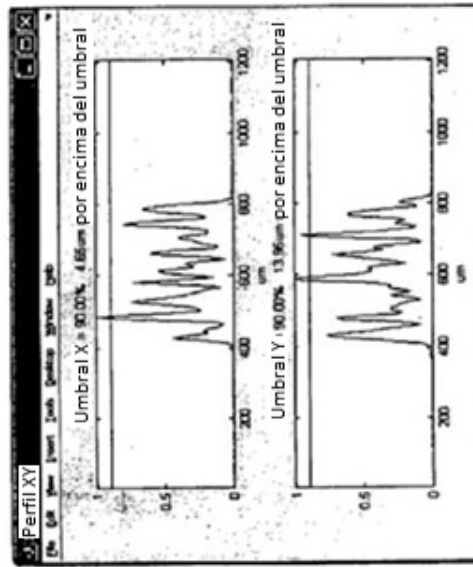
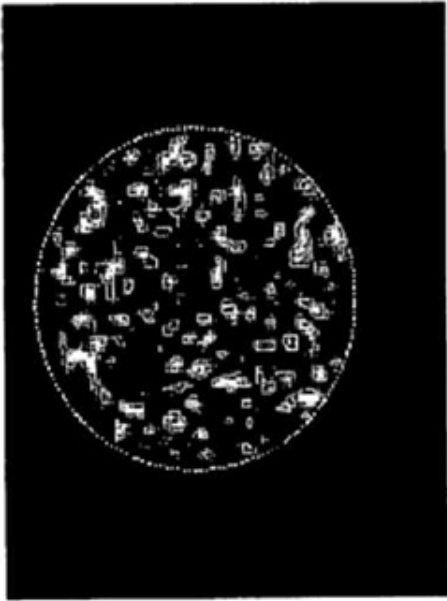


Fig. 35K

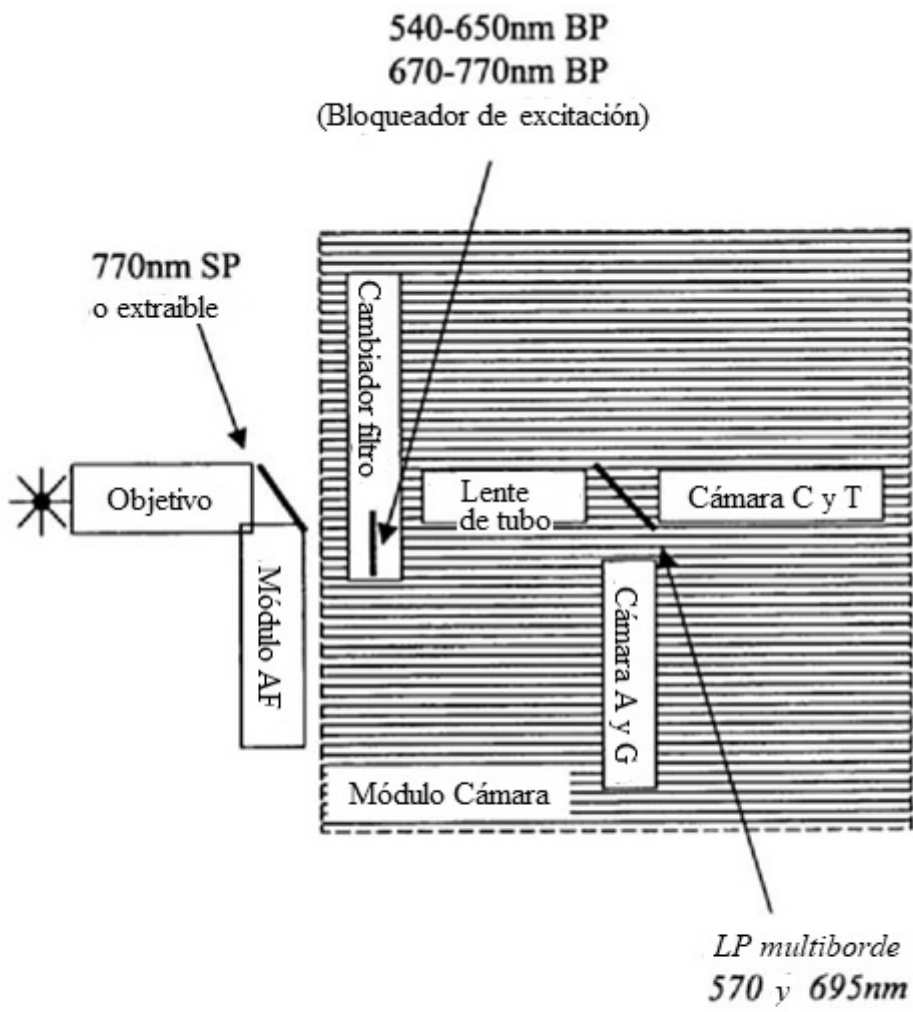
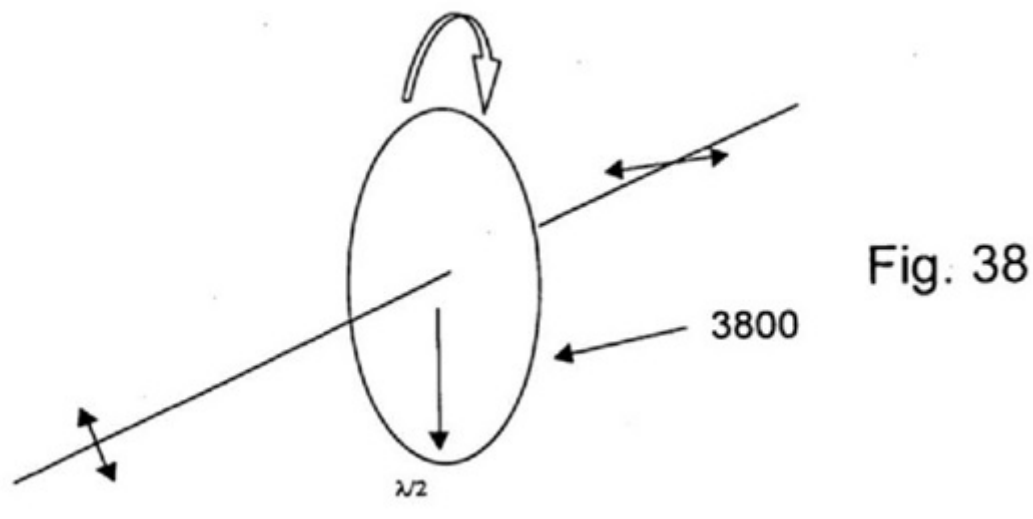
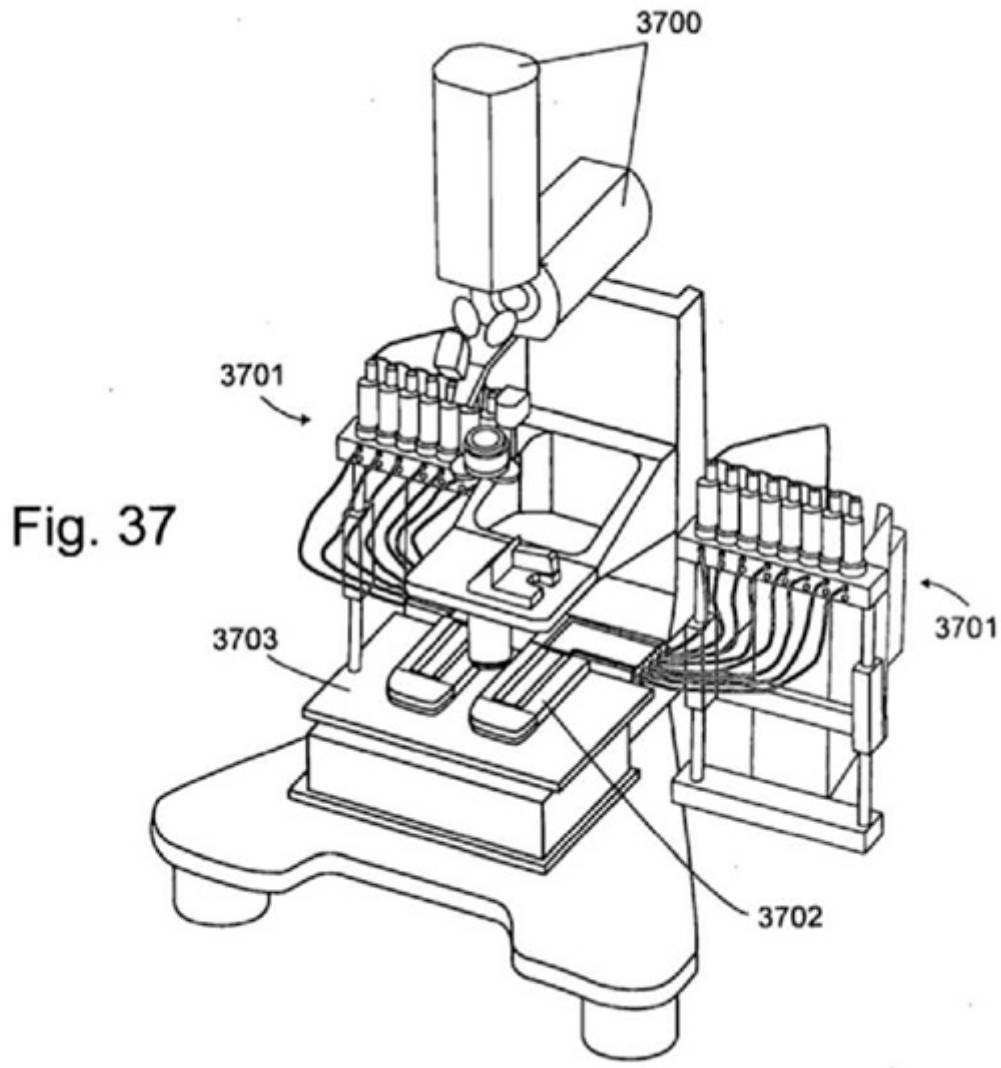


Fig. 36



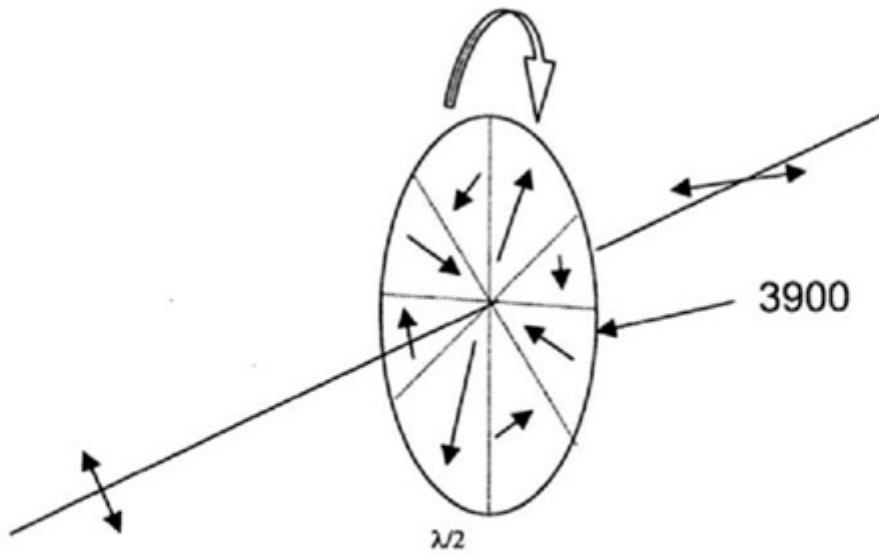


Fig. 39

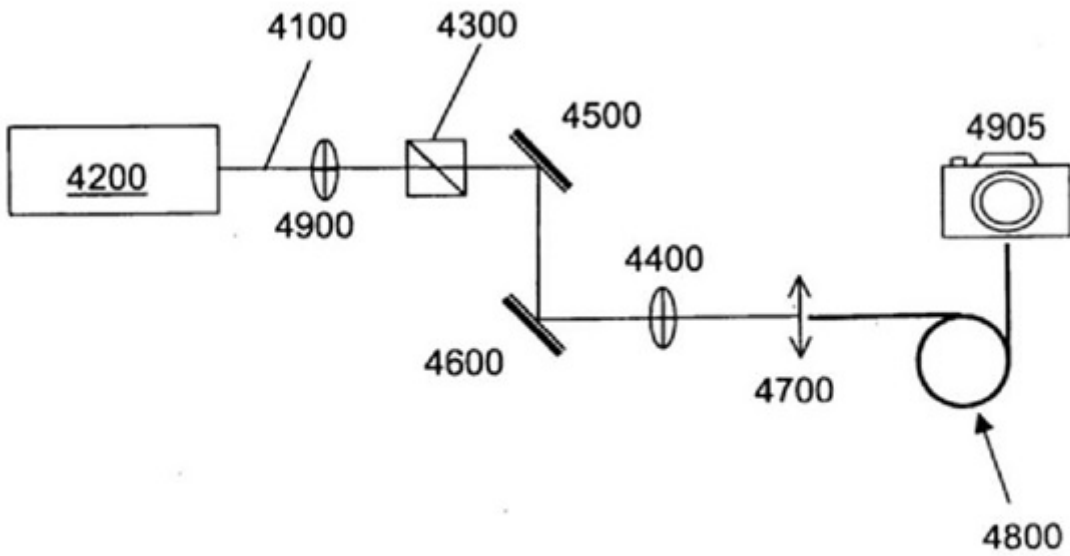


Fig. 40

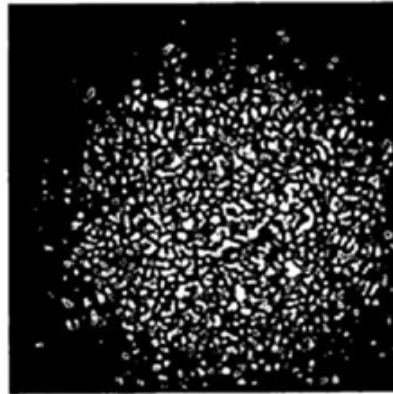


Fig. 41A

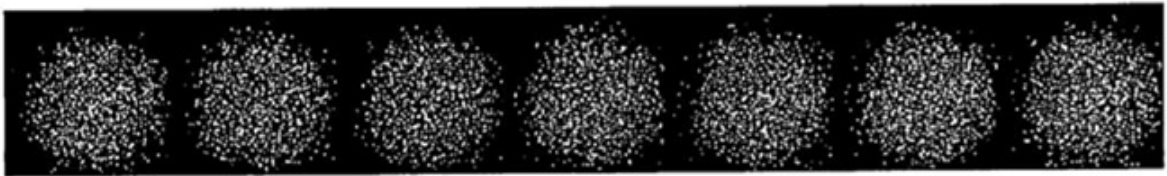


Fig. 41B

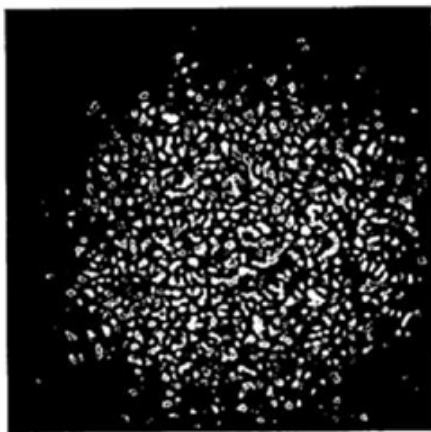


Fig. 41C

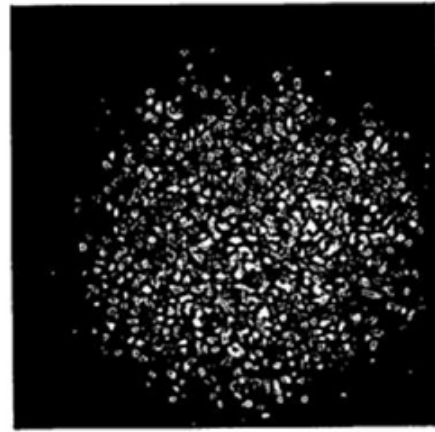


Fig. 41D

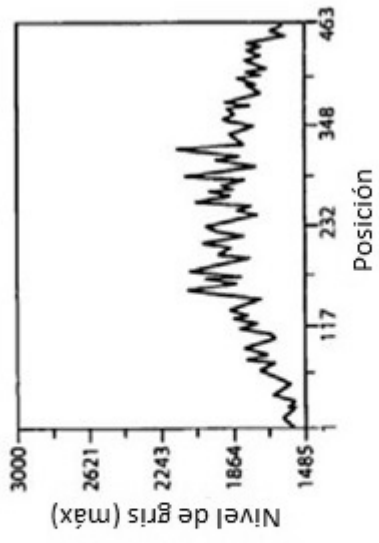


Fig. 42B

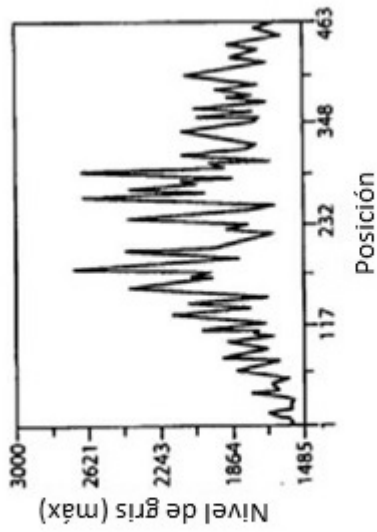


Fig. 42A

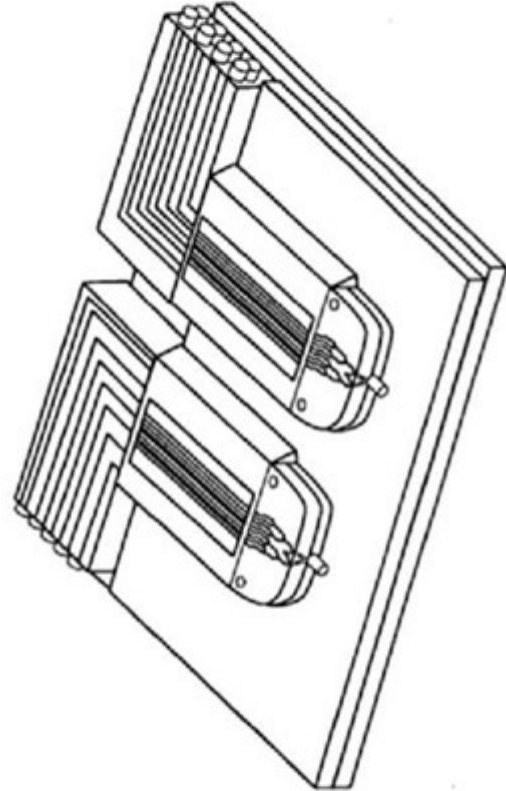


Fig. 43

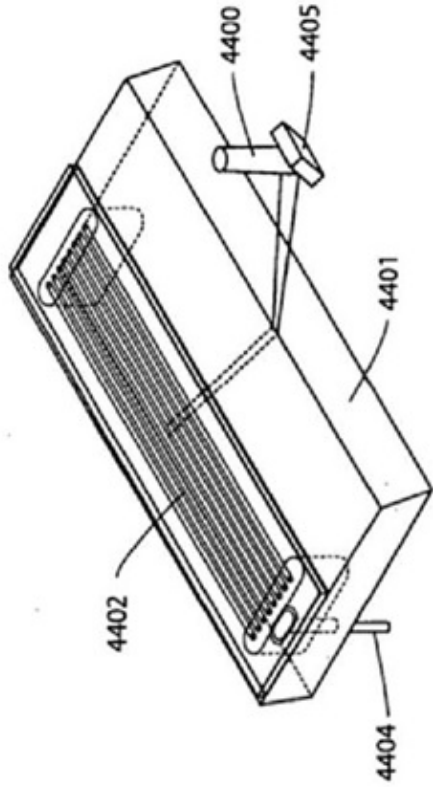


Fig. 44B

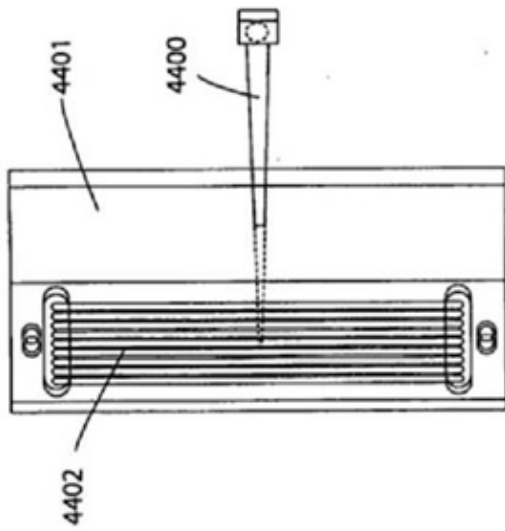


Fig. 44A

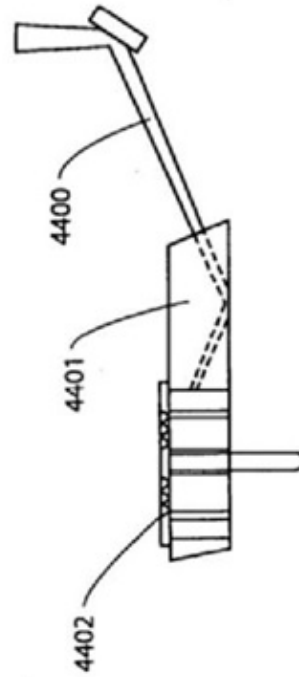


Fig. 44C

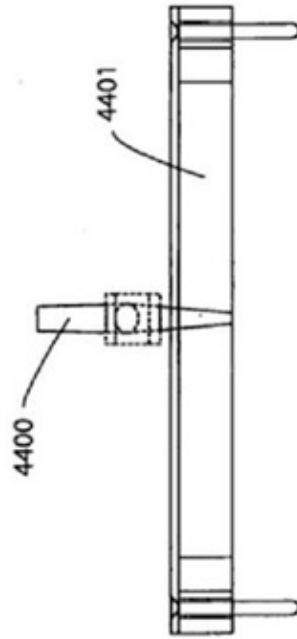


Fig. 44D

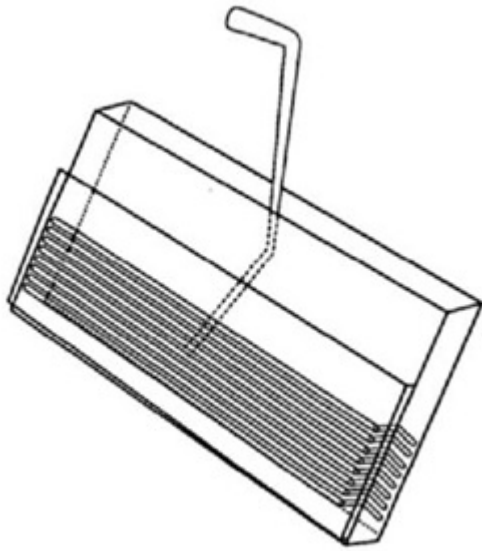


Fig. 44E

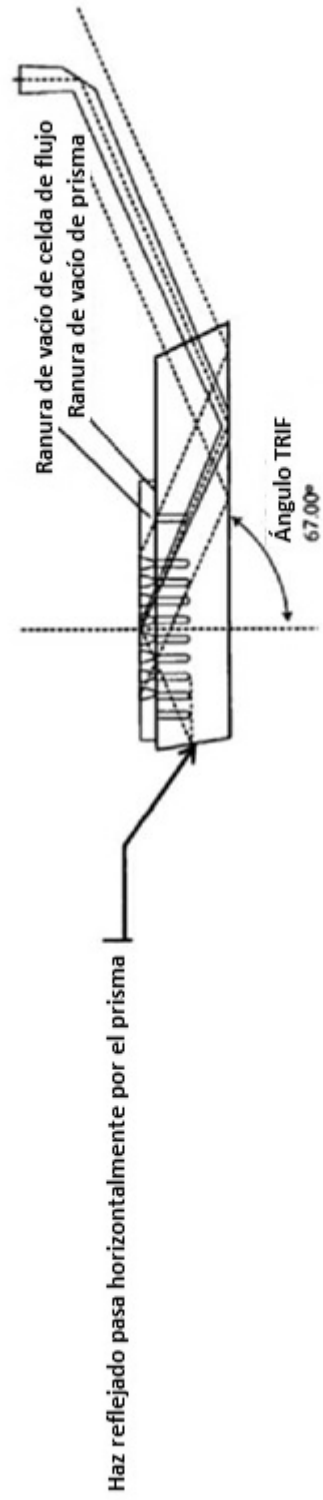


Fig. 44F

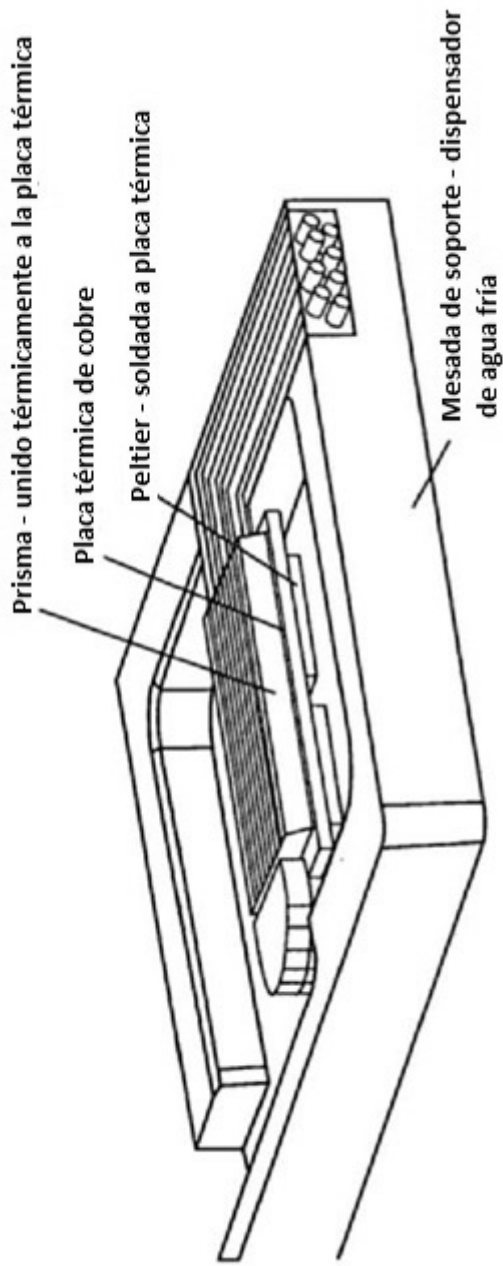


Fig. 45

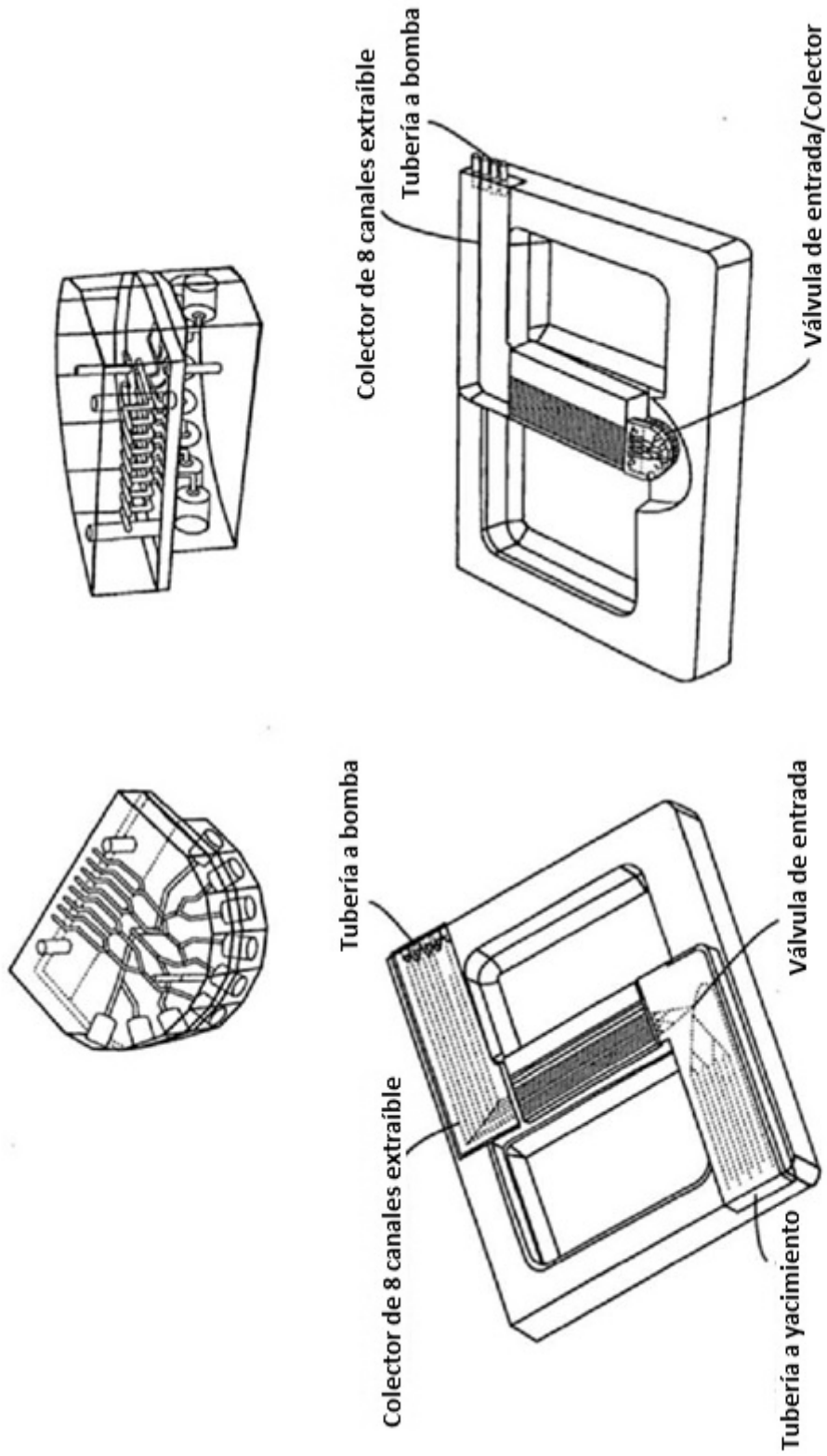


Fig. 46

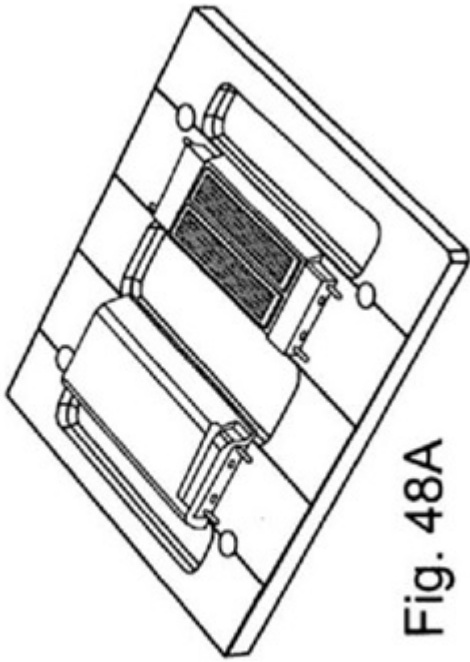


Fig. 48A

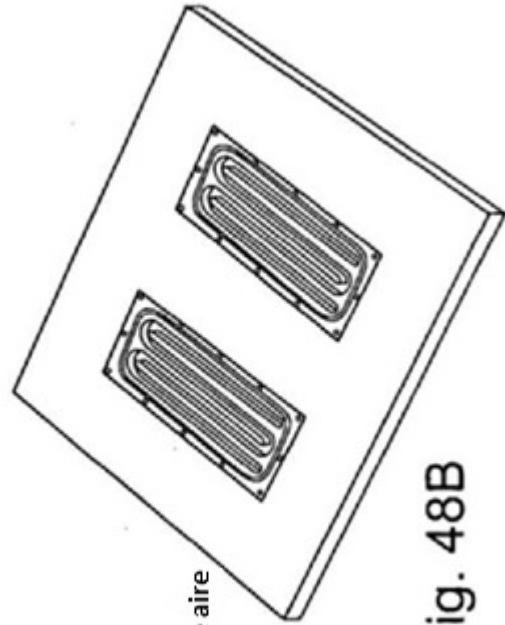


Fig. 48B

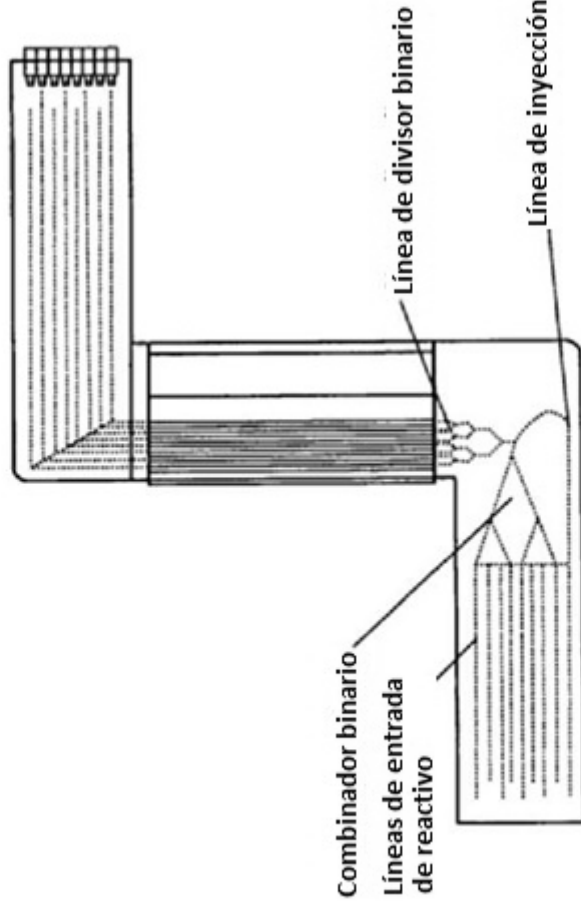
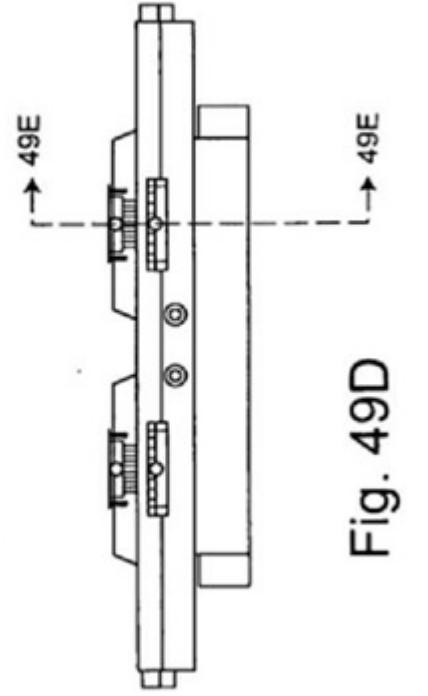
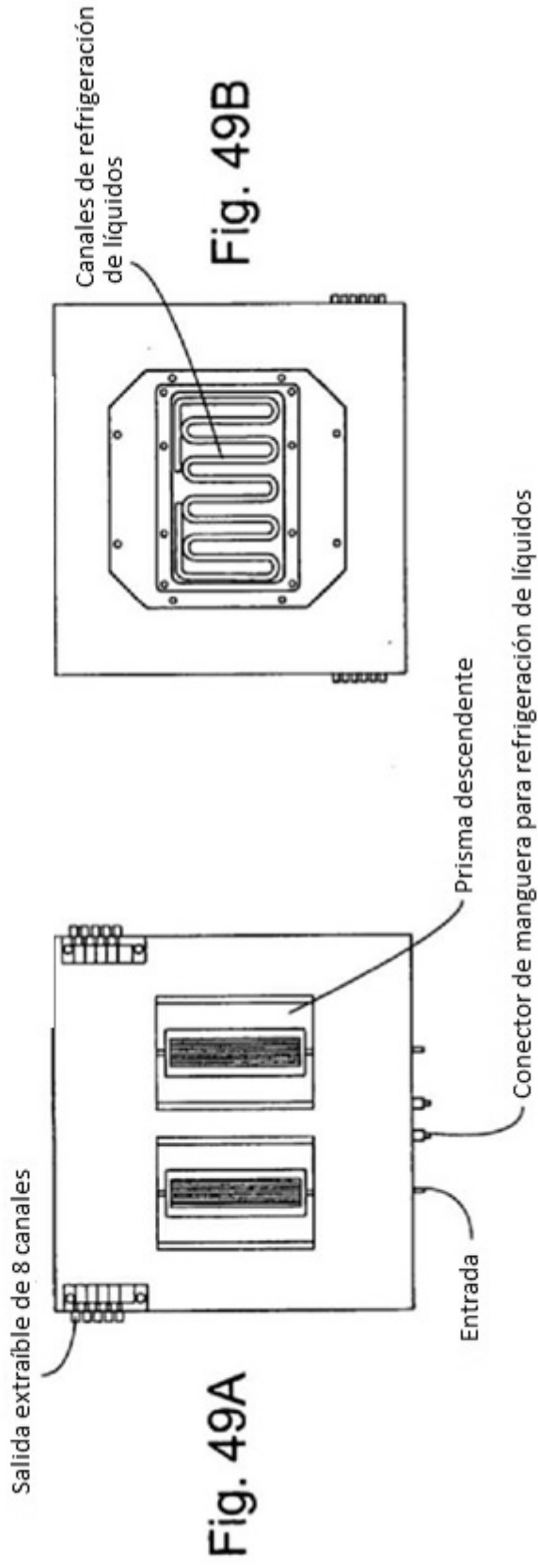


Fig. 47



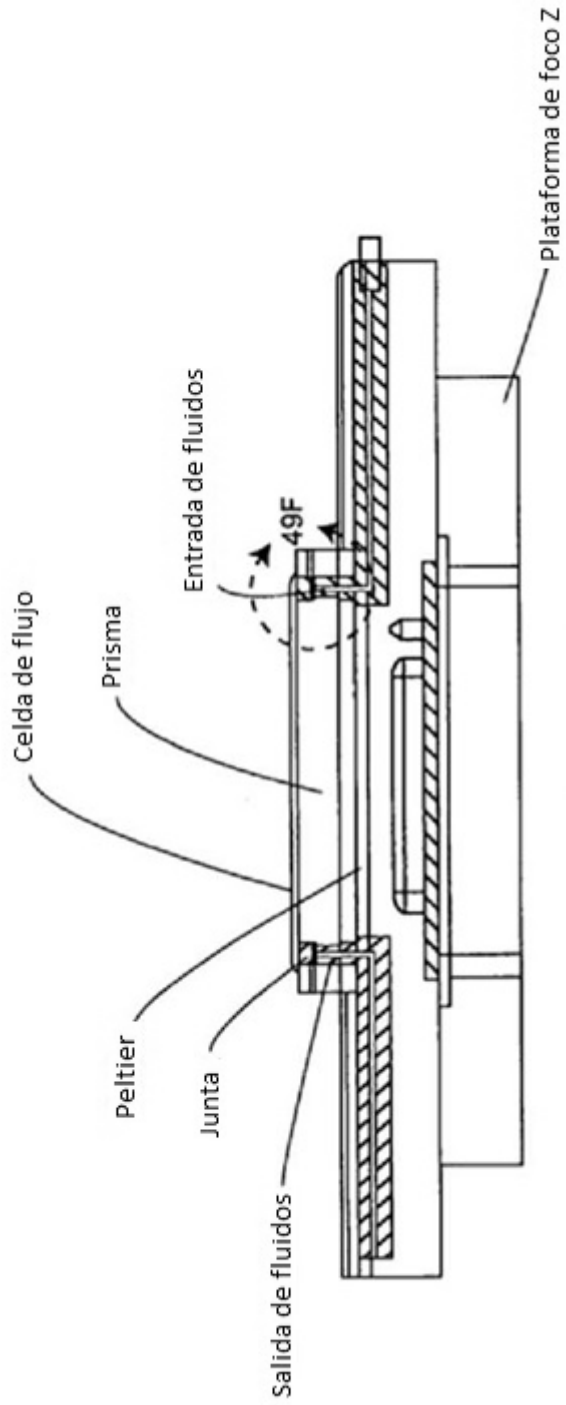


Fig. 49E

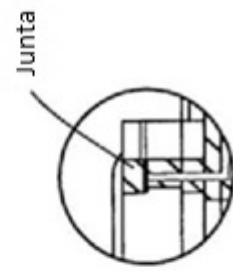


Fig. 49F