República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112017002501-9 B1

(22) Data do Depósito: 07/08/2015

(45) Data de Concessão: 07/06/2022

(54) Título: DISPOSITIVOS INTEGRADOS, SISTEMAS, MÉTODO DE DETECÇÃO DE PRESENÇA DE MOLÉCULA EM AMOSTRA, MÉTODO DE FORMAÇÃO DE DISPOSITIVO INTEGRADO E MÉTODO DE ANÁLISE DE ESPÉCIME

(51) Int.Cl.: G01N 21/64; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 08/08/2014 US 62/035,258; 20/05/2015 US 62/164,464.

(73) Titular(es): QUANTUM-SI INCORPORATED.

(72) Inventor(es): JONATHAN M. ROTHBERG; ALI KABIRI; JASON W. SICKLER; BRETT J. GYARFAS; JEREMY LACKEY; GERARD SCHMID; LAWRENCE C. WEST; BENJAMIN CIPRIANY; KEITH G. FIFE; FARSHID GHASEMI.

(86) Pedido PCT: PCT US2015044379 de 07/08/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/023011 de 11/02/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 07/02/2017

(57) Resumo: DISPOSITIVO INTEGRADO COM FONTE DE LUZ EXTERNA PARA SONDAR, DETECTAR E ANALISAR MOLÉCULAS. Trata-se de sistema e métodos para analisar moléculas únicas e realizar sequenciamento de ácido nucleico. Um dispositivo integrado inclui múltiplos pixels com cavidades de amostra configuradas para receber uma amostra que, quando excitada, emite radiação. O dispositivo integrado inclui pelo menos uma guia de onda configurada para propagar energia de excitação às cavidades de amostra de uma região do dispositivo integrado configurado para se acoplar a uma fonte de energia de excitação. Um pixel também pode incluir pelo menos um elemento para direcionar a energia de emissão em direção a um sensor dentro do pixel. O sistema também inclui um instrumento que interage com o dispositivo integrado. O instrumento pode incluir uma fonte de energia de excitação para fornecer energia de excitação ao dispositivo integrado acoplando-se a uma região de acoplamento de energia de excitação do dispositivo integrado. Um dos múltiplos marcadores distinguíveis por parâmetros temporais da energia de emissão pode identificar a amostra e a configuração do sensor dentro de um pixel pode permitir a detecção de um parâmetro temporal associado ao marcador que identifica a amostra.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DISPOSITIVOS INTEGRADOS, SISTEMAS, MÉTODO DE DETECÇÃO DE PRESENÇA DE MOLÉCULA EM AMOSTRA, MÉTODO DE FORMAÇÃO DE DISPOSITIVO INTEGRADO E MÉTODO DE ANÁLISE DE ESPÉCIME".**

PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/035.258, intitulado "INTEGRATED DEVICE WITH EXTERNAL LIGHT SOURCE FOR PROBING, DETECTING, AND ANALYZING MOLECULES", depositado em 8 de agosto de 2014, e Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/164.464, intitulado "INTEGRATED DEVICE WITH EXTERNAL LIGHT SOURCE FOR PROBING, DETECTING, AND ANALYZING MOLECULES", depositado em 20 de maio de 2015, cada um dos quais está aqui incorporado, a título de referência, em sua totalidade.

[0002] Esse pedido é relacionado aos seguintes pedidos:

• Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/164.506, intitulado "INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS", depositado em 20 de maio de 2015;

• Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/164.485, intitulado "PULSED LASER", depositado em 20 de maio de 2015;

• Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/164.482, intitulado "METHODS FOR NUCLEIC ACID SEQUENCING", depositado em 20 de maio de 2015;

• Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/035,242, intitulado "OPTICAL SYSTEM AND ASSAY CHIP FOR PROBING, DETECTING AND ANALYZING MOLECULES", depositado em 8 de agosto de 2014, o qual está aqui incorporado, a título de referência, em sua totalidade;

• Um pedido de patente não provisório depositado na mesma

data do presente pedido, que porta o nº de Dossiê U.S. R0708.70002 US02, intitulado "INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS"; e

• Um pedido de patente não provisório depositado na mesma data do presente pedido, que porta o nº de Dossiê U.S. R0708.70003 US01, intitulado "OPTICAL SYSTEM AND ASSAY CHIP FOR PROBING, DETECTING AND ANALYZING MOLECULES".

[0003] Cada um dos pedidos relacionados listados acima está aqui incorporado, a título de referência, em sua totalidade.

CAMPO DA APLICAÇÃO

[0004] A presente aplicação é direcionada geralmente a dispositivos, métodos e conjuntos de procedimentos para realizar análise rápida, massivamente paralela e quantitativa de amostras biológicas e/ou químicas, e métodos de fabricar os ditos dispositivos.

ANTECEDENTES

[0005] A detecção e a análise de amostras biológicas podem ser realizadas com uso de ensaios biológicos ("bioensaios"). Os bioensaios envolvem convencionalmente equipamentos de laboratório dispendiosos grandes que exigem pesquisadores treinados para operar o equipamento e realizar os bioensaios. Além disso, os bioensaios são convencionalmente realizados em volume, de modo que uma quantidade grande de um tipo particular de amostra seja necessária para detecção e quantificação.

[0006] Alguns bioensaios são realizados etiquetando-se amostras com marcadores luminescentes que emitem luz de um comprimento de onda particular. Os marcadores são iluminados com uma fonte de luz para causar luminescência, e a luz luminescente é detectada com um fotodetector para quantizar a quantidade de luz luminescente emitida pelos marcadores. Os bioensaios que usam marcadores luminescentes envolvem convencionalmente fontes de luz laser dispendi-

osas para iluminar amostras e óptica e eletrônica de detecção luminescente complicadas para coletar a luminescência a partir das amostras iluminadas.

SUMÁRIO

[0007] A tecnologia descrita no presente documento se refere a um aparelho e a métodos para analisar espécimes rapidamente com uso de uma fonte de pixel ativo, em que o dispositivo integrado pode fazer interface com um instrumento de computação móvel. O dispositivo integrado pode estar na forma de um laboratório em chip descartável ou reciclável ou um módulo empacotado que é configurado para receber uma quantidade pequena de um espécime e executar, em paralelo, um número grande de análises de amostras dentro do espécime. O dispositivo integrado pode ser usado para detectar a presença de analitos químicos ou biológicos particulares em algumas modalidades, para avaliar reações químicas ou biológicas em algumas modalidades, e para determinar sequências genéticas em algumas modalidades. De acordo com algumas implantações, o dispositivo integrado pode ser usado para sequenciamento de gene de molécula única.

[0008] De acordo com algumas implantações, um usuário deposita um espécime em uma câmara no dispositivo integrado, e insere o dispositivo integrado em um instrumento de recepção. O instrumento de recepção, independente ou em comunicação com um computador, faz interface automaticamente com o dispositivo integrado, recebe os dados do dispositivo integrado, processa os dados recebidos, e fornece resultados da análise ao usuário. Conforme pode ser notado, a integração e a inteligência de computação no chip, instrumento de recepção, e ou computador reduz o nível de habilidade exigido pelo usuário.

[0009] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um dispositivo integrado é fornecido, em que compreende uma pluralidade de pixels. Um pixel dentre a pluralidade de pixels compre-

ende uma cavidade de amostra configurada para receber energia de excitação a partir de uma fonte de excitação externa para o dispositivo integrado e pelo menos um sensor posicionado para receber a luminescência a partir de uma amostra posicionada na cavidade de amostra e gerar um sinal que fornece informações de identificação da amostra com base na luminescência recebida.

[0010] Em algumas modalidades, o sinal é indicativo de um parâmetro temporal da luminescência recebida. Em algumas modalidades, o parâmetro temporal é um tempo de vida associado à luminescência da amostra. Em algumas modalidades, o sinal é indicativo de um espectro da luminescência. Em algumas modalidades, o sinal é indicativo de um comprimento de onda característico da luminescência. Em algumas modalidades, o sinal e a energia de excitação indicam um espectro de absorção da amostra. Em algumas modalidades, o sinal e a energia de excitação indicam um comprimento de onda característico absorvido pela amostra.

[0011] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um dispositivo integrado é fornecido, em que compreende uma região de pixel que compreende uma pluralidade de pixels. Um pixel dentre a pluralidade de pixels tem uma cavidade de amostra em uma superfície do dispositivo integrado, em que a cavidade de amostra é configurada para receber uma amostra, pelo menos um sensor configurado para receber luminescência da cavidade de amostra, e pelo menos uma guia de onda para entregar energia de excitação a uma proximidade da cavidade de amostra. O dispositivo integrado compreende uma região de acoplamento de fonte de excitação que compreende um componente de acoplamento configurado para receber a energia de excitação de uma fonte de energia de excitação externa e acoplar a energia de excitação ao guia de onda.

[0012] De acordo com algumas modalidades da presente aplica-

ção, um sistema é fornecido, em que compreende um módulo de fonte de excitação que compreende uma fonte de excitação configurada para emitir um pulso de energia de excitação que tem uma primeira duração de tempo e um dispositivo integrado. O dispositivo integrado que compreende uma cavidade de amostra configurada para receber uma amostra que, quando acoplada ao pulso de energia de excitação, emite luminescência, um sensor que detecta a luminescência ao longo de uma segunda duração de tempo, em que a segunda duração de tempo ocorre após a primeira duração de tempo, uma primeira trajetória de energia ao longo da qual o pulso de energia de excitação se move da fonte de excitação a um componente de acoplamento de fonte de energia, uma segunda trajetória de energia ao longo da qual o pulso de energia de excitação se move do componente de acoplamento de fonte de energia à cavidade de amostra, e uma terceira trajetória de energia ao longo da qual a luminescência se move da cavidade de amostra ao sensor.

[0013] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um método de detectar a presença de uma molécula em uma amostra é fornecido. O método compreende introduzir uma amostra identificada com um dentre uma pluralidade de marcadores luminescentes em uma cavidade de amostra, em que pelo menos uma porção da pluralidade de marcadores luminescentes tem valores de tempo de vida luminescente diferentes. O método compreende adicionalmente irradiar a cavidade de amostra com um pulso de luz, medir o tempo de chegada de fótons emitidos da cavidade de amostra, e determinar a identidade de um marcador com base no tempo de chegada dos fótons.

[0014] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um dispositivo integrado que compreende uma cavidade de amostra e um sensor é fornecido. A cavidade de amostra é configurada para receber uma amostra identificada com um dentre uma plurali-

dade de marcadores luminescentes, cada um dentre a pluralidade de marcadores luminescentes tem um valor de tempo de vida luminescente diferente. O sensor é configurado para detectar luminescência a partir de um dentre a pluralidade de marcadores luminescentes ao longo de uma pluralidade de durações de tempo, em que a pluralidade de durações de tempo é selecionada para diferenciar entre a pluralidade de marcadores luminescentes.

[0015] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um dispositivo integrado que compreende uma cavidade de amostra e uma pluralidade de sensores é fornecido. A cavidade de amostra é configurada para receber uma amostra identificada com um dentre uma pluralidade de marcadores luminescentes. Cada um dentre a pluralidade de marcadores luminescentes emite luminescência dentro de uma dentre uma pluralidade de faixas espectrais e uma porção da pluralidade de marcadores luminescentes que emitem luminescência em uma dentre a pluralidade de faixas espectrais tem, cada um, valores de tempo de vida luminescente diferentes. Cada sensor dentre a pluralidade de sensores é configurado para detectar uma dentre a pluralidade de faixas espectrais ao longo de uma pluralidade de durações de tempo e a pluralidade de durações de tempo são selecionadas para diferenciar entre a porção da pluralidade de marcadores luminescentes.

[0016] De acordo com algumas modalidades, um sistema que compreende pluralidade de fontes de excitação e um dispositivo integrado é fornecido. A pluralidade de fontes de excitação é configurada para emitir uma pluralidade de energias de excitação, em que cada uma dentre a pluralidade de fontes de excitação emite pulsos de uma dentre a pluralidade de energias de excitação. O dispositivo integrado inclui uma cavidade de amostra configurada para receber a amostra identificada com um dentre uma pluralidade de marcadores lumines-

centes. Uma porção da pluralidade de marcadores luminescentes emite luminescência depois de ser iluminada por uma dentre a pluralidade de energias de excitação e tem, cada um, valores de tempo de vida diferentes. O dispositivo integrado inclui adicionalmente um sensor configurado para detectar luminescência a partir de um dentre a pluralidade de marcadores luminescentes ao longo de uma pluralidade de durações de tempo após um pulso de uma dentre a pluralidade de energias de excitação, em que uma temporização do pulso de uma dentre a pluralidade de energias de excitação e a pluralidade de durações de tempo se diferenciam entre a pluralidade de marcadores luminescentes.

[0017] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, a método de formação de um dispositivo integrado é fornecido. O método compreende formar uma pluralidade de regiões de sensor, em que uma região de sensor dentre a pluralidade de regiões de sensor inclui uma pluralidade de sensores, formar uma pluralidade de cavidades de amostra, em que a cavidade de amostra dentre a pluralidade de cavidades de amostra se alinha a uma correspondente dentre a pluralidade de regiões de sensor, e formar pelo menos uma guia de onda configurada para acoplar a energia de excitação separada da pluralidade de cavidades de amostra e energia de excitação direta a pelo menos uma cavidade de amostra.

[0018] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um instrumento é fornecido. O instrumento compreende pelo menos uma fonte de excitação para fornecer pelo menos uma energia de excitação, um sistema de posicionamento de fonte de excitação para alinhar a pelo menos uma energia de excitação emitida por meio da pelo menos uma fonte de excitação a uma região de acoplamento de um dispositivo integrado, e um conjunto de circuitos de leitura configurado para receber pelo menos um sinal de leitura representativo de

energia de emissão detectada por um sensor no dispositivo integrado.

[0019] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um método para sequenciar uma molécula-alvo de ácido nucleico é fornecido. O método compreende fornecer um dispositivo integrado que inclui uma cavidade de amostra que contém a molécula-alvo de ácido nucleico, uma enzima de polimerização, e uma pluralidade de tipos de nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo. Cada tipo de nucleotídeo ou análogo de nucleotídeo dentre a pluralidade de tipos de nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo é identificado com um ou uma pluralidade de marcadores. O método compreende adicionalmente fornecer uma reação de extensão em um local de preparação da molécula-alvo de ácido nucleico na presença de uma enzima de polimerização para incorporar sequencialmente pelo menos uma porção dos nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo em um filamento crescente que é complementar à molécula-alvo de ácido nucleico, em que, mediante excitação por energia de excitação, os marcadores que identificam os nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo produzem emissões da cavidade de amostra mediante incorporação no filamento crescente e tempos de vida de emissão são distinguíveis para a pluralidade de tipos de nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo. O método compreende adicionalmente identificar os nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo com base nos sinais recebidos do sensor que são indicativos dos tempos de vida de emissão, sequenciando, assim, a molécula-alvo de ácido nucleico.

[0020] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, um método para sequenciamento de ácido nucleico é fornecido. O método compreende fornecer um dispositivo integrado que compreende uma pluralidade de cavidades de amostra e uma fonte de energia de excitação que é acoplada de modo operativo à pluralidade de cavidades de amostra. Uma cavidade de amostra individual dentre a

pluralidade de cavidades de amostra compreende uma molécula-alvo nucleica, uma enzima de polimerização e nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo. Um marcador dentre uma pluralidade de marcadores identifica cada um dentre os nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo. O método compreende adicionalmente submeter a molécula-alvo de ácido nucleico a uma reação de polimerização para render um filamento crescente que é complementar à molécula-alvo de ácido nucleico na presença dos nucleotídeos ou de análogos de nucleotídeo e da enzima de polimerização. A pluralidade de marcadores emite emissões mediante excitação por energia de excitação a partir da fonte de excitação enquanto os nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo são incorporados no filamento crescente. O método compreende adicionalmente detectar os tempos de vida das emissões enquanto é realizada a reação de extensão, em que os tempos de vida das emissões são distinguíveis para a pluralidade de marcadores, e identificar uma sequência da molécula-alvo de ácido nucleico com base nos tempos de vida das emissões.

[0021] De acordo com algumas modalidades da presente aplicação, a método de análise de um espécime é fornecido. O método compreende depositar o espécime em uma superfície de um dispositivo integrado que tem uma pluralidade de pixels, em que cada pixel tem uma cavidade de amostra configurada para receber uma amostra identificada com um primeiro marcador de uma pluralidade de marcadores e uma região de sensor que tem pelo menos um sensor, alinhar o dispositivo integrado a um instrumento que tem pelo menos uma fonte de energia de excitação para acoplar a energia de excitação a uma cavidade de amostra de um primeiro pixel e conjunto de circuitos de leitura para receber sinais de leitura do pelo menos um sensor da região de sensor do primeiro pixel, iluminar o primeiro marcador com energia de excitação, e detectar, a partir dos sinais de leitura do pelo

menos um sensor da região de sensor do primeiro pixel, um tempo de vida da energia de emissão gerada a partir de uma emissão pelo primeiro marcador.

[0022] O termo "pixel" pode ser usado na presente revelação para se referir a uma célula de unidade de um dispositivo integrado. A célula de unidade pode incluir uma cavidade de amostra e um sensor. A célula de unidade pode incluir adicionalmente pelo menos uma estrutura óptica de acoplamento por excitação (que pode ser chamada de "primeira estrutura") que é configurada para intensificar o acoplamento de energia de excitação da fonte de excitação à cavidade de amostra. A célula de unidade pode incluir adicionalmente pelo menos uma estrutura de acoplamento por emissão que é configurada para intensificar o acoplamento de emissão da cavidade de amostra ao sensor. A célula de unidade pode incluir adicionalmente dispositivos eletrônicos integrados (por exemplo, dispositivos CMOS). Pode haver uma pluralidade de pixels disposta em uma matriz em um dispositivo integrado.

[0023] O termo "óptico" pode ser usado na presente revelação para se referir a bandas espectrais de infravermelho visíveis, quase infravermelho e visíveis.

[0024] O termo "etiqueta" pode ser usado na presente revelação para se referir a uma etiqueta, sonda, ou repórter e inclui um marcador anexado a uma amostra a ser analisada ou um marcador anexado a um reagente que pode se ligar a uma amostra.

[0025] A expressão "energia de excitação" pode ser usada na presente revelação para se referir a qualquer forma de energia (por exemplo, radiativa ou não radiativa) entregue a uma amostra e/ou marcador dentro da cavidade de amostra. A energia de excitação radioativa pode compreender radiação óptica em um ou mais comprimentos de onda característicos.

[0026] A expressão "comprimento de onda característico" pode ser

usada na presente revelação para se referir a um comprimento de onda central ou predominante dentro de uma largura de banda limitada de radiação. Em alguns casos, a mesma pode se referir a um comprimento de onda de pico de uma largura de banda de radiação. Exemplos de comprimentos de onda característicos de fluoróforos são 563 nm, 595 nm, 662 nm, e 687 nm.

[0027] A expressão "energia característica" pode ser usada na presente revelação para se referir a uma energia associada a um comprimento de onda característico.

[0028] O termo "emissão" pode ser usado na presente revelação para se referir à emissão a partir de um marcador e/ou amostra. Isso pode incluir emissão radioativa (por exemplo, emissão óptica) ou transferência de energia não radioativa (por exemplo, transferência de energia de Dexter ou transferência de energia ressonante de Förster). A emissão resulta a partir de excitação de uma amostra e/ou marcador dentro da cavidade de amostra.

[0029] A expressão "emissão a partir de uma cavidade de amostra" ou "emissão a partir de uma amostra" pode ser usada na presente revelação para se referir à emissão a partir de um marcador e/ou amostra dentro de uma cavidade de amostra.

[0030] O termo "autoalinhado" pode ser usado na presente revelação para se referir a um processo de microfabricação no qual pelo menos dois elementos característicos (por exemplo, uma cavidade de amostra e uma estrutura de acoplamento por emissão, uma cavidade de amostra e uma fonte de excitação) podem ser fabricados e alinhados entre si sem usar duas etapas de padronização litográfica separada nas quais uma primeira etapa de padronização litográfica (por exemplo, fotolitografia, litografia de feixe de íons, litografia EUV) imprime um padrão de um primeiro elemento e uma segunda etapa de padronização litográfica é alinhada à primeira etapa de padronização

litográfica e imprime um padrão do segundo elemento. Um processo autoalinhado pode compreender incluir o padrão tanto do primeiro quanto do segundo elemento em uma etapa de padronização litográfica única, ou pode compreender formar o segundo elemento com uso de recursos de uma estrutura fabricada do primeiro elemento.

[0031] O termo "sensor" pode ser usado na presente revelação para se referir a um ou mais dispositivos de circuito integrado configurados para detectar a emissão da cavidade de amostra e produzir pelo menos um sinal elétrico representativo da emissão detectada.

[0032] O termo "nanoescala" pode ser usado na presente revelação para se referir a uma estrutura que tem pelo menos uma dimensão ou tamanho de recurso mínimo na ordem de 150 nanômetros (nm) ou menos, mas não maior que aproximadamente 500 nm.

[0033] O termo "microescala" pode ser usado na presente revelação para se referir a uma estrutura que tem pelo menos uma dimensão ou tamanho de recurso mínimo entre aproximadamente 500 nm e aproximadamente 100 mícrons.

[0034] A expressão "intensificar energia de excitação" pode ser usada na presente revelação para se referir a aumentar uma intensidade de energia de excitação em uma região de excitação de uma cavidade de amostra. A intensidade pode ser aumentada concentrando-se e/ou ressonando energia de excitação incidente na cavidade de amostra, por exemplo. Em alguns casos, a intensidade pode ser aumentada por revestimentos antirreflexo ou camadas com perdas que permitem que a energia de excitação penetre adicionalmente a região de excitação de uma cavidade de amostra. Uma intensificação de energia de excitação pode ser uma referência comparativa a uma modalidade que não inclui estruturas para intensificar a energia de excitação em uma região de excitação de uma cavidade de amostra.

[0035] Os termos "cerca de", "aproximadamente", e "substancial-

mente" podem ser usados na presente revelação para se referir a um valor, e são destinados a abranger o valor referenciado mais e menos variações aceitáveis. A quantidade de variação pode ser menor que 5% em algumas modalidades, menor que 10% em algumas modalidades, e ainda menor que 20% em algumas modalidades. Em modalidades em que um aparelho pode funcionar apropriadamente por uma faixa grande de valores, por exemplo, uma faixa que inclui uma ou mais ordens de magnitude, em que a quantidade de variação pode ser um fator de dois. Por exemplo, se um aparelho funcionar apropriadamente para um valor na faixa de 20 a 350, "aproximadamente 80" pode abranger valores entre 40 e 160.

[0036] O termo "adjacente" pode ser usado na presente revelação para se referir a dois elementos dispostos em proximidade entre si (por exemplo, dentro de uma distância que é menor que cerca de um quinto de uma dimensão transversal ou vertical de um pixel). Em alguns casos, podem haver estruturas ou camadas intermediárias entre elementos adjacentes. Em alguns casos, elementos adjacentes podem ser imediatamente adjacentes entre si sem estruturas ou elementos intermediários.

[0037] O termo "detectar" pode ser usado na presente revelação para se referir a receber uma emissão em um sensor de uma cavidade de amostra e produzir pelo menos um sinal elétrico representativo de ou associado à emissão. O termo "detectar" também pode ser usado na presente revelação para se referir a determinar a presença de, ou identificar uma propriedade de uma amostra ou marcador particular na cavidade de amostra com base na emissão a partir da cavidade de amostra.

[0038] O supracitado e outros aspectos, modalidades, e recursos dos presentes ensinamentos podem ser mais completamente entendidos a partir da descrição a seguir em combinação com os desenhos

anexos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0039] O artesão versado na técnica entenderá que as Figuras, descritas no presente documento, são apenas com propósitos de ilustração. Deve ser entendido que, em alguns casos, vários aspectos da invenção podem ser mostrados de modo exagerado ou ampliado para facilitar um entendimento da invenção. Nos desenhos, caracteres de referência semelhantes se referem geralmente a recursos semelhantes, elementos funcionalmente similares e/ou estruturalmente similares ao longo das várias Figuras. Os desenhos não estão necessariamente em escala, em que a ênfase é dada, em vez disso, na ilustração dos princípios dos ensinamentos. Os desenhos não são destinados a limitar o escopo dos presentes ensinamentos em qualquer maneira.

[0040] Os recursos e vantagens da presente invenção se tornarão mais evidentes a partir da descrição detalhada estabelecida abaixo quando tomada em combinação com os desenhos.

[0041] Durante a descrição das modalidades com referência aos desenhos, as referências de direção ("acima", "abaixo", "topo", "fundo", "esquerda", "direita", "horizontal", "vertical", etc.) podem ser usadas. Tais referências são destinadas meramente como um auxílio ao leitor que visualiza os desenhos em uma orientação normal. Essas referências direcionais não são destinadas a descrever uma orientação preferida ou única de um dispositivo incorporado. Um dispositivo pode ser incorporado em outras orientações.

[0042] A Figura 1 a 1 ilustra um gráfico de probabilidade para emitir um fóton a partir de um marcador como uma função de tempo.

[0043] A Figura 1-2A ilustra espectros de temporização de emissão, de acordo com algumas modalidades.

[0044] A Figura 1-2B ilustra espectros de comprimento de onda de absorção, de acordo com algumas modalidades.

[0045] A Figura 1-2C ilustra espectros de comprimento de onda de emissão, de acordo com algumas modalidades.

[0046] A Figura 1-3A ilustra um espaço de fase para comprimento de onda de emissão e tempo de vida de emissão.

[0047] A Figura 1-3B ilustra um espaço de fase para comprimento de onda de absorção e tempo de vida de emissão.

[0048] A Figura 1-4 ilustra um espaço de fase para comprimento de onda de emissão, comprimento de onda de absorção, e tempo de vida de emissão.

[0049] A Figura 2-1A é uma representação de diagrama de blocos de um aparelho que pode ser usado para análise móvel rápida de espécimes biológicos e químicos, de acordo com algumas modalidades.

[0050] A Figura 2-1B é um diagrama de blocos de um dispositivo integrado e um instrumento, de acordo com algumas modalidades.

[0051] A Figura 2-2 ilustra um dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[0052] A Figura 3-1A ilustra uma fileira de pixels de um dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[0053] A Figura 3-1B ilustra o acoplamento de energia de excitação a cavidades de amostra em uma fileira de pixels e energia de emissão a partir de cada cavidade de amostra direcionada a sensores, de acordo com algumas modalidades.

[0054] A Figura 3-2 ilustra um dispositivo integrado e uma fonte de excitação, de acordo com algumas modalidades.

[0055] A Figura 4-1A ilustra um acoplamento de borda de uma fonte de excitação a uma guia de onda, de acordo com algumas modalidades.

[0056] A Figura 4-1B ilustra um acoplador de grade para acoplar um dispositivo integrado a uma fonte de excitação, de acordo com algumas modalidades.

[0057] A Figura 4-2 ilustra um dispositivo integrado e uma fonte de excitação, de acordo com algumas modalidades.

[0058] A Figura 4-3A ilustra uma região de excitação de acoplamento exemplificativa, de acordo com algumas modalidades.

[0059] A Figura 4-3B ilustra simulações de intensidade de luz para a região de excitação de acoplamento mostrada na Figura 4-3A.

[0060] A Figura 4-3C ilustra um acoplador de grade e guia de onda, de acordo com algumas modalidades.

[0061] A Figura 4-4 plota a perda como uma função de raio de flexão para configurações de guia de onda diferente.

[0062] A Figura 4-5 ilustra um acoplador em estrela, de acordo com algumas modalidades.

[0063] A Figura 4-6 ilustra um acoplador em estrela para acoplar luz de entrada a partir de dois acopladores de grade, de acordo com algumas modalidades.

[0064] A Figura 4-7 ilustra configurações para divisores de MMI, de acordo com algumas modalidades.

[0065] A Figura 4-8 ilustra simulações de intensidade de luz através de um divisor de MMI.

[0066] A Figura 4-9A ilustra um acoplador de grade, de acordo com algumas modalidades.

[0067] As Figuras 4-9B e 4-9C ilustram um acoplador de grade, de acordo com algumas modalidades.

[0068] A Figura 5-1 ilustra uma cavidade de amostra formada em uma região de pixel de um dispositivo integrado, de acordo com uma modalidade.

[0069] A Figura 5-2 ilustra energia de excitação incidente em uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0070] A Figura 5-3 ilustra a atenuação de energia de excitação ao longo de uma cavidade de amostra que é formada como um guia de

onda de modo zero, de acordo com algumas modalidades.

[0071] A Figura 5-4 ilustra uma cavidade de amostra que inclui uma concavidade, que aumenta a energia de excitação em uma região de excitação associada à cavidade de amostra em algumas modalidades.

[0072] A Figura 5-5 compara intensidades de excitação para cavidades de amostra com e sem uma concavidade, de acordo com uma modalidade.

[0073] A Figura 5-6A ilustra uma cavidade de amostra e concavidade formadas em uma protuberância, de acordo com algumas modalidades.

[0074] A Figura 5-6B ilustra uma cavidade de amostra e concavidade de acordo com algumas modalidades.

[0075] A Figura 5-7A ilustra uma cavidade de amostra que tem paredes laterais afuniladas, de acordo com algumas modalidades.

[0076] A Figura 5-7B ilustra uma cavidade de amostra que tem paredes laterais curvadas e uma concavidade com uma dimensão transversal menor, de acordo com algumas modalidades.

[0077] A Figura 5-7C e a Figura 5-7D ilustram uma cavidade de amostra formada a partir das estruturas plasmônicas de superfície.

[0078] A Figura 5-7E ilustra uma cavidade de amostra que inclui uma estrutura de intensificação de energia de excitação formada ao longo de paredes laterais da cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0079] A Figura 5-7F ilustra uma cavidade de amostra formada em uma pilha de múltiplas camadas, de acordo com algumas modalidades.

[0080] A Figura 5-8 ilustra um revestimento de superfície formado em superfícies de uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0081] A Figura 5-9A a Figura 5-9E ilustram estruturas associadas

a um processo de desprendimento de formar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0082] A Figura 5-9F ilustra uma estrutura associada a um processo de desprendimento alternativo de formar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0083] A Figura 5-10A a Figura 5-10D ilustram estruturas associadas a um processo de gravação direta de formar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0084] A Figura 5-11 ilustra uma cavidade de amostra que pode ser formada em múltiplas camadas com uso de um processo de desprendimento ou um processo de gravação direta, de acordo com algumas modalidades.

[0085] A Figura 5-12 ilustra uma estrutura associada a um processo de gravação que pode ser usado para formar uma concavidade, de acordo com algumas modalidades.

[0086] A Figura 5-13A a Figura 5-13C ilustra estruturas associadas a um processo alternativo de formar uma concavidade, de acordo com algumas modalidades.

[0087] A Figura 5-14A a Figura 5-14D ilustra estruturas associadas a um processo para depositar um aderente e camadas de passivação, de acordo com algumas modalidades.

[0088] A Figura 5-15 ilustra uma estrutura associada a um processo para depositar um aderente de modo central dentro de uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0089] A Figura 5-16 ilustra uma cavidade de amostra com uma concavidade de acordo com algumas modalidades.

[0090] A Figura 6-1A ilustra uma simulação de radiação de excitação a partir de uma guia de onda acoplada a uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0091] A Figura 6-1B ilustra uma simulação de radiação de excita-

ção acoplada a uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[0092] As Figuras 6-2A, 6-2B, e 6-2C ilustra um dispositivo integrado com microcavidades, de acordo com algumas modalidades.

[0093] A Figura 6-3A ilustra um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[0094] A Figura 6-3B ilustra um dispositivo integrado com microcavidades, de acordo com algumas modalidades.

[0095] A Figura 6-3C ilustra um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[0096] A Figura 6-3D ilustra um dispositivo integrado com microcavidades, de acordo com algumas modalidades.

[0097] A Figura 6-4 ilustra um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[0098] A Figura 6-5 ilustra uma simulação de radiação de excitação que se propaga em um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[0099] As Figuras 6-6A, 6-6B, e 6-6C ilustram uma simulação de radiação de excitação que se propaga em um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[00100] A Figura 6-6D ilustra uma simulação de radiação de excitação que se propaga em um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[00101] A Figura 6-7A ilustra um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[00102] A Figura 6-7B ilustra uma simulação de radiação de excitação que se propaga em um dispositivo integrado com uma microcavidade, de acordo com algumas modalidades.

[00103] A Figura 6-7C ilustra uma simulação de radiação de excitação que se propaga em um dispositivo integrado com uma microcavi-

dade, de acordo com algumas modalidades.

[00104] As Figuras 6-8A e 6-8B ilustram um dispositivo integrado com uma guia de onda afunilada, de acordo com algumas modalidades.

[00105] As Figuras 6-9A e 6-9B ilustram um dispositivo integrado com uma guia de onda afunilada, de acordo com algumas modalidades.

[00106] A Figura 6-10 ilustram um gráfico de perda como uma função de comprimento de afunilamento.

[00107] A Figura 6-11A ilustra um dispositivo integrado com declives de cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[00108] As Figuras 6-11B e 6-11C ilustram um dispositivo integrado com declives de cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[00109] A Figura 6-12 ilustra uma matriz de cavidades de amostra de um dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00110] A Figura 6-13 ilustra um dispositivo integrado com uma guia de onda que tem uma dimensão variável, de acordo com algumas modalidades.

[00111] A Figura 6-14 ilustra um dispositivo integrado com uma guia de onda que tem uma dimensão variável, de acordo com algumas modalidades.

[00112] As Figuras 7-1A, 7-1B, e 7-1C ilustram componentes para acoplar a energia de emissão a partir de uma cavidade de amostra de um dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00113] A Figura 7-2A ilustra uma simulação de energia de emissão a partir de uma cavidade de amostra.

[00114] A Figura 7-2B ilustra um gráfico de energia de emissão em um ângulo a partir de uma cavidade de amostra.

[00115] A Figura 7-3 ilustra um gráfico de absorbância e refletância

como uma função de comprimento de onda.

[00116] As Figuras 7-4A e 7-4B ilustram um filtro de polarização, de acordo com algumas modalidades.

[00117] A Figura 7-5 ilustra um filtro de comprimento de onda, de acordo com algumas modalidades.

[00118] A Figura 7-6 ilustra um gráfico de transmitância como uma função de comprimento de onda.

[00119] A Figura 7-7 ilustra um filtro de múltiplos comprimentos de onda, de acordo com algumas modalidades.

[00120] A Figura 7-8 ilustra um gráfico de transmitância como uma função de comprimento de onda.

[00121] A Figura 7-9A e 7-9B ilustram um sensor com intervalos de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00122] A Figura 8-0A ilustra um sistema exemplificativo para fornecer pulsos de luz, de acordo com algumas modalidades.

[00123] A Figura 8-0B ilustra um gráfico de intensidade de luz como uma função de tempo.

[00124] A Figura 8-1 ilustra um gráfico de densidade de carreador como uma função de tempo.

[00125] A Figura 8-2 ilustra um sinal elétrico adaptado para formar uma saída óptica, de acordo com algumas modalidades.

[00126] A Figura 8-3 ilustra uma saída óptica a partir de uma fonte de excitação, de acordo com algumas modalidades.

[00127] A Figura 8-4 ilustra uma saída óptica a partir de uma fonte de excitação, de acordo com algumas modalidades.

[00128] A Figura 8-5 ilustra o desempenho de um diodo laser, de acordo com algumas modalidades.

[00129] A Figura 8-6A ilustra um pulsar de linha de transmissão, de acordo com algumas modalidades.

[00130] A Figura 8-6B ilustra pulsos de luz obtidos por um pulsar de

linha de transmissão, de acordo com algumas modalidades.

[00131] A Figura 8-7 ilustra um circuito para obter pulsos de luz, de acordo com algumas modalidades.

[00132] A Figura 8-8 ilustra um circuito para obter pulsos de luz, de acordo com algumas modalidades.

[00133] A Figura 8-9A ilustra a circuito para obter pulsos de luz, de acordo com algumas modalidades.

[00134] A Figura 8-9B ilustra um sinal elétrico do circuito mostrado na Figura 8-9A.

[00135] A Figura 8-10A ilustra a circuito para obter pulsos de luz, de acordo com algumas modalidades.

[00136] A Figura 8-10B ilustra um sinal elétrico do circuito mostrado na Figura 8-10A.

[00137] A Figura 8-11A ilustra uma disposição para combinar fontes de luz, de acordo com algumas modalidades.

[00138] A Figura 8-11B ilustra um gráfico de desempenho do circuito mostrado na Figura 8-10A.

[00139] A Figura 9-1 ilustra um módulo de fonte de excitação e um instrumento base, de acordo com algumas modalidades.

[00140] A Figura 9-2 ilustra um módulo de fonte de excitação e um instrumento base, de acordo com algumas modalidades.

[00141] A Figura 9-3 ilustra componentes ópticos para alinhar uma fonte de excitação a um dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00142] A Figura 9-4 ilustra um módulo de fonte de excitação e um instrumento base, de acordo com algumas modalidades.

[00143] A Figura 9-5 até a 9-11 ilustram um módulo de fonte de excitação e um instrumento base, de acordo com algumas modalidades.

[00144] A Figura 9-12 até a 9-19 ilustram componentes para alinhamento passivo de uma fonte de excitação a um dispositivo integra-

do, de acordo com algumas modalidades.

[00145] A Figura 9-20 ilustra sensores de monitoramento, de acordo com algumas modalidades.

[00146] A Figura 9-21 ilustra um dispositivo integrado com sensores de monitoramento, de acordo com algumas modalidades.

[00147] A Figura 9-22 ilustra uma disposição de guias de onda e sensores de monitoramento de um dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00148] A Figura 9-23 ilustra sensores de monitoramento de um dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00149] A Figura 9-24 ilustra componentes ópticos para acoplar a energia de excitação ao dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00150] A Figura 9-25A ilustra componentes para acoplar a energia de excitação ao dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00151] A Figura 9-25B ilustra componentes para acoplar a energia de excitação ao dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00152] A Figura 9-25C ilustra componentes para acoplar a energia de excitação ao dispositivo integrado, de acordo com algumas modalidades.

[00153] A Figura 10-1 mostra uma esquemática de uma cavidade de amostra que contém vários componentes para sequenciamento de ácido nucleico, mostram um volume-alvo, complexo de polimerase, ácido nucleico-alvo, filamento complementar e iniciador, e ligante para imobilização.

[00154] A Figura 10-2 mostra um experimento exemplificativo de sequenciamento de ácido nucleico para quatro estágios de uma reação de sequenciamento; (A) antes de incorporação de um nucleotídeo

identificado de modo luminescente; (B) um primeiro evento de incorporação; (C) um período entre o primeiro e o segundo eventos de incorporação; e (D) um segundo evento de incorporação; juntamente com exemplos correspondentes de fileira e dados processados durante os estágios (A) a (D).

[00155] A Figura 10-3 mostra um processo exemplificativo para preparação de superfície, incluindo as etapas de (a) deposição de Al_2O_3, (b) passivação de fosfonato de PEG, (c) silanização de Biotina/PEG, (d) carregamento de complexo, e (e) iniciação de reação de sequenciamento.

[00156] A Figura 10-4 ilustra uma esquemática para realizar medições, de acordo com algumas modalidades.

[00157] A Figura 10-5 ilustra uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

[00158] A Figura 10-6 ilustra um gráfico de sinal de luz como uma função de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00159] A Figura 10-7 ilustra um perfil de sinal para marcadores através de intervalos de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00160] A Figura 10-8 ilustra um gráfico de sinal de luz como uma função de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00161] A Figura 10-9 ilustra um perfil de sinal para marcadores através de intervalos de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00162] A Figura 10-10 ilustra uma esquemática para realizar medições, de acordo com algumas modalidades.

[00163] A Figura 10-11 ilustra um gráfico de tempo de vida como uma função de comprimento de onda de emissão, de acordo com algumas modalidades.

[00164] A Figura 10-12 ilustra um gráfico de sinal de luz como uma função de comprimento de onda, de acordo com algumas modalidades.

[00165] A Figura 10-13 ilustra um gráfico de sinal de luz como uma função de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00166] A Figura 10-14 ilustra um perfil de sinal for marcadores através de intervalos de tempo para múltiplos sensores, de acordo com algumas modalidades.

[00167] A Figura 10-15 ilustra um gráfico de sinal de luz como uma função de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00168] A Figura 10-16 ilustra a perfil de sinal para um marcador através de intervalos de tempo para múltiplos sensores, de acordo com algumas modalidades.

[00169] A Figura 10-17 ilustra uma esquemática para realizar medições, de acordo com algumas modalidades.

[00170] A Figura 10-18 ilustra um gráfico de sinal de luz como uma função de comprimento de onda, de acordo com algumas modalidades.

[00171] A Figura 10-19 ilustra um gráfico de sinal de luz como uma função de tempo, de acordo com algumas modalidades.

[00172] A Figura 10-20 ilustra a perfil de sinal para um marcador através de intervalos de tempo para múltiplos sensores, de acordo com algumas modalidades.

[00173] A Figura 11-1 ilustra um método para fabricar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[00174] A Figura 11-2 ilustra um método para fabricar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[00175] A Figura 11-3 ilustra um método para fabricar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[00176] A Figura 11-4A ilustra um método para fabricar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[00177] A Figura 11-4B ilustra um método para fabricar uma cavidade de amostra, de acordo com algumas modalidades.

[00178] A Figura 11-5 ilustra um método para fabricar uma camada

de cavidade de amostra com declives, de acordo com algumas modalidades.

[00179] A Figura 11-6 ilustra um método para fabricar uma camada de cavidade de amostra com declives, de acordo com algumas modalidades.

[00180] A Figura 11-7 ilustra um método para fabricar uma grade concêntrica, de acordo com algumas modalidades.

[00181] A Figura 11-8 ilustra um método para fabricar uma grade concêntrica, de acordo com algumas modalidades.

[00182] A Figura 11-9 ilustra um método para fabricar uma grade concêntrica, de acordo com algumas modalidades.

[00183] A Figura 11-10 ilustra projetos de microcavidade exemplificativos, de acordo com algumas modalidades.

[00184] A Figura 11-11 ilustra um método para fabricar componentes ópticos refrativos, de acordo com algumas modalidades.

[00185] A Figura 11-12 ilustra imagens de etapas diferentes na fabricação de componentes ópticos refrativos, de acordo com algumas modalidades.

[00186] A Figura 11-13 ilustra um componente óptico refrativo, de acordo com algumas modalidades.

[00187] A Figura 11-14 ilustra um método para fabricar componentes ópticos refrativos, de acordo com algumas modalidades.

[00188] A Figura 11-15 ilustra um método para fabricar componentes ópticos refrativos, de acordo com algumas modalidades.

[00189] A Figura 11-16 ilustra uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

[00190] A Figura 11-17 ilustra uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

[00191] A Figura 11-18 ilustra uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

[00192] A Figura 11-19 ilustra um método para fabricar uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

[00193] A Figura 11-20 ilustra um método para fabricar uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

[00194] A Figura 11-21 ilustra um método para fabricar uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

[00195] A Figura 11-22 ilustra um método para fabricar uma lente de Fresnel, de acordo com algumas modalidades.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00196] Os inventores reconheceram e notaram que um aparelho compacto de velocidade alta para realizar detecção e quantificação de moléculas ou partículas únicas pode reduzir o custo de realizar medições quantitativas complexas de amostras biológicas e/ou químicas e avançar rapidamente a taxa de constatações tecnológicas bioquímicas. Além disso, um dispositivo custo-benefício que é prontamente transportável pode transformar não apenas a maneira em que os bioensaios são realizados no mundo desenvolvido, como também fornecer às pessoas nas regiões em desenvolvimento, pela primeira vez, acesso a testes diagnósticos essenciais que pode melhorar drasticamente sua saúde e seu bem-estar. Por exemplo, as modalidades descritas no presente documento podem ser usadas para testes diagnósticos de sangue, urina e/ou saliva que podem ser usados por indivíduos em sua residência, ou por um doutor em uma clínica remota em um país em desenvolvimento.

[00197] Um dispositivo de sensor pixelado com um número grande de pixels (por exemplo, centenas, milhares, milhões ou mais) permite a detecção de uma pluralidade de moléculas ou partículas individuais em paralelo. As moléculas podem ser, a título de exemplo e não limitação, proteínas e/ou DNA. Além disso, um dispositivo de velocidade alta que pode adquirir dados em mais de cem quadros por segundo

permite a detecção e a análise de processos ou mudanças dinâmicas que ocorrem ao longo do tempo dentro da amostra em análise.

[00198] Os inventores reconheceram e notaram que um obstáculo que impede o equipamento de bioensaio de ser feito mais compacto foi a necessidade de filtrar a luz de excitação que causa eventos de detecção indesejados no sensor. Os filtros ópticos usados para transmitir a luz de sinal desejada (a luminescência) e bloquear suficientemente a luz de excitação podem ser espessos, volumosos, dispendiosos, e intolerantes a variações no ângulo de incidência de luz, impedindo a miniaturização. Os inventores, entretanto, reconheceram e notaram que usar uma fonte de excitação pulsada pode reduzir a necessidade de tal filtração ou, em alguns casos, remover a necessidade de tais filtros completamente. Usando-se sensores com capacidade de determinar o tempo, um fóton é detectado em relação ao pulso de luz de excitação, em que a luz de sinal pode ser separada da luz de excitação com base no tempo em que o fóton é recebido, em vez do espectro da luz recebida. Consequentemente, a necessidade por um filtro óptico volumoso é reduzida e/ou removida em algumas modalidades.

[00199] Os inventores reconheceram e notaram que as medições de tempo de vida de luminescência também podem ser usadas para identificar as moléculas presentes em uma amostra. Um sensor óptico com capacidade de detectar quando um fóton é detectado tem capacidade para medir, com uso das estatísticas reunidas a partir de muitos eventos, o tempo de vida de luminescência da molécula em excitação pela luz de excitação. Em algumas modalidades, a medição de tempo de vida de luminescência pode ser feita além de uma medição espectral da luminescência. Alternativamente, uma medição espectral da luminescência pode ser completamente omitida na identificação da molécula de amostra. As medições de tempo de vida de luminescência

podem ser feitas com uma fonte de excitação pulsada. Adicionalmente, as medições de tempo de vida de luminescência podem ser feitas com uso de um dispositivo integrado que inclui o sensor, ou um dispositivo em que a fonte de luz está localizada em um sistema separado do dispositivo integrado.

[00200] Os inventores também reconheceram e notaram que integrar uma cavidade de amostra (que pode incluir uma nanoabertura) e um sensor em um dispositivo integrado único com capacidade de medir luz luminescente emitida a partir de amostras biológicas reduz o custo de produção de tal dispositivo, de modo que os dispositivos integrados bioanalíticos descartáveis possam ser formados. Os dispositivos integrados de uso único descartáveis que fazem interface com um instrumento base podem ser usados em qualquer local no mundo, sem a restrição de exigir laboratórios biológicos de custo alto para análises de amostra. Desse modo, a bioanalítica automatizada pode ser trazida para regiões do mundo que não podiam realizar anteriormente a análise quantitativa de amostras biológicas. Por exemplo, os testes sanguíneos para crianças podem ser realizados colocando-se uma amostra sanguínea em um dispositivo integrado descartável, colocando-se o dispositivo integrado descartável em um instrumento base portátil pequeno para análise, e processando os resultados por um computador para revisão imediata por um usuário. Os dados também podem ser transmitidos por uma rede de dados para um local remoto para serem analisados, e/ou arquivados para análises clínicas subsequentes.

[00201] Os inventores também reconheceram e notaram que um dispositivo de uso único descartável pode ser feito mais simplesmente e para custo mais baixo não incluindo a fonte de luz no dispositivo integrado. Em vez disso, a fonte de luz pode incluir componentes reusáveis incorporados em um sistema que faz interface com o dispositivo integrado descartável para analisar uma amostra.

[00202] Os inventores também reconheceram e notaram que, quando uma amostra é etiquetada com uma pluralidade de tipos diferentes de marcadores luminescentes, qualquer característica adequada de marcadores luminescentes pode ser usada para identificar o tipo de marcador que está presente em um pixel particular do dispositivo integrado. Por exemplo, as características da luminescência emitida pelos marcadores e/ou características da absorção de excitação podem ser usadas para identificar os marcadores. Em algumas modalidades, a energia de emissão da luminescência (que é diretamente relacionada ao comprimento de onda da luz) pode ser usada para distinguir um primeiro tipo de marcador de um segundo tipo de marcador. Adicional ou alternativamente, as medições de tempo de vida de luminescência também podem ser usadas para identificar o tipo de marcador presente em um pixel particular. Em algumas modalidades, as medições de tempo de vida de luminescência podem ser feitas com uma fonte de excitação pulsada com uso de um sensor com capacidade para distinguir um tempo quando um fóton é detectado com resolução suficiente para obter informações de tempo de vida. Adicional, ou alternativamente, a energia da luz de excitação absorvida pelos tipos diferentes de marcadores pode ser usada para identificar o tipo de marcador presente em um pixel particular. Por exemplo, um primeiro marcador pode absorver luz de um primeiro comprimento de onda, mas não absorver igualmente a luz de um segundo comprimento de onda, enquanto um segundo marcador pode absorver luz do segundo comprimento de onda, mas não absorver igualmente a luz do primeiro comprimento de onda. Nessa maneira, quando mais de uma fonte de excitação de luz, cada uma com uma energia de excitação diferente, puderem ser usadas para iluminar a amostra de maneira entrelaçada, a energia de absorção dos marcadores pode ser usada para identificar que tipo de marcador está presente em uma amostra. Os marcadores

diferentes também podem ter intensidades luminescentes diferentes. Consequentemente, a intensidade detectada da luminescência também pode ser usada para identificar o tipo de marcador presente em um pixel particular.

[00203] Um exemplo não limitante de uma aplicação de um dispositivo contemplado pelos inventores é um dispositivo com capacidade de realizar sequenciamento de uma biomolécula, como um ácido nucleico ou um polipeptídeo (por exemplo, proteína) que tem uma pluralidade de aminoácidos. Os testes diagnósticos que podem ser realizados com uso de tal dispositivo incluem sequenciar uma molécula de ácido nucleico em uma amostra biológica de um indivíduo, como sequenciamento de moléculas de ácido desoxirribonucleico livres de célula ou produtos de expressão em uma amostra biológica do indivíduo.

[00204] A presente aplicação fornece dispositivos, sistemas e métodos para detectar biomoléculas ou subunidades dos mesmos, como moléculas de ácido nucleico. Tal detecção pode incluir sequenciamento. Uma biomolécula pode ser extraída a partir de uma amostra biológica obtida a partir de um indivíduo. A amostra biológica pode ser extraída a partir de um fluido corporal ou tecido do indivíduo, como hálito, saliva, urina ou sangue (por exemplo, sangue total ou plasma). O indivíduo pode ser suspeito de ter uma condição de saúde, como uma doença (por exemplo, câncer). Em alguns exemplos, uma ou mais moléculas de ácido nucleico são extraídas a partir do fluido corporal ou tecido do indivíduo. O um ou mais ácidos nucleicos pode ser extraído a partir de uma ou mais células obtidas a partir do indivíduo, como parte de um tecido do indivíduo, ou obtido a partir de um fluido corporal livre de célula do indivíduo, como sangue total.

[00205] O sequenciamento pode incluir a determinação de subunidades individuais de uma biomolécula modelo (por exemplo, molécula de ácido nucleico) sintetizando-se outra biomolécula que é comple-

mentar ou análoga ao modelo, como sintetizando-se uma molécula de ácido nucleico que é complementar a uma molécula de ácido nucleico modelo e identificando-se a incorporação de nucleotídeos com tempo (por exemplo, sequenciamento por síntese). Como alternativa, o sequenciamento pode incluir a identificação direta de subunidades individuais da biomolécula.

[00206] Durante o sequenciamento, os sinais indicativos de subunidades individuais de uma biomolécula podem ser coletados em uma memória e processados em tempo real ou em um ponto posterior no tempo para determinar uma sequência da biomolécula. Tal processamento pode incluir uma comparação entre os sinais e os sinais de referência que possibilitam a identificação das subunidades individuais que, em alguns casos, rende leituras. As leituras podem ser sequências de comprimento suficiente (por exemplo, pelo menos cerca de 30, 50, 100 pares de bases (bp) ou mais) que podem ser usadas para identificar uma sequência ou região maior, por exemplo, que pode ser alinhada a um local em uma região cromossômica ou genômica ou gene.

[00207] As subunidades individuais de biomoléculas podem ser identificadas com uso de marcadores. Em alguns exemplos, os marcadores luminescentes são usados para identificar subunidades individuais de biomoléculas. Os marcadores luminescentes (também chamados, no presente documento, de "marcadores") podem ser marcadores exógenos ou endógenos. Os marcadores exógenos podem ser marcadores luminescentes externos usados em um repórter e/ou etiqueta para identificação luminescente. Exemplos de marcadores exógenos podem incluir, mas sem limitação, moléculas fluorescentes, fluoróforos, corantes fluorescentes, manchas fluorescentes, corantes orgânicos, proteínas fluorescentes, enzimas, espécies que participam na transferência ressonante de energia por fluorescência (FRET), enzimas, e/ou pontos quânticos. Tais marcadores exógenos

podem ser conjugados para uma sonda ou grupo funcional (por exemplo, molécula, íon e/ou ligante) que se liga especificamente a um alvo ou componente particular. Anexar um marcador exógeno a uma sonda permite a identificação do alvo através de detecção da presença do marcador exógeno. Exemplos de sondas podem incluir proteínas, ácido nucleico (por exemplo, DNA, RNA) moléculas, lipídeos e sondas de anticorpo. A combinação de um marcador exógeno e um grupo funcional pode formar quaisquer sondas, etiquetas, e/ou identificações adequadas usadas para detecção, incluindo molecular sondas, sondas identificadas, sondas de hibridização, sondas de anticorpo, sondas de proteína (por exemplo, sondas de ligação de biotina), identificações de enzima, sondas fluorescentes, etiquetas fluorescentes, e/ou repórteres de enzima.

[00208] Embora a presente revelação faça referência a marcadores luminescentes, outros tipos de marcadores podem ser usados com dispositivos, sistemas e métodos fornecidos no presente documento. Tais marcadores podem incluir etiquetas de massa ou etiquetas eletrostáticas.

[00209] Embora marcadores exógenos possam ser adicionados a uma amostra, marcadores endógenos já podem ser parte da amostra. Os marcadores endógenos podem incluir qualquer marcador luminescente presente que produza luz ou "autofluoresça" na presença de energia de excitação. A autofluorescência de fluoróforos endógenos pode ser livre de identificações e ter identificação não invasiva sem exigir a introdução de fluoróforos exógenos. Exemplos de tais fluoróforos endógenos podem incluir hemoglobina, oxiemoglobina, lipídeos, reticulações de colágeno e elastina, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida (NADH), flavinas oxidadas (FAD e FMN), lipofuscina, queratina, e/ou porfirinas, a título de exemplo, e não limitação.

[00210] Embora some modalidades possam ser direcionadas a tes-

te diagnóstico detectando-se moléculas únicas em um espécime, os inventores também reconheceram que algumas modalidades podem usar as capacidades de detecção de molécula únicas para realizar sequenciamento de ácido nucleico (por exemplo, DNA, RNA) de um ou mais segmentos de ácido nucleico, como, por exemplo, genes ou polipeptídeos. O sequenciamento de ácido nucleico permite a determinação da ordem e posição de nucleotídeos em uma molécula-alvo de ácido nucleico. As tecnologias de sequenciamento de ácido nucleico podem variar nos métodos usados para determinar a sequência de ácido nucleico, assim como na taxa, no comprimento de leitura, e na incidência de erros no processo de sequenciamento. Por exemplo, alguns métodos de sequenciamento de ácido nucleico têm base em sequenciamento por síntese, nos quais a identidade de um nucleotídeo é determinada à medida em que o nucleotídeo é incorporado em um filamento recém-sintetizado de ácido nucleico que é complementar à molécula-alvo de ácido nucleico. Alguns sequenciamentos por métodos de síntese exigem a presença de uma população de moléculas-alvo de ácido nucleico (por exemplo, cópias de um ácido nucleico-alvo) ou uma etapa de amplificação do ácido nucleico-alvo para alcançar uma população de ácidos nucleicos-alvo.

[00211] Reconhecendo a necessidade por aparelhos menos complexos e simples para realizar detecção de molécula única e/ou sequenciamento de ácido nucleico, os inventores conceberam um conjunto de procedimentos para detectar moléculas únicas com uso de conjuntos de marcadores, como marcadores ópticos (por exemplo, luminescentes), para identificar moléculas diferentes. Uma etiqueta pode incluir um nucleotídeo ou aminoácido e um marcador adequado. Os marcadores podem ser detectados enquanto ligados a moléculas únicas, mediante liberação a partir das moléculas únicas, ou enquanto ligados e mediante liberação das moléculas únicas. Em alguns exem-

plos, os marcadores são etiquetas luminescentes. Cada marcador luminescente em um conjunto selecionado é associado a uma respectiva molécula. Por exemplo, um conjunto de quatro marcadores pode ser usado para "identificar" as nucleobases presentes no DNA – em que cada marcador do conjunto é associado a uma nucleobase diferente para formar uma etiqueta, por exemplo, em que um primeiro marcador é associado à adenina (A), um segundo marcador é associado à citosina (C), um terceiro marcador é associado à guanina (G), e um quarto marcador é associado à timina (T). Além disso, cada um dentre os marcadores luminescentes no conjunto de marcadores tem propriedades diferentes que podem ser usadas para distinguir um primeiro marcador do conjunto de outros marcadores no conjunto. Nessa maneira, cada marcador é unicamente identificável com uso de uma ou mais dentre essas características distinguíveis. A título de exemplo e não limitação, as características dos marcadores que podem ser usadas para distinguir um marcador de outro podem incluir a energia de emissão e/ou o comprimento de onda da luz que é emitida pelo marcador em resposta à excitação e/ou o comprimento de onda e/ou energia da luz de excitação que excita um marcador particular. Distinguir um marcador dentre o conjunto de quatro marcadores identifica unicamente a nucleobase associada ao marcador.

[00212] Os marcadores luminescentes podem variar no comprimento de onda de luz que os mesmos emitem, nas características temporais da luz que emitem (por exemplo, seus períodos de tempo de decaimento de emissão), e sua resposta à energia de excitação (por exemplo, sua probabilidade de absorver um fóton de excitação). Consequentemente, marcadores luminescentes podem ser identificados ou discriminados de outros marcadores luminescentes com base na detecção dessas propriedades. Tais conjuntos de procedimentos de identificação ou discriminação podem ser usados independentemente

ou em qualquer combinação adequada.

[00213] Em algumas modalidades, um fotodetector integrado, conforme descrito na presente aplicação, pode medir ou discriminar os tempos de vida de luminescência, como tempos de vida de fluorescência. As medições de tempo de vida têm base na excitação de um ou mais marcadores (por exemplo, moléculas fluorescentes), e na medição da variação de tempo na luminescência emitida. A probabilidade de um marcador emitir um fóton após o marcador alcançar um estado excitado diminui exponencialmente ao longo do tempo. A taxa na qual a probabilidade diminui pode ser característica de um marcador, e pode ser diferente para marcadores diferentes. Detectar as características temporais de luz emitida por marcadores pode permitir identificar marcadores e/ou discriminar marcadores um em relação ao outro. A diminuição na probabilidade de um fóton ser emitido ao longo do tempo pode ser representada por uma função de decaimento exponencial $p(t)=e^{(-t/\tau)}$, em que p(t) é a probabilidade de emissão de fóton em um tempo, t, e τ é um parâmetro temporal do marcador. O parâmetro temporal τ indica um tempo após a excitação quando a probabilidade do marcador que emite um fóton for um certo valor. O parâmetro temporal, τ, é uma propriedade de um marcador que pode ser característica de suas propriedades espectrais de absorção e emissão. Tal parâmetro temporal, τ, é chamado de tempo de vida de luminescência, de tempo de vida de fluorescência ou simplesmente de "tempo de vida" de um marcador.

[00214] A Figura 1-1 plota a probabilidade de um fóton ser emitido como uma função de tempo para dois marcadores com tempos de vida diferentes. O marcador representado pela curva de probabilidade B tem uma probabilidade de emissão que decai mais rapidamente que a probabilidade de emissão para o marcador representado pela curva de probabilidade A. O marcador representado pela curva de probabilidade

B tem um parâmetro temporal, τ, ou tempo de vida mais curto que o marcador representado pela curva de probabilidade A. Os marcadores podem ter tempos de vida na faixa de 0,1 a 20 ns, em algumas modalidades. Entretanto, os conjuntos de procedimentos descritos no presente documento não são limitados como os tempos de vida do marcador (ou marcadores) usado.

[00215] O tempo de vida de um marcador pode ser usado para distinguir entre mais de um marcador, e/ou pode ser usado para identificar marcador (ou marcadores). Em algumas modalidades, as medições de tempo de vida podem ser realizadas, na qual uma pluralidade de marcadores que têm tempos de vida diferentes é excitada por uma fonte de excitação. Como exemplo, quatro marcadores que têm tempos de vida de 0,5, 1, 2, e 3 nanossegundos, respectivamente, podem ser excitados por uma fonte de luz que emite luz tendo um comprimento de onda selecionado (por exemplo, 635 nm, a título de exemplo). Os marcadores podem ser identificados ou diferenciados entre si com base na medição do tempo de vida da luz emitida pelos marcadores.

[00216] As medições de tempo de vida podem usar medições de intensidade relativas comparando-se como a intensidade muda ao longo do tempo, em oposição aos valores de intensidade absolutos. Como resultado, as medições de tempo de vida podem evitar algumas das dificuldades de medições de intensidade absolutas. As medições de intensidade absolutas podem depender da concentração de marcadores presentes e etapas de calibração podem ser necessárias para variar concentrações de marcador. Em contraste, as medições de tempo de vida podem ser insensíveis à concentração de marcadores.

[00217] As modalidades podem usar qualquer combinação adequada de características de marcador para distinguir um primeiro marcador em um conjunto de marcadores dos outros marcadores no mesmo conjunto. Por exemplo, algumas modalidades podem usar apenas as

informações de temporização da luz de emissão dos marcadores para identificar os marcadores. Em tais modalidades, cada marcador em um conjunto selecionado de marcadores tem um tempo de vida de emissão diferente dos outros marcadores no conjunto e os marcadores luminescentes são todos excitados por luz de uma fonte de excitação única. A Figura 1-2A ilustra a temporização de emissão a partir de quatro marcadores luminescentes de acordo com uma modalidade em que os quatro marcadores exibem tempos de vida de emissão média diferentes (τ). A probabilidade que um marcador é medido para ter um tempo de vida de um valor particular é chamada, no presente documento, de "temporização de emissão" do marcador. Uma primeira temporização de emissão 1-101 de um primeiro marcador luminescente tem uma probabilidade de pico de ter um tempo de vida em τ1, uma segunda temporização de emissão 1-102 de um segundo marcador luminescente tem uma probabilidade de pico de ter um tempo de vida de τ2, uma terceira temporização de emissão 1-103 de um terceiro marcador luminescente tem uma probabilidade de pico de ter um tempo de vida de τ3, e uma quarta temporização de emissão 1-104 de um quarto marcador luminescente tem uma probabilidade de pico de ter um tempo de vida de τ4. Nessa modalidade, os picos de probabilidade de tempo de vida dos quatro marcadores luminescentes podem ter quaisquer valores adequados que satisfaçam a relação $\tau 1 < \tau 2 < \tau 3 < \tau 4$. Os quatro gráficos de emissão de temporização podem ou não se sobrepor devido a variações leves no tempo de vida de um marcador luminescente particular, conforme ilustrado na Figura 1-2A. Nessa modalidade, o comprimento de onda de excitação no qual cada um dentre os quatro marcadores absorve luz maximamente da fonte de excitação é substancialmente igual, mas esse não precisa ser o caso. Com uso do conjunto de marcador acima, quatro moléculas diferentes podem ser identificadas com um respectivo marcador do conjunto de marca-

dores, em que os marcadores podem ser excitados com uso de uma fonte de excitação única, e os marcadores podem ser distinguidos entre si detectando-se o tempo de vida de emissão dos marcadores com uso de um sistema óptico e sensores. Embora a Figura 1-2A ilustre quatro marcadores diferentes, deve ser notado que qualquer número adequado de marcadores pode ser usado.

[00218] Outras modalidades podem usar qualquer combinação adequada de características de marcador para determinar a identidade do marcador dentro de um conjunto de marcadores. Exemplos das características de marcador que podem ser usados incluem, mas sem limitação, comprimento de onda de excitação, comprimento de onda de emissão, e tempo de vida de emissão. A combinação de características de marcador forma um espaço de fase e cada marcador pode ser representado como um ponto dentro desse espaço de fase. Os marcadores dentro de um conjunto de marcadores devem ser selecionados de modo que a "distância" entre cada marcador dentro do conjunto seja suficientemente grande, para que o mecanismo de detecção possa distinguir cada marcador dos outros marcadores no conjunto. Por exemplo, em algumas modalidades, um conjunto de marcadores pode ser selecionado, em que um subconjunto dos marcadores tem o mesmo comprimento de onda de emissão, mas tem tempos de vida de emissão diferentes e/ou comprimentos de onda de excitação diferentes. Em outras modalidades, um conjunto de marcadores pode ser selecionado, em que um subconjunto dos marcadores tem o mesmo tempo de vida de emissão, mas tem comprimentos de onda de emissão diferentes e/ou comprimentos de onda de excitação diferentes. Em outras modalidades, um conjunto de marcadores pode ser selecionado, em que um subconjunto dos marcadores tem o mesmo comprimento de onda de excitação, mas tem comprimentos de onda de emissão diferentes e/ou tempos de vida de emissão diferentes.

[00219] A título de exemplo e não limitação, a Figura 1-2B ilustra os espectros de emissão de quatro marcadores luminescentes, de acordo com uma modalidade, em que dois dentre os marcadores têm um primeiro comprimento de onda de emissão de pico e os outros dois marcadores têm um segundo comprimento de onda de emissão de pico. Um primeiro espectro de emissão 1-105 a partir de um primeiro marcador luminescente tem um comprimento de onda de emissão de pico em λ1, um segundo espectro de emissão 1-106 a partir de um segundo marcador luminescente também tem um comprimento de onda de emissão de pico em λ1, um terceiro espectro de emissão 1-107 a partir de um terceiro marcador luminescente te um comprimento de onda de emissão de pico em λ2, e um quarto espectro de emissão 1-108 a partir de um quarto marcador luminescente também tem um comprimento de onda de emissão de pico em λ2. Nessa modalidade, os picos de emissão dos quatro marcadores luminescentes podem ter quaisquer valores adequados que satisfazem a relação λ1 < λ2. Nas modalidades como essa em que o comprimento de onda de emissão de pico é o mesmo para mais de um marcador luminescente, uma característica separada dos marcadores que têm o mesmo comprimento de onda de emissão deve ser diferente. Por exemplo, os dois marcadores que emitem em λ1 podem ter tempos de vida de emissão diferentes. A Figura 1-3A ilustra essa situação esquematicamente em um espaço de fase distribuído pelo comprimento de onda de emissão e pelo tempo de vida de emissão. Um primeiro marcador tem um comprimento de onda de emissão λ1 e um tempo de vida de emissão τ1, um segundo marcador tem um comprimento de onda de emissão λ1 e um tempo de vida de emissão τ4, um terceiro marcador tem um comprimento de onda de emissão λ2 e um tempo de vida de emissão τ1, e um quarto marcador tem um comprimento de onda de emissão λ2 e um tempo de vida de emissão τ4. Nessa maneira, todos os quatro marcadores no

conjunto de marcadores mostrado na Figura 1-3A são distinguíveis entre si. O uso de tal conjunto de marcadores permite distinguir entre quatro marcadores mesmo quando os comprimentos de onda de absorção para os quatro marcadores são idênticos. Isso é possível com uso de um sensor que pode detectar o tempo de emissão da fotoluminescência, assim como o comprimento de onda de emissão.

[00220] A título de exemplo e não limitação, a Figura 1-2C ilustra os espectros de absorção de quatro marcadores luminescentes, de acordo com outra modalidade. Nessa modalidade, dois dentre os marcadores têm um primeiro comprimento de onda de absorção de pico e os outros dois marcadores têm um segundo comprimento de onda de absorção de pico. Um primeiro espectro de absorção 1-109 para o primeiro marcador luminescente tem um comprimento de onda de absorção de pico em λ3, um segundo espectro de absorção 1-110 para o segundo marcador luminescente tem um comprimento de onda de absorção de pico em λ4, um terceiro espectro de absorção 1-111 para o terceiro marcador luminescente tem um comprimento de onda de absorção de pico em λ3, e um quarto espectro de absorção 1-112 para o quarto marcador luminescente tem um comprimento de onda de absorção de pico em λ4. Deve ser notado que os marcadores que compartilham um comprimento de onda de absorção de pico na Figura 1-2C são distinguíveis através de outro marcador característico, como tempo de vida de emissão. A Figura 1-3B ilustra essa situação esquematicamente em um espaço de fase distribuído pelo comprimento de onda de absorção e pelo tempo de vida de emissão. Um primeiro marcador tem um comprimento de onda de absorção λ3 e um tempo de vida de emissão τ1, um segundo marcador tem um comprimento de onda de absorção λ3 e um tempo de vida de emissão τ4, um terceiro marcador tem um comprimento de onda de absorção λ4 e um tempo de vida de emissão τ1, e um quarto marcador tem um comprimento de

onda de absorção λ4 e um tempo de vida de emissão τ4. Nessa maneira, todos os quatro marcadores no conjunto de marcadores mostrado na Figura 1-3A são distinguíveis entre si.

[00221] O uso de tal conjunto de marcadores permite distinguir entre quatro marcadores mesmo quando os comprimentos de onda de emissão para os quatro marcadores são indistinguíveis. Isso é possível com uso de duas fontes de excitação que emitem em comprimentos de onda diferentes ou uma fonte de excitação única com capacidade para emitir em múltiplos comprimentos de onda em conexão com um sensor que pode detectar o tempo de emissão da fotoluminescência. Se o comprimento de onda da luz de excitação for conhecido para cada evento de emissão detectada, então, pode ser determinado qual marcador esteve presente. A fonte (ou fontes) de excitação pode alternar entre um primeiro comprimento de onda de excitação e um segundo comprimento de onda de excitação, que é chamado de entrelaçado. Alternativamente, dois ou mais pulsos do primeiro comprimento de onda de excitação podem ser usados após dois ou mais pulsos do segundo comprimento de onda de excitação.

[00222] O número de fontes de excitação ou comprimentos de onda de excitação usados para distinguir os marcadores não é limitado a dois e, em algumas modalidades, mais de dois comprimentos de onda de excitação ou energias podem ser usados para distinguir os marcadores. Em tais modalidades, os marcadores podem ser distinguidos pela intensidade ou número de fótons emitidos em resposta a múltiplos comprimentos de onda de excitação. Um marcador pode ser distinguível dentre múltiplos marcadores detectando-se o número de fótons emitidos em resposta à exposição do marcador a um certo comprimento de onda de excitação. Em algumas modalidades, um marcador pode ser distinguido iluminando-se o marcador para uma dentre múltiplas energias de excitação em um tempo e identificando-se a energia de

excitação dentre as múltiplas energias de excitação em que o marcador emitiu o número mais alto de fótons. Em outras modalidades, o número de fótons emitidos a partir de um marcador em resposta a energias de excitação diferentes pode ser usado para identificar o marcador. Um primeiro marcador, que tem uma probabilidade mais alta de emitir fótons em resposta a uma primeira energia de excitação que uma segunda energia de excitação, pode ser distinguido de um segundo marcador, que tem uma probabilidade mais alta de emitir fótons em resposta à segunda energia de excitação que a primeira energia de excitação. Nessa maneira, os marcadores que têm probabilidades distinguíveis de emitir certas quantidades de fótons em resposta a energias de excitação diferentes podem ser identificados medindo-se os fótons emitidos enquanto expõe um marcador desconhecido par aas energias de excitação diferentes. Em tais modalidades, um marcador pode ser exposto a múltiplas energias de excitação e a identificação do marcador pode ser alcançada determinando-se se o marcador emitiu qualquer luz e/ou um número particular de fótons emitidos. Qualquer número adequado de energia de fontes de excitação pode ser usado. Em algumas modalidades, quatro energias de excitação diferentes podem ser usadas para distinguir dentre marcadores diferentes (por exemplo, quatro marcadores diferentes). Em algumas modalidades, três energias de excitação diferentes podem ser usadas para distinguir dentre marcadores diferentes. Outras características de um marcador podem ser usadas para distinguir a presença de um marcador em combinação com a quantidade de fótons emitida em resposta a energias de excitação diferentes, incluindo tempo de vida de emissão e espectros de emissão.

[00223] Em outras modalidades, mais de duas características dos marcadores em um conjunto de marcadores podem ser usadas para distinguir qual marcador está presente. A Figura 1-4 ilustra um espaço

de fase ilustrativo distribuído pelo comprimento de onda de absorção, pelo comprimento de onda de emissão e pelo tempo de vida de emissão dos marcadores. Na Figura 1-4, oito marcadores diferentes são distribuídos no espaço de fase. Quatro dentre os oito marcadores têm o mesmo comprimento de onda de emissão, quatro marcadores diferentes têm o mesmo comprimento de onda de absorção e quatro marcadores diferentes têm o mesmo tempo de vida de emissão. Entretanto, cada um dentre os marcadores é distinguível a partir de todos os outros marcadores quando todas as três características dos marcadores são consideradas. As modalidades não são limitadas a qualquer número de marcadores. Esse conceito pode ser estendido para incluir qualquer número de marcadores que pode ser distinguido de outro com uso pelo menos dessas três características de marcador.

[00224] Embora não ilustrado nas Figuras, outras modalidades podem determinar a identidade de um marcador luminescente com base na frequência de absorção independentemente. Tais modalidades são possíveis se a luz de excitação puder ser sintonizada para comprimentos de onda específicos que correspondem ao espectro de absorção dos marcadores em um conjunto de marcadores. Em tais modalidades, o sistema e o sensor ópticos usados para direcionar e detectar a luz emitida a partir de cada marcador não precisam ter capacidade para detectar o comprimento de onda da luz emitida. Isso pode ser vantajoso em algumas modalidades devido ao fato de que reduz a complexidade do sistema e dos sensores ópticos devido ao fato de que a detecção de comprimento de onda de emissão não é exigida em tais modalidades.

[00225] Conforme discutido acima, os inventores reconheceram e notaram a necessidade de poder distinguir marcadores luminescentes diferentes entre si com uso de várias características dos marcadores. O tipo de características usadas para determinar a identidade de um

marcador faz impacto no dispositivo físico usado para realizar essa análise. A presente aplicação revela diversas modalidades de um aparelho, dispositivo, instrumento e métodos para realizar esses experimentos diferentes.

[00226] Os inventores reconheceram e notaram que um dispositivo integrado descartável de uso único de custo baixo que inclui componentes ópticos e sensores pode ser usado em conexão com um instrumento que inclui uma fonte de excitação para medir características diferentes de luz luminescente emitida a partir de um ou marcadores usados para identificar uma amostra biológica a fim de analisar a amostra. O uso de um dispositivo integrado de custo baixo reduz o custo de realizar um dado bioensaio. Uma amostra biológica é colocada no dispositivo integrado e, mediante completação do bioensaio, pode ser descartada. O dispositivo integrado faz interface com o instrumento de múltiplos usos mais dispendioso, que pode ser usado repetidamente com muitos dispositivos integrados descartáveis diferentes. Um dispositivo integrado de custo baixo que faz interface com um instrumento portátil compacto pode ser usado em qualquer local no mundo, sem a restrição de laboratórios biológicos de custo alto que exigem conhecimento específico de laboratório para analisar amostras. Desse modo, a bioanalítica automatizada pode ser trazida para regiões do mundo que não podiam realizar anteriormente a análise quantitativa de amostras biológicas. Por exemplo, os testes sanguíneos para crianças podem ser realizados colocando-se uma amostra sanguínea em um dispositivo integrado descartável, colocando-se o dispositivo integrado descartável no instrumento portátil pequeno para análise, e processando os resultados por um computador que se conecta ao instrumento para revisão imediata por um usuário. Os dados também podem ser transmitidos por uma rede de dados para um local remoto para serem analisados, e/ou arquivados para análises clínicas subsequentes. Alternativamente, o instrumento

pode incluir um ou mais processadores para analisar os dados obtidos a partir dos sensores do dispositivo integrado.

[00227] Várias modalidades são descritas em mais detalhes abaixo.

I. VISÃO GERAL DO SISTEMA

[00228] O sistema inclui um dispositivo integrado e um instrumento configurados para fazer interface com o dispositivo integrado. O dispositivo integrado inclui uma matriz de pixels, em que um pixel inclui uma cavidade de amostra e pelo menos um sensor. Uma superfície do dispositivo integrado tem uma pluralidade de cavidades de amostra, em que uma cavidade de amostra é configurada para receber uma amostra a partir de um espécime colocado na superfície do dispositivo integrado. Um espécime pode conter múltiplas amostras, e em algumas modalidades, tipos diferentes de amostras. A pluralidade de cavidades de amostra pode ser projetada de modo que pelo menos uma porção das cavidades de amostra seja configurada para receber uma amostra de um espécime. Em algumas modalidades, o número de amostras dentro de uma cavidade de amostra pode ser distribuído entre as cavidades de amostra de modo que algumas cavidades de amostra contenham uma amostra com outras contendo zero, duas ou mais amostras. Por exemplo, um espécime pode conter múltiplos modelos de DNA de filamento único, e uma cavidade de amostra em uma superfície de um dispositivo integrado pode receber um modelo de DNA de filamento único. Pelo menos uma porção das cavidades de amostra do dispositivo integrado pode conter um modelo de DNA de filamento único. A espécime também pode conter dNTPs etiquetados que entram, então, na cavidade de amostra e podem permitir a identificação de um nucleotídeo conforme incorporado em um filamento complementar de DNA. Em tal exemplo, a "amostra" pode se referir tanto ao DNA de filamento único quanto ao dNTP etiquetado atualmente incorporado por uma polimerase. Em algumas modalidades, o espécime pode conter

modelos de DNA de filamento único e dNTPS etiquetados podem ser introduzidos subsequentemente em uma cavidade de amostra, à medida que nucleotídeos são incorporados em um filamento complementar de DNA dentro da cavidade de amostra. Nessa maneira, a temporização de incorporação de nucleotídeos pode ser controlada por quando os dNTPs etiquetados forem introduzidos nas cavidades de amostra de um dispositivo integrado.

[00229] A energia de excitação é fornecida a partir de uma fonte de excitação localizada separada da matriz de pixels do dispositivo integrado. A energia de excitação é direcionada pelo menos em parte por elementos do dispositivo integrado em direção a um ou mais pixels para iluminar uma região de iluminação dentro da cavidade de amostra. Um marcador ou uma etiqueta pode, então, emitir energia de emissão quando localizados dentro da região de iluminação e em resposta a ser iluminado por energia de excitação. Em algumas modalidades, uma ou mais fontes de excitação são parte do instrumento do sistema em que componentes do instrumento e do dispositivo integrado são configurados para direcionar a energia de excitação a um ou mais pixels. Em outras modalidades, uma ou mais fontes de excitação são localizadas no dispositivo integrado mas são localizadas em uma região separada da matriz de pixels, e componentes no dispositivo integrado são configurados para direcionar a energia de excitação da fonte de região de excitação para um ou mais pixels.

[00230] A energia de emissão emitida por uma amostra pode, então, ser detectada por um ou mais sensores dentro de um pixel do dispositivo integrado. Em algumas modalidades, uma pluralidade de sensores pode ser dimensionada e disposta para capturar uma distribuição espacial da energia de emissão. Em algumas modalidades, um ou mais sensores podem ser configurados para detectar características de temporização associadas a uma energia de emissão da amostra

(por exemplo, tempo de vida de fluorescência). Os sinais de saída a partir do um ou mais sensor podem, então, usados para distinguir um marcador dentre uma pluralidade de marcadores, em que a pluralidade de marcadores pode ser usada para identificar uma amostra dentro do espécime. Em algumas modalidades, uma amostra pode ser excitada por múltiplas energias de excitação, e a energia de emissão e/ou as características de temporização da energia de emissão emitida pela amostra em resposta às múltiplas energias de excitação podem distinguir um marcador dentre uma pluralidade de marcadores.

[00231] Uma vista geral esquemática do sistema 2-100 é ilustrada nas Figuras 2-1A e 2-1B. O sistema compreende um dispositivo integrado 2-102 que faz interface com um instrumento 2-104. Em algumas modalidades, o instrumento 2-104 pode incluir uma ou mais fontes de excitação 2-106. Em algumas modalidades, uma fonte de excitação pode ser externa tanto para o instrumento 2-104 quanto para o dispositivo integrado 2-102, e o instrumento 2-104 pode ser configurado para receber energia de excitação a partir da fonte de excitação e direcionar a mesma para o dispositivo integrado. O dispositivo integrado faz interface com o instrumento com uso de qualquer soquete adequado para receber o dispositivo integrado e reter o mesmo em alinhamento óptico preciso com a fonte de excitação. A fonte de excitação 2-106 pode ser configurada para fornecer energia de excitação para o dispositivo integrado 2-102. Embora a fonte de excitação seja mostrada como localizada no instrumento na Figura 2-1B, a fonte de excitação pode ser localizada no dispositivo integrado em uma região separada dos pixels em alguns casos. Conforme ilustrado esquematicamente na Figura 2-1B, o dispositivo integrado 2-102 tem múltiplos pixels, em que cada pixel 2-112 tem capacidade para análise independente de uma amostra. Tais pixels 2-112 podem ser chamados de "pixels de fonte passiva" visto que um pixel recebe a energia de excitação a partir de

uma fonte 2-106 separada do pixel, em que a fonte excita uma pluralidade de pixels. Cada pixel 2-112 tem uma cavidade de amostra 2-108 para reter e analisar uma amostra e um sensor 2-110 para detectar a energia de emissão emitida pela amostra em resposta à iluminação da amostra com a energia de excitação fornecida pela fonte de excitação 2-106. Em algumas modalidades, cada sensor 2-110 pode incluir múltiplos subsensores, em que cada subsensor é configurado para detectar um comprimento de onda diferente de energia de emissão a partir da amostra.

[00232] Os elementos ópticos para guiar e acoplar energia de excitação à cavidade de amostra 2-108 são localizados tanto no dispositivo integrado 2-102 quanto no instrumento 2-104. Tais elementos de fonte para cavidade podem incluir um acoplador de grade localizado no dispositivo integrado 2-102 para acoplar a energia de excitação ao dispositivo integrado, guias de onda para entregar energia de excitação para cada pixel 2-112, e lentes, elementos plasmônicos e revestimentos dielétricos no dispositivo integrado para direcionar a energia de excitação recebida a partir do instrumento 2-104 para a cavidade de amostra 2-108. Adicionalmente, os elementos ópticos localizados no dispositivo integrado direcionam a energia de emissão da cavidade de amostra para o sensor. Tais elementos de cavidade para amostra podem incluir componentes que direcionam a energia de emissão para um padrão de radiação, sendo que o padrão de radiação depende da energia de emissão emitida por uma amostra em uma cavidade de amostra. A cavidade de amostra 2-108, uma porção dos componentes ópticos de fonte para cavidade de excitação, e os componentes ópticos de amostra para sensor de excitação são localizados no dispositivo integrado 2-102. A fonte de excitação 2-106 e uma porção dos componentes de fonte para poço são localizadas no instrumento 2-104. Em algumas modalidades, um componente único pode ter um

papel tanto no acoplamento de energia de excitação à cavidade de amostra 2-108 quanto na entrega de energia de emissão da cavidade de amostra 2-108 para o sensor 2-110.

[00233] Conforme ilustrado na Figura 2-1B, o dispositivo integrado compreende uma pluralidade de pixels, em que cada pixel 2-112 é associado à sua própria cavidade de amostra 2-108 e sensor 2-110 individuais. A pluralidade de pixels pode ser disposta em uma matriz, e pode haver qualquer número adequado de pixels. Por exemplo, o dispositivo integrado 2-102 pode incluir entre 100 e 1.000 pixels de acordo com algumas modalidades, entre 1.000 e 10,000 pixels de acordo com algumas modalidades, entre 10,000 e 100.000 pixels de acordo com algumas modalidades, entre 100.000 e 1.000.000 pixels de acordo com algumas modalidades e, ainda, entre 1.000.000 e 10.000.000 pixels de acordo com algumas modalidades. Em algumas implantações, pode haver menos ou mais pixels no dispositivo integrado 2-102. O dispositivo integrado 2-102 e o instrumento 2-104 podem incluir enlaces de comunicação de velocidade alta e de múltip0los canais para manusear dados associados a matrizes de pixel grandes (por exemplo, mais de 1.000 pixels).

[00234] A fonte de excitação 2-106 pode ser qualquer fonte adequada que está disposta a entregar a energia de excitação para pelo menos uma cavidade de amostra. Em algumas modalidades, uma matriz de uma ou mais fontes de excitação é localizado adjacente à matriz de pixels no mesmo dispositivo integrado. Em outras modalidades, uma ou mais fontes de excitação estão em um segundo substrato montado em proximidade ao substrato no qual a matriz de pixels é formada.

[00235] O instrumento 2-104 faz interface com o dispositivo integrado 2-102 através da interface de dispositivo integrado 2-114. A interface de dispositivo integrado 2-114 pode incluir componentes para posi-

cionar e/ou alinhar o dispositivo integrado 2-102 ao instrumento 2-104 para melhorar o acoplamento de energia de excitação da fonte de excitação 2-106 para o dispositivo integrado 2-102. Em algumas modalidades, a fonte de excitação 2-106 inclui múltiplas fontes de excitação que são combinadas para entregar a energia de excitação ao dispositivo integrado 2-102. As múltiplas fontes de excitação podem ser configuradas para produzir múltiplas energias de excitação ou comprimentos de onda. A interface de dispositivo integrado 2-114 pode receber sinais de leitura a partir dos sensores nos pixels localizados no dispositivo integrado. Adicionalmente, a interface de dispositivo integrado 2-114 pode ser projetada de modo que o dispositivo integrado se anexe ao instrumento prendendo-se o dispositivo integrado à interface de dispositivo integrado 2-114.

[00236] O instrumento 2-104 inclui uma interface de usuário 2-116 para controlar a operação do instrumento 2-104. A interface de usuário 2-116 é configurada para permitir que um usuário insira as informações no instrumento, como comandos e/ou definições usadas para controlar o funcionamento do instrumento. Em algumas modalidades, a interface de usuário 2-116 pode incluir botões, comutadores, discos seletores, e um microfone para comandos de voz. Adicionalmente, a interface de usuário 2-116 pode permitir que um usuário receba retorno no desempenho do instrumento e/ou dispositivo integrado, como alinhamento apropriado e/ou informações obtidas por sinais de leitura dos sensores no dispositivo integrado. Em algumas modalidades, a interface de usuário 2-116 pode fornecer retorno com uso de um alto-falante para fornecer retorno audível, e luzes de indicador e/ou tela de exibição para fornecer retorno visual. Em algumas modalidades, o instrumento 2-104 inclui uma interface de computador 2-118 usada para se conectar a um dispositivo de computação 2-120. Qualquer interface de computador adequada 2-118 e dispositivo de computação 2-120

pode ser usado. Por exemplo, a interface de computador 2-118 pode ser uma interface USB ou uma interface FireWire. O dispositivo de computação 2-120 pode ser qualquer computador de propósitos gerais, como um computador do tipo laptop ou desktop. A interface de computador 2-118 facilita a comunicação de informações entre o instrumento 2-104 e o dispositivo de computação 2-120. As informações de entrada para controlar e/ou configurar o instrumento 2-104 podem ser fornecidas através do dispositivo de computação 2-120 conectado à interface de computador 2-118 do instrumento. Adicionalmente, as informações de saída podem ser recebidas pelo dispositivo de computação 2-120 através da interface de computador 2-118. Tais informações de saída podem incluir retorno sobre o desempenho do instrumento 2-104 e/ou o dispositivo integrado 2-112 e informações dos sinais de leitura do sensor 2-110. O instrumento 2-104 também pode incluir um dispositivo de processamento 2-122 para analisar os dados recebidos a partir do sensor 2-110 e/ou enviar sinais de controle à fonte de excitação 2-106. Em algumas modalidades, o dispositivo de processamento 2-122 pode compreender um processador de propósitos gerais, um processador especialmente adaptado (por exemplo, uma unidade de processamento central (CPU), como um ou mais núcleos de microprocessador ou microcontrolador, uma matriz de porta programável em campo (FPGA), um circuito integrado de aplicação específica (ASIC), um circuito integrado personalizado, um processador de sinal digital (DSP), ou uma combinação dos mesmos). Em algumas modalidades, o processamento de dados do sensor 2-110 pode ser realizado tanto pelo dispositivo de processamento 2-122 quanto pelo dispositivo de computação externo 2-120. Em outras modalidades, o dispositivo de computação 2-120 pode ser omitido e o processamento de dados a partir do sensor 2-110 pode ser realizado somente pelo dispositivo de processamento 2-122.

[00237] Uma seção transversal esquemática do dispositivo integrado 3-102 que ilustra uma fileira de pixels é mostrada na Figura 3-1A. Cada pixel 3-112 inclui uma cavidade de amostra 3-108 e um sensor 3-110. O sensor 3-110 pode ser alinhado e posicionado na cavidade de amostra 3-112. Quando uma fonte de excitação for acoplada ao dispositivo integrado, a energia de excitação é fornecida a um ou mais pixels. A Figura 3-1B é uma esquemática que ilustra o acoplamento de uma fonte de excitação 3-106 ao dispositivo integrado 3-102. A fonte de excitação 3-106 fornece energia de excitação 3-130 (mostrada em linhas tracejadas) no dispositivo integrado 3-102. A Figura 3-1B ilustra a trajetória de energia de excitação a partir da fonte de energia de excitação 3-106 para uma cavidade de amostra 3-108 no pixel 3-112. Os componentes localizados fora do dispositivo integrado podem ser usados para posicionar e alinhar a fonte de excitação 3-106 ao dispositivo integrado. Tais componentes podem incluir componentes ópticos incluindo lentes, espelhos, prismas, passagens, atenuadores, e/ou fibras ópticas. Os componentes mecânicos adicionais podem ser incluídos no instrumento configurado para permitir o controle de um ou mais componentes de alinhamento. Tais componentes mecânicos podem incluir atuadores, motores de passo, e/ou botões seletores. O dispositivo integrado inclui componentes que direcionam a energia de excitação 3-130 para pixels no dispositivo integrado. Dentro de cada pixel 3-112, a energia de excitação é acoplada à cavidade de amostra 3-108 associada ao pixel. Embora a Figura 3-1B ilustre a energia de excitação que se acopla a cada cavidade de amostra em uma fileira de pixels, em algumas modalidades, a energia de excitação ode não se acoplar a todos os pixels em uma fileira. Em algumas modalidades, a energia de excitação pode se acoplar a uma porção de pixels ou cavidades de amostra em uma fileira de pixels do dispositivo integrado. A energia de excitação pode iluminar uma amostra localizada dentro de

uma cavidade de amostra. A amostra pode alcançara um estado excitado em resposta a ser iluminada pela energia de excitação. Quando uma amostra está em um estado excitado, a amostra pode emitir energia de emissão e a energia de emissão pode ser detectada por um sensor. A Figura 3-1B ilustra esquematicamente a trajetória de energia de emissão 3-140 (mostrada como linhas sólidas) da cavidade de amostra 3-108 para o sensor 3-110 de um pixel 3-112. O sensor 3-110 em um pixel 3-112 pode ser configurado e posicionado para detectar energia de emissão da cavidade de amostra 3-108. Em algumas modalidades, o sensor 3-110 pode incluir um ou mais subsensores.

[00238] Uma amostra a ser analisada pode ser introduzida em uma cavidade de amostra 3-108 de um pixel 3-112. A amostra pode ser uma amostra biológica ou qualquer outra amostra adequada, como uma amostra química. A amostra pode incluir múltiplas moléculas e a cavidade de amostra pode ser configurada para isolar uma molécula única. Em alguns casos, as dimensões da cavidade de amostra podem atuar para confinar uma molécula única dentro da cavidade de amostra, permitindo que medições sejam realizadas na molécula única. Uma fonte de excitação 3-106 pode ser configurada para entregar a energia de excitação na cavidade de amostra 3-108, de modo a excitar a amostra ou pelo menos um marcador luminescente anexado à amostra ou associado de outro modo à amostra enquanto está dentro de uma área de excitação dentro da cavidade de amostra 3-108. Em uma amostra de múltiplas moléculas, um tipo de marcador luminescente pode se associar unicamente a um tipo de molécula. Durante ou após a excitação, o marcador luminescente pode emitir energia de emissão. Quando múltiplos marcadores são usados, os mesmos podem emitir em energias características diferentes. Em algumas modalidades, múltiplos marcadores podem ter tempos de vida característicos diferentes. Adicionalmente, múltiplos marcadores podem diferir em

resposta a múltiplas energias de excitação. Os marcadores para uma amostra podem ser discernidos por sua resposta de excitação, energias características ou comprimentos de onda, e/ou tempos de vida característicos. As emissões a partir da amostra podem radiar da cavidade de amostra 3-108 para o sensor 3-110.

[00239] Os componentes podem focar a energia de emissão em direção ao sensor e podem separar adicional ou alternativamente as energias de emissão que têm energias características ou comprimentos de onda. A energia de excitação emitida a partir da fonte de excitação 3-106 pode ser direcionada à cavidade de amostra 3-108 em qualquer maneira adequada e configurada para excitar pelo menos uma amostra que é recebida na cavidade de amostra 3-108. De acordo com algumas modalidades, a fonte de excitação 3-106 pode excitar a amostra, que pode luminescer. A fonte de excitação pode fornecer uma ou mais energias de excitação para a cavidade de amostra 3-108. Em algumas implantações, a fonte de excitação 3-106 pode excitar um ou mais marcadores que luminescem ou emitem energia em resposta à excitação e que são anexados à amostra ou associados de outro modo à amostra. A luz luminescente ou energia emitida resultante a partir da excitação pode ser direcionada a um sensor 3-110, que pode ser configurado para detectar a intensidade e/ou temporização da emissão recebida. Os exemplos não limitantes de luminescência são fotoluminescência, fluorescência e fosforescência.

[00240] Em algumas modalidades, o dispositivo integrado pode incluir componentes que direcionam a energia de emissão para um padrão de radiação que é dependente da faixa espectral da energia de emissão. O sensor ou a região de sensor que contém múltiplos subsensores pode detectar uma distribuição espacial da energia de emissão que depende do padrão de radiação. Os marcadores que emitem energias de emissão diferentes e/ou faixas espectrais podem formar

padrões de radiação diferentes. O sensor ou a região de sensor pode detectar informações sobre a distribuição espacial da energia de emissão que pode ser usada para identificar um marcador dentre os múltiplos marcadores.

[00241] A energia de emissão ou as energias podem ser detectadas pelo sensor e convertidas para pelo menos um sinal elétrico. Os sinais elétricos podem ser transmitidos ao longo de linhas condutoras no conjunto de circuitos do dispositivo integrado conectado ao instrumento através da interface de dispositivo integrado, como a interface de dispositivo integrado 2-114 de instrumento 2-104 mostrada na Figura 2-1B. Os sinais elétricos podem ser subsequentemente processados e/ou analisados. O processamento ou a análise de sinais elétricos pode ocorrer em um dispositivo de computação adequado localizado no instrumento 2-104 ou fora do instrumento, como o dispositivo de computação 2-120 mostrado na Figura 2-1B.

[00242] O dispositivo integrado 2-210 pode aparentar conforme ilustrado na Figura 2-2. As estruturas eletrônicas, ópticas e relacionadas podem ser todas incorporadas em um substrato único 2-200. O dispositivo integrado pode incluir uma matriz de pixels 2-205 e conjunto de circuitos eletrônicos integrados. O conjunto de circuitos eletrônicos integrados pode incluir conjunto de circuitos de acionamento e de leitura 2-215 acoplados aos sensores da matriz de pixels, e do conjunto de circuitos de processamento de sinal. O conjunto de circuitos de processamento de sinal pode incluir conversores de analógico para digital 2-217 e uma ou mais matrizes de porta programável em campo e/ou processadores de sinal digital 2-219. Algumas modalidades podem ter mais componentes de circuito, e algumas modalidades podem ter menos componentes de circuito integrados no substrato. Embora os componentes do dispositivo integrado sejam ilustrados em um nível único na Figura 2-2, os componentes podem ser fabricados em múltiplos ní-

veis no substrato 2-200.

[00243] Em algumas modalidades, pode haver elementos ópticos (não mostrado) localizados no dispositivo integrado que são dispostos para guiar e acoplar a energia de excitação de uma ou mais fontes de excitação às cavidades de amostra. Tais elementos de fonte para cavidade podem incluir estruturas plasmônicas e outras estruturas microfabricadas localizadas adjacente às cavidades de amostra. Adicionalmente, em algumas modalidades, pode haver elementos ópticos localizados no dispositivo integrado que são configurados para guiar a energia de emissão das cavidades de amostra para sensores correspondentes. Tais elementos de cavidade para amostra podem incluir estruturas plasmônicas e outras estruturas microfabricadas localizadas adjacente às cavidades de amostra. Em algumas modalidades, um componente único pode ter um papel tanto no acoplamento de energia de excitação a uma cavidade de amostra quanto na entrega de energia de emissão da cavidade de amostra para um sensor correspondente.

[00244] Em algumas implantações, um dispositivo integrado pode incluir mais de um tipo de fonte de excitação que é usada para excitar amostras em uma cavidade de amostra. Por exemplo, pode haver múltiplas fontes de excitação configuradas para produzir múltiplas energias de excitação ou comprimentos de onda para excitar uma amostra. Em algumas modalidades, uma fonte de excitação única pode ser configurada para emitir múltiplos comprimentos de onda que são usados para excitar amostras nas cavidades de amostra. Em algumas modalidades, cada sensor em um pixel do dispositivo integrado pode incluir múltiplos subsensores configurados para detectar características de energia de emissão diferentes da amostra.

[00245] Em operação, as análises paralelas de amostras dentro das cavidades de amostra são executadas excitando-se as amostras dentro das cavidades com uso da fonte de excitação e detectando-se si-

nais da emissão de amostra com os sensores. A energia de emissão de uma amostra pode ser detectada por um sensor correspondente e convertida para pelo menos um sinal elétrico. O sinal resultante, ou sinais, pode ser processado no dispositivo integrado em algumas modalidades, ou transmitido ao instrumento para processamento pelo dispositivo de processamento e/ou dispositivo de computação. Os sinais de uma cavidade de amostra podem ser recebidos e processados independentemente de sinais associados aos outros pixels.

[00246] Quando uma fonte de excitação entregar energia de excitação para uma cavidade de amostra, pelo menos uma amostra dentro do poço pode luminescer, e a emissão resultante pode ser detectada por um sensor. Conforme usado no presente documento, as expressões "uma amostra pode luminescer" ou "uma amostra pode emitir radiação" ou "emissão de uma amostra" significam que uma etiqueta luminescente, marcador, ou repórter, a amostra em si, ou um produto de reação associado à amostra pode produzir a radiação emitida.

[00247] Em algumas modalidades, as amostras podem ser identificadas com um ou mais marcadores, e a emissão associada aos marcadores é discernível pelo instrumento. Por exemplo, o sensor pode ser configurado para converter fótons da energia de emissão para elétrons para formar um sinal elétrico que pode ser usado para discernir um tempo de vida que é dependente da energia de emissão de um marcador específico. Usando-se marcadores com tempos de vida diferentes para identificar amostras, as amostras específicas podem ser identificadas com base no sinal elétrico resultante detectado pelo sensor. Em algumas modalidades, os componentes do dispositivo integrado podem afetar a emissão a partir de uma cavidade de amostra para produzir um padrão de distribuição de emissão espacial que é dependente do comprimento de onda de emissão. Um sensor correspondente para a cavidade de amostra pode ser configurado para detectar os

padrões de distribuição espacial a partir de uma cavidade de amostra e produzir sinais que diferenciam entre os comprimentos de onda de emissão diferentes, conforme descrito em detalhes adicionais abaixo.

II. DISPOSITIVO INTEGRADO

[00248] O dispositivo integrado pode ser configurado para receber energia de excitação a partir de uma fonte de energia de excitação externa. Em algumas modalidades, uma região do dispositivo pode ser usada para se acoplar a uma fonte de energia de excitação localizada fora do dispositivo integrado. Os componentes do dispositivo integrado podem guiar a energia de excitação da região de acoplamento de fonte de excitação a pelo menos um pixel. Em algumas modalidades, pelo menos uma guia de onda pode ser configurada para entregar a energia de excitação para pelo menos um pixel que tem uma cavidade de amostra. A amostra localizada dentro da cavidade de amostra pode emitir energia de emissão em resposta a ser iluminada com energia de excitação. Um ou mais sensores localizados dentro do pixel são configurados para receber a energia de emissão.

[00249] Os componentes e/ou camadas de dispositivo integrado 3-200, de acordo com algumas modalidades mostradas na Figura 3-2, incluem uma cavidade de amostra 3-203, uma guia de onda 3-220, e um sensor 3-275 integrados em um dispositivo. A cavidade de amostra 3-203 pode ser formada na camada de cavidade de amostra 3-201 de dispositivo integrado 3-200. Em algumas modalidades, a camada de cavidade de amostra 3-201 pode ser metal. A cavidade de amostra 3-203 pode ter uma dimensão D_{tv} que pode indicar uma dimensão de corte transversal da cavidade de amostra. A cavidade de amostra 3-203 pode atuar como uma nanopassagem e ter uma ou mais dimensões de subcomprimento de onda que criar um efeito de intensificação de campo que aumenta a intensidade da excitação da amostra na cavidade de amostra 3-203. A guia de onda 3-220 é configurada para entregar a

energia de excitação a partir da fonte de excitação 3-230 localizada fora do dispositivo 3-200 para a cavidade de amostra 3-203. A guia de onda 3-220 pode ser formada em uma camada entre a camada de cavidade de amostra 3-201 e o sensor 3-275. O projeto de dispositivo integrado 3-200 permite que o sensor 3-275 colete luminescência emitida a partir de uma amostra na cavidade de amostra 3-203. Pelo menos em parte do tempo, a amostra absorve energia de excitação e emite um fóton com uma energia menor que aquela da energia de excitação, chamada de energia de emissão ou luminescência.

[00250] Ter cavidade de amostra 3-203 e o sensor 3-275 no dispositivo integrado 3-200 pode reduzir a distância óptica que a luz percorre a partir da cavidade de amostra 3-203 para o sensor 3-215. As dimensões de dispositivo integrado 3-200 ou componentes dentro do dispositivo podem ser configuradas para uma certa distância óptica. As propriedades ópticas dos materiais de componentes e/ou uma ou mais camadas do dispositivo podem determinar uma distância óptica entre uma cavidade de amostra e um sensor. Em algumas modalidades, as espessuras de uma ou mais camadas podem determinar a distância óptica entre a cavidade de amostra e o sensor em um pixel. Adicional ou alternativamente, o índice de refração de materiais que formam uma ou mais camadas de dispositivo integrado 3-200 pode determinar a distância óptica entre a cavidade de amostra 3-203 e o sensor 3-275 em um pixel. Tal distância óptica entre a cavidade de amostra e o sensor em um pixel pode ser menor que 1 mm, menor que 100 mícrons, menor que 25 mícrons, e/ou menor que 10 mícrons. Uma ou mais camadas podem estar presentes entre a camada de cavidade de amostra 3-201 e a guia de onda camada 3-220 para melhorar o acoplamento de energia de excitação da guia de onda 3-220 para a cavidade de amostra 3-203. Embora o dispositivo integrado 3-200 mostrado na Figura 3-2 ilustre apenas uma camada única 3-210, múltiplas camadas

podem ser formadas entre a cavidade de amostra 3-203 e a guia de onda 3-220. A camada 3-210 pode ser formada com propriedades ópticas para melhorar o acoplamento de energia de excitação da guia de onda 3-220 para a cavidade de amostra 3-203. A camada 3-210 pode ser configurada para reduzir dispersão e/ou absorção de energia de excitação e/ou aumentar luminescência de uma amostra na cavidade de amostra 3-203. A camada 3-210 pode ser transparente de modo óptico, de acordo com algumas modalidades, para que a luz possa percorrer para e a partir da cavidade de amostra 3-203 com atenuação pequena. Em algumas modalidades, materiais dielétricos podem ser usados para formar a camada 3-210. Em algumas modalidades, a energia de excitação que acopla componentes dentro da camada 3-210 e/ou na interface entre a camada 3-210 e a camada de cavidade de amostra 3-201 pode ser fornecida para melhorar o acoplamento de energia de excitação da guia de onda 3-220 à cavidade de amostra 3-203. Como exemplo, os componentes de coleta de energia 3-215 formados na interface entre a camada de cavidade de amostra 3-201 e a camada 3-210 podem ser configurados para melhorar o acoplamento de energia de excitação da guia de onda 3-220 à cavidade de amostra 3-203. Os componentes de coleta de energia 3-215 são opcionais e, em algumas modalidades, a configuração de guia de onda 3-220 e de cavidade de amostra 3-203 podem permitir acoplar energia de excitação de modo adequado sem a presença de componentes de coleta de energia de excitação 3-215.

[00251] A luz, ou a energia luminescente, emitida a partir de uma amostra na cavidade de amostra 3-203 pode ser transmitida para o sensor 3-275 em uma variedade de maneiras, em que alguns exemplos são descritos em detalhes abaixo. Algumas modalidades podem usar componentes ópticos para aumentar a probabilidade de a luz de um comprimento de onda particular ser direcionada para uma área ou

porção do sensor 3-275 que é dedicada à detecção de luz daquele comprimento de onda particular. O sensor 3-275 pode incluir múltiplas porções para detectar simultaneamente a luz de comprimentos de onda diferentes que podem corresponder às emissões a partir de marcadores luminescentes diferentes.

[00252] Uma ou mais camadas podem estar presentes entre a cavidade de amostra 3-203 e o sensor 3-275 que podem ser configurados para melhorar a coleta de luminescência da cavidade de amostra 3-203 para o sensor 3-275. Os componentes de direcionamento de luminescência podem ser localizados na interface entre a camada de cavidade de amostra 3-201 e a camada 3-210. Os componentes de coleta de energia 3-215 podem focar a energia de emissão para o sensor 3-275, e podem separar adicional ou alternativamente e espacialmente as energias de emissão que têm energias características ou comprimentos de onda diferentes. Tais componentes de coleta de energia 3-215 podem incluir uma estrutura de grade para direcionar a luminescência ao sensor 3-275. Em algumas modalidades, a estrutura de grade pode ser uma série de anéis concêntricos ou configuração de estrutura de grade "do tipo alvo". As grades circulares concêntricas podem se projetar a partir de uma superfície de fundo da camada de cavidade de amostra 3-201. As grades circulares podem atuar como elementos plasmônicos que podem ser usados para diminuir a dispersão da luz de sinal e direcionar a luz de sinal ao sensor associado 3-275. Tal grade do tipo alvo pode direcionar a luminescência de modo mais eficaz para o sensor 3-275.

[00253] A camada 3-225 pode ser formada adjacente à guia de onda. As propriedades ópticas de camada 3-225 podem ser selecionadas para melhorar a coleta de luminescência a partir da cavidade de amostra para o sensor 3-275. Em algumas modalidades, a camada 3-225 pode ser um material dielétrico. Um defletor pode ser formado entre a

camada de cavidade de amostra 3-201 e o sensor 3-275. O defletor 3-240 pode ser configurado de modo que o sensor 3-275 receba luminescência correspondente à cavidade de amostra 3-203 e reduza a luminescência, e a excitação refletida/dispersa a partir de outras cavidades de amostra. Os elementos de filtração 3-260 podem ser posicionados e configurados para reduzir a energia de excitação que alcança o sensor 3-275. Em algumas modalidades, os elementos de filtração 3-260 podem incluir um filtro que transmite seletivamente a energia de emissão de um ou mais marcadores usados para identificar uma amostra. Nas modalidades com uma matriz de cavidades de amostra e uma matriz de sensores em que cada cavidade de amostra tem um sensor correspondente, um defletor correspondente para cada cavidade de amostra pode ser formado para reduzir a luminescência de outras cavidades de amostra e refletir e/ou dispersar a luz de excitação coletada por um sensor correspondente à cavidade de amostra.

[00254] Uma ou mais camadas podem ser formadas entre a guia de onda 3-220 e o sensor 3-275 para reduzir a transmissão de energia de excitação para o sensor. Em algumas modalidades, os elementos de filtração podem ser formados entre a guia de onda 3-220 e o sensor 3-275. Tais elementos de filtração podem ser configurados para reduzir a transmissão de energia de excitação para o sensor 3-275 enquanto permite que a luminescência da cavidade de amostra seja coletada pelo sensor 3-275.

[00255] A energia de emissão ou as energias podem ser detectadas pelo sensor 3-275 e convertidas para pelo menos um sinal elétrico. O sinal elétrico ou sinais podem ser transmitidos ao longo de uma ou mais linhas condutoras de fileira ou coluna (não mostrado) para o conjunto de circuitos eletrônicos integrados no substrato 3-200 para processamento de sinal subsequente.

[00256] A descrição acima da Figura 3-2 é uma vista geral de al-

guns dentre os componentes do aparelho, de acordo com algumas modalidades. Em algumas modalidades, um ou mais elementos da Figura 3-2 podem estar ausentes ou em um local diferente. Os componentes do dispositivo integrado 3-200 e da fonte de excitação 3-230 são descritos em mais detalhes abaixo.

A. REGIÃO DE ACOPLAMENTO DE FONTE DE EXCITAÇÃO

[00257] O dispositivo integrado pode ter uma região de acoplamento de fonte de excitação configurada para se acoplar a uma fonte de energia de excitação externa e guiar a excitação para pelo menos um pixel em uma área de pixel do dispositivo integrado. A região de acoplamento de fonte de excitação pode incluir uma ou mais estruturas configuradas para acoplar a luz em pelo menos uma guia de onda. Qualquer mecanismo adequado para acoplar a energia de excitação a uma guia de onda pode ser usado.

[00258] Em algumas modalidades, a energia de excitação de uma fonte de excitação externa pode se acoplar a uma guia de onda de um dispositivo integrado através de acoplamento de borda. Uma borda do dispositivo integrado pode incluir uma extremidade da guia de onda de modo que uma fonte de excitação externa posicionada próxima à extremidade da guia de onda possa acoplar a luz à guia de onda. Em tais modalidades, a fabricação da região de acoplamento de fonte de excitação pode incluir o posicionamento de uma extremidade de uma guia de onda em uma borda de dispositivo integrado. A Figura 4-1A ilustra um exemplo de acoplamento de borda. A fibra óptica 4-106, configurada para propagar a energia de excitação, é posicionada próxima a uma borda de dispositivo integrado 4-102 em que uma extremidade de guia de onda 4-104 de dispositivo integrado 4-102 seja localizada na borda de modo que a fibra óptica 4-106 possa acoplar a luz à guia de onda 4-104. Em tais modalidades, monitorar o alinhamento de fibra óptica 4-106 ou outra fonte de excitação para a guia de onda 4-104

pode melhorar a quantidade de luz fornecida pela fibra óptica para a guia de onda.

[00259] Em algumas modalidades, um prisma pode acoplar a luz à guia de onda. A luz pode ser direcionada e refratada pelo prisma a fim de corresponder à frequência de fase óptica do modo de guia de onda de propagação. O índice refrativo do material usado para o prisma pode ser selecionado para melhorar o acoplamento à guia de onda. Em alguns casos, o prisma tem um índice refrativo alto e um vão estreito em relação à guia de onda. Em outras modalidades, a luz pode se acoplar diretamente a uma extremidade de uma guia de onda. Uma borda do dispositivo integrado pode ser suficientemente bem polida para permitir o foco e o alinhamento da luz à guia de onda.

[00260] A região de acoplamento de fonte de excitação de um dispositivo integrado pode incluir componentes estruturais configurados para se acoplarem a uma fonte de excitação externa. Um dispositivo integrado pode incluir um acoplador de grade configurado para se acoplar a uma fonte de excitação externa posicionada próxima a uma superfície do dispositivo integrado e direcionar a luz a pelo menos uma guia de onda do dispositivo integrado. Os recursos do acoplador de grade, como o tamanho, formato, e/ou configurações de grade podem ser formados para melhorar o acoplamento da energia de excitação da fonte de excitação à guia de onda. O acoplador de grade pode incluir um ou mais componentes estruturais, em que o espaçamento entre os componentes estruturais pode atuar para propagar luz. Um ou mais dimensões do acoplador de grade pode fornecer acoplamento desejável de luz que tem um certo comprimento de onda característico.

[00261] Um dispositivo integrado também pode incluir uma guia de onda que tem uma região afunilada em uma extremidade da guia de onda. Uma ou mais dimensões da guia de onda perpendiculares a uma direção de propagação de luz na guia de onda pode ser maior em

uma extremidade da guia de onda, que forma uma região afunilada da guia de onda. Em algumas modalidades, a região afunilada de uma guia de onda pode ter uma dimensão perpendicular à propagação de luz e paralela a uma superfície do dispositivo integrado que é maior em uma extremidade da guia de onda e se torna menor ao longo do comprimento da guia de onda. Nas modalidades que incluem um acoplador de grade, a região afunilada pode ser posicionada próxima ao acoplador de grade de modo que, a extremidade maior da região afunilada seja localizada mais próxima ao acoplador de grade. A região afunilada pode ser dimensionada e conformada para melhorar o acoplamento de luz entre o acoplador de grade e a guia de onda expandindo-se uma ou mais dimensões da guia de onda para permitir a sobreposição de modo melhorado da guia de onda ao acoplador de grade. Nessa maneira, uma fonte de excitação posicionada próxima à superfície de um dispositivo integrado pode acoplar a luz à guia de onda através do acoplador de grade. Tal combinação de acoplador de grade e afunilamento de guia de onda pode permitir mais tolerância no alinhamento e posicionamento da fonte de excitação para o dispositivo integrado.

[00262] Um dispositivo integrado exemplificativo que tem um acoplador de grade e uma guia de onda com uma região afunilada é mostrado na Figura 4-1B. O dispositivo integrado 4-100 tem uma região de acoplamento de fonte de excitação que inclui uma guia de onda com uma região afunilada 4-114 e um acoplador de grade 4-116. A região afunilada 4-114 tem uma extremidade com uma dimensão maior paralela à superfície 4-112 de dispositivo integrado 4-100 e perpendicular à propagação de luz ao longo da guia de onda. A extremidade de região afunilada 4-114 pode ser dimensionada e conformada para fornecer acoplamento adequado entre o acoplador de grade 4-116 e a guia de onda. A fibra óptica 4-120, ou outra fonte de excitação adequada, po-

sicionada em relação ao acoplador de grade 4-116 pode acoplar a energia de excitação à guia de onda.

[00263] Um acoplador de grade pode ser posicionado em uma região do dispositivo integrado externo aos pixels do dispositivo integrado. Em uma superfície do dispositivo integrado, as cavidades de amostra dos pixels podem ocupar uma região da superfície separada da região de acoplamento de fonte de excitação. Uma fonte de excitação posicionada próxima à superfície da região de acoplamento de fonte de excitação pode se acoplar ao acoplador de grade. As cavidades de amostra podem ser posicionadas separadas da região de acoplamento de fonte de excitação para reduzir a interferência de luz da fonte de excitação no desempenho dos pixels. Um acoplador de grade de um dispositivo integrado pode ser formado dentro de uma ou mais camadas do dispositivo integrado que inclui uma guia de onda. Nessa maneira, uma região de acoplamento de fonte de excitação de um dispositivo integrado pode incluir um acoplador de grade dentro do mesmo plano do dispositivo integrado como uma guia de onda. O acoplador de grade pode ser configurado para um conjunto particular de parâmetros de feixe, incluindo largura de feixe, ângulo de incidência, e/ou polarização da energia de excitação incidente.

[00264] Uma vista em corte transversal do dispositivo integrado 4-200 é mostrada na Figura 4-2. O dispositivo integrado 4-200 inclui pelo menos uma cavidade de amostra 4-222 formada na camada 4-223 de dispositivo integrado 4-200. O dispositivo integrado 4-200 inclui o acoplador de grade 4-216 e a guia de onda 4-220 formados substancialmente no mesmo plano de dispositivo integrado 4-200. Em algumas modalidades, o acoplador de grade 4-216 e a guia de onda 4-220 são formados a partir da mesma camada de dispositivo integrado 4-200 e podem incluir o mesmo material. A região de acoplamento de fonte de excitação 4-201 de dispositivo integrado 4-200 inclui o acoplador de

grade 4-216. Conforme mostrado na Figura 4-2, a cavidade de amostra 4-222 é posicionada em uma superfície de dispositivo integrado 4-200 externa à região de acoplamento de fonte de excitação 4-201. A fonte de excitação 4-214 posicionada em relação ao dispositivo integrado 4-200 pode fornecer a energia de excitação incidente na superfície 4-215 de dispositivo integrado 4-200 dentro da região de acoplamento de fonte de excitação 4-201. Posicionando-se o acoplador de grade 4-216 dentro da região de acoplamento de fonte de excitação 4-201, o acoplador de grade 4-216 pode se acoplar à energia de excitação da fonte de excitação 4-214 e acoplar a energia de excitação à guia de onda 4-220. A guia de onda 4-220 é configurada para propagar energia de excitação à proximidade de uma ou mais cavidades de amostra 4-222.

[00265] Um acoplador de grade pode ser formado a partir de um ou mais materiais. Em algumas modalidades, um acoplador de grade pode incluir regiões alternantes de materiais diferentes ao longo de uma direção paralela à propagação de luz na guia de onda. Conforme mostrado na Figura 4-2, o acoplador de grade 4-216 inclui estruturas que são circundadas pelo material 4-224. O um ou mais material que forma um acoplador de grade pode ter um ou mais índices de refração adequados para acoplar e propagar luz. Em algumas modalidades, um acoplador de grade pode incluir estruturas formadas a partir de um material circundado por um material que tem um índice maior de refração. Como exemplo, um acoplador de grade pode incluir estruturas formadas de nitreto de silício e circundadas por dióxido de silício.

[00266] Quaisquer dimensões adequadas e/ou interespaçamento de grade podem ser usados para formar um acoplador de grade. O acoplador de grade 4-216 pode ter uma dimensão perpendicular à propagação de luz através da guia de onda, como ao longo da direção y, conforme mostrado na Figura 4-2, de aproximadamente 50 nm,

aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, ou aproximadamente 200 nm. O espaçamento entre estruturas do acoplador de grade ao longo de uma direção paralela à propagação de luz na guia de onda, como ao longo da direção z, conforme mostrado na Figura 4-2, pode ter qualquer distância adequada. O interespaçamento de grade pode ser de aproximadamente 300 nm, aproximadamente, 350 nm, aproximadamente, 400 nm, aproximadamente 420 nm, aproximadamente 450 nm, ou aproximadamente 500 nm. Em algumas modalidades, o interespaçamento de grade pode ser variável dentro de um acoplador de grade. O acoplador de grade 4-216 pode ter uma ou mais dimensões substancialmente paralelas à superfície 4-215 de dispositivo integrado 4-200 que fornecem uma área adequada para acoplamento com a fonte de excitação externa 4-214. A área de acoplador de grade 4-216 pode coincidir com uma ou mais dimensões de um feixe de luz de fonte de excitação 4-214 de modo que o feixe sobreponha o acoplador de grade 4-215. A acoplador de grade pode ter uma área configurada para um diâmetro de feixe de aproximadamente 10 mícrons, aproximadamente 20 mícrons, aproximadamente 30 mícrons, ou aproximadamente 40 mícrons.

[00267] Uma vista em seção transversal de uma porção de uma região de acoplamento de fonte de excitação exemplificativa de um dispositivo integrado é mostrada na Figura 4-3A. A região de acoplamento de fonte de excitação inclui o acoplador de grade 4-326 e a camada de reflexão 4-336 configurados para refletir luz de excitação que passa através do acoplador de grade 4-326 até o acoplador de grade 4-326. O acoplador de grade 4-326 pode incluir estruturas que têm um interespaçamento de grade representado por Λ ao longo da direção z mostrada na Figura 4-3A. As estruturas podem ter um formato linear, curvado, ou qualquer outro formato adequado. Em algumas modalidades, o acoplador de grade 4-326 pode ter uma dimensão ao longo da

direção y similar à guia de onda 4-330, conforme representado pelas setas em cada lado da guia de onda 4-330. O acoplador de grade 4-326 é circundado pela região 4-324, e a combinação de materiais que formam o acoplador de grade 4-324 e a região 4-324 podem fornecer acoplamento desejado de luz à guia de onda 4-330. O índice de refração de guia de onda 4-330, o acoplador de grade 4-326, e/ou o material circundante 4-324 podem influenciar o acoplamento da energia de excitação à guia de onda e a eficácia de acoplamento geral de energia de excitação à guia de onda 4-330. Uma região de acoplamento de fonte de excitação de um dispositivo integrado pode ter mais de aproximadamente 50% de eficácia de acoplamento. O acoplador de grade 4-326 pode ser configurado para uma ou mais características de feixe incidente de energia de excitação 4-314, incluindo um comprimento de onda característico, um diâmetro de feixe (representado por setas), e o ângulo incidente de feixe (representado por θ). O acoplador de grade 4-326 pode ser configurado por um feixe de luz que tem um diâmetro de feixe de aproximadamente 10 mícrons, aproximadamente 20 mícrons, aproximadamente 30 mícrons, ou aproximadamente 40 mícrons. O acoplador de grade 4-326 pode ser configurado para um feixe de luz que tem um ângulo incidente de aproximadamente 2 graus, aproximadamente 5 graus, ou aproximadamente 7 graus. O acoplador de grade 4-326 pode ser configurado para se acoplar à energia de excitação de uma certa polarização, como luz polarizada TM ou TE.

[00268] Uma simulação de acoplamento de luz de um feixe a uma guia de onda através de um acoplador de grade é mostrada na Figura 4-3B. A guia de onda e o acoplador de grade estão ao longo do eixo geométrico z aproximadamente no ponto 0 do eixo geométrico y. O feixe de luz é um ângulo incidente de aproximadamente 5 graus da direção y e tem um diâmetro de 20 mícrons. A guia de onda usada nessa simulação tem uma altura (ao longo da direção y) de 100 nm, e

o acoplador de grade tem um interespaçamento de grade de 420 nm. O guia de onda e a estrutura de acoplador de grade têm um índice de refração de aproximadamente 1,87. O material que circunda a guia de onda e a estrutura de grade tem um índice de refração de aproximadamente 1,45. A Figura 4-3B ilustra a intensidade de luz de feixe acoplada ao acoplador de grade e à guia de onda e mostra os modos de luz na guia de onda pelas regiões mais escuras.

[00269] Uma ou mais dimensões da região afunilada de uma guia de onda e o posicionamento relativo da região afunilada ao acoplador de grade podem fornecer acoplamento suficiente de energia de excitação à guia de onda. A curvatura e o chilro da região afunilada podem acomodar a convergência e/ou divergência da propagação de energia de excitação incidente à guia de onda. Uma vista planar de uma camada de guia de onda exemplificativa que inclui um acoplador de grade 4-316 e uma região de guia de onda afunilada 4-318 é mostrada na Figura 4-3C. A região de guia de onda 4-318 tem uma dimensão perpendicular à propagação de luz e no plano da Figura 4-3C que diminui gradualmente da direita para a esquerda para alcançar uma dimensão de guia de onda 4-320. O acoplador de grade 4-316 pode ter uma área dentro do plano da Figura 4-3C adequada para acoplamento a uma fonte de excitação externa. O alinhamento de um feixe de energia de excitação ao acoplador de grade 4-316 de modo que o feixe sobreponha substancialmente a área de acoplador de grade 4-316 pode melhorar o acoplamento de energia de excitação à guia de onda 4-320. A disposição de região afunilada 4-318 em relação ao acoplador de grade 4-316 pode fornecer eficácia de acoplamento adequada. O ângulo da região afunilada 4-318 e o acoplador de grade 4-316 podem ser selecionados para melhorar a eficácia de acoplamento de energia de excitação da fonte de excitação à guia de onda 4-320 reduzindo-se a perda de energia de excitação à medida que a dimensão da guia de

onda perpendicular à propagação de luz diminui.

[00270] Um dispositivo integrado pode incluir uma camada formada em um lado de um acoplador de grade oposto à luz de reflexão configurada de fonte de excitação. A camada pode refletir a energia de excitação que passa através do acoplador de grade em direção ao acoplador de grade. Incluindo-se a camada em um dispositivo integrado, a eficácia de acoplamento da energia de excitação à guia de onda pode ser melhorada. Um exemplo de uma camada refletiva é a camada 4-218 de dispositivo integrado 4-200 mostrada na Figura 4-2 e a camada 4-336 mostrada na Figura 4-3A. A camada 4-218 é posicionada dentro da região de acoplamento de fonte de excitação 4-201 de dispositivo integrado 4-200 e é configurada para refletir a luz em direção ao acoplador de grade 4-216. A camada 4-218 é formada próxima ao lado de acoplador de grade 4-216 oposto à energia de excitação incidente da fonte de excitação 4-214. Posicionar a camada 4-218 externa aos pixels de dispositivo integrado 4-200 pode reduzir a interferência de camada 4-218 nas capacidades para desempenho dos pixels. A camada 4-218 pode incluir qualquer material adequado. A camada 4-218 pode ser substancialmente refletiva para uma ou mais energias de excitação. Em algumas modalidades, essa camada pode incluir Al, AlCu e/ou TiN.

B. GUIA DE ONDA

[00271] Um dispositivo integrado pode incluir uma ou mais guias de onda dispostas para entregar uma quantidade desejada de energia de excitação para uma ou mais cavidades de amostra do dispositivo integrado. Uma guia de onda posicionada na proximidade de uma ou mais cavidades de amostra de modo que, à medida que uma energia de excitação se propaga ao longo da guia de onda, uma porção de energia de excitação se acople à uma ou mais cavidade de amostra. Uma guia de onda pode acoplar a energia de excitação a uma pluralidade

de pixels e atuar como uma guia de onda de barramento. Por exemplo, uma guia de onda única pode entregar energia de excitação para uma fileira ou uma coluna de pixels de um dispositivo integrado. Em algumas modalidades, uma guia de onda pode ser configurada para propagar a energia de excitação que tem uma pluralidade de comprimentos de onda característicos. Um pixel de um dispositivo integrado pode incluir estruturas adicionais (por exemplo, microcavidade) configuradas para direcionar a energia de excitação da guia de onda em direção à proximidade da cavidade de amostra. Em algumas modalidades, uma guia de onda pode portar um modo óptico que tem uma cauda evanescente configurada para se estender em uma cavidade de amostra e/ou em uma região na proximidade da cavidade de amostra. As estruturas de acoplamento de energia adicionais localizadas próximas à cavidade de amostra podem acoplar a energia da cauda evanescente para a cavidade de amostra.

[00272] Uma ou mais dimensões de uma guia de onda de um dispositivo integrado podem fornecer a propagação desejada de energia de excitação ao longo da guia de onda e/ou para uma ou mais cavidades de amostra. Uma guia de onda pode ter uma dimensão perpendicular à propagação de luz e paralela a um plano da guia de onda, que pode ser considerado como uma largura em corte transversal. Uma guia de onda pode ter uma largura em corte transversal de aproximadamente 0,4 mícrons, aproximadamente 0,5 mícrons, aproximadamente 0,6 mícrons, aproximadamente 0,65 mícrons, aproximadamente 0,8 mícrons, aproximadamente 1 mícron, ou aproximadamente 1,2 mícrons. Uma guia de onda pode ter uma dimensão perpendicular à propagação de luz e perpendicular a um plano da guia de onda, que pode ser considerado como uma altura em corte transversal. Uma guia de onda pode ter uma altura em corte transversal de aproximadamente 0,05 mícrons, aproximadamente 0,1 mícrons, aproximadamente 0,15

mícrons, aproximadamente 0,16 mícrons, aproximadamente 0,17 mícrons, aproximadamente 0,2 mícrons, ou aproximadamente 0,3 mícrons. Em algumas modalidades, uma guia de onda tem uma largura em corte transversal maior que uma altura de corte transversal. Uma guia de onda pode ser posicionada a uma certa distância a partir de uma ou mais cavidades de amostra dentro de um dispositivo integrado, como a distância D mostrada na Figura 4-2 entre a cavidade de amostra 4-222 e a guia de onda 4-220, que é de aproximadamente 0,3 mícrons, 0,5 mícrons, ou aproximadamente 0,7 mícrons.

[00273] Em uma modalidade exemplificativa, uma guia de onda pode ter uma largura em corte transversal de aproximadamente 0,5 μm e uma altura de corte transversal de aproximadamente 0,1 μm, e ser posicionada aproximadamente 0,5 μm abaixo da camada de cavidade de amostra. Em outra modalidade exemplificativa, uma guia de onda pode ter uma largura em corte transversal de aproximadamente 1 μm e uma altura de corte transversal de 0,18 μm, e ser posicionada 0,3 μm abaixo da camada de cavidade de amostra.

[00274] Uma guia de onda pode ser dimensionada para sustentar um modo de radiação transversal único ou pode ser dimensionada para sustentar modos de radiação multitransversais. Em algumas modalidades, uma ou mais dimensões de uma guia de onda podem atuar de modo que a guia de onda sustente um modo transversal único e podem propagar seletivamente modos de polarização TE ou TM. Em algumas implantações, uma guia de onda pode ter seções altamente refletivas formadas em suas extremidades, para que suporte um modo de repouso longitudinal dentro da guia de onda. Sustentando-se um modo, a guia de onda pode ter efeitos de interferência modal reduzidos a partir de acoplamento cruzado de modos que têm constantes de propagação diferentes. Em algumas modalidades, as seções altamente refletivas compreendem uma superfície altamente refletiva única.

Em outras modalidades, as seções altamente refletivas compreendem múltiplas estruturas refletivas que, em agregação, resultam em uma refletância alta. As guias de onda podem ser configuradas para dividir a energia de excitação de uma fonte de excitação única que tem uma intensidade de emissão mais alta com uso de divisores de feixe de guia de onda para criar uma pluralidade de feixes de energia de excitação a partir de uma fonte de excitação única. Tais divisores de feixe podem incluir mecanismos de acoplamento evanescentes. Adicional ou alternativamente, os cristais fotônicos podem ser usados na estrutura de guia de onda para melhorar a propagação de energia de excitação e/ou no material que circunda a guia de onda para reduzir a dispersão de energia de excitação.

[00275] A posição e a disposição da guia de onda em relação a outros componentes em um pixel dos dispositivos integrados podem ser configuradas para melhorar o acoplamento de energia de excitação em direção a uma cavidade de amostra, melhorar a coleta de energia de emissão pelo sensor, e/ou reduzir ruídos de sinal introduzidos por energia de excitação. Uma guia de onda pode ser dimensionada e/ou posicionada em relação a uma cavidade de amostra de modo a reduzir a interferência de energia de excitação que se propaga na guia de onda com energia de emissão emitida a partir da cavidade de amostra. O posicionamento e a disposição de uma guia de onda em um dispositivo integrado podem depender dos índices refrativos da guia de onda e do material que circunda a guia de onda. Por exemplo, uma dimensão da guia de onda perpendicular para uma direção de propagação de luz ao longo da guia de onda e dentro de um plano da guia de onda pode ser aumentada para que uma quantidade substancial de energia de emissão de uma cavidade de amostra passe através da guia de onda à medida que se propaga no sensor do pixel. Em algumas implantações, uma distância entre uma cavidade de amostra e uma guia de

onda e/ou espessura de guia de onda pode ser selecionada para reduzir as reflexões de uma ou mais interfaces entre a guia de onda e um material circundante. De acordo com algumas modalidades, a reflexão de energia de emissão por uma guia de onda pode ser reduzida para menos de cerca de 5% em algumas modalidades, menos de cerca de 2% em algumas modalidades, e ainda menos de cerca de 1% em algumas modalidades.

[00276] A capacidade de uma guia de onda propagar energia de excitação pode depender tanto no material para a guia de onda quanto no material que circunda a guia de onda. Nessa maneira, a estrutura de guia de onda pode incluir um material de núcleo, como a guia de onda 4-220, e um material de revestimento, como a região 4-224, conforme ilustrado na Figura 4-2. O material tanto da guia de onda quanto do material circundante pode permitir a propagação de energia de excitação que tem um comprimento de onda característico através da guia de onda. O material para a guia de onda ou o material circundante pode ser selecionado para índices particulares de refração ou combinação de índices de refração. O material de guia de onda pode ter um índice refrativo mais baixo que o material de guia de onda circundante. Os materiais de guia de onda exemplificativos incluem nitreto de silício (Si_xN_y), oxinitreto de silício, carbeto de silício, óxido de tântalo (TaO_2), dióxido de alumínio. Os materiais circundantes de guia de onda exemplificativos incluem dióxido de silício (SiO_2) e óxido de silício. A guia de onda e/ou o material circundante podem incluir um ou mais materiais. Em alguns casos, um índice refrativo desejado para uma guia de onda e/ou material circundante pode ser obtido formando-se a guia de onda e/ou material circundante para incluir mais de um material. Em algumas modalidades, uma guia de onda compreende nitreto de silício e um material circundante compreende dióxido de silício.

[00277] Em uma modalidade exemplificativa, uma guia de onda

compreende nitreto de silício e tem um índice refrativo de aproximadamente 1,90 e uma altura de corte transversal de aproximadamente 100 nm, e o material circundante compreende dióxido de silício e tem um índice refrativo de aproximadamente 1,46. Em algumas modalidades, uma guia de onda pode ter um índice refrativo de aproximadamente 1,88 pode ser usado enquanto o material circundante tiver um índice de refração de aproximadamente 1,46. Em tais modalidades, o índice refrativo mais baixo para a guia de onda pode reduzir a perda óptica. Em outra modalidade exemplificativa, uma guia de onda compreende um núcleo de nitreto de silício e um revestimento de dióxido de silício e é configurado para propagar a energia de excitação que tem um comprimento de onda característico de 635 nm. O núcleo pode ter um índice de refração de 1,99 e dimensões de 100 nm por 500 nm.

[00278] Guias de onda de um dispositivo integrado podem ser formadas para ter um nível desejado de uniformidade dentro de uma guia de onda e/ou entre múltiplas guias de onda. A uniformidade dentro de um dispositivo integrado pode ser alcançada fabricando-se o núcleo e/o revestimento de uma estrutura de guia de onda com dimensões e/ou índices de refração substancialmente similares ao longo de uma guia de onda e entre múltiplas guias de onda. Adicionalmente, as guias de onda podem ser formadas em uma maneira repetível através de dispositivos integrados diferentes garantindo que um processo de fabricação repetível alcance um certo nível de conformidade através de dispositivos diferentes. A variação na altura de corte transversal de uma guia de onda e/ou múltiplas guias de onda pode ser menor que aproximadamente 2%, menor que aproximadamente 3%, ou menor que aproximadamente 4%. A variação no índice de refração de um guia de onda e/ou múltiplas guias de onda pode ser menor que aproximadamente 0,5%, menor que aproximadamente 1%, ou menor que aproximadamente 2%. A variação no índice de refração do material

circundante ou revestimento de uma guia de onda e/ou múltiplas guias de onda pode ser menor que aproximadamente 0,5%, menor que aproximadamente 1%, ou menor que aproximadamente 2%.

[00279] Uma guia de onda pode ser localizada entre uma cavidade de amostra e um ou mais sensores em um pixel. Por exemplo, conforme mostrado na Figura 4-2, a guia de onda 4-220 é posicionada entre a cavidade de amostra 4-222 e a camada 4-230 que inclui pelo menos um sensor. Em algumas modalidades, a cavidade de amostra 4-222 pode ser localizada entre a guia de onda e o sensor. Uma guia de onda pode ser alinhada, por exemplo, centro a centro ao sensor de modo que o centro da guia de onda seja substancialmente alinhado ao centro da cavidade de amostra. Em algumas modalidades, a guia de onda pode ser deslocada de um alinhamento de centro para centro à cavidade de amostra por uma certa distância. Em algumas modalidades, duas guias de onda substancialmente paralelas podem entregar a energia de excitação de um mesmo comprimento de onda ou comprimentos de onda diferentes para um pixel, e a cavidade de amostra pode ser localizada entre as duas guias de onda. Em algumas modalidades, uma pluralidade de guias de onda em níveis diferentes dentro do dispositivo integrado pode direcionar a energia de excitação à proximidade de uma ou mais cavidades de amostra localizadas no dispositivo integrado.

[00280] Uma ou mais guias de onda de um dispositivo integrado podem incluir flexões. A flexão das guias de onda pode fornecer uma disposição desejada de guias de onda e/ou pixels de modo que uma quantidade suficiente de energia de excitação se acople a uma ou mais cavidades de amostra de um dispositivo integrado. O projeto de flexões de guia de onda pode balancear a perda de energia de excitação devido à flexão e a extensão espacial das flexões. Adicionalmente, com o projeto apropriado, as flexões dentro de uma guia de onda tam-

bém podem ser usadas para filtrar parte da luz de propagação. Projetar uma porção de uma guia de onda para ter um certo raio de curvatura pode diminuir a luz de uma polarização através da filtração fornecida pela curvatura na guia de onda. Tal flexão pode ser usada para selecionar um modo de polarização específica, como TM e TE. Em algumas modalidades, as flexões podem ser usadas para filtrar e/ou atenuar o modo TM e reter o modo TE. A Figura 4-4 plota a perda de luz devido à flexão como uma função de raio de curvatura para uma flexão para guia de onda que tem uma altura de corte transversal de 100 nm e larguras de 300 nm, 400 nm, 500 nm, 700 nm, e 1.000 nm. Como exemplo, para alcançar uma perda de pelo menos 0,1 dB/flexão de 90 graus, uma guia de onda que tem uma largura de corte transversal de 500 nm pode ter um raio de flexão de mais de aproximadamente 35 mícrons ou uma guia de onda que tem uma largura de corte transversal de 700 nm pode ter um raio de flexão de mais de aproximadamente 22 mícrons.

[00281] Dividir as guias de onda de uma guia de onda única para múltiplas guias de onda pode permitir que a energia de excitação alcance múltiplas fileiras ou colunas de cavidades de amostra de um dispositivo integrado. Uma fonte de excitação pode ser acoplada a uma guia de onda de entrada e a guia de onda de entrada pode ser dividida em múltiplas guias de onda de saída, em que cada guia de onda de saída entrega a energia de excitação a uma fileira ou coluna de cavidades de amostra. Quaisquer conjuntos de procedimentos adequados para dividir e/ou combinar guias de onda podem ser usados. Tal guia de onda que divide e/ou combina os conjuntos de procedimentos pode incluir um divisor ou acoplador em estrela, um divisor em Y, e/ou um acoplador evanescente. Adicional ou alternativamente, um divisor de interferência de múltiplos modos (MMI) pode ser usado para dividir e/ou combinar guias de onda. Um ou mais dentre esses

conjuntos de procedimentos de divisão e/ou combinação de guia de onda podem ser usados para direcionar a energia de excitação a uma cavidade de amostra.

[00282] Um acoplador em estrela exemplificativo 4-500 é ilustrado na Figura 4-5. A luz de dois comprimentos de onda diferentes pode ser inserida no acoplador em estrela com uso de uma guia de onda única ou duas guias de onda, 4-501 e 4-502, conforme mostrado na Figura 4-5. O tamanho e o formato de cada guia de onda de entrada podem ser usados para sintonizar separadamente a dispersão de cada um dentre os feixes de luz de excitação para correspondência nas guias de onda de emissão 4-504 para aumentar a probabilidade de que distribuições de pó similares são obtidas através das guias de onda de emissão 4-504. O acoplador em estrela inclui uma região de propagação livre 4-503, que pode ser implantada como uma guia de onda planar. A região de propagação livre 4-503 é uma região altamente multimodo que permite que a luz de entrada se propague essencial e livremente no plano da guia de onda planar. A região de propagação livre 4-503 pode ser, por exemplo, de 300 a 400 mícrons em largura a partir da primeira guia de onda de emissão para a última guia de onda de emissão.

[00283] O acoplamento da energia de excitação às guias de onda de emissão 4-504 pode ser sintonizado com uso de vários parâmetros do acoplador em estrela, incluindo uma ou mais dimensões de componentes individuais do acoplador em estrela. Por exemplo, uma dimensão do corte transversal de cada uma dentre as guias de onda de entrada 4-501 e 4-502, uma dimensão do corte transversal de cada uma dentre as guias de onda de saída 4-504, e a distância de cada uma dentre as guias de onda de saída 4-504 a partir das guias de onda de entrada podem ser parâmetros do acoplador em estrela para sintonizar e melhorar o acoplamento de energia de excitação às guias de onda

de saída 4-504. Em algumas modalidades, o acoplador em estrela pode ser formado de modo que guias de onda de saída 4-504 tenham distribuição de potência substancialmente igual uma em relação a outra. Em algumas modalidades, as guias de onda de saída próximas à borda externa do acoplador em estrela podem ter um tamanho diferente das guias de onda de saída próximas ao centro. Por exemplo, as guias de onda próximas à borda podem ter uma área de corte transversal maior, assim coletando mais luz que as guias de onda de saída próximas ao centro do acoplador em estrela, que tem uma área de corte transversal menor. Em algumas modalidades, a distância das guias de onda de saída a partir das guias de onda de entrada pode variar. Por exemplo, conforme ilustrado na Figura 4-5, as guias de onda de saída próximas à borda podem ter uma distância das guias de onda de entrada 4-501 e 4-502 que é menor que as guias de onda de saída próximas ao centro do acoplador em estrela.

[00284] O acoplador em estrela 4-500 pode ter qualquer número adequado de guias de onda de saída. Em algumas modalidades, um acoplador em estrela único distribui a energia de excitação para um dispositivo integrado inteiro. Desse modo, o número de guias de onda de saída é igual ao número de fileiras de pixels no dispositivo integrado. Por exemplo, pode haver 128 guias de onda de saída. Em outras modalidades, mais de um acoplador em estrela pode ser usado. Em tal modalidade, um primeiro acoplador em estrela pode ter 64 guias de onda de saída e um segundo acoplador em estrela pode ter 64 guias de onda de saída de modo que uma combinação do primeiro e do segundo acopladores em estrela forneça energia de excitação para 128 fileiras de pixels de um dispositivo integrado.

[00285] Em algumas modalidades, em vez de ter uma guia de onda de entrada, um ou mais acopladores de grade pode acoplar a energia de excitação diretamente a uma região de propagação livre de um

acoplador em estrela que tem uma pluralidade de guias de onda de saída. Um acoplador de grade único pode ser usado para acoplar uma pluralidade de comprimentos de onda a uma região de propagação livre do acoplador em estrela. Para fazer isso, a luz de comprimentos de onda diferentes pode ser incidente no acoplador de grade em ângulos diferentes. Em algumas modalidades, múltiplos acopladores de grade podem ser usados para acoplar a energia de excitação de comprimentos de onda diferentes. Por exemplo, um acoplador de grade para cada comprimento de onda de excitação pode ser usado. Um acoplador de grade configurado como parte de uma região de propagação livre pode operar de modo similar a um dentre os acopladores de grade descritos acima, mas em vez de acoplar a luz a uma guia de onda de entrada que propaga luz ao acoplador em estrela, a luz é acoplada diretamente à guia de onda planar que forma uma região de propagação livre, como 4-603.

[00286] Outra configuração exemplificativa de um acoplador em estrela é mostrada na Figura 4-6. A luz de dois comprimentos de onda pode ser inserida no acoplador em estrela com uso de acopladores de grade 4-605 e 4-606 conectados a guias de onda 4-609 e 4-610, respectivamente. Os acopladores de grade 4-605 e 4-606 e as guias de onda 4-609 e 4-610 podem ser configurados para reduzir a perda de energia de excitação reduzindo-se o número de flexões e/ou selecionando ângulos de flexão que melhoram a propagação de energia de excitação em direção à região de propagação livre 4-607. As guias de onda de saída 4-608 do acoplador em estrela podem ser configuradas em qualquer maneira adequada para fornecer energia de excitação para uma fileira de pixels. No exemplo mostrado na Figura 4-6, há 32 guias de onda de saída. A área em corte transversal das guias de onda de saída 4-608 próximas à região de propagação livre 4-607 pode variar de modo que uma guia de onda de saída próxima a uma extre-

midade de região de propagação livre 4-607 tenha uma área em corte transversal maior que uma guia de onda de saída próxima ao centro de região de propagação livre 4-607. Por exemplo, conforme mostrado na Figura 4-6, a guia de onda de saída 4-608a tem uma área de corte transversal maior que a guia de onda de saída 4-608b, que está localizada próxima ao centro da região de propagação livre 4-607. Tal variação em áreas de corte transversal entre guias de onda de saída 4-608 pode melhorar a distribuição de energia de excitação através de guias de onda de saída 4-608, e em algumas modalidades, permite a entrega de uma quantidade substancialmente similar de energia de excitação por cada guia de onda de saída para uma fileira de pixels. Nessa maneira, múltiplas fileiras de pixels podem receber uma quantidade substancialmente similar de energia de excitação através das fileiras de pixels.

[00287] O projeto para divisão de guia de onda pode ser selecionado com base na eficácia do conjunto de procedimentos de divisão para o número de guias de onda de saída. Se a eficácia de divisão for alta, então, mais guias de onda de saída podem ser produzidas e apenas uma etapa de divisão única pode ocorrer. Em algumas modalidades, uma guia de onda de saída única de um divisor pode corresponder a cada fileira de cavidades de amostra. Algumas modalidades incluem múltiplas etapas de divisão para alcançar um número suficiente de guias de onda configuradas para entregar a energia de excitação para uma porção de cavidades de amostra de um dispositivo integrado. Em algumas modalidades, uma guia de onda pode ser adicionalmente dividida em múltiplas guias de onda com uso de um divisor de interferência de múltiplos modos (MMI). Em um MMI, uma guia de onda de entrada pode ser dividida em múltiplas guias de onda de saída, em que uma ou mais dimensões do MMI pode determinar o número de guias de onda de saída e/ou uma quantidade de energia de excitação

entregue a uma guia de onda de saída. Por exemplo, conforme mostrado na Figura 4-7, o divisor de MMI 4-707 é configurado para fornecer saídas 4-708 a partir da entrada 4-710. As saídas 4-708 podem se acoplar a guias de onda configuradas para propagar energia de excitação a fileiras de cavidades de amostra. Em algumas modalidades, o divisor de MMI 4-707 pode ter 280 saídas acopladas a guias de onda configuradas para propagar energia de excitação a 280 fileiras de cavidades de amostra. Em algumas modalidades, um divisor de MMI é configurado para receber energia de excitação a partir de múltiplas entradas e direcionar a energia de excitação para múltiplas saídas. Conforme mostrado na Figura 4-7, o divisor de MMI 4-717 é acoplado a múltiplas entradas 4-720 e fornece múltiplas saídas 4-718. Em tais modalidades, o número de saídas 4-718 pode ser maior que o número de entradas 4-720. Em algumas modalidades, as entradas 4-720 podem fornecer diferente energias de excitação para o divisor de MMI 4-717. Em outras modalidades, a divisão de guias de onda pode ocorrer em múltiplas etapas de divisão. Como exemplo, a divisão pode ocorrer com uso de dois conjuntos de divisores de interferência de múltiplos modos, em que uma guia de onda de saída de um primeiro divisor de MMI é usada como uma entrada para um segundo divisor de MMI. Por exemplo, conforme mostrado na Figura 4-7, a guia de onda de entrada 4-730 é dividida pelo divisor de MMI 4-727 em uma pluralidade de saídas, incluindo a saída 4-728 acoplada ao divisor de MMI 4-737 configurada para fornecer saídas 4-738. Em algumas modalidades, o divisor de MMI 4-727 pode fornecer 35 saídas e cada uma dentre as saídas é dividida por outro divisor de MMI, como 4-737, em oito guias de onda de saída. Visto que cada uma dentre as 35 guias de onda intermediárias é dividida em oito guias de onda, 280 guias de onda são formadas nesse exemplo não limitante.

[00288] Em algumas modalidades, múltiplas guias de onda de en-

trada podem se acoplar de modo cruzado a um divisor de MMI para formar guias de onda de saída para acoplar a luz às cavidades de amostra do dispositivo integrado. Em tal dispositivo integrado, pode haver múltiplos acopladores de grade para se acoplarem a múltiplas fontes de excitação. MMI de acoplamento cruzado são incluídos para acoplar as múltiplas fontes de excitação juntas e formar múltiplas guias de onda de saída, conforme mostrado na Figura 4-7. Cada uma dentre as múltiplas guias de onda de entrada pode originar em um dentre os acopladores de grade para acoplar a luz de uma dentre as fontes de excitação ao divisor de MMI. Tal acoplamento cruzado de múltiplas fontes de excitação pode melhorar a robustez do sistema contra a degradação e/ou falha de fonte de excitação. Por exemplo, se uma dentre as múltiplas fontes de excitação interromper a produção de energia de excitação, então, as outras fontes de excitações estão disponíveis para fornecer energia de excitação suficiente para um nível desejado de desempenho do dispositivo integrado. Um mecanismo de compensação também pode ser incluído para compensar uma diminuição em energia de excitação por uma ou mais dentre as múltiplas fontes de excitação aumentando-se a intensidade fornecida pelas fontes de excitação restantes que são funcionais.

[00289] Os conjuntos de procedimentos para dividir e/ou combinar guias de onda podem ser selecionados para uma perda reduzida de energia de excitação quando a guia de onda for dividida e/ou combinada, incluindo perda de inserção. A perda de inserção que o corre devido à divisão e/ou combinação de uma guia de onda pode ser aproximadamente menor que 10 por cento, aproximadamente menor que 20 por cento, ou aproximadamente menor que 30 por cento. Os conjuntos de procedimentos para dividir guias de onda podem permitir uma divisão uniforme aproximada de energia de excitação entre as múltiplas guias de onda de saída para distribuir igualmente a energia

de excitação entre cada guia de onda de saída. Os conjuntos de procedimentos para combinar guias de onda podem permitir uma contribuição relativa aproximadamente uniforme de energia de excitação a partir das múltiplas guias de onda de entrada através das guias de onda de saída. Em algumas modalidades, a uniformidade entre as guias de onda de saída pode ser aproximadamente menor que 10 por cento, aproximadamente menor que 20 por cento, ou aproximadamente menor que 30 por cento. Os conjuntos de procedimentos usados para projetar as guias de onda podem ser selecionados para uma certa tolerância de parâmetros de fabricação, incluindo a altura de corte transversal de guia de onda, largura de corte transversal, e/ou o índice de refração das guias de onda.

[00290] Uma ou mais dimensões de um divisor de MMI influencia o número de guias de onda de saída e/ou a eficácia da divisão e/ou combinação de guia de onda. Projetar um divisor de MMI pode incluir determinar as dimensões de um divisor de MMI para ter um certo número de guias de onda de saída e/ou a certa eficácia de divisão. A Figura 4-8 ilustra uma simulação do perfil de intensidade para luz dentro de um divisor de MMI exemplificativo configurado para receber luz a partir de uma guia de onda de entrada e direcionar a luz em oito guias de onda de saída. Nesse exemplo, a guia de onda de entrada e as guias de onda de saída têm uma largura de corte transversal de 500 nm, e as dimensões do divisor de MMI são 16,35 mícrons em largura, W, e 84,28 mícrons em comprimento, L. Medindo-se a luz transmitida em cada uma dentre as guias de onda de saída, uma uniformidade e/ou eficácia de acoplamento pode ser medida. Para o divisor de MMI exemplificativo mostrado na Figura 4-8, a intensidade das oito guias de onda de saída pode variar em aproximadamente 0,1%.

[00291] Em algumas modalidades, um acoplador de grade pode ser configurado para direcionar a luz de entrada em uma pluralidade de

guias de onda de saída. A Figura 4-9A ilustra um acoplador de grade de fatia que pode ser usado para acoplar a luz que tem um ou mais comprimentos de onda a uma pluralidade de guias de onda de saída 4-904. A grade de fatia é uma estrutura de grade linear que é muito mais ampla que o comprimento de onda da luz (por exemplo, centenas de mícrons). A mesma é formada a partir de camadas alternantes de dielétricos, como nitreto de silício e óxido de silício. Em algumas modalidades, múltiplos comprimentos de onda podem ser acoplados à grade de fatia lançando-se os comprimentos de onda diferentes na grade de fatia, de modo que os mesmos sejam incidentes em ângulos diferentes. Em algumas modalidades, os um ou mais feixes incidentes no acoplador de grade têm um tamanho de ponto 4-603 aproximadamente do tamanho da estrutura de grade em si, conforme ilustrado na Figura 4-9A.

[00292] As Figuras 4-9B e 4-9C ilustra um acoplador de grade de fatia exemplificativo, em que a Figura 4-9C é uma vista ampliada de região 4-906 mostrada na Figura 4-9B e inclui o acoplador de grade de fatia 4-903 e as guias de onda de saída 4-905. Tal configuração fornece tanto o acoplamento quanto a divisão de potência de entrada de comprimentos de onda de excitação diferentes em uma pluralidade de guias de onda de saída. No exemplo mostrado na Figura 4-9B, há 128 guias de onda de saída 4-905. Em modalidades com múltiplos comprimentos de onda de excitação, a região de grade 4-906 tem um passo de grade projetado para fornecer o acoplamento dos múltiplos comprimentos de onda de excitação às guias de onda de saída. Uma guia de onda pode ser potencializada por uma fatia única na região de grade em que a largura da fatia pode variar para compensar a intensidade variável do feixe de energia de excitação no acoplador de grade.

C. CAVIDADE DE AMOSTRA

[00293] De acordo com algumas modalidades, uma cavidade de

amostra 5-210 pode ser formada em um ou mais pixels de um dispositivo integrado. A cavidade de amostra pode compreender um pequeno volume, ou região, formado em uma superfície de um substrato 5-105 e disposta de modo que as amostras 5-101 possam se difundir para dentro e fora da cavidade de amostra a partir de um espécime depositado na superfície do substrato, conforme ilustrado na Figura 5-1 e na Figura 5-2, que ilustram um único pixel 5-100 de um dispositivo integrado. Em várias modalidades, a cavidade de amostra 5-210 pode ser disposta para receber energia de excitação de uma guia de onda 5-240. As amostras 5-101 que se difundem à cavidade de amostra podem ser retidas, de modo temporário ou permanente, dentro de uma região de excitação 5-215 da cavidade de amostra por um aderente 5-211. Na região de excitação, a amostra pode ser excitada por energia de excitação (por exemplo, radiação de excitação 5-247) e, subsequentemente, emitir radiação que pode ser observada e avaliada para distinguir a amostra.

[00294] Em detalhes adicionais de operação, pelo menos uma amostra 5-101 a ser analisada pode ser introduzida na cavidade de amostra 5-210, por exemplo, a partir de um espécime (não mostrado) que contém uma suspensão fluida das amostras. A energia de excitação de uma guia de onda 5-240 pode excitar a amostra ou pelo menos um marcador anexado à amostra ou incluído em uma etiqueta associada à amostra enquanto a mesma está dentro de uma região de excitação 5-215 dentro da cavidade de amostra. De acordo com algumas modalidades, a marcador pode ser uma molécula luminescente (por exemplo, fluoróforo) ou ponto quântico. Em algumas implantações, pode haver mais do que um marcador que é usado para analisar uma amostra (por exemplo, marcadores característicos e etiquetas que são usadas para sequenciamento genético de única molécula conforme descrito em "Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Mo-

lecules", por J. Eid, *et al*., *Science* 323, p. 133 (2009), que é incorporado a título de referência em sua totalidade). Durante e/ou após a excitação, a amostra ou o marcador podem emitir energia de emissão. Quando múltiplos marcadores são usados, os mesmos podem emitir em diferentes energias características e/ou emitir com diferentes características temporais incluindo diferentes tempos de vida. A energia de emissão da cavidade de amostra pode irradiar ou, de outro modo, se deslocar a um sensor 5-260 em que a energia de emissão é detectada e convertida em sinais elétricos que podem ser usadas para distinguir a amostra.

[00295] De acordo com algumas modalidades, a cavidade de amostra 5-210 pode ser uma estrutura parcialmente encerrada, conforme ilustrado na Figura 5-2. Em algumas implantações, uma cavidade de amostra 5-210 compreende um furo ou abertura dimensionada em submícron (distinguido por pelo menos uma dimensão transversal D_{sw}) formada em pelo menos uma camada de material 5-230. Em alguns casos, o furo pode ser denominado como "nanopassagem". A dimensão transversal da cavidade de amostra pode ser entre aproximadamente 20 nanômetros e aproximadamente 1 mícron, de acordo com algumas modalidades, embora o maior e o menor tamanhos possam ser usados em algumas implantações. Um volume da cavidade de amostra 5-210 pode ser entre cerca de 10^{-21} litros e cerca de 10^{-15} litros, em algumas implantações. Uma cavidade de amostra pode ser formada como uma guia de onda que pode ou não suportar um modo de propagação. Uma cavidade de amostra pode ser formada como uma guia de onda que pode ou não suportar um modo de propagação. Em algumas modalidades, a cavidade de amostra pode ser formada como uma guia de onda de modo zero (ZMW) que tem um formato cilíndrico (ou formato similar) com um diâmetro (ou maior dimensão transversal) D_{sw}. Um ZMW pode ser formado em uma única camada

de metal como um furo em nanoescala que não suporta um modo óptico uma propagação através do furo.

[00296] Devido ao fato de que a cavidade de amostra 5-210 tem um pequeno volume, a detecção de eventos de amostra única (por exemplo, eventos de molécula única) em cada pixel pode ser possível mesmo que as amostras possam ser concentradas em um espécime examinado em concentrações que são similares aos constatados em ambientes naturais. Por exemplo, concentrações micromolares da amostra podem estar presentes em um espécime que é colocado em contato com o dispositivo integrado, mas no nível de pixel somente cerca de uma amostra (ou evento de molécula única) pode estar dentro de uma cavidade de amostra em qualquer dado tempo. Estatisticamente, algumas cavidades de amostra podem não conter nenhuma amostra e algumas podem conter mais do que uma amostra. No entanto, um número apreciável de cavidades de amostra pode conter uma única amostra (por exemplo, pelo menos 30% em algumas modalidades), de modo que a análise de molécula única possa ser realizada em paralelo para um grande número de pixels. Devido ao fato de que os eventos de molécula única ou de amostra única podem ser analisados em cada pixel, o dispositivo integrado torna possível detectar eventos raros que podem, de outro modo, seguir despercebidos em médias de ajuntamento.

[00297] Uma dimensão transversal D_{sw} de uma cavidade de amostra pode ser entre cerca de 500 nanômetros (nm) e cerca de um mícron em algumas modalidades, entre cerca de 250 nm e cerca de 500 nm em algumas modalidades, entre cerca de 100 nm e cerca de 250 nm em algumas modalidades, e ainda entre cerca de 20 nm e cerca de 100 nm em algumas modalidades. De acordo com algumas implantações, uma dimensão transversal de uma cavidade de amostra é entre aproximadamente 80 nm e aproximadamente 180 nm, ou entre apro-

ximadamente um quarto e um oitavo do comprimento de onda de excitação ou comprimento de onda de emissão. De acordo com outras implantações, a dimensão transversal de uma cavidade de amostra é entre aproximadamente 120 nm e aproximadamente 170 nm. Em algumas modalidades, a profundidade ou altura da cavidade de amostra 5-210 pode ser entre cerca de 50 nm e cerca de 500 nm. Em algumas implantações, a profundidade ou altura da cavidade de amostra 5-210 pode ser entre cerca de 80 nm e cerca de 250 nm.

[00298] Uma cavidade de amostra 5-210 que tem um subcomprimento de onda, a dimensão transversal pode aprimorar a operação de um pixel 5-100 de um dispositivo integrado de pelo menos duas maneiras. Por exemplo, o incidente de energia de excitação na cavidade de amostra de um lado oposto ao espécime pode se acoplar à região de excitação 5-215 com uma potência exponencialmente decrescente, e não se propagar através da cavidade de amostra ao espécime. Como resultado, a energia de excitação é aumentada na região de excitação em que a mesma excita a amostra de interesse, e é reduzida no espécime em que a mesma excitaria outras amostras que contribuiriam para o ruído de fundo. Além disso, a emissão de uma amostra retida em uma base da cavidade (por exemplo, mais próximo ao sensor 5-260) é preferencialmente direcionada ao sensor, visto que a emissão que se propaga através da cavidade de amostra é altamente suprimida. Ambos esses efeitos podem aprimorar a razão de sinal para ruído no pixel. Os inventores reconheceram diversos aspectos da cavidade de amostra que podem ser melhorados para intensificação adicional de níveis de sinal para ruído no pixel. Esses aspectos se referem ao formato e estrutura da cavidade de amostra, e também para estruturas ópticas e plasmônicas adjacentes (descritas abaixo) que auxiliam no acoplamento de energia de excitação à cavidade de amostra e radiação emitida da cavidade de amostra.

[00299] De acordo com algumas modalidades, uma cavidade de amostra 5-210 pode ser formada como uma nanopassagem configurada para não suportar um modo de propagação para comprimentos de onda de interesse particulares. Em alguns casos, a nanopassagem é configurada onde todos os modos estão abaixo de um comprimento de onda limítrofe e a passagem pode ser uma nanopassagem subcortada (SCN). Por exemplo, a cavidade de amostra 5-210 pode compreender um furo ou buraco em formato cilíndrico em uma camada condutiva. O corte transversal de uma cavidade de amostra não precisa ser redondo, e pode ser elíptico, quadrado, retangular ou poligonal em algumas modalidades. A energia de excitação 5-247 (por exemplo, radiação visível ou quase infravermelha) pode entrar na cavidade de amostra através de uma passagem de entrada 5-212 que pode ser definida por paredes 5-214 da cavidade de amostra em uma primeira extremidade da cavidade, conforme ilustrado na Figura 5-2. Quando formada como uma SCN, a energia de excitação pode decair exponencialmente ao longo de um comprimento da nanopassagem (por exemplo, na direção do espécime). Em algumas implantações, a guia de onda pode compreender uma SCN para radiação emitida da amostra, mas pode não ser uma SCN para energia de excitação. Por exemplo, a passagem e guia de onda formada pela cavidade de amostra pode ser grande o suficiente para suportar um modo de propagação para a energia de excitação, visto que a mesma pode ter um comprimento de onda mais curto do que a radiação emitida. A emissão, em um comprimento de onda maior, pode estar além de um comprimento de onda cortado para um modo de propagação na guia de onda. De acordo com algumas modalidades, a cavidade de amostra 5-210 pode compreender uma SCN para a energia de excitação, de modo que a maior intensidade de energia de excitação seja localizada em uma região de excitação 5-215 da cavidade de amostra em uma entrada à cavidade de amostra

5-210 (por exemplo, localizada próxima à interface entre a camada 5-235 e a camada 5-230 conforme retratado no desenho). Tal localização da energia de excitação pode aprimorar a localização da energia de emissão da amostra, e limitar a emissão observada que foi emitida a partir de uma única amostra (por exemplo, uma única molécula).

[00300] De acordo com algumas modalidades, um pixel 5-100 pode incluir estruturas adicionais. Por exemplo, um pixel 5-100 pode incluir um ou mais estrutura de acoplamento de excitação 5-220 que afeta o acoplamento de energia de excitação a uma amostra dentro da cavidade de amostra. Um pixel também pode incluir uma estrutura de direcionamento de emissão 5-250 que afeta o direcionamento de energia de emissão da amostra dentro da cavidade de amostra ao sensor 5-260.

[00301] Um exemplo de localização de excitação próxima a uma entrada de uma cavidade de amostra que compreende uma SCN é retratado na Figura 5-3. Uma simulação numérica foi realizada para determinar a intensidade de radiação de excitação dentro de uma cavidade de amostra 5-210 formada como uma SCN e próximo à mesma. Os resultados mostraram que a intensidade da radiação de excitação é cerca de 70% da energia incidente em uma passagem de entrada da cavidade de amostra e cai para cerca de 20% da intensidade incidente dentro de cerca de 100 nm na cavidade de amostra. Para essa simulação, o comprimento de onda característico da energia de excitação foi de 633 nm e o diâmetro da cavidade de amostra 5-210 foi de 140 nm. A cavidade de amostra 5-210 foi formada em uma camada de metal de ouro. Cada divisão horizontal no gráfico é de 50 nm. Conforme mostrado pelo gráfico, mais do que uma metade da energia de excitação recebida na cavidade de amostra é localizada em cerca de 50 nm dentro da passagem de entrada 5-212 da cavidade de amostra.

[00302] Para melhorar a intensidade da energia de excitação que é localizada na cavidade de amostra, outras estruturas de cavidade de

amostra foram desenvolvidas e estudadas pelos inventores. A Figura 5-4 ilustra uma modalidade de uma cavidade de amostra que inclui uma cavidade ou concavidade 5-216 em uma extremidade de excitação da cavidade de amostra. Conforme pode ser observado nos resultados de simulação da Figura 5-3, uma região de maior intensidade de excitação existe logo antes da passagem de entrada 5-212 da cavidade de amostra. Adicionar uma concavidade 5-216 à cavidade de amostra permite que a amostra se mova à região de maior intensidade de excitação, de acordo com algumas modalidades. Em algumas implantações, o formato e estrutura da concavidade altera o campo de excitação local (por exemplo, devido a uma diferença no índice refrativo entre a camada 5-235 e o fluido na cavidade de amostra), e pode aumentar assim a intensidade da energia de excitação na concavidade. A concavidade 5-216 pode ser formado dentro da camada 5-235 de modo que uma porção do volume de amostra que ocupa a cavidade de amostra 5-214 e a concavidade 5-216 seja circundada pelo material que forma a camada 5-216.

[00303] A concavidade pode ter qualquer formato adequado. A concavidade pode ter um formato transversal que é substancialmente equivalente a um formato transversal da cavidade de amostra, por exemplo, redondo, elíptico, quadrado, retangular, poligonal, etc. Em algumas modalidades, as paredes laterais da concavidade pode ser substancialmente reta e vertical, como as paredes da cavidade de amostra. Em algumas implantações, as paredes laterais da concavidade podem estar em declive e/ou ser curvadas, conforme retratado no desenho. A dimensão transversal da concavidade pode ser aproximadamente do mesmo tamanho que a dimensão transversal da cavidade de amostra em algumas modalidades, pode ser menor do que a dimensão transversal da cavidade de amostra em algumas modalidades, ou pode ser maior do que a dimensão transversal da cavidade de

amostra em algumas modalidades. A concavidade 5-216 pode se estender entre aproximadamente 10 nm e aproximadamente 200 nm além da camada de cavidade de amostra 5-230. Em algumas implantações, a concavidade pode se estender entre aproximadamente 50 nm e aproximadamente 150 nm além da camada de cavidade de amostra 5-230. Em algumas modalidades, a concavidade pode se estender entre aproximadamente 150 nm e aproximadamente 250 nm além da camada de cavidade de amostra 5-230. Formando-se a concavidade, a região de excitação 5-215 pode se estender fora da cavidade de amostra, conforme ilustrado na Figura 5-4.

[00304] A Figura 5-5 ilustra a melhoria de energia de excitação na região de excitação para uma cavidade de amostra que contém uma concavidade (mostrada na imagem de simulação esquerda). Para comparação, o campo de excitação é também simulado para uma cavidade de amostra sem uma concavidade, mostrado à direita. A magnitude de campo foi convertida de uma renderização de cor nessas plotagens, e a região escura na base da concavidade representa maior intensidade do que a região de luz dentro da cavidade de amostra. As regiões escuras acima da cavidade de amostra representam a menor intensidade. Conforme pode ser observado, a concavidade permite que uma amostra 5-101 se mova para uma região de maior intensidade de excitação, e a concavidade também aumente a localização de região de maior intensidade em uma extremidade de excitação da cavidade de amostra. Observe que a região de alta intensidade é mais distribuída para a cavidade de amostra sem a concavidade. Em algumas modalidades, a concavidade 5-216 fornece um aumento de energia de excitação na região de excitação por um fator de dois ou mais. Em algumas implantações, um aumento de mais do que um fator de dois pode ser obtido dependendo do formato e profundidade da concavidade. Nessas simulações, a camada que contém a cavidade de

amostra inclui alumínio e tem uma espessura de aproximadamente 100nm, a concavidade tem uma profundidade de aproximadamente 50nm, e a energia de comprimento de onda de excitação é 635nm.

[00305] A Figura 5-6A retrata outra modalidade de uma cavidade de amostra 5-210 na qual a cavidade de amostra é formada acima de uma protuberância 5-615 em uma superfície de um substrato. Uma estrutura resultante para a cavidade de amostra pode aumentar a energia de excitação na amostra em mais do que um fator de dois em comparação a uma cavidade de amostra mostrada na Figura 5-1 e, pode condensar a emissão da cavidade de amostra a um sensor 5-260. De acordo com algumas modalidades, uma protuberância 5-615 é padronizada em uma primeira camada 5-610 do material. Em algumas modalidades, a protuberância compreende uma guia de onda. A protuberância pode ser formada como uma crista com um corte transversal retangular em algumas implantações, e uma segunda camada 5-620 do material pode ser depositada sobre a primeira camada da protuberância. Na protuberância, a segunda camada pode formar um formato acima da protuberância que se aproxima de uma porção cilíndrica 5-625, conforme retratado. Em algumas modalidades, uma camada condutiva 5-230 (por exemplo, um metal refletivo) pode ser depositada sobre a segunda camada 5-620 e padronizada para formar uma cavidade de amostra 5-210 na camada condutiva acima da protuberância. Uma concavidade 5-216 pode ser então gravada na segunda camada. A concavidade 5-216 pode se estender entre cerca de 50 nm e cerca de 150 nm abaixo da camada condutiva 5-230. De acordo com algumas modalidades, a primeira camada 5-610 e a segunda camada 5-620 pode ser opticamente transparente, e pode ou não ser formada de um mesmo material. Em algumas implantações, a primeira camada 5-610 pode ser formada de um óxido (por exemplo, SiO_2) ou um nitreto (por exemplo, Si_3N_4), e a segunda camada 5-620 pode ser formada de

um óxido ou um nitreto.

[00306] De acordo com algumas modalidades, a camada condutiva 5-230 acima da protuberância 5-615 é modelada aproximadamente como um refletor cilíndrico 5-630. O formato da porção cilíndrica pode ser controlado pela seleção da altura de protuberância *h*, largura ou dimensão transversal *w* da protuberância, e uma espessura *t* da segunda camada 5-620. O local da região de excitação e a posição de uma amostra pode ser ajustada em relação a um ponto focal óptico do refletor cilíndrico pela seleção da profundidade de concavidade *d*. Pode-se verificar que o refletor cilíndrico 5-630 pode concentrar a energia de excitação na região de excitação 5-215, e também pode coletar a radiação emitida de uma amostra e refletir e concentrar a radiação em direção ao sensor 5-260.

[00307] Algumas modalidades se referem a um dispositivo integrado que tem uma cavidade de amostra com uma concavidade posicionada próxima a uma guia de onda. A Figura 5-6B mostra um dispositivo integrado que tem a cavidade de amostra 5-632 formada na camada 5-630 e na camada 5-636. A camada 5-630 pode ser uma camada de metal e pode incluir um ou mais metais (por exemplo, Al). A camada 5-636 pode atuar como uma camada dielétrica e pode incluir um ou mais materiais dielétricos (por exemplo, dióxido de silício). A cavidade de amostra 5-632 pode ter uma dimensão variável em uma direção paralela à camada 5-630 e/ou à camada 5-636. A cavidade de amostra 5-632 pode ter uma dimensão D2 ao longo da direção z pelo menos dentro da camada 5-630 do dispositivo integrado e, em algumas modalidades, a dimensão D2 pode ser considerada um diâmetro da cavidade de amostra 5-632. A dimensão D2 da cavidade de amostra 5-632 pode ser aproximadamente 700 nm, aproximadamente 800 nm, aproximadamente 900 nm, aproximadamente 1 mícron ou aproximadamente 1,1 mícrons. A cavidade de amostra 5-632 pode ter uma dimensão

D1 ao longo da direção z dentro da camada 5-636 do dispositivo integrado e, em algumas modalidades, pode ser considerada um diâmetro em uma superfície da cavidade de amostra 5-632. A dimensão D1 pode ser aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 200 nm ou aproximadamente 250 nm. A superfície da cavidade de amostra 5-632 que tem a dimensão D1 é posicionada em uma dimensão d1 ao longo da x-direção da guia de onda 5-634. Posicionar a cavidade de amostra 5-632 próxima à guia de onda 5-634 pela distância d1 pode permitir o acoplamento de energia de excitação aprimorado da guia de onda 5-634 à cavidade de amostra 5-632. A dimensão d1 pode ser aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 200 nm ou aproximadamente 250 nm.

[00308] Conforme observado acima, uma cavidade de amostra pode ser formada em qualquer formato adequado, e não é limitada somente a formatos cilíndricos. Em algumas implantações, uma cavidade de amostra pode ser cônica, em formato de tetraedro, pentaedro, etc. A Figura 5-7A à Figura 5-7F ilustram alguns formatos e estruturas de cavidade de amostra exemplificadores que podem ser usados em algumas modalidades. Uma cavidade de amostra 5-210 pode ser formada para ter uma passagem de entrada 5-212 que é maior do que uma passagem de saída 5-218 para a energia de excitação, de acordo com algumas modalidades. As paredes laterais da cavidade de amostra podem ser afuniladas ou curvadas. Formar a cavidade de amostra dessa maneira pode admitir mais energia de excitação para a região de excitação, ainda assim atenuar de modo apreciável a energia de excitação que se desloca ao espécime. Adicionalmente, a emissão irradiada por uma amostra pode irradiar de modo apreciável para a extremidade da cavidade de amostra com a maior passagem, devido à transferência de energia favorável naquela direção.

[00309] Em algumas modalidades, uma concavidade 5-216 pode ter uma dimensão transversal menor do que a base da cavidade de amostra, conforme ilustrado na Figura 5-7B. Uma concavidade menor pode ser formada revestindo-se as paredes laterais da cavidade de amostra com uma camada sacrificial antes de gravar a concavidade, e, subsequentemente, remover a camada sacrificial. Uma concavidade menor pode ser formada para reter a amostra em uma região que é mais equidistante das paredes condutoras da cavidade de amostra. Reter uma amostra equidistante das paredes da cavidade de amostra pode reduzir efeitos indesejáveis da cavidade de paredes de amostra na amostra radiante, por exemplo, extinção de emissão, e/ou alteração de tempos de vida de radiação.

[00310] As Figuras 5-7C e 5-7D retratam outra modalidade de uma cavidade de amostra. De acordo com essa modalidade, uma cavidade de amostra 5-210 pode compreender estruturas de intensificação de energia de excitação 5-711 e um aderente 5-211 formado adjacente às estruturas de intensificação de energia de excitação. As estruturas de intensificação de energia 5-711 podem compreender plasmon de superfície ou estruturas de nano-antena formado em materiais condutores em uma camada opticamente transparente 5-235, de acordo com algumas modalidades. A Figura 5-7C ilustra uma vista em elevação da cavidade de amostra 5-210 e próximo à estrutura, e a Figura 5-7D ilustra uma vista plana. As estruturas de intensificação de energia de excitação 5-711 podem ser modeladas e dispostas para intensificar a energia de excitação em uma pequena região localizada. Por exemplo, as estruturas podem incluir condutores apontados que têm ângulos agudos na cavidade de amostra que aumentam a intensidade da energia de excitação dentro de uma região de excitação 5-215. No exemplo retratado, as estruturas de intensificação de energia de excitação 5-711 estão na forma de uma gravata borboleta. As amostras 5-

101 que se difundem à região podem ser retidas, de modo temporário ou permanente, pelo aderente 5-211 e excitadas pela energia de excitação que podem ser entregues da guia de onda 5-240 localizado adjacente à cavidade de amostra 5-210. De acordo com algumas modalidades, a energia de excitação pode acionar as ondas de plasmon de superfície nas estruturas de intensificação de energia 5-711. As correntes de plasmon de superfície resultantes podem produzir altos campos elétricos nos pontos acentuados das estruturas 5-711, e esses altos campos podem excitar uma amostra retida na região de excitação 5-215. Em algumas modalidades, uma cavidade de amostra 5-210 retratada na Figura 5-7C pode incluir uma concavidade 5-216.

[00311] Outra modalidade de uma cavidade de amostra é retratada na Figura 5-7E, e mostra uma estrutura de intensificação de energia de excitação 5-720 formada ao longo das paredes interiores da cavidade de amostra 5-210. A estrutura de intensificação de energia de excitação 5-720 pode compreender um metal ou condutor, e pode ser formada com o uso de uma deposição angulada (ou sombreada), direcional em que o substrato no qual a cavidade de amostra é formada gira durante a deposição. Durante a deposição, a base da cavidade de amostra 5-210 é obscurecida pelas paredes superiores da cavidade, de modo que o material depositado não se acumule na base. A estrutura resultante 5-720 pode formar um ângulo agudo 5-722 próximo ao fundo da estrutura, e esse ângulo agudo do condutor pode intensificar a energia de excitação dentro da cavidade de amostra.

[00312] Em uma modalidade retratada na Figura 5-7E, o material 5-232 no qual a cavidade de amostra é formada não precisa ser condutor, e pode ser qualquer dielétrico adequado. De acordo com algumas implantações, a cavidade de amostra 5-210 e a estrutura de intensificação de energia de excitação 5-720 pode ser formada em um furo cego gravado em uma camada dielétrica 5-235, e uma camada sepa-

rada 5-232 não precisa ser depositada.

[00313] Em algumas implantações, uma evaporação sombreada pode ser subsequentemente realizada na estrutura mostrada na Figura 5-7E para depositar uma estrutura metálica ou intensificadora de energia condutora, por exemplo, uma estrutura trapezoidal ou cone apontado na base da cavidade de amostra, conforme retratado pela linha pontilhada. A estrutura intensificadora de energia pode intensificar a energia de excitação dentro da cavidade de amostra através de plasmons de superfície. Após a evaporação sombreada, um processo de planarização (por exemplo, uma etapa de polimento químico-mecânico ou um processo de gravação de plasma) pode ser realizada para remover ou gravar o material depositado na parte superior da cavidade de amostra, ao deixar a estrutura intensificadora de energia dentro da cavidade.

[00314] Em algumas modalidades, uma cavidade de amostra 5-210 pode ser formada a partir de mais do que uma única camada de metal. A Figura 5-7F ilustra uma cavidade de amostra formada em uma estrutura de múltiplas camadas, em que diferentes materiais podem ser usados para as diferentes camadas. De acordo com algumas modalidades, uma cavidade de amostra 5-210 pode ser formada em uma primeira camada 5-232 (que pode ser um material semicondutor ou condutor), uma segunda camada 5-234 (que pode ser um isolante ou dielétrico), e a terceira camada 5-230 (que pode ser um condutor ou semicondutor). Em algumas modalidades, um semicondutor enriquecido de modo degenerativo ou grafeno pode ser usado para uma camada da cavidade de amostra. Em algumas implantações, uma cavidade de amostra pode ser formada em duas camadas e, em outras implantações, uma cavidade de amostra pode ser formada em quatro ou mais camadas. Em algumas modalidades, materiais de múltiplas camadas usados para formar uma cavidade de amostra podem ser sele-

cionados para aumentar ou suprimir excitações interfaciais que podem ser geradas por radiação de excitação incidente em uma cavidade de amostra. Em algumas modalidades, os materiais de múltiplas camadas usados para formar uma cavidade de amostra podem ser selecionados para aumentar a geração de plasmon de superfície em uma base da cavidade de amostra ou suprimir a radiação de plasmon de superfície em uma parte superior da cavidade. Em algumas modalidades, materiais de múltiplas camadas usados para formar uma cavidade de amostra podem ser selecionados para suprimir a radiação de excitação de se propagar além da cavidade de amostra e da estrutura de múltiplas camadas ao espécime de volume. Em algumas modalidades, materiais de múltiplas camadas usados para formar uma cavidade de amostra podem ser selecionados para aumentar ou suprimir excitações interfaciais que podem ser geradas por radiação de excitação incidente em uma cavidade de amostra.

[00315] Vários materiais podem ser usados para formar cavidades de amostra descritas nas modalidades precedentes. De acordo com algumas modalidades, uma cavidade de amostra 5-210 pode ser formada de pelo menos uma camada de material 5-230, que pode compreender qualquer um dentre um material condutor, um semicondutor, e um isolante ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, uma cavidade de amostra 5-210 compreende uma camada metálica altamente condutora, por exemplo, ouro, prata, alumínio, cobre. Em algumas modalidades, a camada 5-230 pode compreender uma pilha de múltiplas camadas que inclui qualquer um dentre ouro, prata, alumínio, cobre, titânio, nitreto de titânio, paládio, platina, e cromo ou uma combinação dos mesmos. Em algumas implantações, outros metais podem ser usados adicional ou alternativamente. De acordo com algumas modalidades, uma cavidade de amostra pode compreender um uma liga tal como AlCu ou AlSi.

[00316] Em algumas modalidades, as múltiplas camadas de diferentes metais ou ligas podem ser usadas para formar uma cavidade de amostra. Em algumas implantações, o material no qual uma cavidade de amostra 5-210 é formada pode compreender camadas alternativas de metais e não metais, por exemplo, camadas alternativas de metal e um ou mais óxidos. Em algumas modalidades, o não metal pode incluir um polímero, tal como ácido fosfônico de polivinila ou a polietileno glicol (PEG)-tiol.

[00317] Uma camada 5-230 na qual uma cavidade de amostra é formada pode ser depositada em ou adjacente a pelo menos uma camada opticamente transparente 5-235, de acordo com algumas modalidades, de modo que a energia de excitação (na forma de radiação óptica, tais como radiação visível ou próximo a infravermelho) e a energia de emissão (na forma de radiação óptica, tal como radiação visível ou próximo a infravermelho) pode se deslocar à cavidade de amostra 5-210 e a partir da mesma sem atenuação significativa. Por exemplo, a energia de excitação de uma guia de onda 5-240 pode atravessar a pelo menos uma camada opticamente transparente 5-235 à região de excitação 5-215, e emissão da amostra pode atravessar a mesma camada ou camadas ao sensor 5-260. Essa energia de excitação pode ser a partir do rastro evanescente de luz de excitação guiada pela guia de onda.

[00318] Em algumas modalidades, pelo menos uma superfície da cavidade de amostra 5-210 pode ser revestida com uma ou mais camadas 5-211, 5-280 de material que afetam a ação de uma amostra dentro da cavidade de amostra, conforme ilustrado na Figura 5-8. Por exemplo, uma camada dielétrica fina 5-280 (por exemplo, alumina, nitreto de titânio ou sílica) pode ser depositada como um revestimento passivante em paredes laterais da cavidade de amostra. Tal revestimento pode ser implantado para reduzir a adesão de amostra de uma

amostra fora da região de excitação 5-215, ou para reduzir a interação entre a amostra e o material 5-230 no qual a cavidade de amostra 5-210 é formada. A espessura de um revestimento passivante dentro da cavidade de amostra pode ser entre cerca de 5 nm e cerca de 50 nm, de acordo com algumas modalidades.

[00319] Em algumas implantações, um material para uma camada de revestimento 5-280 pode ser selecionado com base em uma afinidade de um agente químico para o material, de modo que a camada 5-280 possa ser tratada com uma substância química e biológica para inibir mais a adesão de uma espécie de amostra à camada. Por exemplo, uma camada de revestimento 5-280 pode compreender alumina, que pode ser passivada com uma camada de passivação de polifosfonato, de acordo com algumas modalidades. Revestimentos adicionais ou alternativos e agentes de passivação podem ser usados em algumas modalidades.

[00320] De acordo com algumas modalidades, pelo menos uma superfície de fundo da cavidade de amostra 5-210 e/ou concavidade 5-216 podem ser tratadas com um aderente químico ou biológico 5-211 (por exemplo, biotina) para promover retenção de uma amostra. A amostra pode ser retida de modo permanente ou temporário, por exemplo, por pelo menos um período de tempo entre cerca de 0,5 milissegundos e cerca de 50 milissegundos. Em outra modalidade, o aderente pode promover a retenção temporária de uma amostra 5-101 por períodos maiores. Qualquer aderente adequado pode ser usado em várias modalidades, e não é limitado à biotina.

[00321] De acordo com algumas modalidades, a camada de material 5-235 adjacente à cavidade de amostra pode ser selecionada com base em uma afinidade de um aderente para o material dessa camada. Em algumas modalidades, a passividade das paredes laterais da cavidade de amostra pode inibir o revestimento de um aderente nas

paredes laterais, de modo que o aderente 5-211 se deposite preferencialmente na base da cavidade de amostra. Em algumas modalidades, um revestimento de aderente pode se estender as paredes laterais da porção da cavidade de amostra. Em algumas implantações, um aderente pode ser depositado por um processo de deposição física anisotrópica (por exemplo, evaporação, dispersão), de modo que o aderente se acumule na base de uma cavidade de amostra ou concavidade e não forme de modo apreciável em paredes laterais da cavidade de amostra.

[00322] Vários conjuntos de procedimentos de fabricação podem ser empregados para fabricar cavidades de amostra 5-210 para um dispositivo integrado. Alguns processos exemplificadores são descritos abaixo, mas a invenção não é limitada somente a esses exemplos.

[00323] A cavidade de amostra 5-210 pode ser formada por qualquer processo de micro ou nanofabricação adequado, que pode incluir, porém, sem limitação, processar etapas associadas a fotolitografia, fotolitografia de ultravioleta profunda, fotolitografia de imersão, fotolitografia de contato óptico de campo próximo, litografia de EUV, litografia de raio X, litografia de nanoimpressão, litografia interferométrica, litografia tipo step e flash , litografia de feixe de elétron de gravação direta, litografia de feixe de íon, fresagem de feixe de íon, processamento de desprendimento, gravação de íon negativo, etc. De acordo com algumas modalidades, uma cavidade de amostra 5-210 pode ser formada com o uso de fotolitografia e processamento de desprendimento. As etapas de fabricação exemplificadoras associadas a processamento de desprendimento de uma cavidade de amostra são retratadas na Figura 5-9A-F. Embora a fabricação de somente uma única cavidade de amostra ou estrutura em um pixel seja tipicamente retratada nos desenhos, será entendido que um grande número de cavidades de amostra ou estruturas pode ser fabricado em um substrato (por exem-

plo, em cada pixel) em paralelo.

[00324] De acordo com algumas modalidades, uma camada 5-235 (por exemplo, uma camada de óxido) em um substrato pode ser coberta com uma camada de revestimento antirreflexo (ARC) 5-910 e fotorresistente 5-920, conforme ilustrado na Figura 5-9A. O fotorresistente pode ser exposto e padronizado com o uso de fotolitografia e desenvolvimento da resistência. A resistência pode ser desenvolvida para remover porções expostas ou porções não expostas (dependendo do tipo de resistência), deixando um pilar 5-922 que tem um diâmetro aproximadamente igual a um diâmetro desejado para a cavidade de amostra, D_{sw}, conforme ilustrado na Figura 5-9B. A altura do pilar pode ser substancialmente diferente do que uma profundidade desejada da cavidade de amostra. Por exemplo, a altura do pilar pode ser substancialmente maior do que uma profundidade desejada da cavidade de amostra.

[00325] O padrão do pilar 5-922 pode ser transferido para a camada de ARC 5-910 através de gravação de íon anisotrópica reativa (RIE), por exemplo, conforme mostrado na Figura 5-9C. A região pode ser então revestida com pelo menos um material 5-230, por exemplo, um condutor ou metal, que é desejado para formar a cavidade de amostra. Uma porção do material depositado, ou materiais, forma uma capa 5-232 sobre o pilar 5-922, conforme ilustrado na Figura 5-9D. O fotorresistente 5-920 e a camada de ARC 5-910 pode ser então esvaziada do substrato, com o uso de um processo de remoção seletivo (por exemplo, com o uso de um banho químico com ou sem agitação que dissolve pelo menos a resistência e libera ou "desprende" a capa). Se a camada de ARC 5-910 permanecer, a mesma pode ser esvaziada do substrato com o uso de uma gravação seletiva, deixando a cavidade de amostra 5-210 conforme mostrado na Figura 5-9E. De acordo com algumas modalidades, as paredes laterais 5-214 da cavidade de

amostra podem estar em declive devido à natureza da deposição do pelo menos um material 5-230.

[00326] Conforme usado no presente documento, uma "gravação seletiva" significa um processo de gravação no qual um agente de gravação seletivamente grava um material que é desejado para ser removido ou gravado em uma taxa maior (por exemplo, pelo menos duas vezes a taxa) do que o agente de gravação grava outros materiais que não são destinados a serem removidos.

[00327] Devido ao fato de que o fotorresistente 5-920 e a camada de ARC 5-910 são tipicamente baseados em polímero, os mesmos são considerados materiais leves que podem não ser adequados para formar cavidades de amostra que tem altas razões de aspecto (por exemplo, razões de aspecto maiores do que cerca de 2:1 em relação à altura para largura). Para cavidades de amostra que têm maiores razões de aspecto, um material rígido pode ser incluído no processo de desprendimento. Por exemplo, antes de depositar a camada de ARC e o fotorresistente, a camada de um material rígido (por exemplo, um material inorgânico) pode ser depositado. Em algumas modalidades, a camada de titânio ou nitreto de silício pode ser depositada. A camada de material rígido deve exibir gravação preferencial sobre o material, ou materiais, 5-230 nos quais a cavidade de amostra é formada. Depois que o fotorresistente é padronizado, um padrão do pilar pode ser transferido na camada de ARC e o material rígido subjacente 5-930 que rende uma estrutura conforme ilustrado na Figura 5-9F. O fotorresistente e a camada de ARC pode ser então esvaziado, o material (ou materiais) 5-230 depositado, e uma etapa de desprendimento realizada para formar a cavidade de amostra.

[00328] De acordo com algumas modalidades, um processo de desprendimento pode ser usado para formar uma cavidade de amostra que compreende estruturas de intensificação de energia 5-711, con-

forme ilustrado na Figura 5-7C e a Figura 5-7D.

[00329] Um processo alternativo para formar uma cavidade de amostra é retratado na Figura 5-10A-D. Nesse processo, a cavidade de amostra pode ser diretamente gravada em pelo menos um material 5-230. Por exemplo, pelo menos um material 5-230 no qual uma cavidade de amostra deve ser formada pode ser depositada em um substrato. A camada pode ser coberta por uma camada de ARC 5-910 e um fotorresistente 5-920, conforme ilustrado na Figura 5-10A. O fotorresistente pode ser padronizado para formar um furo que tem um diâmetro aproximadamente igual a um diâmetro desejado da cavidade de amostra, conforme ilustrado na Figura 5-10B. O padrão do furo pode ser transferido ao ARC e através da camada 5-230 com o uso de uma gravação de íon anisotrópica reativa, conforme mostrado na Figura 5-10C, por exemplo. O fotorresistente e camada de ARC podem ser esvaziados, rendendo uma cavidade de amostra conforme ilustrado na Figura 5-10D. De acordo com algumas modalidades, as paredes laterais de uma cavidade de amostra formada gravando-se a camada de material 5-230 pode ser mais vertical do que as paredes laterais resultantes do processo de desprendimento.

[00330] Em algumas modalidades, o fotorresistente e a camada de ARC podem ser usados para padronizar uma máscara rígida (por exemplo, um nitreto de silício ou camada de óxido, não mostrado) sobre o material 5-230. O furo padronizado pode ser então transferido à máscara rígida, que é então usada para transferir o padrão para a camada de material 5-230. Uma máscara rígida pode permitir maiores profundidades de gravação na camada de material 5-230, de modo a formar cavidades de amostra de maior razão de aspecto.

[00331] Será verificado que os processos de desprendimento e os conjuntos de procedimentos de fabricação de gravação direta descritos acima podem ser usados para formar a cavidade de amostra

quando múltiplas camadas de diferentes materiais são usadas para formar uma pilha de material 5-230 na qual a cavidade de amostra é formada. Uma pilha exemplificadora é mostrada na Figura 5-11. De acordo com algumas modalidades, uma pilha de material pode ser usada para formar a cavidade de amostra para melhorar acoplamento de energia de excitação à região de excitação de uma cavidade de amostra, ou para a reduzir transmissão ou nova radiação de energia de excitação ao espécime de volume. Por exemplo, uma camada absorvente 5-942 pode ser depositada sobre uma primeira camada 5-940. A primeira camada pode compreender um metal ou liga de metal, e a camada absorvente pode compreender um material que inibe plasmons de superfície, por exemplo, silício amorfo, TaN, TiN ou Cr. Em algumas implantações, uma camada de superfície 5-944 também pode ser depositada para passivar a superfície que circunda a cavidade de amostra (por exemplo, inibir a adesão de moléculas).

[00332] A formação de uma cavidade de amostra incluindo uma concavidade 5-216 pode ser feita de qualquer maneira adequada. Em algumas modalidades, uma concavidade pode ser formada gravando-se mais em uma camada adjacente 5-235, e/ou qualquer camada ou camadas de intervenção, adjacente à cavidade de amostra. Por exemplo, depois de formar uma cavidade de amostra em uma camada de material 5-230, essa camada 5-230 pode ser usada como uma máscara de gravação para padronizar uma concavidade, conforme ilustrado na Figura 5-12. Por exemplo, o substrato pode ser submetido a uma gravação de íon reativo anisotrópico seletivo de modo que uma concavidade 5-216 possa ser gravada na camada adjacente 5-235. Por exemplo, em uma modalidade em que o material 5-230 é metálico e a camada adjacente 5-235 de óxido de silício, uma gravação de plasma de íon reativo que tem um gás de alimentação que compreende CHF_3 ou CF_4 pode ser usado para remover preferencialmente óxido de silício

exposto abaixo da cavidade de amostra e formar a concavidade 5-216. Conforme usado no presente documento, "óxido de silício" se refere, em geral, a SiO_x e pode incluir dióxido de silício, por exemplo.

[00333] Em algumas modalidades, as condições dentro do plasma (por exemplo, desvio ao substrato e pressão) durante uma gravação podem ser controladas para determinar o perfil de gravação da concavidade. Por exemplo, em baixa pressão (por exemplo, menos do que cerca de 100 mTorr) e desvio de alta CC (por exemplo, maior do que cerca de 20V), a gravação pode ser altamente anisotrópica e formar paredes laterais substancialmente retas e verticais da concavidade, conforme retratado no desenho. Em pressões maiores e desvios menores, a gravação pode ser mais isotrópica rendendo paredes laterais afuniladas e/ou curvadas da concavidade. Em algumas implantações, uma gravação a úmido pode ser usada para formar a concavidade, que pode ser substancialmente isotrópica e formar uma concavidade aproximadamente esférica que pode se estender lateralmente sob o material 5-230, até ou além das paredes laterais da cavidade de amostra.

[00334] A Figura 5-13A à Figura 5-13C retratam etapas de processo que podem ser usadas para formar uma concavidade 5-216 que tem uma dimensão transversal menor do que a cavidade de amostra 5-210 (por exemplo, uma concavidade como a retratada na Figura 5-7B). Em algumas implantações, depois de formar uma cavidade de amostra, uma camada sacrificial conformal 5-960 pode ser depositada sobre a região que inclui a cavidade de amostra. De acordo com algumas modalidades, a camada sacrificial 5-960 pode ser depositada por um processo de deposição de vapor, por exemplo, deposição de vapor químico (CVD), CVD intensificada por plasma, ou deposição de camada atômica (ALD). A camada sacrificial pode ser então gravada de volta com o uso de uma primeira gravação anisotrópica que é seletiva à camada sacrificial 5-960, remove a camada das superfícies horizon-

tais, deixa revestimentos de parede lateral 5-962 em paredes da cavidade de amostra, conforme ilustrado na Figura 5-13B. A gravação posterior pode ser seletiva e parar no material 5-230 e a camada adjacente 5-235 em algumas modalidades, ou pode ser uma gravação temporizada não seletiva em algumas modalidades.

[00335] Uma segunda gravação anisotrópica que é seletiva à camada adjacente 5-235 pode ser executada para gravar uma concavidade 5-216 na camada adjacente conforme ilustrado na Figura 5-13C. Os revestimentos sacrificiais de parede lateral 5-962 podem ser então opcionalmente removidos por uma gravação seletiva a úmido ou a seco. A remoção dos revestimentos de parede lateral abre a cavidade de amostra para ter uma dimensão transversal maior do que a concavidade 5-216.

[00336] De acordo com algumas modalidades, a camada sacrificial 5-960 pode compreender o mesmo material que a camada adjacente 5-235. Em tais modalidades, a segunda gravação pode remover pelo menos uma parte do revestimento de parede lateral 5-962 à medida que a concavidade é gravada na camada adjacente 5-235. Essa gravação posterior do revestimento de parede lateral pode formar paredes laterais afuniladas da concavidade em algumas modalidades.

[00337] Em algumas implantações, a camada sacrificial 5-960 pode ser formada de um material, ou incluir uma camada do mesmo, que é usado para passivar as paredes laterais da cavidade de amostra (por exemplo, reduzir a adesão de amostras nas paredes laterais da cavidade de amostra). Pelo menos uma parte da camada 5-960 pode ser então deixada nas paredes da cavidade de amostra após a formação da concavidade.

[00338] De acordo com algumas modalidades, a formação dos revestimentos de parede lateral 5-962 ocorre após a formação da concavidade. Em tais modalidades, a camada 5-960 reveste as paredes

laterais da concavidade. Tal processo pode ser usado para passivar as paredes laterais da concavidade e localizar a amostra dentro de uma região central da concavidade.

[00339] As etapas de processo associadas à deposição de um aderente 5-211 em uma base de uma cavidade de amostra 5-210 e uma camada de passivação 5-280 são retratadas na Figura 5 e 14. De acordo com algumas modalidades, uma cavidade de amostra pode incluir uma primeira camada de passivação 5-280 nas paredes da cavidade de amostra. A primeira camada de passivação pode ser formada, por exemplo, conforme descrito acima em conexão com a Figura 5-13B ou a Figura 5-8. Em algumas modalidades, a primeira camada de passivação 5-280 pode ser formada por qualquer processo de deposição adequado e gravação posterior. Em algumas modalidades, uma primeira camada de passivação pode ser formada oxidando-se o material 5-230 no qual a cavidade de amostra é formada. Por exemplo, a cavidade de amostra pode ser formada de alumínio, que pode ser oxidada para criar um revestimento de alumina nas paredes laterais da cavidade de amostra.

[00340] Um aderente 5-980 ou um precursor de aderente (por exemplo, um material que se cola preferencialmente a um aderente) pode ser depositado no substrato com o uso de um processo de deposição física anisotrópica, por exemplo, uma deposição evaporativa, conforme ilustrado na Figura 5-14A. O aderente ou precursor de aderente pode formar uma camada de aderente 5-211 na base da cavidade de amostra, conforme ilustrado na Figura 5-14B, e pode revestir uma superfície superior do material 5-230 no qual a cavidade de amostra é formada. Uma deposição direcional angulada subsequente retratada na Figura 5-14C (algumas vezes denominada como uma deposição sombreada ou processo de evaporação sombreada) pode ser usada para depositar uma segunda camada de passivação 5-280 de

material de passivação 5-990 sobre uma superfície superior do material 5-230 sem cobrir a camada de aderente 5-211. Durante o processo de deposição sombreado, o substrato pode ser girado em torno de um eixo geométrico normal ao substrato, de modo que a segunda camada de passivação 5-280 se deposite de modo mais uniforme ao redor de um aro superior da cavidade de amostra. Uma estrutura resultante é retratada na Figura 5-14D, de acordo com algumas realizações. Como uma alternativa à deposição da segunda camada de passivação, uma gravação de planarização (por exemplo, uma etapa de CMP) pode ser usada para remover o aderente de uma superfície superior do material 5-230.

[00341] De acordo com algumas implantações, uma camada de aderente 5-211 pode ser depositada de modo centralizado na base de uma cavidade de amostra afunilada, conforme ilustrado na Figura 5-15. Por exemplo, um aderente, ou precursor de aderente, pode ser depositado de modo direcional, conforme ilustrado na Figura 5-14A, em uma cavidade de amostra afunilada, formada conforme descrito acima. As paredes da cavidade de amostra podem ser passivadas por um processo de oxidação antes ou após a deposição da camada de aderente 5-211. O aderente ou precursor que permanecem em uma superfície do material 5-230 podem ser passivados conforme descrito em conexão com a Figura 5-14D. Em algumas modalidades, um aderente em uma superfície superior do material 5-230 pode ser removido por uma etapa de polimento químico-mecânico. Formando-se uma camada de aderente, ou uma camada de aderente precursora, de modo centralizado na base de uma cavidade de amostra, efeitos deletérios na emissão de uma amostra (por exemplo, supressão ou extinção de radiação de amostra das paredes de amostra, distribuição de radiação desfavorável da amostra devido ao fato de que a mesma não é localizada de modo centralizado em relação às estruturas de acopla-

mento de energia formadas ao redor de uma cavidade de amostra, efeitos adversos no tempo de vida luminescente para uma amostra) podem ser reduzidos.

[00342] Em algumas modalidades, o padrão de desprendimento, gravação, e processos de deposição usados para formar a cavidade de amostra e a concavidade podem ser compatíveis com os processos de CMOS que são usados para formar circuitos de CMOS integrados em um dispositivo integrado. Consequentemente, um dispositivo integrado pode ser fabricado com o uso de instalações de CMOS convencionais e conjuntos de procedimentos de fabricação, embora instalações de fabricação personalizada ou personalizada podem ser usados em algumas implantações.

[00343] Variações das etapas de processo descritas acima podem ser usadas para formar modalidades alternativas de cavidades de amostra. Por exemplo, uma cavidade de amostra afunilada tal como conforme ilustrado na Figura 5-7A ou na Figura 5-7B pode ser formada com o uso de um processo de deposição angulada retratado na Figura 5-14C. Para a cavidade de amostra da Figura 5-7B, o ângulo de deposição pode ser mudado durante o processo de deposição. Para tais modalidades, uma cavidade de amostra que tem paredes laterais substancialmente retas e verticais pode ser primeiro formada, e então material adicional 5-230 depositado por uma deposição angulada para afunilar as paredes laterais da cavidade de amostra.

[00344] Em algumas modalidades, uma cavidade de amostra pode ser formada de uma pilha de múltiplas camadas que compreende uma pluralidade de camadas. A Figura 5-16 ilustra uma cavidade de amostra com uma concavidade que é formada na camada de substrato 5-105. A cavidade de amostra nessa modalidade tem aproximadamente 140 a 180 nm de diâmetro com uma profundidade de concavidade de aproximadamente 40-90 nm. O substrato 5-105 pode ser formado de

qualquer material adequado, tal como óxido de silício. Uma primeira camada 5-1001 pode ser formada na superfície do substrato 5-105. Essa primeira camada 5-1001 pode ser formada de qualquer metal adequado, tal como alumínio e pode ter, por exemplo, aproximadamente 60 nm de espessura. Uma segunda camada 5-1003 pode ser formada na primeira camada 5-1001. Essa segunda camada 5-1003 pode ser formada de qualquer metal adequado tal como titânio e pode ter, por exemplo, 10 nm de espessura. Uma terceira camada 5-1005 pode ser formada na segunda camada 5-1003. Essa terceira camada 5-1005 pode ser formada de qualquer cerâmica adequada tal como nitreto de titânio e pode ter, por exemplo, 30 nm de espessura. Uma quarta camada 5-1007 pode ser formada na parte superior da terceira camada 5-1005 e também revestir a parede vertical da cavidade de amostra. Essa quarta camada 5-1007 pode ser formada de qualquer material adequado, tal como óxido de alumínio e pode ter aproximadamente 5 nm de espessura.

[00345] A cavidade de amostra da Figura 5-16 pode ser formada aproximadamente 350 nm acima de uma guia de onda 5-240 configurada para conduzir energia de excitação na forma de pulsos de luz à cavidade de amostra. A guia de onda pode ter, por exemplo, 250nm a 700 nm de largura. Em algumas modalidades, a guia de onda tem aproximadamente 500 nm de largura.

[00346] A cavidade de amostra pode ser formada de qualquer modo adequado. Por exemplo, as primeiras três camadas (5-1001, 5-1003, e 5-1005) pode ser formada no substrato 5-105 conforme descrito acima. Adicionalmente, uma camada fina (aproximadamente 5 nm) de óxido de alumínio pode ser depositada sobre as primeiras três camadas. Então, a cavidade de amostra e a concavidade podem ser quimicamente gravadas nas camadas. Uma segunda camada de óxido de alumínio pode ser depositada para revestir de modo conformado as

bordas da cavidade de amostra, incluindo o fundo da concavidade. A segunda camada de óxido de alumínio pode ser depositada por deposição da camada atômica, de acordo com algumas modalidades. Então, a segunda camada de óxido de alumínio pode ser gravada de modo anisotrópico do fundo da concavidade para expor o substrato de óxido de silício.

D. ACOPLAMENTO DA ENERGIA DE EXCITAÇÃO À CAVIDADE DE AMOSTRA

[00347] O acoplamento de energia de excitação a uma ou mais cavidades de amostra do dispositivo integrado pode ocorrer através de um ou mais conjuntos de procedimentos. Conforme anteriormente discutido, em algumas modalidades, uma guia de onda é posicionada para acoplar uma fonte de excitação a uma ou mais cavidades de amostra. À medida que a energia de excitação se propaga ao longo da guia de onda, uma porção da energia de excitação pode ser acoplada uma ou mais cavidades de amostra através de uma variedade de conjuntos de procedimentos de acoplamento de luz. Por exemplo, a guia de onda pode guiar energia de excitação substancialmente em uma direção, e uma onda de evanescente ou rastro podem se formar perpendiculares a essa uma direção e, em alguns casos, ser localizados fora da estrutura de guia de onda. Tal um rastro evanescente pode direcionar uma porção de energia de excitação em direção a uma ou mais cavidades de amostra. Em algumas modalidades, a camada de cavidade de amostra pode ser projetada e configurada para direcionar a energia de excitação a uma região localizada dentro da cavidade de amostra. A cavidade de amostra pode ser configurada para reter uma amostra dentro da região localizada da cavidade de amostra de modo que a energia de excitação seja direcionada à amostra.

[00348] As Figuras 6-1A e 6-1B são vistas em corte transversal de um dispositivo integrado e fornecem uma ilustração exemplificativa de

uso de uma guia de onda para acoplar a energia de excitação à cavidade de amostra. A Figura 6-1A é um esquema em corte transversal que mostra uma guia de onda 6-104 posicionada em proximidade a uma cavidade de amostra 6-108 em uma camada de cavidade de amostra 6-116. A energia de excitação se propaga ao longo da guia de onda em uma direção perpendicular ao campo de vista da Figura 6-1A. A proximidade de uma cavidade de amostra à guia de onda pode permitir que a energia de excitação se acople à cavidade de amostra. A Figura 6-1B ilustra uma vista mais aproximada da região da cavidade de amostra 6-108 e da camada de cavidade de amostra 6-116 e mostra a energia de excitação localizada dentro da cavidade de amostra 6-108.

[00349] Adicionalmente, um ou mais componentes podem ser formados em um dispositivo integrado para melhorar ou intensificar o acoplamento de energia de excitação à cavidade de amostra. Esses componentes adicionais podem ser formados por um pixel e fornecer acoplamento de energia de excitação de uma guia de onda ao pixel e em direção à cavidade de amostra. Um ou mais componentes localizados em um pixel pode atuar para tampar uma porção da energia de excitação de uma guia de onda ao pixel. Tais componentes podem incluir estruturas ópticas tais como, estruturas de grade, estruturas de dispersão, microcavidades e/ou nano antenas. Recursos ou configurações de um ou mais desses componentes podem ser selecionados para acoplar uma determinada quantidade de energia de excitação a cada cavidade de amostra dentro de uma fileira ou coluna de cavidades de amostra. Uma guia de onda configurada para fornecer energia de excitação a uma fileira de pixels pode se acoplar a um componente em cada região de pixel para fornecer uma porção da energia de excitação a cada pixel na fileira de pixels. Quando uma guia de onda é configurada para direcionar energia de excitação de uma fonte de exci-

tação a um ou mais pixels, a guia de onda pode ser denominada como uma guia de onda de barramento.

[00350] Os componentes posicionados adjacentes à cavidade de amostra podem melhorar o acoplamento de energia de excitação da guia de onda à cavidade de amostra. Tais componentes podem ser chamados derivações e/ou microcavidades. Uma microcavidade pode defletir uma porção da energia de excitação da guia de onda de modo que a energia de excitação alcance a cavidade de amostra. Uma ou mais microcavidades podem ser usadas para acoplar energia de excitação a uma cavidade de amostra. A uma ou mais microcavidades podem reduzir a perda de energia de excitação da guia de onda, incluindo perda metálica. Uma ou mais microcavidades podem atuar como uma lente para focar energia de excitação à cavidade de amostra. Em algumas modalidades, uma ou mais microcavidades podem melhorar o direcionamento de luminescência de um marcador na cavidade de amostra em direção ao sensor. As microcavidades podem ter uma configuração cilíndrica, convexa, côncava, retangular, esférica, ou elíptica ou qualquer outro formato adequado. Uma microcavidade pode ser formada a partir de qualquer material adequado. Em algumas modalidades, uma microcavidade pode incluir nitreto de silício.

[00351] Uma ou mais microcavidades podem se sobrepor com pelo menos uma porção de uma guia de onda para direcionar a energia de excitação à cavidade de amostra quando vista da parte superior do dispositivo integrado em que as cavidades de amostra estão presentes. A espessura de uma guia de onda pode ser configurada para reduzir a perda de energia de excitação e melhorar o acoplamento de energia de excitação a uma ou mais microcavidades. Em algumas modalidades, as microcavidades ao longo de uma fileira de cavidades de amostra pode variar em resistência de acoplamento entre a guia de onda a cada cavidade de amostra. As microcavidades podem aumen-

tar o acoplamento ao longo da direção de propagação da energia de excitação a fim de acomodar uma potência reduzida na guia de onda à medida que a energia de excitação é direcionada fora da guia de onda à cada cavidade de amostra. Em algumas modalidades, uma ou mais microcavidades são adjacentes à cavidade de amostra. Pode haver uma distância de deslocamento entre o local do centro de uma cavidade de amostra e o centro de uma microcavidade. Em outras modalidades, uma microcavidade é localizada abaixo de uma cavidade de amostra de modo que pelo menos a porção da cavidade de amostra e a porção da microcavidade se sobreponha quando vista da parte superior do dispositivo integrado em que as cavidades de amostra estão presentes.

[00352] A Figura 6-2A ilustra uma vista plana de uma região de pixel exemplificativa que tem guia de onda 6-204 posicionada próxima à cavidade de amostra 6-208 de modo que a guia de onda 6-204 e a cavidade de amostra 6-208 não se sobreponham. Conforme mostrado na Figura 6-2A, a microcavidade 6-218b tem um diâmetro de corte transversal menor do que a microcavidade 6-218a. As microcavidades 6-218a e 6-218b são posicionadas em relação à guia de onda 6-204 e à cavidade de amostra 6-208 para acoplar a energia de excitação da guia de onda 6-204 à cavidade de amostra 6-208. Em conjunto, as microcavidades 6-218a e 6-218b defletem uma porção de energia de excitação dentro da guia de onda à cavidade de amostra. Uma porção da microcavidade 6-218b é posicionada para se sobrepor à guia de onda 6-204. A microcavidade 6-218b é posicionada próxima à microcavidade 6-218b para fornecer acoplamento suficiente entre as duas microcavidades. A microcavidade 6-218a é posicionada mais próxima à cavidade de amostra 6-208 do que a microcavidade 6-218b. Em tal configuração, as microcavidades 6-218a e 6-218b podem atuar como uma derivação para acoplar uma porção de energia de excitação da guia de

onda 6-204 à cavidade de amostra 6-208. A Figura 6-2B ilustra uma vista em elevação a partir da perspectiva ao longo da linha A-A' mostrada na Figura 6-2A. As microcavidades 6-218a e 6-218b são posicionadas adjacentes à camada 6-216 que forma a cavidade de amostra 6-208. A camada 6-216 pode incluir um metal (por exemplo, alumínio). Nessa modalidade exemplificativa, as microcavidades 6-218a e 6-218b têm formatos cilíndricos em que uma extremidade do cilindro é posicionada em ou pelo menos próxima à superfície de camada 6-218. A distância entre a guia de onda 6-204 e uma borda da microcavidade 6-218a e/ou da microcavidade 6-218b pode permitir que uma quantidade desejada de energia de excitação se acople à cavidade de amostra 6-218. A Figura 6-2C ilustra uma vista em elevação da perspectiva ao longo da linha B-B' mostrada na Figura 6-2A. A microcavidade 6-218b é posicionada para se sobrepor à guia de onda 6-204, enquanto a microcavidade 6-218a é posicionada para não se sobrepor à guia de onda 6-204.

[00353] As Figuras 6-3A-3D ilustram vistas planas de configurações exemplificativas adicionais de uma ou mais microcavidades em relação a uma cavidade de amostra e à guia de onda em um dispositivo integrado. A uma ou mais microcavidades pode se sobrepor a uma porção da guia de onda. Em alguns casos, uma microcavidade é localizada abaixo da cavidade de amostra. A Figura 6-3A mostra a microcavidade 6-306 em sobreposição à cavidade de amostra 6-308 em relação à guia de onda 6-304. A Figura 6-3B mostra a cavidade 6-316b em sobreposição à cavidade de amostra 6-318 em relação à guia de onda 6-314. Em outras modalidades, uma microcavidade é localizada em uma distância deslocada da cavidade de amostra de modo que a microcavidade e a cavidade de amostra não se sobreponham. A Figura 6-3B mostra a microcavidade 6-318a posicionada da cavidade de amostra 6-318 de modo que não haja região de sobreposição entre a

microcavidade 6-316a e a cavidade de amostra 6-318. De modo similar, a Figura 6-3C mostra a microcavidade 6-326 posicionada da cavidade de amostra 6-328 em relação à guia de onda 6-324 de modo que não haja região de sobreposição entre a microcavidade 6-316a e a cavidade de amostra 6-318. Em algumas modalidades, múltiplas microcavidades podem ser posicionadas deslocadas de uma cavidade de amostra. A Figura 6-3D mostra microcavidades 6-336a e 6-336b posicionadas da cavidade de amostra 6-338 em relação à guia de onda 6-334 de modo que não haja região de sobreposição entre a cavidade de amostra 6-338 e tanto 6-336a como 6-336b. O projeto de microcavidade, a posição em relação à cavidade de amostra, e/ou a posição em relação à guia de onda pode ser determinada com base na redução da perda de acoplamento geral e melhoria da eficiência de acoplamento entre a guia de onda e a cavidade de amostra.

[00354] A Figura 6-4 mostra uma vista em corte transversal da microcavidade 6-418 posicionada para acoplar a energia de excitação da guia de onda 6-404 à cavidade de amostra 6-408 na camada 6-416. Um ou mais dimensões de microcavidade 6-418 e/ou da guia de onda 6-404 podem fornecer uma quantidade desejada de acoplamento. Uma guia de onda de um dispositivo integrado, tal como guia de onda 6-404, tem altura de corte transversal, t, que pode ser aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 160 nm, aproximadamente 170 nm ou aproximadamente 200 nm. A microcavidade 6-418 tem uma dimensão de corte transversal D, tal como diâmetro se a microcavidade tiver um formato cilíndrico. A dimensão de corte transversal, D, pode ser aproximadamente 550 nm, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 650 nm, aproximadamente 700 nm, aproximadamente 750 nm ou aproximadamente 800 nm. A microcavidade 6-418 tem altura de corte transversal, h, que pode ser aproximadamente 450 nm, aproximadamente 500 nm,

aproximadamente 550 nm ou aproximadamente 600 nm. A posição da microcavidade 6-418 em relação à guia de onda 6-408 e cavidade de amostra 6-408 pode permitir o acoplamento de energia de excitação da guia de onda 6-408 à cavidade de amostra 6-408. Uma distância entre a microcavidade 6-418 e a guia de onda 6-408 que é perpendicular à propagação de luz na guia de onda 6-408, mostrada como x na Figura 6-4, pode ser aproximadamente 300 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 400 nm, aproximadamente 450 nm ou aproximadamente 500 nm. Uma distância da microcavidade 6-418 deslocada da cavidade de amostra 6-408, mostrada como d na Figura 6-4, pode ser aproximadamente 500 nm, aproximadamente 550 nm, aproximadamente 600 nm, aproximadamente 650 nm ou aproximadamente 700 nm. A camada 6-416 que inclui a cavidade de amostra 6-408 pode ter uma altura de corte transversal, y, de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm ou aproximadamente 150 nm. A cavidade de amostra 6-408 pode ter uma dimensão de corte transversal, tal como um diâmetro, de aproximadamente 75 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 125 nm, aproximadamente 150 nm ou aproximadamente 175 nm.

[00355] Em uma modalidade exemplificativa, a guia de onda 6-404 tem uma largura em corte transversal de 667 nm e uma altura em corte transversal de 100 nm. A microcavidade 6-418 tem uma dimensão h de 591 nm, um diâmetro em corte transversal de 750 nm, e é posicionada de modo que a distância x da guia de onda 6-404 seja 398 nm e a distância d da cavidade de amostra 6-408 seja 693 nm. Tal configuração de pixel pode ter uma perda de acoplamento total de 0,28%, que se implantada em um dispositivo integrado que tem 256 pixels, pode ter uma perda de transmissão de aproximadamente 51% e uma perda metálica de aproximadamente 11%.

[00356] Em uma outra modalidade exemplificativa, a guia de onda

6-404 tem uma largura em corte transversal de 639 nm e uma altura em corte transversal de 100 nm. A microcavidade 6-418 tem um formato elipsoide com uma dimensão de corte transversal de 600 nm, uma outra dimensão de corte transversal de 639 nm, uma dimensão h de 512 nm. Tal configuração de pixel pode ter uma perda de acoplamento total de aproximadamente 0,77%, que se implantada em um dispositivo integrado que tem 64 pixels, pode ter uma perda de transmissão de aproximadamente 30% e uma perda de metal de aproximadamente 35%.

[00357] A Figura 6-5 ilustra os resultados de simulação de propagação de luz em uma configuração que tem duas microcavidades 6-536a e 6-536b em relação à cavidade de amostra 6-538 e à guia de onda 6-534. Conforme mostrado nas Figuras 6 a 5, as regiões escuras correspondem a intensidade de luz mais alta que se estende da guia de onda 6-534 para a cavidade de amostra 6-538 e é sustentada pelas microcavidades 6-536a e 6-536b.

[00358] Em uma outra modalidade exemplificativa, a guia de onda tem uma largura em corte transversal de 700 nm e uma altura em corte transversal de 100 nm. Uma microcavidade é cilíndrica com um diâmetro de 600 nm e tem dimensão h de 650 nm. A microcavidade é posicionada em proximidade à guia de onda e à cavidade de amostra de modo que haja um acoplamento de 0,148%, uma perda metálica de 0,09856%, uma perda de retorno de 0,1225%, e uma perda de radiação de 0,1270%. As Figuras 6-6A a 6-6C ilustram simulações de propagação de luz através de tal modalidade. A Figura 6-6A ilustra uma vista em corte transversal de cavidade de amostra 6-638, a microcavidade 6-636, e guia de onda 6-634. A guia de onda 6-634 sustenta um modo de luz que se propaga ao longo da guia de onda 6-634, e a microcavidade 6-636 é posicionada para atuar como uma derivação para acoplar alguma energia de excitação no interior da cavidade de amos-

tra 6-638. Na Figura 6-6A, as regiões mais escuras indicam áreas que têm intensidade de luz mais alta. A Figura 6-6B ilustra uma vista plana da microcavidade 6-636 e cavidade de amostra 6-638, em que luz é direcionada pela microcavidade 6-636 na direção da cavidade de amostra 6-638. A Figura 6-6C ilustra uma vista em corte transversal que mostra a luz da guia de onda 6-634 que se acopla à cavidade de amostra 6-638.

[00359] A Figura 6-6D ilustra uma vista plana de simulações para uma outra configuração exemplificativa que tem guia de onda 6-654, a microcavidade 6-656, e cavidade de amostra 6-658. Nessa configuração, a cavidade de amostra 6-658 sobrepõe a microcavidade 6-656, e microcavidade 6-658 e guia de onda 6-654 se sobrepõem. A Figura 6-6D mostra a propagação de luz, em que as regiões escuras indicam intensidade maior, para a cavidade de amostra 6-658 sustentada pela microcavidade 6-656.

[00360] Algumas modalidades se referem a uma microcavidade posicionada entre uma camada de cavidade de amostra e uma guia de onda de modo que a microcavidade seja deslocada de uma superfície da camada de cavidade de amostra. A microcavidade pode ser deslocada de uma superfície da camada de cavidade de amostra em uma direção perpendicular à propagação de luz ao longo da guia de onda. Em algumas modalidades, a microcavidade também pode ser deslocada de um local de uma cavidade de amostra de modo que a cavidade de amostra e microcavidade estejam se sobrepondo. A microcavidade pode ser dimensionada e conformada para fornecer uma quantidade desejada de acoplamento de energia de excitação da guia de onda para a cavidade de amostra. Em algumas modalidades, as microcavidade podem ter uma dimensão mais longa ao longo de uma direção paralela a uma direção de propagação de luz através da guia de onda do que em uma dimensão perpendicular à propagação de luz

através da guia de onda.

[00361] A Figura 6-7A mostra uma vista em corte transversal de um dispositivo integrado que tem microcavidade 6-718 posicionada próximo a cavidade de amostra 6-708 e guia de onda 6-704. A cavidade de amostra 6-708 é formada na camada de cavidade de amostra 6-716. A microcavidade tem dimensão D, que é paralela à direção de luz que se propaga através da guia de onda 6-704 e dimensão h, que é perpendicular à direção de luz que se propaga através da guia de onda 6-704. Em algumas modalidades, a dimensão D da microcavidade 6-718 é maior do que a dimensão h da microcavidade 6-718. A microcavidade 6-718 pode ter uma dimensão h de aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, ou aproximadamente 200 nm. A microcavidade 6-718 pode ter uma dimensão D de aproximadamente 500 nm, aproximadamente, 750 nm, ou aproximadamente 1000 nm. A microcavidade 6-718 é posicionada em uma distância ao longo da direção y de uma superfície da guia de onda 6-704 que tem dimensão x1 e uma distância ao longo da direção y de uma superfície de camada de cavidade de amostra 6-716 que tem dimensão x2. Em algumas modalidades, a dimensão x2 é menor do que a dimensão x1. A microcavidade 6-718 pode ser deslocada da camada de cavidade de amostra 6-716 de modo que x2 seja aproximadamente 200 nm, aproximadamente 300 nm, ou aproximadamente 400 nm, em algumas modalidades.

[00362] Em algumas modalidades, a microcavidade 6-718 é deslocada da cavidade de amostra 6-708 por uma distância ao longo de uma direção paralela a uma direção de propagação de luz através da guia de onda 6-704. A microcavidade 6-718 pode ser deslocada da cavidade de amostra 6-708 por uma distância de centro a centro, d. Em algumas modalidades, a microcavidade 6-718 é deslocada da cavidade de amostra 6-708 de modo que a microcavidade 6-718 e a cavidade de amostra 6-708 não estejam se sobrepondo. Em algumas

modalidades, a microcavidade 6-718 pode ser posicionada de modo que uma borda da microcavidade 6-718 próximo da cavidade de amostra 6-708 seja deslocada da cavidade de amostra 6-708 por uma distância. Uma distância deslocada entre uma borda da microcavidade 6-718 e cavidade de amostra 6-708 pode ser aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, ou aproximadamente 200 nm.

[00363] A Figura 6-7B mostra uma vista em corte transversal de intensidade de luz à medida que a energia de excitação se propaga através da guia de onda 6-704 e se acople à cavidade de amostra 6-708 na camada de cavidade de amostra 6-716 através da microcavidade 6-718, similar à configuração mostrada na Figura 6-7A. A energia de excitação percorre ao longo da direção z através da guia de onda 6-704. Conforme mostrado na Figura 6-7B, uma porção de energia de excitação (mostrada como linhas pretas) alcança a cavidade de amostra 6-708 pelo acoplamento à microcavidade 6-718. Visto que a energia de excitação continua a se propagar ao longo da guia de onda 6-704, a microcavidade 6-718 atua como uma derivação pela direção de uma porção da energia de excitação na direção contrária da guia de onda 6-704 e na direção da cavidade de amostra 6-708.

[00364] A Figura 6-7C mostra uma vista plana da microcavidade 6-718 posicionada próximo da cavidade de amostra 6-708. A energia de excitação (mostrada como regiões escuras) se propaga através da microcavidade e é direcionada para dentro da cavidade de amostra 6-708. Conforme mostrado na Figura 6-7C, a microcavidade 6-718 pode ter um formato retangular com bordas curvadas que atuam para direcionar luz na direção da cavidade de amostra 6-708. Uma borda da microcavidade 6-718 pode ter um raio de curvatura para permitir um nível desejado de acoplamento de energia de excitação para a cavidade de amostra 6-708. Uma primeira borda da microcavidade 6-718

próximo da cavidade de amostra 6-708 pode ter um raio menor de curvatura do que uma segunda borda da microcavidade 6-718 oposta à primeira borda.

[00365] Algumas modalidades se referem a uma microcavidade posicionada entre uma cavidade de amostra e uma guia de onda de modo que a microcavidade se sobreponha à cavidade de amostra e seja uma distância deslocada da cavidade de amostra. A microcavidade e cavidade de amostra podem se sobrepor em uma direção perpendicular a uma direção de propagação de luz ao longo da guia de onda. A microcavidade pode atuar para melhorar o acoplamento de energia de excitação na cavidade de amostra. Em algumas modalidades, a microcavidade pode ser alinhada à cavidade de amostra com um alinhamento de centro a centro substancial entre a microcavidade e cavidade de amostra. Em algumas modalidades, a microcavidade pode ser posicionada mais próximo da guia de onda do que da cavidade de amostra. Em algumas modalidades, a microcavidade pode ser posicionada em uma superfície da guia de onda.

[00366] A Figura 6-7D mostra uma vista em corte transversal de um dispositivo integrado que tem cavidade de amostra 6-728, guia de onda 6-734, e microcavidade 6-738 posicionada entre a cavidade de amostra 6-728 e a guia de onda 6-734. A cavidade de amostra 6-728 é formada na camada de cavidade de amostra 6-738 e pode se estender além da camada de cavidade de amostra 6-738 para incluir uma concavidade na camada 6-732 do dispositivo integrado. A camada 6-732 pode ter dimensão h ao longo da direção x conforme mostrado na Figura 6-7D. A microcavidade 6-738 pode ser posicionada dentro da camada 6-732 de modo que haja uma porção de camada 6-732 entre microcavidade 6-738 e cavidade de amostra 6-728 e uma porção de camada 6-732 entre microcavidade 6-738 e guia de onda 6-734. Conforme mostrado na Figura 6-7D, a microcavidade 6-738 é posicionada

em uma distância ao longo da direção y da cavidade de amostra 6-728 que tem dimensão d1. A microcavidade 6-738 é posicionada em uma distância ao longo da direção y da guia de onda 6-734 que tem dimensão d2. Em algumas modalidades, a dimensão d2 é menor do que d1. Em algumas modalidades, a microcavidade 6-738 é posicionada em uma superfície de cavidade de amostra 6-728 e dentro da camada 6-732 de modo que dimensão d1 seja igual a zero.

[00367] Uma ou mais dimensões de uma guia de onda de um dispositivo integrado podem variar ao longo do comprimento da guia de onda na direção de propagação de luz através da guia de onda. A variação de uma ou mais dimensões ao longo da guia de onda pode aprimorar a eficiência de acoplamento e uniformidade substancial na quantidade de energia de excitação fornecida pela guia de onda para uma pluralidade de cavidades de amostra. Em algumas modalidades, a largura em corte transversal de uma guia de onda pode variar ao longo de uma fileira ou coluna de pixels. A guia de onda pode incluir um afunilamento de modo que a largura em corte transversal da guia de onda diminua ao longo da direção de propagação de energia de excitação através da guia de onda. A Figura 6-8A mostra uma vista plana da guia de onda 6-804 em um dispositivo integrado. A fonte de excitação 6-802 se acopla à guia de onda 6-804 com o uso de um ou mais conjuntos de procedimentos descritos no presente documento (por exemplo, acopladores de grade, acopladores em estrela, divisores de MMI). A guia de onda 6-804 é afunilada de modo que uma dimensão da guia de onda 6-804 ao longo da direção x mostrada na Figura 6-8A diminua ao longo de uma dimensão da guia de onda 6-804 ao longo da direção z ou uma direção propagação de luz através da guia de onda 6-804. Dessa maneira, a guia de onda 6-804 tem uma largura em corte transversal maior (ao longo da direção x) próximo da fonte de excitação incidente 6-802 do que em um local adicionalmente ao longo

do comprimento (ao longo da direção z) da guia de onda 6-804. O posicionamento da guia de onda 6-804 para se acoplar às cavidades de amostra em uma fileira de pixels pode fornecer uma configuração suficiente para o acoplamento de uma quantidade desejada de energia de excitação em cada cavidade de amostra. Visto que uma porção de energia de excitação é acoplada fora da guia de onda 6-804 para cada cavidade de amostra, a quantidade de energia de excitação propagada pela guia de onda 6-804 reduz ao longo da direção z. Ao longo da guia de onda 6-804, a quantidade de potência reduz à medida que a energia de excitação é acoplada fora das cavidades de amostra. Através da redução da largura em corte transversal da guia de onda 6-804 pode-se propagar uma energia de excitação mais ao longo da guia de onda 6-804 do que em uma guia de onda sem tal afunilamento.

[00368] A Figura 6-8B mostra uma vista em corte transversal da guia de onda 6-804 mostrada na Figura 8A. Uma dimensão da guia de onda 6-804 ao longo da direção y permanece substancialmente similar de modo que uma distância ao longo da direção y entre as cavidades de amostra 6-808 e a guia de onda 6-804 seja substancialmente constante ao longo do comprimento da guia de onda 6-804. As linhas curvas pontilhadas ilustram a dispersão de energia de excitação à medida que a mesma se propaga ao longo da guia de onda 6-804 na direção z. À medida que a largura em corte transversal da guia de onda 6-808 se estreita, a dispersão de energia de excitação se torna mais ampla e pode compensar para potência reduzida. Dessa maneira, a largura em corte transversal da guia de onda 6-802 pode equilibrar a redução na potência de energia de excitação propagada pela guia de onda 6-802 de modo que uma quantidade suficiente de energia de excitação seja entregue para cada cavidade de amostra em uma fileira de pixels para um desempenho desejado de um dispositivo integrado.

[00369] Em algumas modalidades, um guia de onda afunilada pode

ser configurado para uma eficiência similar de acoplamento para uma fileira de pixels em que os pixels na fileira incluem uma microcavidade e uma cavidade de amostra. Uma combinação de variação de uma ou mais dimensões da guia de onda afunilada e/ou a microcavidade pode acomodar a redução na potência de energia de excitação ao longo do comprimento de uma guia de onda visto que a energia de excitação é acoplada a cada cavidade de amostra na fileira.

[00370] Em algumas modalidades, um ou mais sensores podem ser posicionados em relação a uma guia de onda para medir a energia de excitação que se propaga ao longo da guia de onda. As estruturas adicionais (por exemplo, grades) podem ser posicionadas para atenuar a saída de pelo menos uma porção de energia de excitação para um sensor. Conforme mostrado na Figura 6-8B, os sensores de monitoramento 6-812a e 6-812b são posicionados próximo das extremidades da guia de onda. As grades 6-810a e 6-810b são posicionadas em um lado da guia de onda 6-808 oposta aos sensores 6-812a e 6-812b. As grades 6-810a e 6-810b podem ser configuradas para direcionar a energia de excitação na guia de onda 6-808 na direção dos sensores 6-812a e 6-812b, respectivamente. A combinação da grade 6-810a e do sensor 6-812a pode monitorar a entrada de energia de excitação na guia de onda 6-804. A combinação de grade 6-810b e sensor 6-812b pode monitorar a energia de excitação, se existir, energia de excitação em uma extremidade da guia de onda 6-804 que permanece após o acoplamento energia de excitação a uma fileira de cavidades de amostra 6-808. Dessa maneira, os sensores 6-812a e 6-812b podem monitorar a potência na guia de onda 6-804 em uma extremidade de entrada, e extremidade de saída, e/ou qualquer local adequado ao longo da guia de onda 6-808. Os sensores 6-812a e 6-812b podem detectar informações incluindo um nível de potência em um local ao longo da guia de onda 6-808. Essas informações podem ser usadas para controlar os aspectos de

componentes que atuam para alinhar uma fonte de excitação para o dispositivo integrado e/ou uma potência da fonte de excitação.

[00371] Em algumas modalidades, uma guia de onda pode se acoplar a uma cavidade de amostra por um campo evanescente. Em algumas modalidades, uma estrutura de grade do tipo alvo que tem anéis de grades concêntricas posicionados próximo de uma cavidade de amostra pode aprimorar o acoplamento de energia de excitação da guia de onda à cavidade de amostra. Em algumas modalidades, a guia de onda pode incluir uma região que tem uma largura reduzida em corte transversal na proximidade de uma cavidade de amostra de modo que um campo evanescente da energia de excitação que se propaga na guia de onda se acople à cavidade de amostra. Para uma fileira de pixels, uma guia de onda pode incluir múltiplas regiões que têm uma largura reduzida em corte transversal ao longo do comprimento da guia de onda para aprimorar a uniformidade de acoplamento e eficiência entre as cavidades de amostra na fileira. Dessa maneira, a guia de onda pode ser considerada para ter seções comprimidas em certas localizações ao longo da guia de onda.

[00372] A camada de um dispositivo integrado que tem uma ou mais cavidades de amostra pode interferir na propagação de luz através de uma guia de onda. Em algumas modalidades, a camada de cavidade de amostra é formada de um metal (por exemplo, alumínio). Pode ser desejável posicionar a camada de cavidade de amostra em uma certa distância da guia de onda para reduzir perda e aprimorar o desempenho do dispositivo. Esses conjuntos de procedimentos podem permitir um desempenho desejado alcançado pelo posicionamento da camada de cavidade de amostra a uma certa distância da guia de onda enquanto permitem que uma cavidade de amostra na camada receba uma quantidade suficiente de energia de excitação.

[00373] A Figura 6-9A mostra uma vista plana da guia de onda 6-

904 em relação a uma estrutura de grade do tipo alvo 6-910. A estrutura de grade do tipo alvo 6-910 compreende uma pluralidade de grades circulares concêntricas centralizadas em uma cavidade de amostra. A guia de onda 6-904 inclui uma região comprimida em que a largura em corte transversal da guia de onda 6-904 é menor em um local próximo do centro de estrutura de grade do tipo alvo 6-910. A região comprimida da guia de onda 6-904 pode ser formada pelo afunilamento de uma certa distância ao longo da guia de onda 6-904. O comprimento da guia de onda 6-904 que é afunilado pode ser uma quantidade adequada para reduzir a perda de energia de excitação e/ou aprimorar a eficiência de acoplamento. Uma guia de onda pode incluir múltiplas regiões comprimidas, em que cada região comprimida é associada a uma cavidade de amostra. As múltiplas regiões comprimidas podem ter uma ou mais dimensões que variam ao longo do comprimento da guia de onda para fornecer potência adequadamente uniforme e eficiência de acoplamento a cada uma das cavidades de amostra. A Figura 6-9B mostra uma vista em corte transversal da guia de onda 6-904 configurada para acoplar energia de excitação à cavidade de amostra 6-908. A grade do tipo alvo 6-910 é substancialmente centralizada na cavidade de amostra 6-908 e configurada para acoplar a energia de excitação da guia de onda 6-904 à cavidade de amostra 6-908. A largura em corte transversal da guia de onda 6-904 tem uma região comprimida próximo da cavidade de amostra 6-908 de modo que a dispersão do campo de energia de excitação alargue à medida que a largura em corte transversal se estreita. A linha pontilhada indica a extensão a qual o campo de energia de excitação se estende perpendicularmente a partir da guia de onda 6-904 na direção y. Em um local ao longo da guia de onda 6-904 que se sobrepõe a cavidade de amostra 6-908, o campo de energia de excitação é, em um certo local, para permitir o acoplamento da energia de excitação à cavidade de amostra 6-908.

[00374] Uma ou mais dimensões do afunilamento em uma região comprimida e/ou um formato do afunilamento na região comprimida de uma guia de onda podem fornecer um nível desejado de eficiência de acoplamento. A Figura 6-10 ilustra uma plotagem de perda total para diferentes perfis de afunilamento como uma função de comprimento através da qual o perfil de afunilamento ocorre ou de comprimento de afunilamento para indicar uma quantidade de perda provocada pelo processo de afunilamento. Conforme mostrado pela Figura 10, que tem um afunilamento mais gradual da região comprimida pode aprimorar a eficiência de acoplamento pela redução da perda de acoplamento total. O afunilamento da largura em corte transversal de 0,5 mícrons a 0,3 mícrons para configurações conformadas em s ou lineares tem perda total menor do que se a largura em corte transversal for afunilada de 0,5 mícrons a 0,2 mícrons. Adicionalmente, o aumento do comprimento no qual a largura em corte transversal é reduzida pode aprimorar a perda de acoplamento total. Em algumas modalidades, uma guia de onda pode incluir uma região comprimida em que uma largura em corte transversal da guia de onda varia de aproximadamente 0,3 mícrons a aproximadamente 0,5 mícrons em um comprimento ao longo da guia de onda de aproximadamente 20 mícrons, aproximadamente 40 mícrons, aproximadamente 50 mícrons, aproximadamente 60 mícrons, aproximadamente 80 mícrons, ou aproximadamente 100 mícrons.

[00375] Em algumas modalidades, uma guia de onda pode se acoplar a uma cavidade de amostra pela diminuição de uma distância entre a cavidade de amostra e a guia de onda dentro de uma região da cavidade de amostra. Tal configuração pode permitir que as porções da guia de onda sejam posicionadas em uma certa distância de uma camada de cavidade de amostra para fornecer uma eficiência desejada e perda de energia de excitação. A Figura 6-11A mostra uma vista em corte transversal da guia de onda 6-1104 posicionada em relação à

camada 6-1102 que tem cavidade de amostra 6-1108. A grade do tipo alvo é formada adjacente à camada 6-1102 e substancialmente centralizada na cavidade de amostra 6-1108. Em tais modalidades, a guia de onda tem uma espessura em corte transversal substancialmente uniforme e o campo de energia de excitação que se estende da guia de onda 6-1104 é aproximadamente uniforme ao longo do comprimento da guia de onda 6-1104. Pela formação de camada 6-1102 de modo que a cavidade de amostra 6-1108 e a guia de onda 6-1104 tenham uma certa distância ao longo da direção y, a energia de excitação pode se acoplar à cavidade de amostra 6-1108. A grade do tipo alvo 6-1110 pode atuar para acoplar adicionalmente a energia de excitação da guia de onda 6-1104 à cavidade de amostra 6-1108. Outras regiões ao longo da guia de onda 6-1104 separadas da cavidade de amostra 6-1108 podem ter camada 6-1102 em uma distância maior ao longo da direção y do que em uma proximidade próximo da cavidade de amostra 6-1108. Tal configuração pode ser considerada uma configuração de imersão de cavidade de amostra e, em algumas modalidades, fornece uma eficiência de acoplamento de aproximadamente 0,3%.

[00376] Algumas modalidades relacionadas à formação de uma ou mais camadas de material em uma guia de onda para aprimorar o acoplamento de energia de excitação da guia de onda para uma cavidade de amostra. A Figura 6-11B mostra uma vista em corte transversal de cavidade de amostra 6-1112 formada a partir da camada de cavidade de amostra 6-1116. Conforme mostrado na Figura 6-11B, a camada de cavidade de amostra 6-1116 inclui uma região que tem uma abertura de camada de cavidade de amostra 6-1116 que forma a cavidade de amostra 6-1112. A região de camada de cavidade de amostra 6-1116 é deslocada pela dimensão h de uma superfície do dispositivo integrado. A dimensão h pode ser maior do que aproximadamente 200 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 300

nm, aproximadamente 350 nm, ou aproximadamente 400 nm. A região de deslocamento de camada de cavidade de amostra 6-1116 pode ser formada pela gravação de uma porção de camada 6-1120 e formação da camada de cavidade de amostra 6-116 na camada 6-1120. A região de camada de cavidade de amostra 6-1116 que inclui a cavidade de amostra 6-1112 é posicionada em uma distância d1 da guia de onda 6-1118 ao longo da direção y. A distância d1 pode ser aproximadamente 250 nm, aproximadamente 300 nm, aproximadamente 350 nm, aproximadamente 400 nm, ou aproximadamente 450nm. A camada 6-1114 é formada adjacente à guia de onda 6-1118. A camada 1114 pode ter um índice refrativo maior do que a camada 6-1120 e um índice refrativo menor do que a guia de onda 6-1118. Em algumas modalidades, a camada 6-1114 inclui uma pluralidade de camadas que têm diferentes materiais. Em uma modalidade exemplificativa, a guia de onda 6-1118 inclui nitreto de silício e camada 6-1114 inclui óxido de alumínio e/ou óxido de titânio. A camada 6-1114 é posicionada em uma distância d2 da camada de cavidade de amostra 6-1116. A distância d2 pode ser aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 150 nm, aproximadamente 200 nm, ou aproximadamente 250 nm. A Figura 6-11C mostra uma vista em corte transversal ao longo da linha A-A’ mostrada na Figura 6-11B. Conforme mostrado na Figura 6-11C, a guia de onda 6-1118 pode ter uma dimensão lateral transversal ao longo da direção x que se sobrepõe com a região de deslocamento de camada de cavidade de amostra 6-1116 que inclui cavidade de amostra 6-1112. A camada 6-1114 pode ser formada na guia de onda 6-1118 de modo que a camada 6-1114 entre em contato com uma pluralidade de lados da guia de onda 6-111C.

[00377] Adicional ou alternativamente, o espaçamento entre pixels em uma fileira ao longo de uma guia de onda pode ser selecionado para reduzir a perda de guia de onda. Cada pixel pode incluir uma ca-

vidade de amostra, um ou mais sensores, e/ou uma grade do tipo alvo. O espaçamento entre fileiras de pixels pode ser selecionado para acomodar outros componentes de dispositivo integrado, tais como conjunto de circuitos. A Figura 6-12 mostra uma vista plana de um dispositivo integrado que tem pixels 6-1208 dispostos em uma matriz retangular com guias de onda 6-1204 configuradas para entregar a energia de excitação para uma fileira de pixels 6-1208. A Figura 6-12 mostra uma configuração da matriz de pixel em que o espaçamento entre pixels em uma fileira, x, é menor do que o espaçamento entre fileiras, y. Pelo posicionamento dos pixels em uma fileira a uma certa distância, a perda de guia de onda ao longo da guia de onda pode ser reduzida. Ter um maior espaçamento entre fileiras pode reduzir a interferência de uma fileira de pixels em uma outra fileira e/ou fornecer espaçamento adequado para acomodar os componentes adicionais no dispositivo, incluindo os componentes de conjunto de circuitos.

[00378] Toda a matriz de pixels de um dispositivo integrado pode ter qualquer número adequado de pixels e qualquer disposição adequada de pixels. Em algumas modalidades, uma matriz de pixels pode ter uma configuração quadrada e/ou retangular. Em algumas modalidades, a matriz de pixels pode ser retangular e ter um comprimento paralelo às guias de onda que é maior do que o comprimento perpendicular às guias de onda. Em outras modalidades, pode haver mais guias de onda e/ou fileiras de pixels, e o comprimento de cada fileira de pixels paralelos às guias de onda pode ser menor do que o comprimento perpendicular à guia de onda.

[00379] Algumas modalidades se referem a um dispositivo integrado com uma guia de onda que tem uma dimensão variável em uma direção perpendicular à propagação de luz através da guia de onda e perpendicular à uma superfície do dispositivo integrado com uma ou mais cavidades de amostra. Em algumas modalidades, a dimensão da

guia de onda pode variar para ser maior em uma região próximo de uma cavidade de amostra, mas sem se sobrepor à cavidade de amostra. Em algumas modalidades, a dimensão da guia de onda pode diminuir em uma região da guia de onda que se sobrepõe com a cavidade de amostra. Um dispositivo integrado pode incluir uma guia de onda configurada para se acoplar a uma fileira de cavidades de amostra, em que a variação na dimensão da guia de onda permite que uma quantidade substancialmente similar de energia de excitação se acople à cada cavidade de amostra.

[00380] A Figura 6-13 mostra uma vista em corte transversal de um dispositivo integrado que tem cavidade de amostra 6-1308 formada na camada de cavidade de amostra 6-1316. A guia de onda 6-1304 inclui a região 6-1310 que tem uma dimensão x1 ao longo da direção y x1 que é maior do que uma porção da guia de onda 6-1304 que se sobrepõe à cavidade de amostra 6-1308 que tem dimensão x2 ao longo da direção y. Conforme mostrado na Figura 6-13, a região 6-1310 é deslocada da cavidade de amostra 6-1308 e de uma crista na guia de onda 6-1304. A região 6-1310 pode ser dimensionada e conformada para fornecer uma quantidade desejada de energia de excitação da guia de onda 6-1304 para a cavidade de amostra 6-1308. A Figura 6-14 mostra uma vista em corte transversal de um dispositivo integrado que tem cavidade de amostra 6-1408 formada na camada de cavidade de amostra 6-1416. A guia de onda 6-1404 inclui a região 6-1410 que se sobrepõe à cavidade de amostra 6-1408. A guia de onda na região 6-1410 tem uma dimensão x2 ao longo da direção y que é menor do que as porções da guia de onda fora da região 6-1410, que tem uma dimensão x1 ao longo da direção y. Nessa configuração, a guia de onda 6-1404 inclui uma dimensão menor dentro da região 6-1410 que se sobrepõe à cavidade de amostra 6-1408.

[00381] Embora as Figuras 6-13 e 6-14 mostrem uma única cavida-

de de amostra, as guias de onda 6-1304 e 6-1404 podem ser configuradas para se acoplarem a uma fileira de cavidades de amostra e ter uma região similar às regiões 6-1310 e 6-1404 posicionadas próximo de cada cavidade de amostra. Em algumas modalidades, as regiões posicionadas próximo da pluralidade de cavidades de amostra na fileira podem variar de tamanho e/ou formato de modo que uma quantidade substancialmente similar de energia de excitação se acople a cada cavidade de amostra. Dessa maneira, as regiões de a guia de onda podem ser configuradas para se acomodarem para energia de excitação diminuída que se propaga ao longo da guia de onda ao longo de uma fileira de cavidades de amostra.

E. DIRECIONAMENTO DE ENERGIA DE EMISSÃO PARA SENSOR

[00382] Um dispositivo integrado pode incluir um ou mais componentes posicionados entre uma cavidade de amostra e um sensor de um pixel para aprimorar a coleta de luminescência pelo sensor de uma amostra na cavidade de amostra. Tais componentes podem aprimorar a relação sinal-ruído do sinal de luminescência para um sinal antecedente para fornecer detecção aprimorada de um marcador luminescente. Alguns componentes podem direcionar a luminescência de uma cavidade de amostra para um sensor correspondente em um pixel. Em algumas modalidades, um componente pode fornecer tanto acoplamento de energia de excitação adequado a uma cavidade de amostra quanto acoplamento de luminescência fora da cavidade de amostra. Outros componentes (por exemplo, filtros) podem reduzir a energia de excitação e outra luz não associada à amostra e/ou ao marcador em relação à contribuição para um sinal adquirido pelo sensor.

[00383] Uma grade do tipo alvo pode ser formada a partir dos anéis de grades concêntricos em torno de uma cavidade de amostra. Uma grade do tipo alvo pode se acoplar a uma cavidade de amostra para aprimorar a propagação de luminescência fora da cavidade de amos-

tra. A estrutura de grade do tipo alvo pode direcionar luminescência na direção de um sensor em um pixel que tem a cavidade de amostra. Em algumas modalidades, um diâmetro eficaz da luminescência direcionada por uma grade do tipo alvo é de aproximadamente 5 mícrons.

[00384] A Figura 7-1A mostra uma vista plana da estrutura do tipo alvo 7-110 configurada para direcionar a luminescência a partir da cavidade de amostra 7-108. A estrutura do tipo alvo 7-110 inclui uma pluralidade de grades concêntricas. As grades concêntricas podem se alinhar substancialmente com o centro da cavidade de amostra 7-108. A guia de onda 7-104 pode ser posicionada para se sobrepor a pelo menos uma porção de do tipo alvo estrutura 7-110 e cavidade de amostra 7-108. A guia de onda 7-104 inclui uma região afunilada, que pode permitir que a luminescência passe para um sensor posicionado dentro do pixel que tem cavidade de amostra 7-108 e um nível desejado de coleta de luminescência pelo sensor. A região afunilada pode permitir a interferência reduzida da guia de onda 7-104 na coleta de luminescência pelo sensor. Em algumas modalidades, uma grade do tipo alvo pode ser configurada para direcionar mais do que uma energia de luminescência característica ou comprimentos de onda na direção de um sensor. A Figura 7-1B mostra uma vista em corte transversal de grade do tipo alvo configurada para direcionar a luminescência da cavidade de amostra 7-108. As linhas pontilhadas indicam a dispersão de dois comprimentos de onda característicos, λ1 e λ2, que pode ser acoplada fora da cavidade de amostra 7-108. Os dois comprimentos de onda característicos, λ1 e λ2, podem ser comprimentos de onda característicos emitidos a partir de diferentes marcadores usados para identificar uma amostra. A Figura 7-1C mostra uma vista em corte transversal de grade do tipo alvo 7-110 em uma vista em corte transversal da guia de onda 7-104. A grade do tipo alvo 7-110 e a guia de onda 7-104 são configuradas de modo que a luminescência emitida da

cavidade de amostra 7-108 seja dispersada para permitir que a energia de luminescência passe através de uma região do dispositivo integrado diferente da guia de onda 7-104. A grade do tipo alvo 7-110 pode direcionar a luminescência em uma certa distância da cavidade de amostra 7-108 que é maior do que se a grade do tipo alvo não estiver presente. Em algumas modalidades, a grade do tipo alvo 7-110 pode reduzir toda a dispersão de luminescência. A grade do tipo alvo 7-110 pode ser configurada tanto para acoplar a energia de excitação à cavidade de amostra 7-108 quanto para direcionar a energia de luminescência para fora da cavidade de amostra 7-108.

[00385] As microcavidades possibilitam o acoplamento de uma guia de onda e uma cavidade de amostra para permitir que a propagação de energia de excitação para a cavidade de amostra também possa direcionar a luminescência da cavidade de amostra para um sensor. A Figura 7-2A mostra uma vista em corte transversal da guia de onda 7-204 deslocada da cavidade de amostra 7-208. A microcavidade 7-211 é configurada para direcionar luminescência a partir da cavidade de amostra 7-208. A Figura 7-2A mostra a intensidade de luminescência emitida pela cavidade de amostra 7-208 em que as regiões que têm uma intensidade maior de luminescência são mais escuras. A microcavidade 7-211 pode direcionar a luminescência em um ângulo na direção contrária da guia de onda 7-204 para reduzir a dispersão da luminescência pela guia de onda 7-204. A Figura 7-2B ilustra uma luminescência em plotagem emitida de uma cavidade de amostra como uma função de ângulo. Conforme mostrado na Figura 7-2B, a microcavidade 7-211 pode direcionar a luminescência em um ângulo de aproximadamente 15 graus da direção y. Uma ou mais microcavidades podem direcionar a luminescência em um ângulo de aproximadamente 5 graus, aproximadamente 10 graus, aproximadamente 15 graus, aproximadamente 20 graus, aproximadamente 25 graus da direção y. Em

algumas modalidades, um sensor pode ser deslocado a partir da cavidade de amostra a fim de receber a luminescência direcionada em tal ângulo. A microcavidade 7-211 também pode ser configurada para acoplar a energia de excitação da guia de onda para a cavidade de amostra de modo que a microcavidade 7-211 tanto forneça acoplamento de energia de excitação a uma cavidade de amostra quanto direcione a luminescência fora da cavidade de amostra. Em algumas modalidades, mais do que uma microcavidade podem ser formadas para acoplar a luminescência fora de uma cavidade de amostra.

[00386] Um defletor que tem uma abertura centralizada em um sensor pode ser formado entre uma cavidade de amostra e o sensor. Conforme mostrado na Figura 4-2, a camada defletora 4-226 é posicionada entre a cavidade de amostra 4-22 e o sensor camada 4-230. Um defletor em um pixel pode ser projetado para suprimir a coleta de energia além da luminescência para o pixel. Um defletor associado a uma cavidade de amostra e um sensor pode permitir que a luminescência da cavidade de amostra alcance o sensor enquanto reduz a luminescência dos pixels vizinhos, energia de excitação, e outra energia não associada à luminescência da cavidade de amostra associada ao sensor. Uma dimensão da abertura do defletor pode ser configurada para permitir a luminescência direcionada por uma estrutura do tipo alvo no mesmo pixel. Conforme mostrado na Figura 4-2, o defletor 4-226 tem aberturas ao longo da direção z para permitir que a luminescência passe através dos sensores posicionados na camada 4-230. O material de um defletor pode ser selecionado para certas propriedades ópticas, tal como, reduzia a transmissão de certas energias ou comprimentos de onda de luz em certos ângulos de incidência. Em algumas modalidades, um defletor pode ser formado por múltiplas camadas de materiais que têm diferentes índices refrativos. Um defletor pode incluir uma ou mais camadas de silício, nitreto de silício (Si_3N_4), silí-

cio, nitreto de titânio (TiN), e alumínio (Al). Uma camada configurada para formar um defletor pode ter uma altura em corte transversal de aproximadamente 20 nm, aproximadamente 20 nm, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 60 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 80 nm, ou aproximadamente 90 nm.

[00387] Em uma modalidade exemplificativa, um defletor inclui quatro camadas: uma camada de nitrato de silício que tem uma espessura em corte transversal de 22,34 nm, uma camada de silício amorfo que tem uma espessura em corte transversal de 81,34 nm, uma camada de nitreto de titânio que tem uma espessura em corte transversal de 30 nm, e uma camada de alumínio que tem uma espessura em corte transversal de 50 nm. A absorção e a refletância de um projeto de defletor exemplificativo são ilustradas na Figura 7-3, que mostra a absorbância e refletância em diferentes ângulos de incidência de 0, 20, e 35 graus tanta pata polarização p quanto polarização s. Conforme mostrado na Figura 7-3, o defletor tem níveis variáveis de absorbância para diferentes ângulos de incidência para o defletor e tem uma maior absorbância em ângulos de incidência maiores.

[00388] Os componentes de filtragem podem ser formados entre uma guia de onda e um sensor para reduzir a coleta de energia de excitação pelo sensor. Qualquer maneira adequada para filtrar a energia de excitação pode ser fornecida. As técnicas para filtrar a energia de excitação podem incluir filtrar com base em uma ou mais características de luz. Tais características podem incluir o comprimento de onda e/ou polarização. Os componentes de filtragem podem suprimir seletivamente a energia de excitação dispersada enquanto permitem que a luminescência passe através do sensor. A camada 4-228 mostrada na Figura 4-2 pode incluir um ou mais componentes de filtragem descritos no presente documento.

[00389] Um filtro de polarização configurado para refletir e/ou ab-

sorver luz de uma polarização particular pode atuar como um filtro para um dispositivo integrado. Um filtro de polarização pode ser usado em sistemas em que a energia de excitação que se propaga através de uma guia de onda tem uma certa polarização e luminescência emitida por um marcador pode ter uma diferente polarização da energia de excitação. O filtro de excitação de polarização pode ser configurado para filtrar a polarização da energia de excitação e, através disso, reduzir a energia de excitação de ser coletada por um sensor. Em algumas modalidades, um filtro de polarização pode ser configurado para absorver luz polarizada por TE quando a energia de excitação fornecida pela excitação for polarizada por TE. O filtro de polarização pode consistir em um polarizador de tela de arame padronizado. Em algumas modalidades, os arames na tela de arame são alumínio. A orientação dos arames pode ser alinhada em paralelo ao longo de uma direção perpendicular à propagação direção de uma ou mais guias de onda. Quando a energia de excitação for polarizada por TE, a orientação dos arames pode ser alinhada ao campo elétrico de oscilação da energia de excitação polarizada por TE. A fabricação de tal polarizador de tela de arame pode fornecer um filtro adequado enquanto contribui de modo negligenciável com a espessura de todo o dispositivo integrado. Tal polarizador de tela de arame pode ter uma perda de energia de excitação dispersada de aproximadamente mais do que 10 dB e uma perda de luminescência de aproximadamente 3 dB. Em algumas modalidades, as aberturas na tela de arame filtro em que os arames não estão presentes podem se alinhar a um ou mais sensores subjacentes. As aberturas podem ter uma dimensão que é menor ou maior do que uma dimensão de um ou mais sensores. Uma abertura pode permitir que a luminescência de uma cavidade de amostra de um pixel seja coletada por um sensor no pixel enquanto o padrão de tela de arame circundante pode fornecer a filtragem da energia de excitação.

[00390] A Figura 7-4A mostra uma vista plana de um filtro de excitação de polarização que tem uma grade que compreende uma pluralidade de arames 7-406. A tela de arame tem aberturas 7-408 que formam regiões de pixel em uma matriz de pixel de um dispositivo integrado. A guia de onda 7-404 pode ser posicionada para passar através de uma fileira de aberturas 7-408. A Figura 7-4B mostra uma vista em corte transversal ao longo da linha A-A' conforme mostrado na Figura 7-4A. Os arames 7-406 são posicionados entre a guia de onda 7-404 e o sensor 7-410. A abertura 7-408 nos arames 7-406 é posicionada para se sobrepor pelo menos parcialmente ao sensor 7-410. Dessa maneira, a abertura 7-408 e o sensor 7-410 podem estar incluídos no mesmo pixel de um dispositivo integrado. A abertura 7-408 pode permitir que a energia de luminescência atravesse de modo que o sensor 7-410 possa detectar a luminescência, enquanto reduz uma quantidade de energia de excitação detectada pelo sensor 7-410.

[00391] Um dispositivo integrado pode incluir um filtro de comprimento de onda configurado para refletir luz de um ou mais comprimentos de onda característicos e permitir que a transmissão de luz tenha um diferente comprimento de onda característico. Em algumas modalidades, a luz refletida por um filtro de comprimento de onda pode ter um comprimento de onda característico menor do que da luz transmitida pelo filtro de comprimento de onda. Tal filtro de comprimento de onda pode refletir a energia de excitação e permitir a transmissão de luminescência visto que a energia de excitação usada para excitar um marcador tenha tipicamente tem um comprimento de onda característico menor do que da luminescência emitida pelo marcador em resposta ao alcance de um estado de excitação pela energia de excitação.

[00392] Um filtro de comprimento de onda pode incluir uma ou mais camadas que têm um ou mais materiais. Um filtro de comprimento de onda pode incluir dióxido de titânio (TiO_2) e/ou dióxido de silício (SiO_2).

Em algumas modalidades, um filtro de comprimento de onda pode incluir uma pilha de múltiplas camadas que têm camadas alternadas de um alto índice de material de refração e um baixo índice de material de refração. A espessura em corte transversal de cada camada pode ser qualquer espessura adequada e, em alguns exemplos, pode ser configurada para refletir e/ou transmitir um comprimento de onda de luz particular. A espessura em corte transversal das camadas pode ser aproximadamente um quarto do comprimento de onda da luz transmitida pelo filtro de comprimento de onda. Uma espessura de a camada de um filtro de comprimento de onda pode ser aproximadamente 10 nm, aproximadamente 40 nm, aproximadamente 50 nm, aproximadamente 60 nm, aproximadamente 70 nm, aproximadamente 80 nm, aproximadamente 90 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 110 nm, aproximadamente 130 nm, ou aproximadamente 150 nm. Em algumas modalidades, uma camada de um filtro de comprimento de onda pode ter menos do que 1% de variação de espessura através da camada, que fornece uniformidade de espessura adequada dentro do filtro de comprimento de onda.

[00393] Em algumas modalidades, os diferentes materiais podem incluir camadas alternadas de dióxido de titânio (TiO_2) e dióxido de silício (SiO_2). O uso de dióxido de titânio e dióxido de silício como as camadas alternadas em um filtro de comprimento de onda pode reduzir toda a espessura da estrutura do filtro de comprimento de onda.

[00394] A pilha de camadas alternadas pode ter qualquer espessura adequada para fornecer um nível desejado de filtragem de energia de excitação enquanto permite a transmissão de luminescência. Um filtro de comprimento de onda pode ter uma espessura de aproximadamente 3 mícrons, aproximadamente 3.5 mícrons, aproximadamente 4 mícrons, ou aproximadamente 4,5 mícrons. Um filtro de comprimento de onda pode ser formado através de múltiplos pixels de um dispositi-

vo integrado.

[00395] A Figura 7-5 mostra uma vista em corte transversal do filtro de comprimento de onda 7-500 de um dispositivo integrado. O filtro de comprimento de onda inclui camadas alternadas de camada 7-501 e camada 7-502. A camada 7-501 e a camada 7-502 têm diferente índices de refração. Por exemplo, a camada 7-501 pode ter um índice de refração maior do que a camada 7-502. Diferentes índices de refração para as camadas 7-501 e 7-502 podem ser alcançados pelo uso de materiais que têm diferente índices de refração. Em algumas modalidades, a camada 7-501 pode incluir dióxido de silício, e a camada 7-502 pode incluir dióxido de titânio. O filtro de comprimento de onda 7-500 é formado dentro da região de pixel 7-508 que tem sensor 7-510. O filtro de comprimento de onda 7-500 pode ser configurado para permitir que a transmissão de luz que tem um comprimento de onda característico, λ2, enquanto reflete substancialmente um diferente comprimento de onda característico, λ1. Um marcador pode emitir a luminescência que tem λ2, que pode passar através do filtro de excitação 7-500 e ser detectado pelo sensor 7-510. A energia de excitação pode incluir λ1. Dessa maneira, o sensor 7-510 pode detectar um sinal substancialmente em relação à luminescência de um marcador.

[00396] Em uma modalidade exemplificativa, um filtro de guia de onda pode incluir 49 camadas de TiO_2 e SiO_2 alternadas com uma camada de SiO_2 em qualquer lado da pilha de camadas de TiO_2 e SiO_2. A espessura total de toda a pilha é aproximadamente 3,876 mícrons. A Figura 7-6 demarca a transmitância como uma função de comprimento de onda para a p-polarização, polarização média, s-polarização para um ângulo incidente de aproximadamente 10 graus e transmitância em um ângulo incidente de aproximadamente 0 graus. A perda de extinção pode variar significativamente em uma faixa de comprimento de onda de aproximadamente 21 nm e ser aproximada-

mente 30 dB em aproximadamente 646 nm para um ângulo incidente de aproximadamente 10. A variação de espessura para tal filtro pode ser menor do que aproximadamente 1% a fim de reduzir artefatos devido à uniformidade de espessura.

[00397] A alteração das espessuras de camadas dentro de uma pilha de múltiplas camadas de um filtro de comprimento de onda pode alterar suas propriedades de transmissão. A alteração da espessura de uma ou mais camadas em filtros de comprimento de onda pode alterar o comprimento de onda de luz que o filtro transmite. Com o uso de tal conjunto de procedimentos, as seções de elementos de filtração podem transmitir um comprimento de onda de luz enquanto as outras seções podem transmitir um diferente comprimento de onda de luz para formar um filtro de múltiplos comprimentos de onda. Uma seção de um filtro de múltiplos comprimentos de onda pode se sobrepor a um sensor configurado para receber luz transmitida através da seção. A pilha de camadas alternadas de um filtro de múltiplos comprimentos de onda pode ter duas seções em que a espessura das camadas alternadas é aproximadamente um quarto de um comprimento de onda de luz com um espaçador que tem metade de um comprimento de onda entre dois quartos das seções de comprimento de onda. O espaçador pode atuar como um ressonador Fabry-Perot. O espaçador pode ter uma espessura variável de modo que tenha uma espessura em uma primeira região que é maior do que uma espessura em uma segunda região. O comprimento de onda de luz transmitida pelo filtro de comprimento de onda pode variar através do filtro devido à variação na espessura do espaçador. A primeira região pode permitir a transmissão de luz que tem um primeiro comprimento de onda, e a segunda região pode permitir a transmissão de luz que tem um segundo comprimento de onda em que o primeiro comprimento de onda é maior do que o segundo comprimento de onda. Adicionalmente, a primeira região do fil-

tro pode refletir substancialmente a luz que tem o segundo comprimento de onda, e a segunda região do filtro pode refletir substancialmente a luz que tem o primeiro comprimento de onda. Dessa maneira, o filtro de comprimento de onda pode fornecer variação do comprimento de onda de luz transmitida através do filtro de comprimento de onda fornecido pela variação na espessura do espaçador. Tais filtros de múltiplos comprimentos de onda podem ser usados em modalidades em que mais do que um comprimento de onda de luminescência é detectado. Os filtros de múltiplos comprimentos de onda podem refletir a energia de excitação por mais do que 10 dB.

[00398] Ao fabricar tal filtro de comprimento de onda, o espaçador pode ser formado na espessura para a transmissão do comprimento de onda de luz mais longo e marcado nas regiões em que o comprimento de onda de luz mais curto é transmitido. A camada de alto índice refrativo nas regiões que transmitem o comprimento de onda de luz mais curto pode ter uma região marcada padronizada.

[00399] A Figura 7-7 mostra uma vista em corte transversal de um filtro de múltiplos comprimentos de onda 7-700. O pixel 7-707 inclui região 7-708 e região 7-709 de filtro de múltiplos comprimentos de onda 7-700 e sensor 7-710 e sensor 7-711. O filtro de múltiplos comprimentos de onda 7-700 inclui camadas alternadas de 7-701 e 7-702 e espaçador 7-706. A camada 7-701 e a camada 7-702 têm diferente índices de refração. Por exemplo, a camada 7-701 pode ter um índice de refração maior do que a camada 7-702. Diferentes índices de refração para as camadas 7-701 e 7-702 podem ser alcançados pelo uso de materiais que têm diferente índices de refração. Em algumas modalidades, a camada 7-701 pode incluir dióxido de silício, e a camada 7-702 pode incluir dióxido de titânio. Conforme mostrado na Figura 7-7, o espaçador 7-706 tem uma espessura variável de modo que a região 7-708 tenha uma espessura menor do que a região 7-709. Através da

variação da espessura de espaçador 7-706, o comprimento de onda de luz transmitido pelo filtro 7-700 varia da região 7-708 para região 7-709. Dependendo da região, a espessura de espaçador 7-706 pode ser igual a aproximadamente metade do comprimento de onda da luz transmitida. O espaçador 7-706 tem uma espessura menor na região 7-708 do que na região 7-709 de modo que a transmissão de luz através da região 7-708 tenha um comprimento de onda menor do que a transmissão de luz através da região 7-709. A variação na espessura de região 7-708 e 7-709 pode ser aproximadamente 5 nm, aproximadamente 10 nm, aproximadamente 15, aproximadamente 20 nm, ou aproximadamente 25 nm. Conforme mostrado na Figura 7-7, a região 7-708 permite a transmissão de λ1, e a região 7-709 permite a transmissão de λ2, em que λ2 é maior do que λ1. Dessa maneira, o sensor 7-710 posicionado na região 7-708 pode detectar λ1 e o sensor 7-711 posicionado na região 7-709 pode detectar λ2. Adicionalmente, o filtro de múltiplos comprimentos de onda 7-706 pode ser configurado para refletir energia de excitação tanto pela região 7-708 quanto pela região 7-709. Conforme mostrado na Figura 7.7, tanto a região 7-708 quanto a região 7-709 refletem λ3, que pode ter um comprimento de onda mais longo do que tanto λ1 quanto λ2.

[00400] A Figura 7-8 ilustra uma plotagem da transmitância de luz polarizada como uma função de comprimento de onda de um filtro de comprimento de onda exemplificativo que tem 13 camadas que alternam TiO_2 e SiO_2 com uma camada de SiO_2 em qualquer lado da pilha e um espaçador de TiO_2 que tem espessura variável. As camadas alternadas de TiO_2 e SiO_2, que formam um quarto das camadas de comprimento de onda, têm espessuras de 76,20 nm e 118,51, respectivamente. O espaçador de TiO_2 tem uma espessura em uma região que é de 137,16 nm e uma espessura em uma outra região que é de aproximadamente 122,16 nm. A espessura total de toda a pilha é 1,3 mícrons. A

camada de espaçador tem uma região marcada que é aproximadamente 15 nm mais fina para as regiões de transmissão de passa-baixa de comprimento de onda mais curto do que as regiões de transmissão de passa-baixa de comprimento de onda mais longo. As regiões de transmissão são centralizadas em aproximadamente 660 nm e 685 nm. Os espaçadores de cavidade adicionais podem ampliar os picos de transmissão para serem mais quadrados. A perda de extinção pode estar aproximadamente na faixa de 10 dB a 15 dB. A variação de espessura para tal filtro pode ser menor do que aproximadamente 1% a fim de reduzir artefatos devido à uniformidade de espessura.

F. SENSOR

[00401] Qualquer sensor adequado capaz de adquirir informações de distância de tempo pode ser usado para medições a fim de detectar os tempos de vida de marcadores luminescentes. Por exemplo, o Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/164.506, intitulado "INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS", depositado em 20 de maio de 2015, descreve um sensor capaz de determinar um tempo de chegada de um fóton, e é incorporado a título de referência em sua totalidade. Os sensores são alinhados de modo que cada cavidade de amostra tenha pelo menos uma região de sensor para detectar a luminescência da cavidade de amostra. Em algumas modalidades, o dispositivo integrado pode incluir matrizes de fotodiodo de avalanche de modo Geiger e/ou matrizes de diodo de avalanche de fóton único (SPADs).

[00402] É descrito no presente documento um fotodetector integrado que pode medir de modo preciso, ou "distância de tempo", a temporização da chegada de fótons incidentes, e que pode ser usado em uma variedade de aplicações, tais como sequenciamento de ácidos nucleicos (por exemplo, sequenciamento de DNA), por exemplo. Em algumas modalidades, o fotodetector integrado pode medir a chegada de fótons com

resolução de nanossegundo ou picossegundo, que pode facilitar uma análise de tempo-domínio da chegada de fótons incidentes.

[00403] Algumas modalidades se referem a um circuito integrado que tem um fotodetector que produz carreadores de carga em resposta a fótons incidentes e que é capaz de discriminar a temporização na qual os carreadores de carga são gerados pela chegada de fótons incidentes em relação a um tempo de referência (por exemplo, um evento de disparo). Em algumas modalidades, uma estrutura de segregação de carreador de carga segrega carreadores de carga gerados em tempos diferentes e direciona os carreadores de carga em uma ou mais regiões de armazenamento de carreador de carga (chamada de "compartimentos") que agregam carreadores de carga produzidos dentro de diferentes períodos de tempo. Cada compartimento armazena os carreadores de carga produzidos dentro de um intervalo de tempo selecionado. A leitura da carga armazenada em cada compartimento pode fornecer informações sobre a quantidade de fótons que chegou dentro de cada intervalo de tempo. Tal circuito integrado pode ser usado em qualquer uma dentre uma variedade de aplicações, tais como as mesmas descritas no presente documento.

[00404] Um exemplo de um circuito integrado que tem uma região de fotodetecção e uma estrutura de segregação de carreador de carga será descrito. Em algumas modalidades, o circuito integrado pode incluir uma matriz de pixels, e cada pixel pode incluir uma ou mais regiões de fotodetecção e uma ou mais estruturas de segregação de carreador de carga, conforme discutido abaixo.

[00405] A Figura 7-9A mostra um diagrama de um pixel 7-900, de acordo com algumas modalidades. O pixel 7-900 inclui uma região de absorção de fóton/absorção de fóton 7-902 (também chamada de uma região de fotodetecção), uma região de percurso/captura de carreador 7-906, uma região de armazenamento de carreador 7-908 que tem

uma ou mais regiões de armazenamento de carreador de carga, também chamados no presente documento de "compartimentos de armazenamento de carreador de carga" ou simplesmente "compartimentos", e conjunto de circuitos de leitura 7-910 par ler sinais dos intervalos de armazenamento de carreador de carga.

[00406] A região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 pode ser uma região de material semicondutor (por exemplo, silício) que pode converter fótons incidentes em carreadores de carga fotogerados. A região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 pode ser exposta a luz, e pode receber fótons incidentes. Quando um fóton é absorvido pela região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 o mesmo pode gerar carreadores de carga fotogerados, tais como um par elétron/furo. Os carreadores de carga fotogerados são também chamados no presente documento simplesmente como "carreadores de carga".

[00407] Um campo elétrico pode ser estabelecido na região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902. Em algumas modalidades, o campo elétrico pode ser "estático", conforme distinguido do campo elétrico que muda na região de percurso/captura de carreador 7-906. O campo elétrico na região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 pode incluir um componente lateral, um componente vertical ou tanto um componente lateral quanto um componente vertical. O componente lateral do campo elétrico pode ser na direção a jusante da Figura 7-9A, conforme indicado pelas setas, que induz uma força nos carreadores de carga fotogerados que acionam os mesmos no sentido da região de percurso/captura de carreador 106. O campo elétrico pode ser formado em uma variedade de maneiras.

[00408] Em algumas modalidades, um ou mais eletrodos pode ser formado sobre a região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902. O eletrodo (ou os eletrodos) pode ter tensões aplicadas no mes-

mo para estabelecer um campo elétrico na região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902. Tal eletrodo (ou tais eletrodos) pode ser chamado de "célula fotoelétrica (ou células fotoelétricas)". Em algumas modalidades, a região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 pode ser uma região de silício que é totalmente esgotada de carreadores de carga.

[00409] Em algumas modalidades, o campo elétrico na região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 pode ser estabelecido através de uma junção, tal como uma junção do tipo PN. O material semicondutor da região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 pode ser dopado para formar a junção do tipo PN com uma orientação e/ou formato que produz um campo elétrico que induz uma força nos carreadores de carga fotogerados que acionam os mesmos no sentido da região de percurso/captura de carreador 7-906. Em algumas modalidades, o terminal P do diodo de junção do tipo PN pode se conectar a um terminal que define sua tensão. Tal diodo pode ser chamado de um fotodiodo "pinado". Um fotodiodo pinado pode promover uma recombinação de carreador na superfície, devido ao terminal que define sua tensão e atrai carreadores, o que pode reduzir uma corrente escura. Os carreadores de carga fotogerados que são desejados a serem capturados podem passar abaixo da área de recombinação na superfície. Em algumas modalidades, o campo elétrico lateral pode ser estabelecido com o uso de uma concentração de dopagem graduada no material semicondutor.

[00410] Conforme ilustrado na Figura 7-9A, um fóton pode ser capturado e um carreador de carga 7-901A (por exemplo, um elétron) pode ser produzido no tempo t1. Em algumas modalidades, um gradiente de potencial elétrico pode ser estabelecido ao longo da região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 e da região de percurso/captura de carreador 7-906 que faz com que o carreador de carga

7-901A percorra na direção a jusante da Figura 7-9A (conforme ilustrado pelas setas mostradas na Figura 7-9A). Em resposta ao gradiente potencial, o carreador de carga 7-901A pode se mover de sua posição no tempo t1 para uma segunda posição no tempo t2, uma terceira posição no tempo t3, uma quarta posição no tempo t4 e uma quinta posição no tempo t5. O carreador de carga 7-901A assim se move para a região de percurso/captura de carreador 7-906 em resposta ao gradiente potencial.

[00411] A região de percurso/captura de carreador 7-906 pode ser uma região de semicondutor. Em algumas modalidades, a região de percurso/captura de carreador 7-906 pode ser uma região de semicondutor do mesmo material que a região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 (por exemplo, silício) com a exceção de que a região de percurso/captura de carreador 7-906 pode ser protegida de luz incidente (por exemplo, por um material apoio sobreposto, tal como uma camada de metal).

[00412] Em algumas modalidades, e conforme discutido adicionalmente abaixo, um gradiente potencial pode ser estabelecido na região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 e na região de percurso/captura de carreador 7-906 através de eletrodos posicionados acima dessas regiões. No entanto, os conjuntos de procedimentos descritos no presente documento não são limitados quanto as posições particulares de eletrodos usados para produzir um gradiente de potencial elétrico. Tampouco os conjuntos de procedimentos descritos no presente documento são limitados a estabelecer um gradiente de potencial elétrico com o uso de eletrodos. Em algumas modalidades, um gradiente de potencial elétrico pode ser estabelecido com o uso de um perfil de dopagem espacialmente graduado. Qualquer conjunto de procedimentos adequados pode ser usado para estabelecer um gradiente de potencial elétrico que faz com que os carreadores de carga

percorram ao longo da região de absorção de fóton/geração de carreador 7-902 e da região de percurso/captura de carreador 7-906.

[00413] Uma estrutura de segregação de carreador de carga pode ser formada no pixel para permitir a segregação de carreadores de carga produzidos em diferentes momentos. Em algumas modalidades, pelo menos uma porção da estrutura de segregação de carreador de carga pode ser formada sobre a região de percurso/captura de carreador 7-906. Conforme será descrito abaixo, a estrutura de segregação de carreador de carga pode incluir um ou mais eletrodos formados sobre a região de percurso/captura de carreador 7-906, cuja tensão pode ser controlada por um conjunto de circuitos de controle para mudar o potencial elétrico na região de percurso/captura de carreador 7-906.

[00414] O potencial elétrico na região de percurso/captura de carreador 7-906 pode ser mudado para permitir a captura de um carreador de carga. O gradiente potencial pode ser mudado mudando-se a tensão em um ou mais eletrodos que sobrepõe a região de percurso/captura de carreador 7-906 a fim de produzir uma barreira potencial que pode confinar um carreador dentro de uma região espacial predeterminada. Por exemplo, a tensão em um eletrodo que sobrepõe a linha tracejada na região de percurso/captura de carreador 7-906 da Figura 7-9A pode ser mudada no tempo t5 para elevar uma barreira potencial ao longo da linha tracejada na região de percurso/captura de carreador 7-906 da Figura 7-9A, e através disso capturar o carreador de carga 7-901A. Conforme mostrado na Figura 7-9A, o carreador capturado no tempo t5 pode ser para um compartimento "compartimento0" da região de armazenamento de carreador 7-908. A transferência do carreador para o compartimento de armazenamento de carreador de carga pode ser realizada mudando-se o potencial na região de percurso/captura de carreador 7-906 e/ou a região de armazenamento de carreador 7-908 (por exemplo, mudando-se a tensão do eletrodo (ou dos eletrodos) que sobre-

põem essas regiões) para fazer com que o carreador percorra para o compartimento de armazenamento de carreador de carga.

[00415] Mudar o potencial em um certo ponto no tempo dentro de uma região espacial predeterminada da região de percurso/captura de carreador 7-906 pode permitir a retenção de um carreador que foi gerado através de absorção de fóton que ocorreu dentro de um intervalo de tempo específico. Retendo-se os carreadores de carga fotogerados em tempos e/ou locais diferentes, os tempos nos quais os carreadores de carga foram gerados através de absorção de fóton podem ser discriminados. Nesse sentido, um carreador de carga pode ser submetido a "distância de tempo" retendo-se o carreador de carga em um certo ponto de tempo e/ou espaço após a ocorrência de um evento de disparo. O distanciamento de tempo de um carreador de carga em um compartimento particular fornece informações sobre o tempo no qual o carreador de carga fotogerado foi gerado pela absorção de um fóton incidente, e assim do mesmo modo as "distâncias de tempo", em relação ao evento de disparo, em que a chegada do fóton incidente que produziu o carreador de carga fotogerados.

[00416] A Figura 7-9B ilustra a captura de um carreador de carga em um diferente ponto em tempo e espaço. Conforme mostrado na Figura 7-9B, a tensão em um eletrodo que sobrepõe a linha tracejada na região de percurso/captura de carreador 7-906 pode ser mudada no tempo t9 para elevar uma barreira potencial ao longo da linha tracejada na região de percurso/captura de carreador 106 da Figura 7-9B, e através disso capturar o carreador 7-901B. Conforme mostrado na Figura 7-9B, o carreador capturado no tempo t9 pode ser para um compartimento "compartimento1" da região de armazenamento de carreador 7-908. Visto que o carreador de carga 7-901B é retido no tempo t9, o mesmo representa um evento de absorção de fóton que ocorreu em um tempo diferente (por exemplo, tempo t6) do que o evento de ab-

sorção de fóton (por exemplo, em t1) para o carreador 7-901A, que é capturado no tempo t5.

[00417] Realizar múltiplas medições e agregar os carreadores de carga nos compartimentos de armazenamento de carreador de carga da região de armazenamento de carreador 7-908 com base nos tempos nos quais os carreadores de carga são capturados pode fornecer informações sobre os tempos nos quais fótons são capturados na área de absorção de fóton/geração de carreador 7-902. Tais informações podem ser úteis em uma variedade de aplicações, conforme discutido acima.

[00418] Em algumas modalidades, a duração de tempo que cada distância de tempo captura após um pulso de excitação pode variar. Por exemplo, as distâncias de tempo mais curtas podem ser usadas para detectar luminescência logo após o pulso de excitação, enquanto distâncias de tempo mais longas podem ser usadas em momentos além de um pulso de excitação. Variando-se os intervalos de distância de tempo, a razão de sinal para ruído para as medições do sinal elétrico associado a cada distância de tempo pode ser aprimorada para um dado sensor. Visto que a probabilidade de um evento de emissão de fóton é mais alta logo após um pulso de excitação, uma distância de tempo nesse tempo pode ter um intervalo de tempo menor para considerar o potencial de mais fótons para detectar. Enquanto em tempos mais longos, a probabilidade de emissão de fóton pode ser menor e uma detecção de distância de tempo nesse tempo pode ser mais longo para considerar uma quantidade menor de fótons em potencial. Em algumas modalidades, uma distância de tempo com uma duração de tempo significativamente mais longa pode ser usada para distinguir dentre múltiplos tempos de vida. Por exemplo, a maioria de distâncias de tempo pode capturar um intervalo de tempo na faixa de aproximadamente 0,1 a 0,5 ns, enquanto uma distância de tempo pode capturar

um intervalo de tempo na faixa de aproximadamente 2 a 5 ns. A quantidade de distâncias de tempo e/ou o intervalo de tempo de cada distância pode depender do sensor usado para detectar os fótons emitidos do objeto de amostra. Determinar o intervalo de tempo para cada intervalo pode incluir identificar os intervalos de tempo necessários para a quantidade de distâncias de tempo fornecidas pelo sensor para distinguir dentre os marcadores luminescentes usados para uma análise de uma amostra. A distribuição do histograma gravado pode ser comparada a histogramas conhecidos de marcadores sob condições e intervalos de tempo similares para identificar o tipo de marcador na cavidade de amostra. As diferentes modalidades do presente pedido de patente podem, medir os tempos de vida de marcadores, mas pode variar nas energias de excitação usadas para excitar um marcador, a quantidade de regiões de sensor em cada pixel e/ou o comprimento de onda detectado pelo sensores.

III. FONTE DE EXCITAÇÃO

[00419] De acordo com algumas modalidades, uma ou mais fontes de excitação podem ser localizada de modo externo ao dispositivo integrado, e pode ser disposta para entregar pulsos de luz para um dispositivo integrado que tem cavidades de amostra. Por exemplo, o Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/164.485, intitulado "PULSED LASER", depositado em 20 de maio de 2015, descreve uma fonte de laser pulsado que pode ser usado como uma fonte de excitação, e é incorporado a título de referência em sua totalidade. Os pulsos de luz podem ser acoplados a uma pluralidade de cavidades de amostra e usados para excitar um ou mais marcadores nos poços, por exemplo. A uma ou mais fontes de excitação podem entregar pulsos de luz em um ou mais comprimentos de onda característicos, de acordo com algumas implantações. Em alguns casos, uma fonte de excitação pode ser empacotada como um módulo trocável que se monta em uma base

de instrumento ou se acopla a mesma, na qual o dispositivo integrado pode ser carregado. A energia de uma fonte de excitação pode ser entregue de modo radiativo ou não radiativo para pelo menos uma cavidade de amostra ou para pelo menos uma amostra em pelo menos uma cavidade de amostra. Em algumas implantações, uma fonte de excitação que tem uma intensidade controlável pode ser disposta para entregar energia de excitação para uma pluralidade de pixels de um dispositivo integrado. Os pixels podem ser dispostos em uma matriz linear (por exemplo, fileira ou coluna), ou em uma matriz em 2D (por exemplo, uma subárea da matriz de pixels ou toda a matriz de pixels).

[00420] Qualquer fonte de luz adequada pode ser usada para uma fonte de excitação. Algumas modalidades podem usar fontes de luz incoerentes e outras modalidades podem usar fontes de luz coerentes. A título de exemplos não limitantes, as fontes de luz incoerentes de acordo com algumas modalidades podem incluir diferentes tipos de diodos de emissão de luz (LEDs), tais como LEDs orgânicos (OLEDs), pontos quânticos (QLEDs), LEDs de nanofio e LEDs semicondutores (in)orgânicos. A título de exemplos não limitantes, as fontes de luz coerentes de acordo com algumas modalidades podem incluir diferentes tipos de lasers tais como lasers semicondutores (por exemplo, lasers de emissão de superfície de cavidade vertical (VCSELs), lasers de emissão de borda e diodos de laser de retorno distribuído (DFB)). Adicional ou alternativamente, laser de guia de onda óptico acoplado em placa (SCOWLs) ou outras estruturas de guia de onda de modo único assimétricas podem ser usadas. Em algumas implantações, as fontes de luz coerentes podem compreender lasers orgânicos, lasers de ponto quântico e lasers em estado sólido (por exemplo, um laser de Nd:YAG ou ND:Vidro, bombeado por diodos de laser ou lâmpadas de luz). Em algumas modalidades, um laser de fibra bombeada com diodo de laser pode ser usado. Uma fonte de luz coerente pode ser travada

de modo passivo a fim de produzir pulsos ultracurtos. Pode haver mais do que um tipo de fonte de excitação para uma matriz de pixels em um dispositivo integrado. Em algumas modalidades, diferentes tipos de fontes de excitação podem ser combinados. Uma fonte de excitação pode ser fabricada de acordo com tecnologias convencionais que são usadas para fabricar um tipo selecionado de fonte de excitação.

[00421] A título de introdução e sem limitar a invenção, uma disposição exemplificativa de uma fonte de luz coerente é retratada na Figura 8-0A. O desenho ilustra um instrumento analítico 8-100 que pode incluir uma fonte de excitação de laser de pulso ultracurto 8-110 como a fonte de excitação. O laser pulsado ultracurto 8-110 pode compreender um meio de ganho 8-105 (que pode ser um material em estado sólido em algumas modalidades), uma fonte de bombeamento para excitar o meio de ganho (não mostrado), e pelo menos dois espelhos de cavidade 8-102, 8-104 que definem as extremidades de uma cavidade de laser óptico. Em algumas modalidades, pode haver um ou mais elementos ópticos adicionais na cavidade de laser para finalidades de formatação de feixe, seleção de comprimento de onda e/ou formação de pulso. Quando em operação, a fonte de excitação de laser pulsado 8-110 pode produzir um pulso óptico ultracurto 8-120 que circula em vaivém na cavidade de laser entre os espelhos de extremidade da cavidade 8-102, 8-104 e através do meio de ganho 8-105. Um dos espelhos de cavidade 8-104 pode parcialmente transmitir uma porção do pulso circulante, de modo que um trem de pulsos ópticos 8-122 é emitido do laser pulsado 8-110 até o componente subsequente 8-160, tal como um componente óptico e um dispositivo integrado. Os pulsos emitidos podem submeter a varredura um feixe (indicado pelas linhas tracejadas) que é caracterizado por uma profundidade de feixe *w*.

[00422] Os perfis de intensidade temporal medidos dos pulsos emitidos 8-122 podem aparecer conforme ilustrado na Figura 8-0B. Em

algumas modalidades, os valores de intensidade de pico dos pulsos emitidos podem ser aproximadamente iguais, e os perfis podem ter um perfil temporal Gaussiano, embora outros perfis tais como um perfil sech pode ser possível. Em alguns casos, os pulsos podem não ter perfis temporais simétricos e podem ter outros formatos temporais. Em algumas modalidades, as dinâmicas de ganho e/ou perda pode render pulsos que têm perfis assimétricos. A duração de cada pulso pode ser distinguido por um valor máximo de metade de largura completa (FWHM), conforme indicado na Figura 8-0B. Os pulsos ópticos ultracurtos pode valores de FWHM menores do que 100 picossegundos.

[00423] Os pulsos que emitem de uma fonte de excitação de laser podem ser separados por intervalos regulares *T*. Em algumas modalidades, *T* pode ser determinado por taxas de ganho ativo e/ou de modulação de perda no laser. Para lasers de modo travado, *T* pode ser determinado por um tempo de percurso de ida e volta entre os espelhos de extremidade de cavidade 8-102, 8-104. De acordo com algumas modalidades, o tempo de separação de pulso *T* pode ser entre cerca de 1 ns e cerca de 100 ns. Em alguns casos, o tempo de separação de pulso *T* pode ser entre cerca de 0,1 ns e cerca de 1 ns. Em algumas implantações, o tempo de separação de pulso *T* pode ser entre cerca de 100 ns e cerca de 2 μs.

[00424] Em algumas modalidades, um sistema óptico 8-140 pode operar em um feixe de pulsos 8-122 de uma fonte de excitação de laser 8-110. Por exemplo, o sistema óptico pode incluir um ou mais lentes para reformatar o feixe e/ou mudar a divergência do feixe. A reformatação do feixe pode incluir aumentar ou diminuir o valor da profundidade de feixe e/ou mudar um formato de corte transversal do feixe (por exemplo, elíptico para circular, circular para elíptico, *etc*.). Mudar a divergência do feixe pode compreender convergir ou divergir o fluxo de feixe. Em algumas implantações, o sistema óptico 8-140 pode incluir

um atenuador ou um amplificador para mudar a quantidade de energia de feixe. Em alguns casos, o sistema óptico pode incluir elementos de filtração de comprimento de onda. Em algumas implantações, o sistema óptico pode incluir elementos de formatação de pulso, por exemplo, um esticador de pulso e/ou um compressor de pulso. Em algumas modalidades, o sistema óptico pode incluir um ou mais elementos ópticos não lineares, tais como um absorvedor passível de saturação para reduzir um comprimento de pulso. De acordo com algumas modalidades, o sistema óptico 8-140 pode incluir um ou mais elementos que altera a polarização de pulsos de uma fonte de excitação de laser 8-110.

[00425] Em algumas implantações, um sistema óptico 8-140 pode incluir um cristal não linear para converter o comprimento de onda de saída de uma fonte de excitação 8-110 para um comprimento de onda mais curto por meio de duplicação de frequência ou a um comprimento de onda mais longo por meio de amplificação paramétrica. Por exemplo, uma saída do laser pode ser duplicada em frequência em um cristal não linear (por exemplo, em niobato de lítio periodicamente polarizado (PPLN)) ou outro cristal não linear não polarizado. Tal processo de duplicação de frequência pode permitir que mais lasers eficientes gerem comprimentos de onda mais adequados para a excitação de fluoróforos selecionados.

[00426] A expressão "comprimento de onda característico" ou "comprimento de onda" pode se referir a um comprimento de onda central ou predominante na largura de banda limitada de radiação produzida por uma fonte de excitação. Em alguns casos, o mesmo pode se referir a um comprimento de onda de pico na largura de banda de radiação produzido por uma fonte de excitação. Um comprimento de onda característico de uma fonte de excitação pode ser selecionado com base em uma escolha de marcadores luminescentes ou sondas que são usadas em um dispositivo de bioanálise, por exemplo. Em al-

gumas implantações, o comprimento de onda característico de uma fonte de energia de excitação é selecionado para uma excitação direta (por exemplo, excitação de fóton único) de um fluoróforo escolhido. Em algumas implantações, o comprimento de onda característico de uma fonte de excitação é selecionado para uma excitação indireta (por exemplo, excitação multifóton ou conversão harmônica para um comprimento de onda que irá fornecer uma excitação direta). Em algumas modalidades, a radiação de excitação pode ser gerada por uma fonte de luz que é configurada para gerar uma energia de excitação em um comprimento de onda em particular para uma aplicação na cavidade de amostra. Em algumas modalidades, um comprimento de onda característico da fonte de excitação pode ser menor do que um comprimento de onda característico de emissão correspondente da amostra. Por exemplo, uma fonte de excitação pode emitir uma radiação que tem um comprimento de onda característico entre 500 nm e 700 nm (por exemplo, 515 nm, 532 nm, 563 nm, 594 nm, 612 nm, 632 nm, 647 nm). Em algumas modalidades, uma fonte de excitação pode fornecer uma energia de excitação centrada em dois comprimentos de onda diferentes, tais como 532 nm e 593 nm, por exemplo.

[00427] Em algumas modalidades, uma fonte de excitação pulsada pode ser usada para excitar um marcador luminescente a fim de medir um tempo de vida de emissão do marcador luminescente. Isso pode ser útil para distinguir marcadores luminescentes com base no tempo de vida de emissão ao invés da cor de emissão ou do comprimento de onda. Como exemplo, uma fonte de excitação pulsada pode excitar periodicamente um marcador luminescente a fim de gerar e detectar eventos de emissão de fóton subsequentes que são usados para determinar um tempo de vida para o marcador. As medições de tempo de vida de marcadores luminescentes podem ser possíveis quando o pulso de excitação de uma fonte de excitação transiciona de uma po-

tência ou intensidade de pulso de pico para uma potência ou intensidade menor (por exemplo, quase extinguida) por uma duração de tempo que é menor do que o tempo de vida do marcador luminescente. Pode ser benéfico se o pulso de excitação termina rapidamente, de modo que o mesmo não excite novamente o marcador luminescente durante uma fase pós-excitação quando um tempo de vida do marcador luminescente é avaliado. A título de exemplo e não limitação, a potência de pulso pode cair até aproximadamente 20 dB, aproximadamente 40 dB, aproximadamente 80 dB ou aproximadamente 120 dB menor do que a potência de pico após 250 picossegundos. Em algumas implantações, a potência de pulso pode cair até aproximadamente 20 dB, aproximadamente 40 dB, aproximadamente 80 dB ou aproximadamente 120 dB menor do que a potência de pico após 100 picossegundos.

[00428] Uma vantagem adicional de usar pulsos de excitação ultracurtos para excitar os marcadores luminescentes é reduzir um fotobranqueamento dos marcadores. Aplicar uma energia de excitação contínua a um marcador pode branquear e/ou danificar um marcador luminescente com o tempo. Embora uma potência de pulso de pico da fonte de excitação possa ser consideravelmente maior do que um nível que pode rapidamente danificar um marcador em uma exposição contínua, o uso de pulsos ultracurtos pode aumentar a quantidade de tempo e a quantidade de medições úteis antes do marcador se tornar danificado pela energia de excitação.

[00429] Ao usar uma fonte de excitação pulsada para discernir os tempos de vida de marcadores luminescentes, o tempo entre pulsos de energia de excitação pode ser tão longo ou maior do que um tempo de vida mais longo dos marcadores a fim de observar e avaliar os eventos de emissão após cada pulso de excitação. Por exemplo, o intervalo de tempo *T* (consulte a Figura 8-0B) entre os pulsos de excita-

ção pode ser mais longo do que qualquer tempo de vida de emissão dos fluoróforos examinados. Nesse caso, um pulso subsequente pode não chegar antes de um fluoróforo excitado de um pulso anterior teve uma quantidade de tempo razoável para fluorescer. Em algumas modalidades, o intervalo *T* precisa ser longo o suficiente para determinar um tempo entre um pulso de excitação que excita um fluoróforo e um fóton subsequente emitido pelo fluoróforo após o término do pulso de excitação e antes do próximo pulso de excitação.

[00430] Embora o intervalo entre os pulsos de excitação *T* deve ser logo o suficiente para observar as propriedades de decadência dos fluoróforos, é também desejável que *T* seja curto o suficiente para permitir que muitas medições sejam feitas em um curto período de tempo. A título de exemplo e não limitação, os tempos de vida de emissão de fluoróforos usados em algumas aplicações pode ser na faixa de cerca de 100 picossegundos a cerca de 10 nanossegundos. Consequentemente, os pulsos de excitação usados para detectar e/ou discernir tais tempos de vida podem ter durações (FWHM) na faixa de cerca de 25 picossegundos a cerca de 2 nanossegundos, e podem ser fornecidos em taxas de repetição de pulso na faixa de cerca de 20 MHz a cerca de 1 GHz.

[00431] Em detalhes adicionais, quaisquer conjuntos de procedimentos adequados para modular a energia de excitação a fim de criar medições de fonte de excitação pulsada por tempo de vida podem ser usados. A modulação direta de uma fonte de excitação, tal como um laser, pode envolver modular o sinal de acionamento elétrico da fonte de excitação de modo que a potência emitida esteja na forma de pulsos. A potência de entrada para uma fonte de luz, incluindo a potência de bombeamento óptico, e a injeção de carreador e/ou remoção de carreador em estado excitado de uma porção da região de ganho, pode ser modulado para afetar o ganho do meio de ganho, o que permite

a formação de pulsos de energia de excitação através de formatação de ganho dinâmico. Adicionalmente, o fator de qualidade (Q) do ressonador óptico pode ser modulado por vários meios para formar pulsos com o uso de conjuntos de procedimentos de comutação de Q. Tais conjuntos de procedimentos de comutação de Q podem ser ativos e/ou passivos. Os modos longitudinais de uma cavidade ressonante de um laser podem ser travados em fase a fim de produzir uma série de pulsos de luz emitida através de travamento de modo. Tais conjuntos de procedimentos de travamento de modo podem ser ativos e/ou passivos. Uma cavidade de laser pode incluir uma seção de absorção separada para permitir a modulação da densidade de carreador e o controle da perda de absorção da mesma seção e, assim, fornecer mecanismos adicionais para formatar o pulso de excitação. Em algumas modalidades, um modulador óptico pode ser usado para modular um feixe de onda de luz contínua (CW) para ser na forma de um pulso de energia de excitação. Em outras modalidades, um sinal enviado para um modulador óptico acústico (AOM) acoplado a uma fonte de excitação pode ser usado para mudar a deflexão, intensidade, frequência, fase e/ou polarização da luz emitida a fim de produzir uma energia de excitação pulsada. Os AOMs podem também ser usados para uma varredura de feixe de onda contínuo, comutação de Q e/ou travamento de modo. Embora os conjuntos de procedimentos acima sejam descritos para criar uma fonte de excitação pulsada, qualquer maneira adequada para produzir uma fonte de excitação pulsada pode ser usada para medir os tempos de vida de marcadores luminescentes.

[00432] Em algumas modalidades, conjuntos de procedimentos para formar medições de fonte de excitação pulsada adequada por tempo de vida pode incluir a modulação de um sinal elétrico de entrada que aciona a emissão de fóton. Algumas fontes de excitação (por exemplo, lasers de diodo e LEDs) convertem um sinal elétrico, tal co-

mo uma corrente de entrada, em um sinal de luz. As características do sinal de luz podem depender de características do sinal elétrico. A produzir um sinal de luz pulsado, o sinal elétrico pode variar com o tempo a fim de produzir um sinal de luz variável. Modular o sinal elétrico para ter uma forma de onda específica pode produzir um sinal óptico com uma forma de onda específica. O sinal elétrico pode uma forma de onda senoidal com uma certa frequência e os pulsos de luz resultantes podem ocorrer dentro de intervalos de tempo relacionados à frequência. Por exemplo, um sinal elétrico com uma frequência de 500 MHz pode produzir um sinal de luz com pulsos a cada 2 nanossegundos. Os feixes combinados produzidos por fontes de excitação pulsada características, sejam similares ou diferentes uma da outra, pode ter uma diferença relativa de trajetória abaixo de 1 mm.

[00433] Em algumas fontes de excitação, tais como diodos de laser, o sinal elétrico muda a densidade de carreador e os fótons são produzidos através da recombinação de elétron e pares de furo. A densidade de carreador é referente ao sinal de luz de modo que quando a densidade de carreador está acima de um limiar, uma quantidade substancial de fótons coerentes é gerada por meio de uma emissão estimulada. A corrente suprida para um laser de diodo pode injetar elétrons ou carreadores no dispositivo, e através disso aumentar a densidade de carreador. Quando a densidade de carreador está acima de um limiar, os fótons podem ser gerados em uma taxa mais rápida do que a corrente que supre os carreadores, e assim a densidade de carreador pode diminuir abaixo do limiar e a geração de fóton reduz. Com a geração de fóton reduzida, a densidade de carreador começa a aumentar novamente devido a uma injeção de corrente continuada e à absorção de fótons, e, eventualmente, aumenta acima do limiar novamente. Esse ciclo leva a oscilações da densidade de carreador ao redor do valor limiar para a geração de

fóton, o que resulta em um sinal de luz oscilante. Essas dinâmicas, conhecidas como oscilações de relaxamento, podem levar a artefatos no sinal de luz devido as oscilações da densidade de carreador. Quando a corrente é inicialmente suprida para um laser, pode haver oscilações antes que o sinal de luz alcance uma potência estável devido as oscilações na densidade de carreador. Ao formar uma fonte de excitação pulsada, as oscilações da densidade de carreador podem introduzir artefatos para um sinal de luz pulsado. Por exemplo, a plotagem na Figura 8-1 ilustra como a densidade de carreador pode ter oscilações de relaxamento e um sinal de luz correspondente com uma potência de oscilação através da modulação através de comutação de ganho. Os artefatos de tais oscilações de relaxamento podem alargar um sinal de luz pulsado e/ou produzir um rastro no sinal de luz, que limita os tempos de vida que podem ser detectados por tal fonte de luz pulsada visto que o sinal de excitação pode sobrepor com fótons emitidos por um marcador luminescente.

[00434] Em algumas modalidades, os conjuntos de procedimentos para encurtar a duração de tempo de um pulso de excitação podem ser usados para reduzir a energia de excitação exigida para detectar marcadores luminescentes e através disso reduzir ou atrasar o branqueamento e outro dano aos marcadores luminescentes. Os conjuntos de procedimentos para encurtar a duração de tempo do pulso de excitação podem ser usados para reduzir a potência e/ou intensidade da energia de excitação após um valor máximo ou pico do pulso de excitação, que permite a detecção de tempos de vida mais curtos. Tais conjuntos de procedimentos podem acionar eletricamente a fonte de excitação a fim de reduzir a potência de excitação após a potência de pico. Isso pode suprimir um rastro do pulso conforme mostrado na Figura 8-2. Um sinal de acionamento elétrico pode ser ajustado para acionar a intensidade do pulso de energia de excitação até zero o mais

rápido possível após o pulso de pico. Um exemplo de um sinal de acionamento elétrico ajustado combinado com uma comutação de ganho é mostrado na Figura 8-2. Tal conjunto de procedimentos pode envolver reverter a sinalização de um sinal de acionamento elétrico após a potência de pico ser produzida. Tal sinal de acionamento elétrico ajustado pode produzir uma saída óptica mostrada na Figura 8-2. O sinal elétrico pode ser ajustado para reduzir rapidamente a densidade de carreador após a primeira oscilação de relaxamento ou primeira oscilação do sinal óptico. Reduzindo-se a densidade de carreador após a primeira oscilação, um pulso de luz apenas da primeira oscilação pode ser gerado. O sinal elétrico pode ser configurado para gerar um pulso curto que desliga o sinal de luz rapidamente reduzindo-se a quantidade de fótons emitidos após um pico no sinal, tal como mostrado pela plotagem na Figura 8-3 que mostra a saída óptica de tal sinal elétrico. Um sistema de laser de diodo de picossegundo pode ser projetado para emitir pulsos de luz de acordo com algumas modalidades. A Figura 8-4 ilustra um gráfico de um pulso de luz exemplificativo com um pico de 985 mW, uma largura de 84,3 picossegundos e um sinal reduzido em aproximadamente 24,3 dB aproximadamente 250 picossegundos após o pico. Em algumas modalidades, absorvedores passíveis de saturação, incluindo absorvedores passíveis de saturação de semicondutor (SESAMs) podem ser usados para suprimir o rastro óptico. Em tais modalidades, o uso dos absorvedores passíveis de saturação pode suprimir o rastro óptico em 3 a 5 dB ou, em alguns casos, mais do que 5 dB. Reduzir os efeitos de um rastro no pulso de excitação pode reduzir e/ou eliminar quaisquer exigências em filtragens adicionais da energia de excitação, aumentar a faixa de tempos de vida que podem ser medidas e/ou permitir taxas de pulso mais rápidas. Aumentar a taxa de pulso de excitação pode permitir que mais experimentos sejam conduzidos em um dado tempo, o que pode diminuir o tempo necessá-

rio para adquirir estatísticas suficientes para identificar um tempo de vida para um marcador que rotula um objeto de amostra.

[00435] Adicionalmente, dois ou mais desses conjuntos de procedimentos podem ser usados em união para gerar a energia de excitação pulsada. Por exemplo, a energia de excitação pulsada emitida de uma fonte diretamente modulada pode ser adicionalmente modificada com o uso de conjuntos de procedimentos de modulação óptica. As técnicas para modular o pulso de excitação e ajustar o sinal de acionamento de pulso elétrico podem ser combinadas em qualquer maneira adequada para otimizar uma energia de excitação pulsada a fim de realizar as medições de tempo de vida. Um sinal de acionamento elétrico ajustado pode ser aplicado a uma energia de excitação pulsada de uma fonte diretamente modulada.

[00436] Em algumas modalidades, um laser de diodo que tem uma certa quantidade de ligações por fio pode ser usado como uma fonte de excitação pulsada. Os diodos de laser com mais ligações por fio podem reduzir a indutância da fonte de excitação. Os diodos de laser que têm uma indutância menor podem permitir que a corrente no laser opere em uma frequência mais alta. Conforme mostrado na Figura 8-5, quando acionado por um pulso de 18 V em uma linha de transmissão de 50 ohm, a fonte de laser com resistência de série de 3 ohm e 36 ligações por fio tem uma corrente mais alta em frequências mais altas do que as fontes de laser com menos ligações por fio. Selecionar um método de empacotamento para minimizar a indutância pode aprimorar a potência suprida para a fonte de excitação em frequências mais altas, permitir pulsos de excitação mais curtos, reduções de potência óptica mais rápidas após o pico e/ou uma taxa de repetição de pulso aumentada para detectar marcadores luminescentes.

[00437] Em algumas modalidades, uma linha de transmissão em combinação com uma fonte de excitação pode ser usada para gerar

pulsos de luz. A linha de transmissão pode colocar em contiguidade a impedância de um laser de diodo a fim de aprimorar o desempenho e/ou a qualidade de pulsos de luz. Em algumas modalidades, a impedância de linha de transmissão pode ser 50 ohms. Em alguns casos, a resistência de término pode ser similar à resistência da linha a fim de evitar reflexões. Alternativa ou adicionalmente, a impedância de término pode ser similar à impedância da linha a fim de evitar reflexões. A impedância de término pode ser menor do que a impedância da linha a fim de refletir um pulso negativo. Em outras modalidades, a impedância de término pode ter um componente capacitivo ou indutivo a fim de controlar o formato do pulso de reflexão negativo. Em outras modalidades, a linha de transmissão pode permitir uma frequência maior de pulsos. A Figura 8-6A ilustra um protótipo exemplificativo de um pulsar de linha de transmissão e a Figura 8-6B ilustra pulsos de luz exemplificativos obtidos com tal linha de transmissão. Usar uma linha de transmissão pode produzir pulsos elétricos que têm uma frequência dentro de uma faixa de 40 MHz a 500 MHz. Uma linha de transmissão pode ser usada em combinação com um sinal elétrico ajustado descrito acima a fim de produzir uma fonte de luz pulsada com pulsos de luz que têm um certo tempo duração e um intervalo de tempo específico.

[00438] Os conjuntos de técnicas para ajustar o sinal elétrico a fim de aprimorar a produção de pulsos de luz podem incluir conectar a fonte de excitação a um circuito com uma capacidade de desvio negativo. Em algumas modalidades, um desvio negativo pode ser fornecido em uma fonte de excitação após um pulso de luz emitir a fim de reduzir emissão de um rastro no pulso de luz. A Figura 8-7 ilustra um circuito exemplificativo que contém uma fonte de corrente, laser de diodo, resistor, capacitor e comutador que pode ser implantado para reduzir a presença de um rastro em um pulso de luz. Tal circuito pode criar uma corrente contínua que ignora o laser de diodo quando o comutador es-

tá fechado ou em um estado de condução. Quando o comutador está aberto, o comutador pode uma resistência alta e a corrente pode fluir através do laser de diodo. Os pulsos de luz podem ser gerados abrindo-se e fechando-se o comutador a fim de fornecer uma corrente intermitente para o laser de diodo. Em alguns casos, o resistor pode ser suficientemente alto e o capacitor suficientemente pequeno de modo que haja uma tensão que atravessa o capacitor quando o comutador está aberto e o laser de diodo emite luz. Quando o comutador está fechado, a tensão através do capacitor irá desviar de modo reverso o laser de diodo. Tal desvio reverso pode reduzir ou eliminar a presença de um rastro no pulso de luz. Em tais casos, o comutador pode ser configurado para fechar após o pico do pulso de luz a fim de reduzir a potência de laser logo após o pulso de luz de pico. O valor do resistor no circuito pode ser selecionado de modo que a carga no capacitor descarregue antes do comutador ser subsequentemente aberto e/ou um pulso de luz subsequente ser gerado pelo laser de diodo.

[00439] Os componentes de circuito adicionais podem ser fornecidos para ajustar um sinal elétrico de um laser de diodo a fim de produzir pulsos de luz. Em algumas modalidades, múltiplos capacitores, resistores e múltiplas tensões podem ser conectados como um circuito de rede para controlar a forma de onda de um sinal elétrico suprido para um laser de diodo. Uma forma de onda controlada pode ser criada comutando-se uma quantidade de tensões, V1, V2, …, VN com sinais correspondentes S1, S2, …, SN quando há N subcircuitos de capacitor. Um circuito de rede exemplificativo de quatro subcircuitos de capacitor é mostrado na Figura 8-8 em que uma forma de onda elétrica controlada pode ser criada comutando-se tensões V1, V2, V3 e V4 com os sinais S1, S2, S3 e S4, respectivamente. Em algumas modalidades, as tensões V1, V2, V3 e V4 podem ser variáveis. No exemplo mostrado na Figura 8-8, V4 é negativo para o laser e pode criar um

desvio reverso dependendo do sinal S4. A temporização da frequência de pulsos de luz emitidos pelo laser, a duração de cada pulso de luz, e os recursos de cada pulso de luz podem ser ajustados com as entradas de sinal S1, S2, S3 e S4. Em algumas modalidades, uma resistência adicional pode ser adicionada para diminuir a corrente de pico. Em tais casos, a resistência pode ser adicionada após um ou mais dos comutadores S1, S2, S3, S4. Embora a Figura 8-8 mostre uma configuração com quatro capacitores e quatro tensões, qualquer configuração adequada e qualquer quantidade adequada dos componentes de circuito adicionais podem ser fornecidas a fim de produzir um sinal elétrico ajustado ao laser de diodo para gerar pulsos de luz para medições de tempo de vida.

[00440] Em algumas modalidades, um sinal elétrico para gerar pulsos de luz pode usar um circuito que tem componentes característicos, incluindo componentes de radiofrequência (RF) e/ou micro-onda. Os componentes característicos que podem ser incluídos em tal circuito são blocos de CC, adaptadores, portas lógicas, terminadores, defasadores, atrasos, atenuadores, combinadores e/ou amplificadores de RF. Tais componentes podem ser usados para criar um sinal elétrico positivo que tem uma certa amplitude seguida por um sinal elétrico negativo com outra amplitude. Pode haver um atraso entre os sinais elétricos positivos e negativos. A Figura 8-9A ilustra um circuito exemplificativo que tem um amplificador de RF que pode ser usado a fim de produzir um sinal elétrico ajustado como um pulso de saída, tal como o perfil de pulso mostrado na Figura 8-9B, que pode ser suprido para uma fonte de excitação, tal como um laser de diodo, para emitir um pulso de luz. Em outras modalidades, um circuito pode produzir múltiplos sinais elétricos combinados para formar um sinal de pulso elétrico configurado para acionar uma fonte de excitação. Tal circuito pode produzir uma saída diferencial que pode ser usada para aumentar a potência do pulso de

luz. Ajustando-se os componentes característicos do circuito, o sinal de saída elétrico pode ser ajustado a fim de produzir um pulso de luz adequado para medições de tempo de vida. Em um exemplo mostrado na Figura 8-10A, dois amplificadores de RF são usados a fim de produzir um sinal de pulso de saída que tem um perfil mostrado na Figura 8-10B que consiste em um pulso de sinal elétrico positivo e um pulso de sinal elétrico negativo correspondente em que os pulsos de sinal elétrico positivo e negativo se sobrepõem e têm uma largura similar.

[00441] Em algumas modalidades, as fontes de excitação podem ser combinadas para gerar pulsos de luz para medições de tempo de vida. As fontes pulsadas sincronizadas podem ser acopladas a um circuito ou carga por uma certa distância. Em algumas modalidades, as fontes de excitação podem ser acopladas em paralelo a um circuito. As fontes de excitação podem ser da mesma fonte ou de múltiplas fontes. Em algumas modalidades com múltiplas fontes, as múltiplas fontes podem variar em tipo de fonte de excitação. Quando combinar fontes, pode ser importante considerar a impedância do circuito e as fontes de excitação a fim de ter potência suficiente suprida para as fontes de excitação. A combinação de fontes pode ser alcançada usando-se um ou mais dos conjuntos de procedimentos descritos acima para produzir uma fonte de excitação pulsada. A Figura 8-11A ilustra a esquemática para combinar quatro diferentes fontes que tem um ou mais valores de impedância. A Figura 8-11B mostra um gráfico de corrente, eficiência de potência e tensão como uma função de impedância. Essa modalidade exemplificativa mostra 4 fontes que entregam uma potência em linhas de transmissão de 50 ohms e a mesma entrega de potência ótima ocorre quando a impedância da carga é igual à razão da impedância das linhas individuais para a quantidade de fontes.

[00442] Uma fonte de excitação pode incluir uma bateria ou qualquer outra fonte de alimentação disposta a fornecer potência para a

fonte de excitação. Por exemplo, uma fonte de excitação pode ser localizada em um instrumento base e sua potência de operação pode ser recebida através de um dispositivo de bioanálise integrado ao qual o mesmo é acoplado (por exemplo, por meio de cabos de alimentação de condução). Uma fonte de excitação pode ser controlada independentemente de um controle de um dispositivo de bioanálise integrado ou em colaboração com o mesmo. Como apenas um exemplo, os sinais de controle para uma fonte de excitação podem ser fornecidos para a fonte de excitação de modo sem fio ou por meio de uma interconexão (por exemplo, uma interconexão USB) com um computador pessoal e/ou o dispositivo de bioanálise integrada.

[00443] Em algumas implantações, uma fonte de excitação pode ser operada em uma maneira acionada por tempo e/ou sincronizada com um ou mais sensores de um dispositivo integrado. Por exemplo, uma fonte de excitação pode ser ativada para excitar um marcador luminescente, e então desativada. O sensor pode ser ativado enquanto a fonte de excitação é ativada, e então pode ser ativado para um intervalo de amostragem após a fonte de excitação ser desativada. Em algumas modalidades, o sensor pode ser ativado para um intervalo de amostragem enquanto a fonte de excitação é ativada.

IV. ALINHAMENTO DE FONTE DE EXCITAÇÃO PARA UM DISPOSITIVO INTEGRADO

[00444] O posicionamento de energia de excitação de uma ou mais fontes de excitação para um acoplador de grade em um dispositivo integrado pode ocorrer com o uso de quaisquer conjuntos de procedimentos adequados. Em algumas modalidades, a energia de excitação pode ser direcionada de uma fonte de excitação através de um ou mais componentes ópticos para um acoplador de grade. Em tais modalidades, a energia de excitação pode ser projetada no dispositivo integrado. O alinhamento de tal fonte de excitação pode ocorrer ativa-

mente posicionando-se a fonte de excitação e/ou os componentes ópticos. Em outras modalidades, uma fonte de excitação pode ser alinhada a um acoplador de grade através de componentes que posicionam a fonte de excitação em relação ao acoplador de grade. O posicionamento de tal fonte de energia de excitação pode ocorrer através de alinhamento passivo de uma fibra óptica configurada para fornecer energia de excitação em uma virola. Em tais modalidades, a fonte de excitação pode ser conectada diretamente ou indiretamente ao dispositivo integrado.

A. ALINHAMENTO ATIVO

[00445] O alinhamento de uma ou mais fontes de excitação para um dispositivo integrado pode ocorrer uma vez antes que energia de excitação seja entregue para a cavidade de amostra e/ou múltiplas vezes enquanto o dispositivo integrado é usado para uma análise. Quaisquer conjuntos de procedimentos adequados para um alinhamento e/ou uma estabilização de uma ou mais fontes de excitação podem ser usados para acoplar a energia de excitação ao dispositivo integrado. Em algumas modalidades, a fonte de excitação externa pode ser alinhada ao dispositivo integrado e então fixada em posição sem um ajuste adicional no decorrer da duração enquanto o dispositivo integrado é usado para análise. Em outras modalidades, um mecanismo de retroalimentação é fornecido para aprimorar o alinhamento da fonte de excitação ao dispositivo integrado. O mecanismo de retroalimentação pode ser usado em combinação com um operador com o uso de um mecanismo de alinhamento manual para alinhar a fonte de excitação com base no sinal de retroalimentação. Em outros casos, um mecanismo de alinhamento automático pode ajustar automaticamente o alinhamento da fonte de excitação ao dispositivo integrado com base no sinal de retroalimentação. Um alinhamento automático pode ocorrer antes da operação do dispositivo integrado ocorrer e/ou antes de ad-

quirir a medição. Um alinhamento automático pode também ocorrer durante uma operação do dispositivo integrado enquanto as medições são adquiridas. Em alguns casos, o tempo quando um alinhamento automático ocorre pode corresponder a tempos quando o sensor não adquire ativamente as medições. Reajustar o alinhamento da fonte de excitação ao dispositivo integrado pode aprimorar a estabilidade da fonte de excitação e/ou a consistência em medições de sensor com o tempo entre uma ou mais amostras.

[00446] O alinhamento pode ser ativamente controlado em múltiplas dimensões com base no sinal de retroalimentação. As múltiplas dimensões podem incluir as posições laterais x-y do feixe de energia de excitação para o acoplador de grade, o ângulo de incidência do feixe ao longo da direção do acoplador de grade, a z direção de foco do feixe e/ou um ângulo ortogonal de incidência do feixe perpendicular à direção do acoplador de grade. A fonte de excitação pode ser conectada ao dispositivo integrado através de uma montagem de quadro. Tal mecanismo de alinhamento pode ser realizado com o uso de um ou mais elementos ópticos controlados por servos. O mecanismo de alinhamento ativo pode aumentar a eficiência de acoplamento geral da fonte de excitação para a uma ou mais guias de onda no dispositivo integrado. Tal mecanismo de alinhamento pode diminuir custos adicionais associados a um dispositivo integrado descartável em comparação a outros métodos de alinhamento e/ou reduzir a área ocupada no dispositivo integrado exigido por outras abordagens de alinhamento. Adicionalmente, um mecanismo de alinhamento ativo pode reduzir o treinamento necessário para um operador operar tal dispositivo integrado e/ou sistema.

[00447] Os componentes que realizam o alinhamento podem depender da configuração da fonte de excitação e do dispositivo integrado. Em algumas modalidades, um dispositivo integrado e uma fonte de

excitação podem ser configurados em módulos separados. Um instrumento base pode incluir uma caixa escura com uma tampa e um engaste para conectar o dispositivo integrado ao conjunto de circuitos elétricos a fim de detectar um sinal elétrico do sensor no dispositivo integrado. Um módulo de fonte de excitação pode incluir uma ou mais fontes de excitação, conexões de engaste para a uma ou mais fontes de excitação e/ou componentes ópticos a fim de direcionar luz para o dispositivo integrado. Quando um laser é usado como uma fonte de excitação, o módulo de fonte de excitação pode ser chamado de um módulo de laser.

[00448] Em algumas modalidades, os componentes ópticos acoplam a fonte de excitação ao dispositivo integrado em espaço livre. O espelho e/ou os componentes ópticos adicionais podem direcionar a energia de excitação da fonte de excitação para a guia de onda. Os componentes ópticos podem aumentar a profundidade de foco da fonte de excitação. A Figura 9-1 ilustra o instrumento base 9-112 configurado para receber dispositivo integrado 9-102. O instrumento base 9-112 inclui o espelho 9-114 disposto para direcionar a energia de excitação (mostrado como linhas tracejadas) recebida do módulo de fonte de excitação 9-110 e direcionar a energia de excitação no sentido da região do dispositivo integrado 9-102, tal como a superfície próxima a um acoplador de grade. O módulo de fonte de excitação 9-110 inclui a fonte de excitação 9-106 e o mecanismo de ajuste 9-108. O mecanismo de alinhamento 9-108 pode modular as posições x, y, z, os ângulos de incidência x e y e o posicionamento z ou foco de fonte de excitação 9-206 para alinhar a fonte de excitação e/ou componentes ópticos a fim de aprimorar o acoplamento da energia de excitação ao dispositivo integrado. Tais componentes ópticos podem incluir espelhos, refletores, lentes, prismas, grades e/ou janelas inclináveis, tais como o conjunto exemplificativo de componentes ópticos dispostos na Figura 9-3.

O alinhamento de fonte de excitação 9-106 pode ser determinado através de um retorno (mostrado como uma seta sólida) do dispositivo integrado 9-102 e recebido pelo módulo de fonte de excitação 9-110 através do engaste 9-116 que acopla ao dispositivo integrado 9-102. Os sinais elétricos recebidos pelo engaste 9-116 podem indicar o alinhamento de fonte de excitação 9-106. Tais sinais elétricos podem ser usados em um processo de retorno ativo enviando-se sinais elétricos recebidos do dispositivo integrado 9-102 para o módulo de fonte de excitação 9-110 e fornecer um sinal para o mecanismo de alinhamento 9-108 que indica o ajuste de um ou mais parâmetros do mecanismo de alinhamento 9-108 e/ou da fonte de excitação 9-106. Quando o sinal elétrico é recebido pelo módulo de fonte de excitação 9-110, o mecanismo de alinhamento 9-108 pode consistir em ajustar a posição da fonte de excitação 9-106 e/ou dos componentes ópticos. Tal processo de alinhamento pode ocorrer automaticamente e/ou manualmente.

[00449] Em algumas modalidades, um espelho é fornecido como parte do módulo de fonte de excitação. A Figura 9-2 ilustra a esquemática do módulo de fonte de excitação 9-210 que inclui o espelho 9-214 configurado para direcionar energia de excitação (mostrado em linhas tracejadas) ao dispositivo integrado 9-202. O instrumento base 9-212 é configurado para receber o dispositivo integrado 9-202 e o módulo de fonte de excitação 9-210 de modo que o espelho 9-214 seja posicionado para direcionar energia de excitação da fonte de excitação 9-206 para o dispositivo integrado 9-202. O módulo de alinhamento 9-206 pode modular um ou mais parâmetros de fonte de excitação 9-206 e/ou o espelho 9-214 com base no sinal de retorno (mostrado como uma seta sólida) recebido pelo módulo de fonte de excitação 9-210 do engaste 9-216 configurado para acoplar ao 9-202. O sinal de retorno pode fornecer uma indicação do alinhamento de energia de excitação a uma região (por exemplo, acoplador de grade) do dispositivo inte-

grado 9-202. O mecanismo de alinhamento 9-208 pode modular as posições x, y, z, os ângulos de incidência x e y e o posicionamento z ou o foco de fonte de excitação 9-206 e/ou os componentes ópticos para aprimorar o acoplamento da energia de excitação ao dispositivo integrado. Tais componentes ópticos podem incluir espelhos, refletores, lentes, prismas, grades e/ou janelas inclináveis, tais como o conjunto exemplificativo de componentes ópticos dispostos na Figura 9-3.

[00450] Em algumas modalidades, a energia de excitação do módulo de fonte de excitação é acoplada ao instrumento base através de uma fibra óptica, tal como no exemplo mostrado na Figura 9-4. A fibra óptica conecta uma saída de energia de excitação do modelo de fonte de excitação para uma entrada no instrumento base. Em algumas modalidades, a fibra óptica é uma fibra de modo único. Os componentes ópticos no instrumento base direcionam a energia de excitação ao dispositivo integrado. O alinhamento da energia de excitação ao dispositivo integrado pode ocorrer através de tais componentes ópticos. O retorno de um sinal elétrico recebido pelo dispositivo integrado pode direcionar um ajuste de um ou mais componentes ópticos no instrumento base para aprimorar o alinhamento da energia de excitação ao dispositivo integrado.

[00451] Outro exemplo de um módulo de excitação que repousa no lado superior do dispositivo integrado é ilustrado nas Figuras 9-5 a 9-11. O módulo de fonte de excitação contém uma ou mais fontes de excitação além de componentes ópticos e de alinhamento para entregar energia de excitação para um ou mais acopladores de grade no dispositivo integrado posicionado em 9-501. Os componentes de alinhamento são incluídos no módulo 9-502 e são posicionados sobre o dispositivo integrado 9-501. Um alinhamento grosseiro da fonte de excitação ao dispositivo integrado pode ocorrer colocando-se rolamentos de esfera de aço na superfície do dispositivo integrado e formar, no

módulo de fonte de excitação, ranhuras magnetizadas que automaticamente registram os rolamentos de esfera de aço. Conforme mostrado na Figura 9-6, há três rolamentos de esfera de aço 9-503 ligados ao dispositivo integrado superfície 9-501 e o módulo de fonte de excitação tem três ranhuras em V radiais magnetizadas 9-504 que automaticamente registram os três rolamentos de esfera para estabilizar o posicionamento do módulo de fonte de excitação ao dispositivo integrado, incluindo todos os três graus translacionais e todos os três graus de giro de liberdade. O módulo de fonte de excitação 9-502 pode incluir um pino de dobradiça 9-505 para inclinar o módulo para longe do dispositivo integrado em uma posição para cima a fim de fornecer acesso ao dispositivo integrado. A Figura 9-6 mostra o módulo de fonte de excitação na posição para cima. A Figura 9-7 mostra o mesmo módulo de fonte de excitação na posição para baixo quando os rolamentos de esfera de aço são registrados pelas ranhuras magnetizadas. Na superfície superior do módulo de fonte de excitação há uma placa de circuito 9-506 com uma fonte de excitação, nesse exemplo um laser de diodo. A placa de circuito 9-506 com o laser de diodo, as lentes de colimação 9-508 e o dissipador de calor 9-507 são mostrados em detalhes adicionais na Figura 9-8. A placa de circuito impresso pode ter um conjunto de circuitos para acionar e apoiar o laser de diodo. Pode haver lentes de colimação focáveis para focalizar luz do laser de diodo. Adicionalmente, há um dissipador de calor que cerca o laser de diodo para dissipação de calor. O módulo de fonte de excitação tem uma porta de entrada 9-509 para o feixe de laser colimado, conforme mostrado na Figura 9-9. A porta de entrada é cercada por um bloco de condução de calor 9-510 para receber o dissipador de calor de laser de diodo. Adicionalmente, os atuadores giratórios 9-511a, 9-511b e 9-511c são fornecidos no módulo de fonte de excitação para controlar a posição x-y e o ângulo de incidência do feixe entregue ao dispositivo integrado. Os

atuadores giratórios podem ser qualquer atuador adequado que produz um movimento de giro ou torque, incluindo motores de passo e servos. Os atuadores giratórios controlam placas paralelas planas que agem como janelas inclináveis ao longo da trajetória de luz. A inclinação de cada uma das placas é controlada pelo atuador giratório correspondente. Quando usa uma fonte de luz pontual, tal como um laser de diodo, introduzir uma placa paralela plana antes de uma lente de focalização na trajetória de luz ajusta o ângulo de incidência enquanto introduz uma placa paralela plana após a lente de focalização ajustar a posição x-y do feixe. Os componentes ópticos dentro do módulo de fonte de excitação direcionam e modulam luz do laser de diodo, conforme ilustrado em uma vista de corte transversal mostrada na Figura 9-10. A trajetória do feixe de luz é denotada por linhas pontilhadas. O feixe de luz entra pela superfície superior do módulo de fonte de excitação, que está no plano de vista de trás, e é refletido por um prisma de 45 graus para propagar para o topo da vista plana da Figura 9-10. Um atuador giratório 9-511a com uma placa paralela plana 9-512 é fornecido ao longo da trajetória de luz antes de um prisma anamórfico 9-513 com um ângulo de incidência ajustável. O prisma anamórfico estica ou encolhe o feixe em uma direção para ajustar o corte transversal do feixe de um perfil elíptico para ser substancialmente mais circular em perfil. A quantidade de esticamento ou encolhimento de feixe é controlada pelo ângulo de incidência do prisma. O feixe de luz então reflete de outro prisma 9-514 para passar através de uma lente de focalização 9-515 para levar o feixe a focalizar no dispositivo integrado. O feixe de luz então passa através de mais duas janelas inclináveis 9-516 acionadas por um atuador giratório que ajusta a posição x-y do feixe no dispositivo integrado e o feixe de luz propaga perpendicularmente fora do plano de vista no sentido do visualizador na Figura 9-10. Um ponto de vista adicional que ilustra o posicionamento dos

três atuadores giratórios no módulo de fonte de excitação é mostrado na Figura 9-11.

[00452] O alinhamento ao longo da trajetória de energia de excitação de uma fonte de excitação para um dispositivo integrado pode ser realizado em qualquer tempo adequado após um dispositivo integrado se posicionado em um instrumento base. Em algumas modalidades, o alinhamento da fonte de excitação e/ou dos componentes ópticos ou no módulo de fonte de excitação ou no instrumento base é inicialmente obtido e não há um processo de realinhamento subsequente. Tal procedimento de alinhamento pode ser chamado de um alinhamento estático inicial. Um processo de alinhamento estático inicial pode ser manual, automatizado ou uma combinação de um processo manual e automatizado. Em algumas modalidades, o alinhamento da fonte de excitação e/ou dos componentes ópticos pode ser submetido a múltiplos realinhamentos em um processo de alinhamento ativo e contínuo. Um processo de alinhamento ativo e contínuo pode ser automático com base no sinal de retorno elétrico do dispositivo integrado. Em algumas modalidades, o processo de alinhamento pode incluir um alinhamento manual inicial seguido por um alinhamento ativo contínuo.

[00453] Vários possíveis parâmetros do feixe de energia de excitação podem ser ajustados durante um processo de alinhamento. Tais parâmetros podem incluir posições x-y-z, foco, ângulo em relação à guia de onda, ângulo perpendicular à guia de onda e/ou a amplificação, razão de aspecto, e/ou teor de astigmatismo do feixe. Variações para alinhamento de feixe de energia de excitação projetado para o dispositivo integrado são sumarizadas na Figura 9-12.

B. ALINHAMENTO PASSIVO

[00454] O posicionamento de uma ou mais fontes de excitação pode ocorrer através de alinhamento passivo de uma fibra óptica, que carreia energia de excitação, para um dispositivo integrado. Os conjun-

tos de procedimentos de alinhamento passivo podem incluir uma série de componentes que posicionam de modo seguro a fibra óptica em relação ao acoplador de grade a fim de acoplar uma energia de excitação a uma guia de onda. Os componentes são feitos de qualquer material adequado, incluindo plástico e metal. Os componentes de alinhamento passivo têm qualquer tamanho adequado a fim de acomodar uma fibra óptica de um certo tamanho. Adicionalmente, os componentes podem ser projetados para facilidade de conectar e desconectar uma fibra óptica a um dispositivo integrado.

[00455] Em algumas modalidades, alguns dos componentes de alinhamento passivo podem formar um receptáculo para conectar e posicionar uma virola para uma fibra óptica que carreia energia de excitação e alinha a virola em relação a um dispositivo integrado. O receptáculo pode ser feito de qualquer material adequado, tal como plástico ou metal. O receptáculo pode ser dimensionado para enquadrar a virola.

[00456] Os componentes de alinhamento passivo podem incluir componentes de referência mecânica para alcançar um posicionamento de uma fibra óptica para um dispositivo integrado. Os componentes de referência mecânica podem aprimorar a precisão de posicionamento da fibra óptica em relação a um acoplador de grade no dispositivo integrado. Os componentes de referência mecânica podem ser localizados na superfície do dispositivo integrado. Em alguns casos, os componentes de referências mecânicas definem um ângulo de alinhamento da virola para a superfície do dispositivo integrado. Os componentes de referência mecânica podem definir a distância da superfície do dispositivo integrado de modo que a virola de fibra não entre em contato com a superfície do dispositivo integrado. Adicional ou alternativamente, os componentes de referência mecânica podem fornecer um indicador para um usuário para identificar quando um alinhamento correto é alcançado. Como exemplo, uma referência mecânica pode

fornecer uma indicação visual de alinhamento correto da virola de fibra no receptáculo. Em algumas modalidades, uma presilha pode ser anexada à virola de fibra para alcançar um posicionamento de giro correto da virola de fibra em relação a um ou mais componentes de alinhamento passivos.

[00457] É ilustrada nas Figuras 9-12 a 9-16 os componentes de alinhamento passivo exemplificativos que podem formar um receptáculo e/ou referências mecânicas para uma virola de fibra. A virola de fibra tem uma parede de virola 9-1201 e um núcleo de fibra de modo único (SMF) 9-1202. Em algumas modalidades, a virola de fibra pode ter um diâmetro de 0,5 mm. Conforme mostrado na Figura 9-12, uma vista em corte transversal plano de um receptáculo exemplificativo pode incluir um componente 9-1203 com duas paredes de alinhamento para formar um receptáculo e entrar em contato com a virola de fibra quando a virola de fibra é posicionada no receptáculo. As paredes de alinhamento podem formar um canto com um ângulo de 90 graus. Em algumas modalidades, uma das paredes de alinhamento pode ser opcionalmente angulada em 5 graus de perpendicular à superfície do dispositivo integrado. Os componentes de referência mecânica podem posicionar a virola de fibra no receptáculo. Em algumas modalidades, os componentes de referência mecânica na superfície do dispositivo integrado podem incluir um primeiro cilindro de referência mecânico alinhado ao canto do receptáculo formado pelas duas paredes de alinhamento e um segundo cilindro de referência mecânico alinhado a um lado do componente de parede de alinhamento. O primeiro cilindro de referência mecânico 9-1205 pode ser chamado de "bloco de canto" e o segundo cilindro de referência mecânico 9-1204 pode ser chamado de "bloco lateral". Os cilindros de referência mecânicos podem ser formados através de eletroplaqueamento de ouro na superfície do dispositivo integrado. Componentes adicionais de referência mecânica podem

incluir um ou mais blocos de interrupção-z 9-1206 posicionados na superfície do dispositivo integrado para manter a distância entre a extremidade da virola de fibra e a superfície do dispositivo integrado. Os blocos de interrupção-z podem ser formados através de eletroplaqueamento de ouro na superfície do dispositivo integrado. Em algumas modalidades, uma presilha de plástico moldado 9-1207 pode ser anexada à virola de fibra para fornecer um alinhamento giratório em relação ao componente de parede de alinhamento para posicionar a virola no canto das duas paredes de alinhamento fixando-se ao componente de parede de alinhamento. O dispositivo integrado de plástico moldado pode também ser configurado para posicionar a virola a uma distância da superfície do dispositivo integrado, de modo a fornecer uma interrupção-z quando insere a virola no receptáculo.

[00458] A Figura 9-13 ilustra um corte transversal ao longo da linha A-A’ mostrada na Figura 9-12 de uma modalidade de um receptáculo passivo em que a virola de fibra é alinhada em relação ao dispositivo integrado superfície 9-1208. A extremidade da virola de fibra pode ser angulada para 8 graus perpendicular à direção do núcleo de fibra. Tal ângulo pode ser formado polindo-se a extremidade da virola de fibra. Um ou mais blocos de interrupção-z e/ou um bloco de canto pode ser fornecido na superfície do dispositivo integrado. Enquanto é posicionado no receptáculo, o núcleo de fibra pode sobrepor o acoplador de grade 9-1209 no dispositivo integrado a fim de acoplar a energia de excitação a um guia de onda.

[00459] Outra modalidade de alinhamento da virola de fibra é mostrada na Figura 9-14 que ilustra um corte transversal ao longo da linha A-A’ mostrada na Figura 9-12. Nessa modalidade, uma presilha de plástico moldado 9-1207 é anexada à virola de fibra 9-1201 para fornecer um posicionamento da virola de fibra 9-1201 em relação ao componente de parede de alinhamento 9-1203 de modo que a virola

esteja em contato com as paredes de alinhamento e forçada no canto de 90 graus entre as duas paredes de alinhamento. A presilha de plástico moldado anexada à virola de fibra pode também fornecer uma interrupção-z para a virola de fibra tendo-se uma seção que se estende da extremidade da virola de fibra de modo que quando a presilha de plástico moldado está em contato com o dispositivo integrado a extremidade da virola de fibra é posicionada a uma distância da superfície do dispositivo integrado.

[00460] Em outra modalidade, um degrau é formado na superfície de metal do dispositivo integrado para fornecer uma interrupção-z quando posiciona a virola de fibra. A Figura 9-15 ilustra uma vista em corte transversal de tal modalidade ao longo da linha A-A' da Figura 9-12. Conforme a virola de fibra 9-1201 é posicionada, a extremidade da virola de fibra entra em contato com o degrau 9-1210 e posiciona a virola de fibra em relação à superfície de dispositivo integrado.

[00461] A Figura 9-16 ilustra uma modalidade em que uma das paredes de alinhamento 9-1603 tem um ângulo de 5 graus em relação perpendicular à superfície de dispositivo integrado. Quando posicionada em tal receptáculo, a virola de fibra entra em contato com a parede de alinhamento angulada de modo que o núcleo de fibra esteja também em um ângulo perpendicular à superfície de dispositivo integrado. A extremidade da virola de fibra pode ser perpendicular à direção do núcleo de fibra. Em tal modalidade, a extremidade da virola de fibra pode estar no ângulo polido visto que o ângulo da fibra óptica para a superfície de dispositivo integrado é alcançado pelo ângulo da parede de alinhamento.

[00462] Em algumas modalidades, uma virola de fibra pode ser posicionada em um componente de plástico moldado substancialmente paralelo à superfície do dispositivo integrado e o componente de plástico moldado pode ter uma ou mais lentes para direcionar luz. A ener-

gia de excitação de tal virola de fibra pode propagar da fibra óptica através do componente de plástico moldado para acoplar com um acoplador de grade na superfície de dispositivo integrado. O componente de plástico moldado pode ser feito de um material que tem um índice de refração para direcionar a energia de excitação no sentido do acoplador de grade. Adicionalmente, o plástico moldado pode ser formado com ângulos de borda para direcionar a energia de excitação no sentido do acoplador de grade. Quando posicionado no componente de plástico moldado, a virola de fibra pode ser alinhada no componente de plástico moldado de modo que, através de uma combinação do índice de refração e um ou mais ângulos de borda do componente de plástico moldado, a energia de excitação pode ser direcionada no sentido do acoplador de grade no dispositivo integrado. A Figura 9-17 ilustra um componente de plástico moldado exemplificativo configurado para encaixar uma virola de fibra com um diâmetro de 500 mícrons. A energia de excitação da fibra óptica propaga através de uma superfície de colimação até uma superfície angulada e reflete da superfície angulada, de modo a propagar através do plástico moldado de um certo índice refrativo, até o acoplador de grade. O ângulo de incidência da energia de excitação na superfície de dispositivo integrado pode depender do ângulo da superfície angulada e do índice de refração do material. Em algumas modalidades, a superfície angulada pode ser angulada em 45 graus menos a razão do ângulo de incidência para índice de refração a fim de alinhar a energia de excitação ao dispositivo integrado.

[00463] A Figura 9-18 ilustra uma disposição de uma virola de fibra, um componente de parede de alinhamento e um dispositivo integrado exemplificativos. A virola de fibra é posicionada no componente de parede de alinhamento em um canto do dispositivo integrado. A virola de fibra tem um diâmetro de 0,5 mm. As paredes de alinhamento têm

0,75 mm de espessura. Os blocos de alinhamento são posicionados dentro do receptáculo e têm 200 mícrons de diâmetro. Quando posicionada em tal receptáculo, a energia de excitação da fibra óptica pode acoplar com uma guia de onda inicial alinhada na direção do dispositivo integrado que tem um certo comprimento. Em algumas modalidades, a guia de onda inicial é alinhada na direção do dispositivo integrado com um comprimento de aproximadamente 9 mm.

[00464] A Figura 9-19 ilustra acoplamento da energia de excitação do núcleo de fibra a um guia de onda por meio do acoplador de grade. Em algumas modalidades, o feixe de energia de excitação pode se expandir para 15 mícrons em diâmetro. O raio de curvatura dos recursos de acoplador de grade pode ser de aproximadamente 81 mícrons em que o acoplador de grade reorienta o feixe de excitação. O acoplador de grade pode, então, reorientar energia de excitação em direção a um sonotrodo e, por fim, um guia de onda.

[00465] Em algumas modalidades, alinhamento passivo pode ocorrer através de um feixe projetado em um acoplador. Projetar um feixe de energia de excitação pode ocorrer quando há estabilidade suficiente do aparelho óptico para permitir alinhamento apropriado. Durante a fabricação, alinhamento de um feixe pode ser definido de modo que, quando um dispositivo integrado é posicionado de modo correto, o feixe se acopla ao acoplador de grade no dispositivo integrado. O dispositivo integrado pode ser inserido com o uso de técnicas que exigem alinhamento preciso de um dispositivo integrado inserido em um módulo de laser que inclui a fonte de excitação. Como exemplo, o alinhamento de um dispositivo integrado inserido pode ser alcançado passivamente através do uso de esferas e hastes cinemáticas. Nesse caso, esferas, posicionadas no dispositivo integrado, permitem que o módulo de laser registre o dispositivo integrado e, adicionalmente, alinhem o dispositivo integrado ao módulo de laser após o dispositivo

integrado ser colocado em proximidade pelo usuário. Em algumas modalidades, a precisão de posição do dispositivo integrado está dentro do diâmetro de feixe. Como exemplo, colocar esferas em um dispositivo integrado pode permitir o posicionamento de um feixe de 20 μm para uma precisão dentro de 5 μm. Em alguns exemplos, o ângulo do feixe para o acoplador de grade pode ter precisão em dentro de alguns milirradianos. Adicionalmente, o espaçamento das esferas no dispositivo integrado pode ser ajustado para permitir colocação manual melhorada do dispositivo integrado em relação ao módulo de luz. Como exemplo, o espaçamento das esferas que tem uma separação de mais de 5 mm pode permitir precisão de milirradiano em colocação manual. Tais técnicas de alinhamento passivo podem reduzir o custo geral para o sistema e reduzir uma necessidade por técnicas de alinhamento ativo que podem interferir com a operação do sistema.

C. SENSORES DE MONITORAMENTO DE ENERGIA DE EXCITAÇÃO

[00466] Uma variedade de sensores de monitoramento pode ser formada dentro do substrato integrado e configurada para monitorar a intensidade e/ou potência de energia de excitação em localizações diferentes dentro do dispositivo integrado. Um sinal elétrico produzido por tais sensores de monitoramento pode ser usado em um processo de retorno durante a operação do dispositivo integrado. O sinal elétrico dos sinais de monitoramento também pode indicar uma qualidade reduzida da energia de excitação propagada através do dispositivo integrado, produzindo um sinal de erro para um operador. Isso pode incluir uma indicação que uma fonte de excitação tem ou está falhando. Em alguns exemplos, os sensores de monitoramento podem fornecer um sinal de retorno durante o alinhamento da energia de excitação para o acoplador de grade. Os sensores de monitoramento podem ser qualquer sensor adequado, incluindo sensores de luz como fotodetectores e fotodiodos.

[00467] Os sensores de monitoramento podem ser fornecidos para monitorar a energia de excitação ao longo de um guia de onda. Os sensores podem ser fornecidos no início do guia de onda, em que a energia de excitação se acopla inicialmente ao guia de onda, na extremidade do guia de onda após o guia de onda ter sido acoplado a uma fileira de cavidades de amostra e/ou em qualquer lugar ao longo do comprimento do guia de onda. Um acoplador de grade pode ser formado para aprimorar o acoplamento da energia de excitação fora do guia de onda a fim de ser detectado por um sensor. As informações dos sensores de monitoramento podem ser usadas para controlar partes do sistema e/ou como entradas para processamento de sinal.

[00468] Em algumas modalidades, um sensor de monitoramento é posicionado abaixo do acoplador de grade para receber energia de excitação que passa através do acoplador de grade. O sinal com base na intensidade da energia de excitação detectada por tal sensor pode ser usado para posicionar e alinhar o feixe de energia de excitação ao acoplador de grade. Em alguns exemplos, múltiplos sensores de monitoramento estão localizados abaixo do acoplador de grade. Uma camada não transparente de material, como metal, que tem múltiplos furos pode estar localizada entre o acoplador de grade e os múltiplos sensores. Cada furo na camada não transparente pode se sobrepor a cada sensor de modo que a energia de excitação que passa através do furo seja detectada pelo sensor. Detectando-se a energia de excitação que passa através de cada furo pelos múltiplos sensores, a posição do feixe de energia de excitação na grade pode ser determinada. A Figura 9-20 mostra um exemplo de tal disposição em que quatro furos 9-2010 em uma camada de metal estão posicionados para deixar a luz passar para quatro sensores 9-2008, que podem ser considerados um fotodetector de quadrante. Conforme a energia de excitação 9-2004 se acopla ao acoplador de grade 9-2002 e no interior de guia de

onda afunilado 9-2006, um pouco da energia de excitação pode passar através dos furos 9-2010 na camada de metal para um ou mais sensores 9-2008. A camada de metal pode atuar como uma camada refletora em regiões sem furos 9-2010 e pode melhorar acoplamento de energia de excitação 9-2004 para o acoplador de grade 9-2002 e o guia de onda afunilado 9-2006. O sinal dos sensores 9-2008 pode fornecer um vetor para retorno de alinhamento, com informações suficientes para deduzir tanto a magnitude quanto o sinal exigido para cada ajuste no ciclo de retorno. Em alguns exemplos, o retorno de alinhamento pode ser fornecido com cada pulso de energia de excitação. O alinhamento pode ser alcançado quando o feixe de energia de excitação está centralizado nos quatro sensores.

[00469] Em algumas modalidades, um ou mais sensores associados a cada pixel podem ser usados para monitorar e/ou alinhar a energia de excitação. A potência ou a intensidade da energia de excitação podem ser definidas como um valor baixo, como um modo de "potência baixa" e o posicionamento da fonte de excitação pode ser realizado ajustando-se uma ou mais das posições x-y-z e/ou ângulos em relação ao guia de onda no dispositivo integrado. Melhorar o alinhamento da energia de excitação pode ocorrer posicionando-se o feixe de energia de excitação quando o sinal de intensidade detectado pelos fotodetectores aumenta para um determinado valor. Em alguns exemplos, parâmetros de ajuste da fonte de excitação podem ser realizados para determinar um sinal de intensidade acima de um determinado valor, indicando alinhamento suficiente para operação.

[00470] Em algumas modalidades, sensores de monitor podem estar localizados na extremidade de cada guia de onda para detectar a quantidade de luz propagada ao longo de cada guia de onda. Uma grade associada a cada sensor de monitor pode ser posicionada de modo que a grade e o sensor de monitor estejam localizados em lados

opostos do guia de onda. Um exemplo de sensores 9-2101a e 9-2101b e grades 9-2102a e 9-2102b fornecidos em ambas as extremidades de um guia de onda é mostrado na Figura 9-21. Em alguns exemplos, sinais em ambas as extremidades do guia de onda podem ser usados para processamento de sinal adicional para compensar pela energia de excitação perdida ao longo do guia de onda. Quando um guia de onda é configurado para fornecer energia de excitação para multiplicar cavidades de amostra, compensação pela energia de excitação geral perdida ao longo do comprimento do guia de onda pode ser usada para distribuir pelo menos uma determinada quantidade de energia de excitação para cada cavidade de amostra. Adicionalmente, elementos de absorção 9-2104 na extremidade de um guia de onda podem ser posicionados para reduzir dispersão de qualquer luz restante no guia de onda, conforme mostrado nas Figuras 9-22.

[00471] De modo adicional ou alternativo, sensores de monitor podem estar localizados em posições específicas ao longo da trajetória de um guia de onda. Tais sensores de monitor podem estar posicionados antes de divisores de interferência de múltiplos modos, após divisores de interferência de múltiplos modos, antes de uma ou mais cavidades de amostra e/ou após uma ou mais cavidades de amostra. Tais localizações para sensores de monitor podem ser selecionadas com base na perda de energia de excitação pode ocorrer e/ou em que o monitoramento de perda de energia de excitação pode ser um fator na operação geral do dispositivo integrado.

[00472] Em algumas modalidades, sensores podem estar localizados em ambos os lados de uma matriz de pixel do dispositivo integrado para monitorar energia de excitação de entrada e energia de excitação de saída de um ou mais guias de onda. O dispositivo integrado pode ter um ou mais acopladores de grade para acoplar a energia de excitação de entrada em um ou mais guias de onda. Os guias de onda

de entrada podem ser divididos em múltiplos guias de onda, em que cada guia de onda dividido distribui energia de excitação para uma fileira de cavidades de amostra. Por um lado, os sensores podem monitorar a posição da energia de excitação de entrada no acoplador de grade. Os sensores, por outro lado, podem medir a energia de excitação da extremidade de um ou mais guias de onda após uma fileira de cavidades de amostra. Em algumas modalidades, o alinhamento da fonte de excitação para o dispositivo integrado pode consistir em centralizar inicialmente o feixe de energia de excitação no acoplador de grade com o uso de sinais dos sensores de entrada que indicam o posicionamento x-y do feixe e ajustam adicionalmente os parâmetros de feixe de energia de excitação, como foco e/ou um ângulo de incidência, a partir de sinais de um sensor de saída na extremidade de cada guia de onda. Em alguns exemplos, sinais dos sensores de saída podem ser usados como uma etapa de calibragem que pode ser determinada para cada dispositivo integrado prior antes de usar o dispositivo integrado para análise. Adicionalmente, sinais dos sensores de saída podem ser usados para normalizar medições obtidas com o dispositivo integrado.

[00473] As Figuras 9-22 e 9-23 ilustram disposições exemplificativas de sensores de monitoramento em que há duas colunas de sensores em ambos os lados da matriz de pixel. Cada sensor tem um espaçamento de centro para centro de duas vezes a densidade de pixel nas direções x e y. Tal disposição de sensores pode acomodar configurações diferentes de acopladores de grade. Um dos conjuntos de duas colunas monitora a energia de excitação de entrada em que um conjunto de quatro sensores em uma disposição quadrada são usados como um detector de quadrante, conforme discutido acima com em referência às Figuras 9-20. Um acoplador de grade 9-2201 pode ser posicionado sobre quatro sensores 9-2202 nas colunas de entrada

com uma camada opaca à energia de excitação entre o acoplador de grade e os sensores. Em tal configuração, os quatro sensores podem ser usados para monitorar o posicionamento do feixe de energia de excitação no acoplador de grade. Por exemplo, a intensidade medida pelos quatro sensores pode ser usada para monitorar posicionamento x-y do feixe de energia de excitação e alinhamento no acoplador de grade. As duas colunas no lado de saída podem monitorar a energia de excitação fora de guias de onda individuais. Conforme ilustrado nas Figuras 9-22, um sensor 9-2204 nas colunas de saída é conectado a um guia de onda individual 9-2203. Um acoplador de grade 9-2205 pode ser usado para acoplar a energia de excitação do guia de onda para o sensor de saída. Um sensor de saída pode monitorar a energia de excitação direcionada em um guia de onda medindo-se a potência acoplada à extremidade cada guia de onda após uma fileira de cavidades de amostra. A Figura 9-22 ilustra uma disposição de acopladores de grade exemplificativa para os guias de onda de entrada nos sensores de entrada de monitoramento, dividir, por componente 9-2206, dos guias de onda de entrada em guias de onda que distribuem energia de excitação para cavidades de amostra 9-2207 e acopladores de grade nas extremidades dos guias de onda posicionados em sensores de saída, em que cada sensor de saída é usado para monitorar um guia de onda. A Figura 9-23 ilustra uma disposição exemplificativa de um dispositivo integrado com duas colunas de sensores de monitoramento 9-2307 em ambos os lados da matriz de pixel para fornecer uma leitura de alinhamento da energia de excitação, conforme discutido acima.

D. MÚLTIPLAS FONTES DE EXCITAÇÃO

[00474] Múltiplas fontes de excitação podem fornecer luz que tem energias ou comprimentos de onda diferentes para a pluralidade de cavidades de amostra. Cada uma das múltiplas fontes de excitação

pode fornecer luz que tem um comprimento de onda ou energia de característica diferentes. Um ou mais marcadores podem ser identificados com base em se a luz de uma fonte de excitação excita um marcador de modo que o marcador emita um fóton. Dessa maneira, marcadores podem ser identificados com base em seus espectros de absorção medindo-se a resposta de uma amostra após iluminar a amostra com luz das fontes de excitação diferentes. Por exemplo, uma amostra que tem um marcador pode ser iluminada com luz de uma primeira fonte de excitação seguida por luz de uma segunda fonte de excitação. Se o marcador emitir luminescência em resposta a ser iluminado por luz da primeira fonte de excitação, então, o marcador pode ter um espectro de absorção que se sobrepõe ao comprimento de onda característico da primeira fonte de excitação.

[00475] Em algumas modalidades, é possível usar uma pluralidade de fontes de excitação para a energia de excitação. Essa pluralidade de fontes pode ser, por exemplo, implantada como uma barra de diodo de laser que compreende múltiplos emissores de laser de diodo. Na fabricação de diodos de laser, múltiplos emissores são comumente fabricados de modo litográfico em um único substrato e, então, cortado em peças de emissor único para embalagem individual. Mas também é possível cortar o substrato em peças com uma pluralidade de emissores. Em algumas modalidades, os emissores são quase idênticos e podem ser espaçados igualmente uns dos outros para tolerâncias litográficas, tipicamente da ordem de 0,1 micrômetro.

[00476] Para acoplar a luz de múltiplos emissores no dispositivo integrado, é possível imagear cada emissor em um acoplador de grade separado no dispositivo integrado. A Figura 9-24 mostra duas maneiras de acoplamento da energia de excitação ao dispositivo integrado. Em ambos os exemplos mostrados na Figura 9-24, a matriz de emissores está ao longo da linha pontilhada na esquerda e a matriz de acopladores

de grade está ao longo da linha pontilhada na direita. Os diagramas ilustram matrizes de quatro emissores e quatro acopladores de grade, mas qualquer número de emissores e acopladores é possível.

[00477] No exemplo de topo das Figuras 9-24A, duas lentes são usadas, em que a lente esquerda é pelo menos tão grande quanto a matriz de emissores e a lente direita é pelo menos tão grande quanto a matriz de acopladores de grade. Esse exemplo ilustra o caso de magnificação de unificação, mas qualquer magnificação apropriada pode ser usada, desde que cada lente seja um comprimento focal de sua matriz correspondente e desde que a distância entre as lentes é a soma de seus comprimentos focais.

[00478] No exemplo de fundo da Figura 9-24B, as matrizes de lentes são usadas para imagear os emissores para os acopladores de grade. Cada matriz de lentes pode ser implantada como uma matriz monolítica ou polilítica de lentes esféricas ou asféricas, ou como uma matriz monolítica ou polilítica de lentes cilíndricas ou acilíndricas no plano do diagrama, suplementadas por uma única lente cilíndrica ou acilíndrica na direção ortogonal. Esse exemplo ilustra o caso de magnificação de unificação, mas qualquer magnificação apropriada pode ser usada, desde que as lentes de compactação de feixe ou expansão de feixe apropriadas sejam inseridas entre as matrizes de lentes.

[00479] Cavidades de amostra e guias de onda podem estar dispostos em um dispositivo integrado em qualquer maneira adequada para permitir acoplamento de energia de excitação de múltiplas fontes de excitação com uma pluralidade de cavidades de amostra. Múltiplas fontes de excitação podem fornecer luz de comprimentos de onda característicos diferentes para a pluralidade de cavidades de amostra. Um guia de onda posicionado para receber luz das múltiplas fontes de excitação pode distribuir a luz para uma ou mais cavidades de amostra. Um dispositivo integrado pode incluir componentes adicionais (por

exemplo, divisor de potência, combinador de comprimento de onda) que permite que a luz de múltiplas fontes de excitação seja distribuída para multiplicar cavidades de amostra.

[00480] Em algumas modalidades referentes a um dispositivo integrado que tem um guia de onda configurado para propagar mais de uma característica de comprimentos de onda de luz recebidos de uma extremidade do guia de onda. Cavidades de amostra posicionadas próximas ao guia de onda podem acoplar uma porção da luz do guia de onda. A Figura 9-25A mostra um esquemático exemplificativo para acoplamento luz de duas fontes de excitação em um dispositivo integrado. Uma primeira fonte de excitação fornece luz que tem um primeiro comprimento de onda característico, λ1. Uma segunda fonte de excitação fornece luz que tem um segundo comprimento de onda característico, λ2. O dispositivo integrado inclui dois acopladores de grade: um primeiro acoplador de grade configurado para acoplar luz da primeira fonte de excitação que tem λ1 e um segundo acoplador de grade configurado para acoplar luz da segunda fonte de excitação que tem λ2. O dispositivo integrado inclui dois divisores de potência, cada um acoplado a um dos acopladores de grade. O divisor de potência acoplado ao primeiro acoplador de grade é dimensionado e conformado para fornecer múltiplas saídas configuradas para propagar a luz que tem λ1. O divisor de potência acoplado ao segundo acoplador de grade é dimensionado e conformado para fornecer múltiplas saídas configuradas para propagar a luz que tem λ2. Um combinador de comprimento de onda recebe uma saída de ambos os divisores de potência como entradas e é dimensionado e conformado para ter uma saída configurada para acoplar tanto λ1 quanto λ2 em um guia de onda. Dessa maneira, as cavidades de amostra posicionadas próximas ao guia de onda podem receber tanto λ1 quanto λ2 da primeira e da segunda fontes de excitação.

[00481] Em algumas modalidades referentes a um dispositivo integrado que tem um guia de onda configurado para propagar mais de uma característica de comprimentos de onda de luz recebidos de extremidades opostas do guia de onda. Cavidades de amostra posicionadas próximas ao guia de onda podem acoplar uma porção da luz do guia de onda. A Figura 9-25B mostra um esquemático exemplificativo para acoplamento luz de duas fontes de excitação em um dispositivo integrado. Um guia de onda no dispositivo integrado é configurado para receber luz que tem um primeiro comprimento de onda característico, λ1, de uma extremidade do guia de onda e luz que tem um segundo comprimento de onda característico, λ2, de outra extremidade do guia de onda. O dispositivo integrado inclui dois acopladores de grade: um primeiro acoplador de grade configurado para acoplar luz da primeira fonte de excitação que tem λ1 e um segundo acoplador de grade configurado para acoplar luz da segunda fonte de excitação que tem λ2. O dispositivo integrado inclui dois divisores de potência, cada um acoplado a um dos acopladores de grade. O divisor de potência acoplado ao primeiro acoplador de grade é dimensionado e conformado para fornecer uma saída configurada para propagar luz que tem λ1 e se acoplar a uma primeira extremidade de um guia de onda. O divisor de potência acoplado ao segundo acoplador de grade é dimensionado e conformado para fornecer para fornecer uma saída configurada para propagar luz que tem λ2 e se acoplar a uma segunda extremidade do guia de onda.

[00482] Em algumas modalidades referentes a um dispositivo integrado que tem dois guias de onda posicionados em relação a uma cavidade de amostra de modo que luz que se propaga em cada um dos dois guias de onda é acoplado à cavidade de amostra. Os dois guias de onda são acoplados a fontes de excitação diferentes que fornecem luz que tem comprimentos de onda característicos diferentes. A Figura

9-25C mostra um esquemático exemplificativo para acoplamento luz de duas fontes de excitação em um dispositivo integrado. Um primeiro guia de onda é configurado para propagar luz que tem um primeiro comprimento de onda característico, λ1. Um segundo guia de onda é configurado para propagar luz que tem um segundo comprimento de onda característico, λ2. Uma cavidade de amostra é posicionada para acoplar luz que tem λ1 do primeiro guia de onda e luz que tem λ2 do segundo guia de onda. O primeiro guia de onda pode receber luz de uma fonte de excitação por uma combinação de um acoplador de grade e/ou um divisor de potência configurados para propagar luz que tem λ1. O segundo guia de onda pode receber luz de uma fonte de excitação por uma combinação de um acoplador de grade e/ou divisor de potência configurados para propagar luz que tem λ2.

V. MEDIÇÕES EXEMPLIFICATIVAS COM O DISPOSITIVO INTEGRADO E FONTE DE EXCITAÇÃO

[00483] Medições para detectar, analisar e/ou sondar moléculas em uma amostra podem ser obtidas com o uso de qualquer combinação do dispositivo integrado ou dispositivo integrado e uma fonte de excitação descritos no presente pedido. A fonte de excitação pode ser uma fonte de excitação pulsada ou, em alguns casos, uma fonte de onda contínua. Um marcador luminescente rotulado a uma amostra específica pode indicar a presença da amostra. Os marcadores luminescentes podem ser distinguidos por uma energia de excitação, comprimento de onda de emissão de luminescência e/ou a vida útil de energia de emissão emitida por um marcador. Os marcadores com comprimento de onda de emissão de luminescência similar podem ser identificados determinando-se a vida útil para cada marcador. Adicionalmente, marcadores com vidas úteis similares podem ser identificados pelo comprimento de onda de emissão de luminescência para cada marcador. Usando-se marcadores, em que os marcadores são identificados por

uma combinação das propriedades temporais e/ou espectrais da luminescência emitida, uma análise quantitativa e/ou identificação de marcadores e amostras associadas pode ser realizada.

[00484] As medições de vida útil podem ser usadas para determinar que um marcador está presente em uma cavidade de amostra. A vida útil de um marcador luminescente pode ser identificada realizando-se múltiplos experimentos nos quais o marcador luminescente é excitado em um estado excitado e, então, o tempo no qual um fóton emite é medido. A fonte de excitação é pulsada para produzir um pulso de energia de excitação e direcionada no marcador. O tempo entre o pulso de excitação e um evento de emissão de fóton subsequente de um marcador luminescente é medido. Repetindo-se tais experimentos com uma pluralidade de pulsos de excitação, o número de ocasiões que um fóton emite dentro de um intervalo de tempo particular pode ser determinado. Tais resultados podem popular um histograma que representa o número de eventos de emissão de fóton que ocorrem dentro de uma série de intervalos de tempo característicos ou distâncias de tempo. O número de distâncias de tempo e/ou o intervalo de tempo de cada distância pode ser ajustado para identificar um conjunto particular de vidas úteis e/ou marcadores.

[00485] A seguir, está uma descrição de medições exemplificativas que podem ser realizadas para identificar marcadores luminescentes em algumas modalidades. Especificamente, exemplos de marcadores luminescentes de distinção com o uso de apenas uma medição de vida útil de luminescente, uma medição de vida útil de luminescente e espectral de junta e apenas uma medição de vida útil de luminescente, mas com o uso de duas energias de excitação diferentes são discutidas. As modalidades não são limitadas aos exemplos detalhados abaixo. Por exemplo, algumas modalidades podem identificar os marcadores luminescentes com o uso de apenas medições espectrais. Detalhes adici-

onais de medições exemplificativas podem ser revelados em Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/164.482, intitulado "METHODS FOR NUCLEIC ACID SEQUENCING", depositado em 20 de maio de 2015, que é incorporado a título de referência em sua totalidade.

[00486] Quaisquer marcadores luminescentes adequados podem ser usados. Em algumas modalidades, fluoróforos comercialmente disponíveis podem ser usados. A título de exemplo e não de limitação, os seguintes fluoróforos podem ser usados: Atto Rho14 ("ATRho14"), Dylight 650 ("D650"), SetaTau 647 ("ST647"), CF 633 ("C633"), CF 647 ("C647"), Alexa fluor 647 ("AF647"), BODIPY 630/650 ("B630"), CF 640R ("C640R") e/ou Atto 647N ("AT647N").

[00487] De modo adicional e/ou opcional, marcadores luminescentes podem ser modificados de qualquer maneira adequada para aumentar a velocidade e a precisão do processo de análise de amostra. Por exemplo, um fotoestabilizador pode ser conjugado com um marcador luminescente. Exemplos de fotoestabilizadores incluem, porém, sem limitação sequestrantes de oxigênio ou supressor de estado de tripleto. Conjugar fotoestabilizadores ao marcador luminescente pode aumentar a taxa de fótons emitidos e também pode reduzir um efeito "intermitente" no qual o marcador luminescente não emite fótons. Em algumas modalidades, quando um evento biológico ocorre na escala de milissegundos, uma taxa aumentada de emissão de fóton pode aumentar a probabilidade de detecção do evento biológico. As taxas aumentadas de eventos de fóton podem aumentar de modo subsequente a razão de sinal para ruído de sinal de luminescência e aumenta a taxa na qual medições de vida útil são realizadas, levando a uma análise de amostra mais rápida e mais precisa.

[00488] Além disso, o ambiente em uma cavidade de amostra de um dispositivo integrado pode ser ajustado para projetar a vida útil dos marcadores, conforme necessário. Isso pode ser alcançado reconhe-

cendo-se que a vida útil de um marcador é afetada pela densidade de estado do marcador, que pode ser ajustado com o uso do ambiente. Por exemplo, quanto mais distante um marcador está da camada de metal de fundo da cavidade de amostra, mais longa será a vida útil. Consequentemente, para aumentar a vida útil de um marcador, a profundidade de uma superfície de fundo de uma cavidade de amostra, como uma concavidade, pode se estender em uma determinada distância de uma camada de metal. Além disso, os materiais usados para formar a cavidade de amostra podem afetar a vida útil dos marcadores. Embora marcadores diferentes tenham tipicamente suas vidas úteis deslocadas na mesma direção (por exemplo, ou maior ou menor), o efeito pode escalonar de modo diferente para marcadores diferentes. Consequentemente, dois marcadores que não podem ser distinguidos por meio de medições de vida útil em espaço livre podem ser projetados para serem distinguíveis fabricando-se o ambiente de cavidade de amostra para ajustar as vidas úteis dos diversos marcadores.

A. DETECÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE MOLÉCULA ÚNICA

[00489] De acordo com um aspecto do presente pedido, uma molécula única pode ser identificada (por exemplo, distinguida de outras moléculas possíveis em uma amostra de reação) com base em uma ou mais propriedades de uma série de fótons que são emitidos a partir da molécula quando a mesma é exposta a uma pluralidade de pulsos de luz separados. Em algumas modalidades, a molécula é rotulada com um marcador luminescente. Em algumas modalidades, o marcador luminescente é um fluoróforo. Em algumas modalidades, o marcador luminescente pode ser identificado ou distinguido com base em uma propriedade do marcador luminescente. As propriedades de um marcador luminescente (por exemplo, um fluoróforo) incluem, porém, sem limitação vidas úteis de luminescente, espectros de absorção, espectros de emissão, rendimento quântico de luminescência e intensi-

dade de luminescência e combinações de dois ou mais dos mesmos.

[00490] Uma amostra biológica pode ser processada em preparação para detecção (por exemplo, sequenciamento). Tal processamento pode incluir isolamento e/ou purificação da biomolécula (por exemplo, molécula de ácido nucleico) da amostra biológica e geração de mais cópias da biomolécula. Em alguns exemplos, uma ou mais moléculas de ácido nucleico são isoladas e purificadas formam um tecido ou fluido corporal do indivíduo e amplificadas através de amplificação de ácido nucleico, como reação de cadeia de polimerase (PCR). Então, a uma ou mais subunidades ou moléculas de ácido nucleicos dos mesmos podem ser identificadas, como através de sequenciamento. No entanto, em algumas modalidades, amostras de ácido nucleico podem ser avaliadas (por exemplo, sequenciadas) conforme descrito neste pedido sem exigir amplificação.

[00491] O sequenciamento pode incluir a determinação de subunidades individuais de uma biomolécula modelo (por exemplo, molécula de ácido nucleico) sintetizando-se outra biomolécula que é complementar ou análoga ao modelo, como sintetizando-se uma molécula de ácido nucleico que é complementar a uma molécula de ácido nucleico modelo e identificando-se a incorporação de nucleotídeos com tempo (por exemplo, sequenciamento por síntese). Como alternativa, o sequenciamento pode incluir a identificação direta de subunidades individuais da biomolécula.

[00492] Durante o sequenciamento, uma enzima de polimerização pode acoplar (por exemplo, fixar) a uma localização de preparação de uma molécula de ácido nucleico-alvo. A localização de preparação pode ser um iniciador que é complementar à molécula de ácido nucleico-alvo. Como alternativa, a localização de preparação é uma lacuna ou entalhe que é fornecida dentro de um segmento entrelaçado duplo da molécula de ácido nucleico-alvo. Uma lacuna ou entalhe podem ser de

0 a pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 ou 40 nucleotídeos em comprimento. Um entalhe pode fornecer uma ruptura em um filamento de uma sequência com filamento duplo, que pode fornecer uma localização de preparação para uma enzima de polimerização, como, por exemplo, uma enzima polimerase de deslocamento de filamento.

[00493] Em alguns casos, um iniciador de sequenciamento pode ser recozido para uma molécula de ácido nucleico-alvo que pode ou não ser imobilizada para uma sustentação sólida, como uma cavidade de amostra. Em algumas modalidades, um iniciador de sequenciamento pode ser imobilizado para uma sustentação sólida e hibridação da molécula de ácido nucleico-alvo também imobiliza a molécula de ácido nucleico-alvo para a sustentação sólida. Por meio da ação de uma enzima (por exemplo, uma polimerase) com capacidade para adicionar ou incorporar um nucleotídeo ao iniciador, nucleotídeos podem ser adicionados ao iniciador em modo de ligação de modelo de 12,7 cm a 7,6 cm (5’ a 3’). Tal incorporação de nucleotídeos a um iniciador (por exemplo, por meio da ação de uma polimerase) pode, em geral, ser referenciada como uma reação de extensão de iniciador. Cada nucleotídeo pode ser associado a um marcador detectável como parte de uma etiqueta que pode ser detectada e usada para determinar cada nucleotídeo incorporado ao iniciador e, desse modo, uma sequência da molécula de ácido nucleico recém-sinterizada. Por meio de complementaridade de sequência da molécula de ácido nucleico recém sinterizada, a sequência da molécula de ácido nucleico-alvo também pode ser determinada. Em alguns casos, recozimento de um iniciador de sequenciamento para uma molécula de ácido nucleico-alvo e incorporação de nucleotídeos ao iniciador de sequenciamento pode ocorrer em condições de reação similares (por exemplo, a mesma temperatura de reação ou temperatura de reação similar) ou em condições de reação diferentes (por exemplo, temperaturas de reação diferentes).

Ademais, algum sequenciamento por métodos de síntese pode incluir a presença de uma população de moléculas de ácido nucleico-alvo (por exemplo, cópias de um ácido nucleico-alvo) e/ou uma etapa de amplificação do ácido nucleico-alvo para alcançar uma população de ácidos nucleicos-alvo.

[00494] O modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único pode ser posto em contato com um iniciador de sequenciamento, dNTPs, polimerase e outros reagentes necessários para síntese de ácido nucleico. Em algumas modalidades, todos os dNTPs apropriados podem ser postos em contato com o modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único de modo simultâneo (por exemplo, todos os dNTPs estão simultaneamente presentes) de modo que a incorporação de dNTPs possa ocorrer de modo contínuo. Em outras modalidades, os dNTPs podem ser postos em contato com o modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único de modo sequencial, em que o modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único é posto em contato com cada dNTP apropriado de modo separado, com etapas de lavagem entre contato do modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único com dNTPs diferentes. Tal ciclo de contato do modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único com cada dNTP de modo separado seguido por lavagem pode ser repetido para cada posição-base sucessiva do modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único a ser identificado.

[00495] O iniciador de sequenciamento realiza recozimento para o modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único e a polimerase, de modo consecutivo, incorpora os dNTPs (ou outros fosfatos de deoxirribonucleósideo) ao iniciador por meio do modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único. O marcador luminescente exclusivo associado a cada dNTP incorporado pode ser excitado com a luz de excitação apropriada durante ou após a incorporação do dNTP ao iniciador e sua emissão pode ser detectada de modo subsequente, com o uso de

qualquer dispositivo (ou dispositivos) e/ou método (ou métodos) adequado, incluindo dispositivos e métodos para a detecção descrita em outro local no presente documento. A detecção de uma emissão particular de luz pode ser atribuída a um dNTP particular incorporado. A sequência obtida a partir da coleta de marcadores luminescentes detectados pode, então, ser usada para determinar a sequência do modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único por meio de complementaridade de sequência.

[00496] Embora a presente revelação faça referência a dNTPs, dispositivos, sistemas e métodos fornecidos no presente documento podem ser usados com diversos tipos de nucleotídeos, como ribonucleotídeos e deoxirribonucleotídeos (por exemplo, fosfatos de deoxirribonucleotídeos com pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 grupos de fosfato). Tais ribonucleotídeos e deoxirribonucleotídeos podem formar diversos tipos de etiquetas usando-se um ligante para fixar um marcador a um ribonucleotídeo ou um deoxirribonucleotídeo.

[00497] Os sinais emitidos mediante a incorporação de nucleosídeos podem ser armazenados na memória e processados em um ponto posterior em tempo para determinar a sequência do modelo de ácido nucleico-alvo. Isso pode incluir comparar os sinais a sinais de referência para determinar as identidades dos nucleosídeos incorporados como uma função de tempo. De modo alternativo ou além disso, sinal emitido mediante a incorporação de nucleosídeo pode ser coletado e processado em tempo real (isto é, mediante a incorporação de nucleosídeo) para determinar a sequência do modelo de ácido nucleico-alvo em tempo real.

[00498] O sequenciamento de ácido nucleico de uma pluralidade de modelos de ácido nucleico-alvo de filamento único pode ser completando quando múltiplas cavidades de amostra estão disponíveis, como é o caso em dispositivos descritos em outro local no presente docu-

mento. Cada cavidade de amostra pode ser fornecida com um modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único e uma reação de sequenciamento pode ser completada em cada cavidade de amostra. Cada uma das cavidades de amostra pode ser posta em contato com os reagentes apropriados (por exemplo, dNTPs, iniciadores de sequenciamento, polimerase, cofatores, tamponamentos apropriados, etc.) necessários para síntese de ácido nucleico durante uma reação de extensão de iniciador e a reação de sequenciamento pode prosseguir em cada cavidade de amostra. Em algumas modalidades, as múltiplas cavidades de amostra são postas em contato com todos os dNTPs apropriados de modo simultâneo. Em outras modalidades, as múltiplas cavidades de amostra são postas em contato com cada dNTP apropriado de modo separado e cada um lavado em contato com dNTP diferentes. Os dNTPs incorporados podem ser detectados em cada cavidade de amostra e uma sequência determinada para o ácido nucleico-alvo de filamento único em cada cavidade de amostra conforme é descrito acima.

[00499] As modalidades direcionadas para o sequenciamento de RNA de molécula única podem usar qualquer transcriptase reversa que tem capacidade para sinterizar DNA complementar (cDNA) de um modelo de RNA. Em tais modalidades, uma transcriptase reversa pode funcionar de uma maneira similar à polimerase na qual cDNA pode ser sinterizado a partir de um modelo de RNA por meio da incorporação de dNTPs a um iniciador de transcrição reversa recozido para um modelo de RNA. O cDNA pode, então, participar em uma reação de sequenciamento e sua sequência determinada conforme descrito acima. A sequência determinada do cDNA pode, então, ser usada, por meio de complementaridade de sequência, para determinar a sequência do modelo de RNA original. Exemplos de transcriptases reversas incluem transcriptases reversas de Vírus de Leucemia Murínica de Moloney

(M-MLV), transcriptase reversa de vírus da mieloblastose aviária (AMV), transcriptases reversas de vírus de imunodeficiência humana (HIV-1) e transcriptase reversa de telomerase.

[00500] As leituras de sequência podem ser usadas para reconstruir uma região mais longa de um genoma de um indivíduo (por exemplo, por alinhamento). As leituras podem ser usadas para reconstruir regiões de cromossomo, cromossomas completos ou todo o genoma. As leituras de sequência ou uma sequência maior gerada a partir de tais leituras podem ser usadas para analisar um genoma de um indivíduo, como para identificar variantes ou polimorfismos. Exemplos de variantes incluem, porém, sem limitação, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) incluindo SNPs de tandem, deleções ou inserções de múltiplas bases de escala pequena, também referenciadas como poliformismos de inserção/deleção ou indels (DIPs), Polimorfismos de Múltiplos Nucleotídeos (MNPs), Repetições de Tandem Curtas (STRs), deleções, incluindo microdeleções, inserções, incluindo microinserções, variações estruturais, incluindo duplicações, inversões, translocações, multiplicações, variantes de múltiplos locais complexas, variações de número de cópia (CNV). As sequências genômicas podem compreender combinações de variantes. Por exemplo, sequências genômicas podem abranger a combinação de um ou mais SNPs e um ou mais CNVs.

[00501] Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base em vida útil de luminescente. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base em intensidade de luminescência. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base no comprimento de onda da energia de excitação distribuída necessária para observar um fóton emitido. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base no comprimento de onda de um fóton

emitido. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base em tanto na vida útil de luminescente quanto no comprimento de onda da energia de excitação distribuída necessária para observar um fóton emitido. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base em tanto na intensidade de luminescente quanto no comprimento de onda da energia de excitação distribuída necessária para observar um fóton emitido. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base em vida útil de luminescente, intensidade de luminescência e no comprimento de onda da energia de excitação distribuída necessária para observar um fóton emitido. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base tanto na vida útil de luminescente quanto no comprimento de onda de um fóton emitido. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base tanto em uma intensidade de luminescência quanto no comprimento de onda de um fóton emitido. Em algumas modalidades, as moléculas são identificadas ou distinguidas com base em vida útil de luminescente, intensidade de luminescência e no comprimento de onda de um fóton emitido.

[00502] Em determinadas modalidades, tipos diferentes de moléculas em um experimento ou mistura de reação são etiquetados com marcadores diferentes luminescentes. Em algumas modalidades, os marcadores diferentes têm propriedades luminescentes diferentes que podem ser distinguidas. Em algumas modalidades, os marcadores diferentes são distinguidos devido ao fato de terem vidas úteis de luminescente diferentes, intensidades de luminescência diferentes, comprimentos de onda diferentes de fótons emitidos ou uma combinação dos mesmos. A presença de uma pluralidade de tipos de moléculas com marcadores diferentes luminescentes pode permitir que etapas diferentes de uma reação complexa sejam monitoradas, ou que com-

ponentes diferentes de um produto de reação complexa sejam identificados. Em algumas modalidades, a ordem na qual os tipos diferentes de moléculas reagem ou interagem pode ser determinada.

[00503] Em determinadas modalidades, as propriedades luminescentes de uma pluralidade de tipos de moléculas com marcadores diferentes luminescentes são usadas para identificar a sequência de uma biomolécula, como um ácido nucleico ou proteína. Em algumas modalidades, as propriedades luminescentes de uma pluralidade de tipos de moléculas com marcadores diferentes luminescentes são usadas para identificar moléculas únicas conforme as mesmas são incorporadas durante a síntese de uma biomolécula. Em algumas modalidades, as propriedades luminescentes de uma pluralidade de tipos de nucleotídeos com marcadores diferentes luminescentes são usadas para identificar nucleotídeos únicos conforme os mesmos são incorporados durante uma reação de sequenciamento. Em algumas modalidades, métodos, composições e dispositivos descritos no aplicativo podem ser usados para identificar uma série de nucleotídeos que são incorporados a um produto de reação de sequenciamento de ácido nucleico dependente de modelo sinterizado por uma enzima polimerase.

[00504] Em determinadas modalidades, o produto de sequenciamento de ácido nucleico dependente de modelo é produzido ocorrendo-se naturalmente polimerases de ácido nucleico. Em algumas modalidades, a polimerase é uma variante mutante ou modificada de uma polimerase que ocorre naturalmente. Em algumas modalidades, o produto de sequência de ácido nucleico dependente de modelo irá compreender um ou mais segmentos de nucleotídeo complementares ao filamento de ácido nucleico de modelo. Em um aspecto, o pedido fornece um método para determinar a sequência de um filamento de ácido nucleico de modelo (ou alvo) determinando-se a sequência de seu filamento de ácido nucleico complementar.

[00505] Em outro aspecto, o pedido fornece métodos de sequenciamento ácidos nucleicos-alvo por sequenciamento de uma pluralidade de fragmentos de ácido nucleico, em que o ácido nucleico-alvo compreende os fragmentos. Em determinadas modalidades, o método compreende combinar uma pluralidade de sequência de fragmento para fornecer uma sequência ou sequência parcial para o ácido nucleico-alvo principal. Em algumas modalidades, a etapa de combinação é realizada por hardware e software de computador. Os métodos descritos no presente documento podem permitir que um conjunto de ácidos nucleicos-alvo relacionados, como um cromossomo ou genoma completos sejam sequenciados.

[00506] O termo "genoma", em geral, se refere a uma totalidade de informações hereditárias do organismo. Um genoma pode ser codificado ou em DNA ou em RNA. Um genoma pode compreender regiões de codificação que codificam proteínas, bem como regiões de não codificação. Um genoma pode incluir a sequência de todos os cromossomos juntos em um organismo. Por exemplo, o genoma humano tem um total de 46 cromossomos. A sequência de todos esses juntos constitui o genoma humano. Em algumas modalidades, a sequência de todo um genoma é determinada. No entanto, em algumas modalidades, informações de sequência para um subconjunto de um genoma (por exemplo, um ou alguns cromossomos, ou regiões dos mesmos) ou para um ou alguns genes (ou fragmentos dos mesmos) são suficientes para aplicações de diagnóstico, prognóstico e/ou terapêuticas.

[00507] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico-alvo usada em sequenciamento de molécula única é um modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único (por exemplo ácido deoxirribonucleico (DNA), derivados de DNA, ácido ribonucleico (RNA), derivados de RNA) que é adicionado ou imobilizado para uma cavidade de amostra que contém pelo menos um componente adicional de uma

reação de sequenciamento (por exemplo, uma polimerase como, um DNA polimerase, um iniciador de sequenciamento) imobilizada ou fixada a uma sustentação sólida como o fundo da cavidade de amostra. Em alguns casos, um iniciador de sequenciamento pode ser recozido para uma molécula-alvo de ácido nucleico que pode ou não ser imobilizada para uma sustentação sólida, como uma cavidade de amostra (por exemplo, nanoabertura). Em algumas modalidades, um iniciador de sequenciamento pode ser imobilizado para uma sustentação sólida e hibridação da molécula-alvo de ácido nucleico também imobiliza a molécula-alvo de ácido nucleico para a sustentação sólida. Em algumas modalidades, uma polimerase é imobilizada para uma sustentação sólida e iniciador solúvel e ácido nucleico-alvo são postos em contato para a polimerase. No entanto, em algumas modalidades, um complexo que compreende uma polimerase, um ácido nucleico-alvo e um iniciador é formado na solução e o complexo é imobilizado para uma sustentação sólida (por exemplo, por meio de imobilização da polimerase, iniciador e/ou ácido nucleico-alvo).

[00508] Mediante condições apropriadas, uma enzima polimerase que é posta em contato com um ácido nucleico iniciador/alvo recozido pode adicionar ou incorporar um ou mais nucleotídeos no iniciador e os nucleotídeos podem ser adicionados ao iniciador em um modo de ligação modelo de 12,7 cm a 7,6 cm (5’ a 3’). Tal incorporação de nucleotídeos em um iniciador (por exemplo, por meio da ação de uma polimerase) pode, em geral, ser referenciada como uma reação de extensão de iniciador. Cada nucleotídeo pode ser associado a um marcador detectável que pode ser detectado e identificado (por exemplo, com base em sua vida útil de luminescente, espectros de emissão, espectros de absorção e/ou outras características) e usado para determinar cada nucleotídeo incorporado ao iniciador e, desse modo, uma sequência da molécula de ácido nucleico recém sinterizada. Por meio

de complementaridade de sequência da molécula de ácido nucleico recém sinterizada, a sequência da molécula-alvo de ácido nucleico também pode ser determinada. Em algumas modalidades, algum sequenciamento por métodos de síntese pode incluir a presença de uma população de moléculas-alvo de ácido nucleico (por exemplo, cópias de um ácido nucleico-alvo) e/ou uma etapa de amplificação do ácido nucleico-alvo para alcançar uma população de ácidos nucleicos-alvo. No entanto, em algumas modalidades, sequenciamento por síntese é usado para determinar a sequência de uma molécula única em cada reação que está sendo avaliada (e amplificação de ácido nucleico não é exigida para preparar o modelo-alvo para o sequenciamento). Em algumas modalidades, uma pluralidade de reações de sequenciamento de molécula única é realizada em paralelo (por exemplo, em um único dispositivo integrado ou chip) de acordo com os aspectos do presente pedido.

[00509] As modalidades têm capacidade para sequenciamento moléculas únicas de ácido nucleico com alta precisão e comprimentos de leitura longos, como uma precisão de pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99%, 99,999% ou 99,9999%, e/ou comprimentos de leitura maiores que ou iguais a cerca de 10 pares de base (bp), 50 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 1.000 bp, 10.000 bp, 20.000 bp, 30.000 bp, 40.000 bp, 50.000 bp ou 100.000 bp.

[00510] A molécula de ácido nucleico-alvo ou a polimerase podem ser fixadas a uma cavidade de amostra, como no fundo da cavidade de amostra diretamente ou através de um ligante. A cavidade de amostra (por exemplo, nanoabertura) também pode conter quaisquer outros reagentes necessários para síntese de ácido nucleico por meio de uma reação de extensão de iniciador como, por exemplo, tampões adequados, cofatores, enzimas (por exemplo, uma polimerase) e fosfatos de deoxir-

ribonucleosídeo, como, por exemplo, trifosfatos de deoxirribonucleosídeo, incluindo trifosfato de deoxiadenosina (dATP), trifosfato de deoxicitidina (dCTP), trifosfato de deoxiguanosina (dGTP), trifosfato de deoxiuridina (dUTP) e trifosfato de deoxitimidina (dTTP) dNTPs, que incluem marcadores luminescentes, como fluoróforo. Em algumas modalidades, cada classe de dNTPs (por exemplo dNTPs que contêm adenina (por exemplo, dATP), dNTPs que contêm citosina (por exemplo, dCTP), dNTPs que contêm guanina (por exemplo, dGTP), dNTPs que contêm uracila (por exemplo, dUTPs) e dNTPs que contêm timina (por exemplo, dTTP)) é conjugada com um marcador luminescente característico de modo que a detecção de luz emitida do marcador indique a identidade do dNTP que foi incorporado ao ácido nucleico recém sinterizado. A luz emitida do marcador luminescente pode ser detectada e atribuída a seu marcador luminescente apropriado (e, desse modo, dNTP associado) por meio de qualquer dispositivo e/ou método adequado, incluindo tais dispositivos e métodos para detecção descrita em outro local no presente documento. O marcador luminescente pode ser conjugado com o dNTP em qualquer posição de modo que a presença do marcador luminescente não iniba a incorporação do dNTP ao filamento de ácido nucleico recém sinterizado ou a atividade da polimerase. Em algumas modalidades, o marcador luminescente é conjugado com o fosfato terminal (o fosfato gama) do dNTP.

[00511] Em algumas modalidades, o iniciador de sequenciamento realiza recozimento para o modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único e a polimerase, de modo consecutivo, incorpora os dNTPs (ou outros fosfatos de deoxirribonucleósideo) ao iniciador por meio do modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único. O marcador luminescente exclusivo associado a cada dNTP incorporado pode ser excitado com a luz de excitação apropriada durante ou após a incorporação do dNTP ao iniciador e sua emissão pode ser detectada de modo subsequente,

com o uso de, qualquer dispositivo (ou dispositivos) e/ou método (ou métodos) adequados, incluindo dispositivos e métodos para a detecção descrita em outro local no presente documento. A detecção de uma emissão particular de luz (por exemplo, que tem uma vida útil de emissão particular, intensidade e/ou combinação dos mesmos) pode ser atribuída a um dNTP particular incorporado. A sequência obtida a partir da coleta de marcadores luminescentes detectados pode, então, ser usada para determinar a sequência do modelo de ácido nucleico-alvo de filamento único por meio de complementaridade de sequência.

[00512] Como exemplo, a Figura 10-1 ilustra esquematicamente a configuração de um método de sequenciamento de ácido nucleico de molécula única. O exemplo não se destina a limitar a invenção de qualquer maneira. 610 é uma cavidade de amostra (por exemplo, nanoabertura) configurada para conter um único complexo que compreende uma polimerase de ácido nucleico 601, um ácido nucleico-alvo 602 a ser sequenciado e um iniciador 604. Nesse exemplo, uma região de fundo de cavidade de amostra 610 é ilustrada como um volume-alvo 620. Na Figura 10-1 o complexo que compreende polimerase 601 é confinado em volume-alvo 620. O complexo pode ser opcionalmente imobilizado fixando-se a uma superfície da cavidade de amostra. Nesse exemplo, o complexo é imobilizado por um ligante 603 que compreende uma ou mais biomoléculas (por exemplo, biotina) adequadas para fixar o ligante à polimerase 601.

[00513] O volume da cavidade de amostra também contém uma mistura de reação com solvente, tampão adequados e outros aditivos necessários para complexo de polimerase para sinterizar um filamento de ácido nucleico. A mistura de reação também contém uma pluralidade de tipos de nucleotídeos etiquetados de modo luminescente. Cada tipo de nucleotídeo é representado pelos símbolos *−A, @−T, $−G, #−C, em que A, T, G e C representam a base de nucleotídeo e os

símbolos *, @, $, e # representam um marcador luminescente exclusivo fixado a cada nucleotídeo, através do ligante −. Na Figura 10-1, um nucleotídeo #−C está sendo atualmente incorporado ao filamento complementar 602. O nucleotídeo incorporado está localizado dentro do volume-alvo 620.

[00514] A Figura 10-1 também indicam com setas o conceito de uma energia de excitação que é distribuída para uma proximidade do volume-alvo e luminescência que é emitida em direção a um detector. As setas são esquemáticas e não se destinam a indicar a orientação particular de distribuição ou luminescência de energia de excitação. Algumas luminescências podem emitir em um vetor que não é direcionado ao detector (por exemplo, em direção à parede lateral da cavidade de amostra) e podem não ser detectadas.

[00515] A Figura 10-2 ilustra esquematicamente um processo de sequenciamento em uma única cavidade de amostra ao longo do tempo. Os estágios A a D ilustram uma cavidade de amostra com um complexo de polimerase como na Figura 10-1. O estágio A ilustra o estado inicial antes de quaisquer nucleotídeos terem sido adicionados ao iniciador. O estágio B ilustra o evento de incorporação de um nucleotídeo etiquetado de modo luminescente (#−C). O estágio C, ilustra o período entre eventos de incorporação. Nesse exemplo, nucleotídeo C foi adicionado ao iniciador e a etiqueta e ligante anteriormente fixados ao nucleotídeo etiquetado de modo luminescente (#−C) que foi clivado. O estágio D ilustra um segundo evento de incorporação de um nucleotídeo etiquetado de modo luminescente (*−A). O filamento complementar após estágio D consiste no iniciador, um nucleotídeo C e um nucleotídeo A.

[00516] Os estágios A e C, ambos ilustram os períodos antes ou entre os eventos de incorporação, que são indicados nesse exemplo para durar durante cerca de 10 milissegundos. Nos estágios A e C,

devido ao fato de que não há nucleotídeo sendo incorporado, não há nucleotídeo etiquetado de modo luminescente no volume-alvo (não desenhado na Figura 10-2), através de luminescência antecedente ou luminescência artificial de um nucleotídeo etiquetado de modo luminescente que não está sendo incorporado pode ser detectado. Os estágios B e D mostram eventos de incorporação de nucleotídeos diferentes (#−C e *−A, respectivamente). Nesse exemplo, esses eventos também são indicados para durar durante cerca de 10 milissegundos.

[00517] A fileira etiquetada "dados de distância bruta" ilustra os dados gerados durante cada estágio. Durante todo o experimento exemplificativo, uma pluralidade de pulsos de luz é distribuída para a proximidade do volume-alvo. Para cada pulso, um detector é configurado para registrar qualquer fóton emitido recebido pelo detector e designar o fóton detectado para uma distância de tempo com base na duração de tempo visto desde o último pulso de energia de excitação. Nesse exemplo, há 3 distâncias, e os "dados de distância bruta" registram um valor de 1 (barras mais curtas), 2 (barras médias) ou 3 (barras mais longas), que correspondem às distâncias mais curtas, intermediárias e mais longas, respectivamente. Cada barra indica detecção de um fóton emitido.

[00518] Visto que não há nucleotídeo etiquetado de modo luminescente presente no volume-alvo para o estágio A ou C, não há fótons detectados. Para cada de estágio B e D, uma pluralidade de luminescências é detectada durante o evento de incorporação. O marcador luminescente # tem uma vida útil de luminescência mais curta que o marcador luminescente *. Os dados de estágio B são, desse modo, ilustrados como tendo valores de distância média inferiores registrados que o estágio D no qual os valores de distâncias são maiores.

[00519] A fileira etiquetada "dados processados" ilustra dados brutos que foram processados para indicar o número (contagens) de fó-

tons emitidos em tempos em relação a cada pulso. Nesse exemplo, os dados são apenas processados para determinar a vida útil de luminescente, mas os dados também são avaliados para outras propriedades luminescentes, como intensidade de luminescência ou o comprimento de onda dos fótons absorvidos ou emitidos. Os dados processados exemplificativos se aproximam de uma característica de curva de decadência exponencial para a vida útil de luminescência do marcador luminescente no volume-alvo. Devido ao fato de que o marcador luminescente # tem uma vida útil de luminescência mais curta que o marcador luminescente*, os dados processados para o estágio B tem contagens menores em durações de tempo maiores, enquanto os dados processados para o estágio D tem relativamente mais contagens em durações de tempo mais longas.

O experimento exemplificativo da Figura 10-2 identificaria os dois primeiros nucleotídeos adicionados ao filamento complementar como CA. Para DNA, a sequência do filamento-alvo imediatamente após a região recozida para o iniciador seria, desse modo, identificada como GT. Nesse exemplo, os nucleotídeos C e A poderiam ser distinguidos dentre a pluralidade de C, G, T e A, com base em vida útil de luminescente apenas. Em algumas modalidades, outras propriedades, como a intensidade de luminescência ou o comprimento de onda dos fótons absorvidos ou emitidos podem ser necessárias para distinguir um ou mais nucleotídeos particulares.

B. PROPRIEDADES LUMINESCENTES

[00520] Conforme aqui descrito, uma molécula luminescente é uma molécula que absorve um ou mais fótons e pode emitir, subsequentemente, um ou mais fótons após uma ou mais durações de tempo. A luminescência da molécula é descrita por diversos parâmetros, incluindo, mas sem limitação, tempo de vida luminescente, espectros de absorção e/ou emissão, rendimento quântico luminescente e intensi-

dade luminescente.

[00521] O fóton emitido a partir de um evento de emissão luminescente irá emitir a um comprimento de onda dentro de uma faixa espectral de possíveis e comprimentos de onda. Tipicamente, o fóton emitido tem um comprimento de onda mais longo (por exemplo, tem menos energia ou é trocado para vermelho) em comparação ao comprimento de onda do fóton de excitação. Em certas modalidades, uma molécula é identificada medindo-se o comprimento de onda de um fóton emitido. Em certas modalidades, uma molécula é definida medindo-se o comprimento de onda de uma pluralidade de fótons emitidos. Em certas modalidades, uma molécula é identificada medindo-se o espectro de emissão.

[00522] A tempo de vida luminescente se refere uma duração de tempo (por exemplo, tempo de decaimento de emissão) associada a um evento de excitação e um evento de emissão. Em algumas modalidades, a tempo de vida luminescente é expressada como a constante em uma equação de decaimento exponencial. Em algumas modalidades, em que há um ou mais eventos de pulso que entregam energia de excitação, a duração de tempo é o tempo entre o pulso e o evento de emissão subsequente.

[00523] O rendimento quântico luminescente se refere à fração de eventos de excitação em um dado comprimento de onda ou dentro de uma dada faixa espectral que leva a um evento de emissão e é tipicamente menos do que 1. Em algumas modalidades, o rendimento quântico luminescente de uma molécula descrita no presente documento está entre 0 e cerca de 0,001, entre cerca de 0,001 e cerca de 0,01, entre cerca de 0,01 e cerca de 0,1, entre cerca de 0,1 e cerca de 0,5, entre cerca de 0,5 e 0,9 ou entre cerca de 0,9 e 1. Em algumas modalidades, uma molécula é identificada determinando-se ou estimando-se o rendimento quântico luminescente.

[00524] Conforme usado no presente documento para moléculas únicas, a intensidade luminescente se refere ao número de fótons emitidos por unidade de tempo que são emitidos por uma molécula que está sendo excitada pela entrega de uma energia de excitação pulsada. Em algumas modalidades, a intensidade luminescente se refere ao número detectado de fótons emitidos per unidade de tempo que são emitidos por uma molécula que está sendo excitada pela entrega de uma energia de excitação pulsada e são detectados por um sensor específico ou um conjunto de sensores.

[00525] Em um aspecto, o pedido fornece um método de terminação da vida útil luminescente de uma molécula luminescente única que compreende: fornecer a molécula luminescente em um volume alvo; entregar uma pluralidade de pulsos de uma energia de excitação a uma adjacência do volume alvo; e detectar uma pluralidade de luminescências da molécula luminescente. Em algumas modalidades, o método compreende, ainda, registrar uma pluralidade de durações de tempo entre cada par de pulsos e luminescências e avaliar a distribuição da pluralidade de durações de tempo entre cada par de pulsos e luminescências.

C. NUCLEOTÍDEOS IDENTIFICADOS DE MODO LUMINESCENTE

[00526] Em um aspecto, métodos e composições descritas no presente documento compreendem um ou mais nucleotídeos identificados de modo luminescente. Em certas modalidades, um ou mais nucleotídeos compreendem nucleosídeos de desoxirribose. Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos compreendem nucleosídeos de desoxirribose. Em certas modalidades, um ou mais nucleotídeos compreendem nucleosídeos de ribose. Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos compreendem nucleosídeos de ribose. Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos compreendem um açúcar de ribose modificado ou análogo de ribose (por exemplo, ácido nucleico blo-

queado). Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos compreendem bases de ocorrência natural (por exemplo, citosina, guanina, adenina, timina, uracila). Em algumas modalidades, um ou mais nucleotídeos compreendem derivados ou análogos de citosina, guanina, adenina, timina ou uracila.

[00527] Em certas modalidades, um método compreende a etapa de expor um complexo de polimerase a uma pluralidade de nucleotídeos identificados de modo luminescente. Em certas modalidades, uma composição ou dispositivo compreende uma mistura de reação que compreende uma pluralidade de nucleotídeos identificados de modo luminescente. Em algumas modalidades, a pluralidade de nucleotídeos compreende quatro tipos de nucleotídeos. Em algumas modalidades, os quatro tipos de nucleotídeos compreendem, cada um, um dentre citosina, guanina, adenina e timina. Em algumas modalidades, os quatro tipos de nucleotídeos compreendem, cada um, um dentre citosina, guanina, adenina e uracila.

[00528] O termo "ácido nucleico" conforme usado no presente documento, se refere geralmente a uma molécula que compreende uma ou mais subunidades de ácido nucleico. Um ácido nucleico pode incluir uma ou mais subunidades selecionadas a partir de adenosina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) e uracila (U) ou variantes das mesmas. Em alguns exemplos, um ácido nucleico é ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) ou derivados dos mesmos. Um ácido nucleico pode ter cadeia simples ou cadeia dupla. Um ácido nucleico pode ser circular.

[00529] O termo "nucleotídeo', conforme usado aqui, geralmente se refere a uma subunidade de ácido nucleico que pode incluir A, C, G, T ou U, ou variantes ou análogos dos mesmos. Um nucleotídeo pode incluir qualquer subunidade que pode ser incorporada em uma cadeia de ácido nucleico crescente. Tal subunidade pode ser uma A, C, G, T

ou U ou qualquer outra subunidade que é específica a uma ou mais A, C, G, T ou U complementar, ou complementar a uma purina (isto é, A ou G, ou variante ou análogos dos mesmos) ou uma pirimidina (isto é, C, T ou U, ou variante ou análogos dos mesmos). Uma subunidade pode permitir que bases de ácido nucleico individuais ou grupos de bases (por exemplo, AA, TA, AT, GC, CG, CT, TC, GT, TG, AC, CA ou contrapartidas de uracila das mesmas) sejam solucionadas.

[00530] Um nucleotídeo geralmente inclui um nucleosídeo e pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais grupos fosfato (PO3). Um nucleotídeo pode incluir uma nucleobase, um açúcar com cinco carbonos (ou ribose ou desoxirribose) e um ou mais grupos fosfato. Ribonucleotídeos são nucleotídeos em que o açúcar é ribose. Desoxirribonucleotídeos são nucleotídeos em que o açúcar é desoxirribose. Um nucleotídeo pode ser um monofosfato de nucleosídeo ou um polifosfato de nucleosídeo. Um nucleotídeo pode ser um polifosfato de desoxirribonucleosídeo, tal como, por exemplo, um trifosfato de desoxirribonucleosídeo que pode ser selecionado a partir de trifosfato de desoxiadenosina (dATP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), trifosfato de desoxiuridina (dUTP) e trifosfato de desoxitimidina (dTTP) dNTPs que incluem marcadores detectáveis (por exemplo, fluoróforos).

[00531] Um polifosfato de nucleosídeo pode ter ‘n’ grupos fosfato, em que ‘n’ é um número que é maior que ou igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10. Exemplos de polifosfato de nucleosídeos incluem difosfato de nucleosídeo e trifosfato de nucleosídeo. Um nucleotídeo pode ser um fosfato terminal identificado como nucleosídeo, tal como um fosfato terminal identificado como polifosfato de nucleosídeo. Tal marcador pode ser um marcador luminescente (por exemplo, fluorescente ou quemiluminescente), um marcador fluorogênico, um marcador colorido, um marcador cromogênico, uma etiqueta de massa, um marcador

eletrostático ou um marcador eletroquímico. Um marcador pode ser acoplado a um fosfato terminal através de um ligante. O ligante pode incluir, por exemplo, pelo menos um ou uma pluralidade de grupos hidroxila, grupos sulfidrila, grupos amino ou grupos haloalquila que podem ser adequados para formar, por exemplo, um éster de fosfato, um tioéster, um fosforamidato ou uma ligação de fosfonato de alquila no fosfato terminal de um nucleotídeo natural ou modificado. Um ligante pode ser clivado de modo a separar um marcador do fosfato terminal, tal como com o auxílio de uma enzima de polimerização. Exemplos de nucleotídeos e ligantes são fornecidos no Pedido nº U.S. 7.041.812 que é incorporado totalmente no presente documento a título de referência.

D. MARCADORES

[00532] Em certas modalidades, a molécula incorporada é uma molécula luminescente, por exemplo, sem fixação a um marcador luminescente característico. Um nucleotídeo e aminoácidos típicos não são luminescentes ou não luminescem dentro de faixas adequadas de energias de excitação e emissão. Em certas modalidades, a molécula incorporada compreende um marcador luminescente. Em certas modalidades, a molécula incorporada é um nucleotídeo identificado de modo luminescente. Em certas modalidades, a molécula incorporada é um aminoácido identificado de modo luminescente ou tRNA identificado de modo luminescente. Em algumas modalidades, um nucleotídeo identificado de modo luminescente compreende um nucleotídeo e um marcador luminescente. Em algumas modalidades, um nucleotídeo identificado de modo luminescente compreende um nucleotídeo, um marcador luminescente e um ligante. Em algumas modalidades, o marcador luminescente é um fluoróforo.

[00533] Para sequenciamento de nucleotídeos, certas combinações de nucleotídeos identificados de modo luminescente podem ser preferenciais. Em algumas modalidades, pelo menos um dos nucleotídeos

identificados de modo luminescente compreende um corante de cianina ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, pelo menos um nucleotídeo identificado de modo luminescente compreende um corante de rodamina ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, pelo menos um dos nucleotídeos identificados de modo luminescente compreende um corante de cianina ou um análogo do mesmo e pelo menos um nucleotídeo identificado de modo luminescente compreende um corante de rodamina ou um análogo do mesmo.

[00534] Em certas modalidades, o marcador luminescente é um corante selecionado da Tabela FL-1. Os corantes listados na Tabela FL-1 não são limitadores e os marcadores luminescentes do pedido podem incluir corantes não listados na Tabela FL -1. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de um ou mais nucleotídeos identificados de modo luminescente são selecionados a partir da Tabela FL-1. Em certas modalidades, os marcadores luminescentes de quatro ou mais nucleotídeos identificados de modo luminescente são selecionados a partir da Tabela FL-1.

TABELA FL-1. FLUORÓFOROS EXEMPLIFICATIVOS.

Fluoróforos			
5/6-Carboxyrhodamine 6G	CF532	DyLight 747-B3	Dyomics-781
5- Carboxyrhodamine 6G	CF543	DyLight 747-B4	Dyomics-782
6- Carboxyrhodamine 6G	CF546	DyLight 755	Dyomics-800
6-TAMRA	CF555	DyLight 766Q	Dyomics-831
Abberior Star 440SXP	CF568	DyLight 775-B2	eFluor 450
Abberior Star 470SXP	CF594	DyLight 775-B3	Eosin
Abberior Star 488	CF620R	DyLight 775-B4	FITC
Abberior Star 512	CF633	DyLight 780-B1	Fluorescein
Abberior Star 520SXP	CF633-V1	DyLight 780-B2	HiLyte Fluor 405

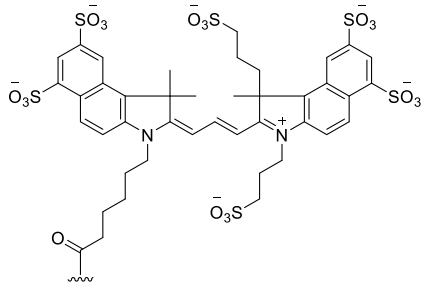
Fluoróforos			
Abberior Star 580	CF640R	DyLight 780-B3	HiLyte Fluor 488
Abberior Star 600	CF640R-V1	DyLight 800	HiLyte Fluor 532
Abberior Star 635	CF640R-V2	DyLight 830-B2	HiLyte Fluor 555
Abberior Star 635P	CF660C	Dyomics-350	HiLyte Fluor 594
Abberior Star RED	CF660R	Dyomics-350XL	HiLyte Fluor 647
Alexa Fluor 350	CF680	Dyomics-360XL	HiLyte Fluor 680
Alexa Fluor 405	CF680R	Dyomics-370XL	HiLyte Fluor 750
Alexa Fluor 430	CF680R-V1	Dyomics-375XL	IRDye 680LT
Alexa Fluor 480	CF750	Dyomics-380XL	IRDye 750
Alexa Fluor 488	CF770	Dyomics-390XL	IRDye 800CW
Alexa Fluor 514	CF790	Dyomics-405	JOE
Alexa Fluor 532	Chromeo 642	Dyomics-415	LightCycler 640R
Alexa Fluor 546	Chromis 425N	Dyomics-430	LightCycler Red 610
Alexa Fluor 555	Chromis 500N	Dyomics-431	LightCycler Red 640
Alexa Fluor 568	Chromis 515N	Dyomics-478	LightCycler Red 670
Alexa Fluor 594	Chromis 530N	Dyomics-480XL	LightCycler Red 705
Alexa Fluor 610-X	Chromis 550A	Dyomics-481XL	Lissamine Rhodamine B
Alexa Fluor 633	Chromis 550C	Dyomics-485XL	Napthofluorescein
Alexa Fluor 647	Chromis 550Z	Dyomics-490	Oregon Verde 488
Alexa Fluor 660	Chromis 560N	Dyomics-495	Oregon Verde 514
Alexa Fluor 680	Chromis 570N	Dyomics-505	Pacific Blue
Alexa Fluor 700	Chromis 577N	Dyomics-510XL	Pacific Green
Alexa Fluor 750	Chromis 600N	Dyomics-511XL	Pacific Orange
Alexa Fluor 790	Chromis 630N	Dyomics-520XL	PET
AMCA	Chromis 645A	Dyomics-521XL	PF350

Fluoróforos			
ATTO 390	Chromis 645C	Dyomics-530	PF405
ATTO 425	Chromis 645Z	Dyomics-547	PF415
ATTO 465	Chromis 678A	Dyomics-547P1	PF488
ATTO 488	Chromis 678C	Dyomics-548	PF505
ATTO 495	Chromis 678Z	Dyomics-549	PF532
ATTO 514	Chromis 770A	Dyomics-549P1	PF546
ATTO 520	Chromis 770C	Dyomics-550	PF555P
ATTO 532	Chromis 800A	Dyomics-554	PF568
ATTO 542	Chromis 800C	Dyomics-555	PF594
ATTO 550	Chromis 830A	Dyomics-556	PF610
ATTO 565	Chromis 830C	Dyomics-560	PF633P
ATTO 590	Cy3	Dyomics-590	PF647P
ATTO 610	Cy3.5	Dyomics-591	Quasar 570
ATTO 620	Cy3B	Dyomics-594	Quasar 670
ATTO 633	Cy5	Dyomics-601XL	Quasar 705
ATTO 647	DyLight 350	Dyomics-605	Rhodamine 123
ATTO 647N	DyLight 405	Dyomics-610	Rhodamine 6G
ATTO 655	DyLight 415-Co1	Dyomics-615	Rhodamine B
ATTO 665	DyLight 425Q	Dyomics-630	Rhodamine Green
ATTO 680	DyLight 485-LS	Dyomics-631	Rhodamine Green-X
ATTO 700	DyLight 488	Dyomics-632	Rhodamine Red
ATTO 725	DyLight 504Q	Dyomics-633	ROX
ATTO 740	DyLight 510-LS	Dyomics-634	Seta 375
ATTO Oxa12	DyLight 515-LS	Dyomics-635	Seta 470
ATTO Rho101	DyLight 521-LS	Dyomics-636	Seta 555
ATTO Rho11	DyLight 530-R2	Dyomics-647	Seta 632

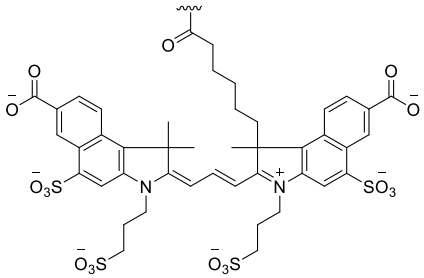
Fluoróforos			
ATTO Rho12	DyLight 543Q	Dyomics-647P1	Seta 633
ATTO Rho13	DyLight 550	Dyomics-648	Seta 650
ATTO Rho14	DyLight 554-R0	Dyomics-648P1	Seta 660
ATTO Rho3B	DyLight 554-R1	Dyomics-649	Seta 670
ATTO Rho6G	DyLight 590-R2	Dyomics-649P1	Seta 680
ATTO Thio12	DyLight 594	Dyomics-650	Seta 700
BD Horizon V450	DyLight 610-B1	Dyomics-651	Seta 750
BODIPY 493/501	DyLight 615-B2	Dyomics-652	Seta 780
BODIPY 530/550	DyLight 633	Dyomics-654	Seta APC-780
BODIPY 558/568	DyLight 633-B1	Dyomics-675	Seta PerCP-680
BODIPY 564/570	DyLight 633-B2	Dyomics-676	Seta R-PE-670
BODIPY 576/589	DyLight 650	Dyomics-677	Seta646
BODIPY 581/591	DyLight 655-B1	Dyomics-678	SeTau 380
BODIPY 630/650	DyLight 655-B2	Dyomics-679P1	SeTau 405
BODIPY 650/665	DyLight 655-B3	Dyomics-680	SeTau 425
BODIPY FL	DyLight 655-B4	Dyomics-681	SeTau 647
BODIPY FL-X	DyLight 662Q	Dyomics-682	Square 635
BODIPY R6G	DyLight 675-B1	Dyomics-700	Square 650
BODIPY TMR	DyLight 675-B2	Dyomics-701	Square 660
BODIPY TR	DyLight 675-B3	Dyomics-703	Square 672
C5.5	DyLight 675-B4	Dyomics-704	Square 680
C7	DyLight 679-C5	Dyomics-730	Sulforhodamine 101
CAL Flúor Gold 540	DyLight 680	Dyomics-731	TAMRA
CAL Flúor Green 510	DyLight 683Q	Dyomics-732	TET
CAL Flúor Orange 560	DyLight 690-B1	Dyomics-734	Texas Red
CAL Fluor Red 590	DyLight 690-B2	Dyomics-749	TMR

Fluoróforos			
CAL Fluor Red 610	DyLight 696Q	Dyomics-749P1	TRITC
CAL Fluor Red 615	DyLight 700-B1	Dyomics-750	Yakima Yellow
CAL Fluor Red 635	DyLight 730-B1	Dyomics-751	Zenon
Cascade Blue	DyLight 730-B2	Dyomics-752	Zy3
CF350	DyLight 730-B3	Dyomics-754	Zy5
CF405M	DyLight 730-B4	Dyomics-776	Zy5.5
CF405S	DyLight 747	Dyomics-777	Zy7
CF488A	DyLight 747-B1	Dyomics-778	
CF514	DyLight 747-B2	Dyomics-780	

[00535] Em certas modalidades, o marcador luminescente pode ser (Corante 101) ou (Corante 102) das fórmulas:



(Corante 101),



(Corante 102),

ou um análogo dos mesmos. Em algumas modalidades, cada sulfonato ou carboxilato é protonado de modo independentemente opcional. Em algumas modalidades, os corantes acima são fixados ao ligante ou nucleotídeo pela formação de uma ligação de amida no ponto indicado de fixação.

[00536] Em certas modalidades, pelo menos um tipo, pelo menos dois tipos, pelo menos três tipos ou pelo menos quatro dos tipos de

nucleotídeos identificados de modo luminescente compreendem um marcador luminescente selecionado a partir do grupo que consiste em 6-TAMRA, 5/6-Carboxirodamina 6G, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 647, Aberrior Star 635, ATTO 647N, ATTO Rho14, Chromis 630, Chromis 654A, Chromeo 642, CF514, CF532, CF543, CF546, CF546, CF555, CF568, CF633, CF640R, CF660C, CF660R, CF680R, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Dyomics-530, Dyomics-547P1, Dyomics-549P1, Dyomics-550, Dyomics-554, Dyomics-555, Dyomics-556, Dyomics-560, Dyomics-650, Dyomics-680, DyLight 554-R1, DyLight 530-R2, DyLight 594, DyLight 635-B2, DyLight 650, DyLight 655-B4, DyLight 675-B2, DyLight 675-B4, DyLight 680, HiLyte Fluor 532, HiLyte Fluor 555, HiLyte Fluor 594, LightCycler 640R, Seta 555, Seta 670, Seta700, SeTau 647 e SeTau 665 ou são fórmulas (Corante 101) ou (Corante 102), conforme aqui descrito.

[00537] Em algumas modalidades, pelo menos um tipo, pelo menos dois tipos, pelo menos três tipos, ou pelo menos quatro dos tipos de nucleotídeos identificados de modo luminescente compreendem um marcador luminescente selecionado a partir do grupo que consiste em Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, CF532, CF543, CF555, CF594, Cy3, DyLight 530-R2, DyLight 554-R1, DyLight 590-R2, DyLight 594 e DyLight 610-B1 ou são de fórmulas (Corante 101) ou (Corante 102).

[00538] Em algumas modalidades, um primeiro e um segundo tipo de nucleotídeo identificado de modo luminescente compreendem um marcador luminescente selecionado a partir do grupo que consiste em Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, CF532, CF543, CF555, Cy3, DyLight 530-R2 e DyLight 554-R1 e um terceiro e um quarto tipo de nucleotídeo identificado de modo luminescente compreendem um marcador luminescente selecionado a partir do grupo que consiste em Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, CF594, DyLight 590-R2,

DyLight 594 e DyLight 610-B1 ou são das fórmulas (Corante 101) ou (Corante 102).

E. LIGANTES

[00539] Um marcador luminescente pode ser fixado à molécula diretamente, por exemplo, por uma ligação ou pode ser fixado através de um ligante. Em certas modalidades, o ligante compreende um ou mais fosfatos. Em algumas modalidades, um nucleosídeo é conectado a um marcador luminescente através de um ligante que compreende um ou mais fosfatos. Em algumas modalidades, um nucleosídeo é conectado a um marcador luminescente através de um ligante que compreende três ou mais fosfatos. Em algumas modalidades, um nucleosídeo é conectado a um marcador luminescente através de um ligante que compreende quatro ou mais fosfatos.

[00540] Em certas modalidades, um ligante compreende uma cadeia alifática. Em algumas modalidades, um ligante compreende $-(CH_2)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 20, inclusivo. Em algumas modalidades, n é um número inteiro de 1 a 10, inclusivo. Em certas modalidades, um ligante compreende uma cadeia heteroalifática. Em algumas modalidades, um ligante compreende uma porção de polietileno glicol. Em algumas modalidades, um ligante compreende uma porção de polipropileno glicol. Em algumas modalidades, um ligante compreende $-(CH_2CH_2O)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 20, inclusivo. Em algumas modalidades, um ligante compreende $-(CH_2CH_2O)_n-$, em que n é um número inteiro de 1 a 10, inclusivo. Em certas modalidades, um ligante compreende $-(CH_2CH_2O)_4-$. Em certas modalidades, um ligante compreende um ou mais arilenos. Em algumas modalidades, um ligante compreende um ou mais fenilenos (por exemplo, fenileno substituído por para). Em certas modalidades, um ligante compreende um centro quiral. Em algumas modalidades, um ligante compreende prolina ou um derivado da mesma. Em algumas modali-

dades, um ligante compreende um hexâmero de prolina ou um derivado do mesmo. Em algumas modalidades, um ligante compreende cumarina ou um derivado da mesma. Em algumas modalidades, um ligante compreende naftaleno ou um derivado do mesmo. Em algumas modalidades, um ligante compreende antraceno ou um derivado do mesmo. Em algumas modalidades, um ligante compreende uma polifenilamida ou um derivado da mesma. Em algumas modalidades, um ligante compreende cromanona ou um derivado da mesma. Em algumas modalidades, um ligante compreende 4-aminopropargil-L-fenilalanina ou um derivado da mesma. Em certas modalidades, um ligante compreende um polipeptídeo.

[00541] Em algumas modalidades, um ligante compreende um oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, um ligante compreende dois oligonucleotídeos recozidos. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo ou oligonucleotídeos compreendem nucleotídeos de desoxirribose, nucleotídeo de ribose ou nucleotídeos de ribose bloqueados. Em certas modalidades, um ligante compreende um fotoestabilizador.

F. PREPARAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE CAVIDADE DE AMOSTRA

[00542] Em certas modalidades, um método de detecção de uma ou mais moléculas identificadas de modo luminescente é realizado com as moléculas confinadas a um volume alvo. Em algumas modalidades, o volume alvo é uma região dentro de uma cavidade de amostra (por exemplo, uma nanopassagem). Em certas modalidades, a cavidade de amostra compreende uma superfície de fundo que compreende um primeiro material e paredes laterais formadas por uma pluralidade de camadas de metal ou de óxido metálico. Em algumas modalidades, o primeiro material é um material transparente ou vidro. Em algumas modalidades, a superfície de fundo é plana. Em algumas modalidades, a superfície de fundo é uma cavidade curvada. Em algumas modalidades, a superfície de fundo inclui uma porção das paredes late-

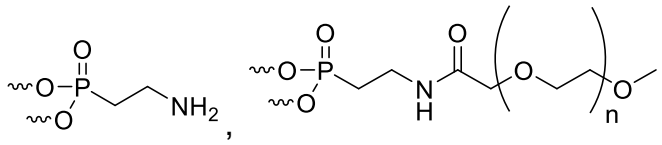
rais abaixo das paredes laterais formadas por uma pluralidade de camadas de metal ou de óxido metálico. Em algumas modalidades, o primeiro material é sílica infundida ou dióxido de silício. Em algumas modalidades, a pluralidade de camadas compreende, cada uma, um metal (por exemplo, Al, Ti) ou óxido metálico (por exemplo, Al_2O_3, TiO_2, TiN).

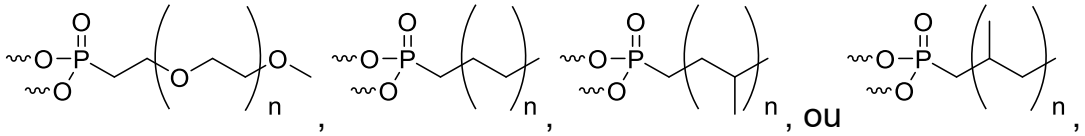
G. PASSIVAÇÃO

[00543] Em algumas modalidades quando uma ou mais molécula ou complexo é imobilizada em uma superfície, é desejável passivar outras superfícies do dispositivo para evitar imobilizado em um local indesejado. Em algumas modalidades, a molécula ou complexo é imobilizado em uma superfície de fundo de uma cavidade de amostra e as paredes laterais da cavidade de amostra são passivadas. Em algumas modalidades, as paredes laterais são passivadas pelas etapas de: depositar uma camada de barreira de metal ou óxido metálico nas superfícies de parede lateral; e aplicar um revestimento à camada de barreira. Em algumas modalidades, a camada de barreira de óxido metálico compreende óxido de alumínio. Em algumas modalidades, a etapa de deposição compreende depositar a camada de barreira de metal ou óxido metálico nas superfícies de parede lateral e na superfície de fundo. Em algumas modalidades, a etapa de deposição compreende, ainda, gravar uma camada de barreira de metal ou óxido metálico camada de barreira na superfície de fundo.

[00544] Em algumas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende grupos fosfonato. Em algumas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende grupos fosfonato com uma cadeia de alquila. Em algumas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende um polifosfonato polimérico. Em algumas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende ácido polivinilfosfônico (PVPA). Em algumas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende grupos fosfonato com

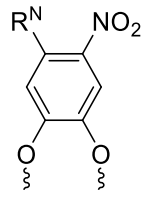
uma cadeia de alquila substituída. Em algumas modalidades, a cadeia de alquila compreende uma ou mais amidas. Em algumas modalidades, a cadeia de alquila compreende uma ou mais cadeias de poli(etilenoglicol). Em algumas modalidades, o revestimento compreende grupos fosfonato de fórmula:


,


, ou

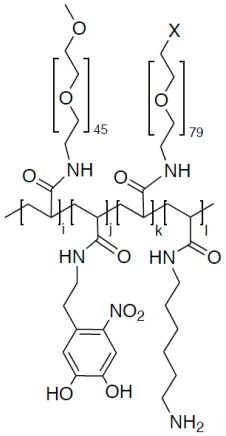
em que n é um número inteiro entre 0 e 100, inclusivo e 〰 é hidrogênio ou um ponto de fixação à superfície. Em algumas modalidades n é um número inteiro entre 3 e 20, inclusivo. Em algumas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende uma mistura de diferentes tipos de grupos fosfonato. Em algumas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende uma mistura de grupos fosfonato que compreende cadeias de poli(etilenoglicol) de peso de PEG diferente.

[00545] Em certas modalidades, a camada de barreira compreende grupos nitrodopa. Em certas modalidades, o revestimento de camada de barreira compreende grupos de fórmula:


,

em que R^N é uma cadeia de alquila opcionalmente substituída e 〰 é hidrogênio ou um ponto de fixação à superfície. Em algumas modalidades, R^N compreende um polímero. Em algumas modalidades, R^N compreende uma poli(lisina) ou um poli(etilenoglicol). Em algumas modalidades, a camada de barreira compreende um copolí-

mero de poli(lisina) que compreende monômeros de lisina, em que os monômeros de lisina compreendem, independentemente, PEG, grupos nitrodopa, grupos fosfonato ou aminas primárias. Em certas modalidades, a camada de barreira compreende um polímero de fórmula (**P**):



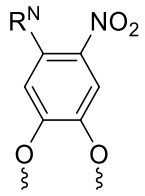
(**P**)

em algumas modalidades, X é −OMe, um grupo biotina, fosfonato ou silano. Em algumas modalidades, cada um dentre i, j, k e l é independentemente um número inteiro entre 0 e 100, inclusivo.

H. IMOBILIZAÇÃO DE POLIMERASE

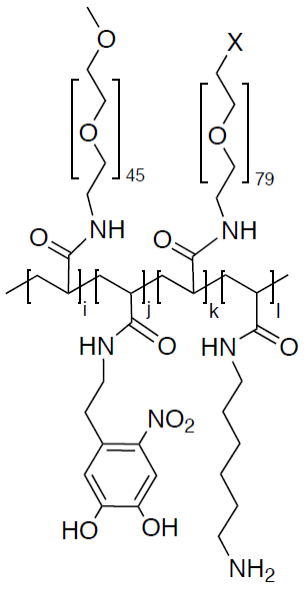
[00546] Em algumas modalidades, quando uma ou mais molécula ou complexo é imobilizada em uma superfície, a superfície é funcionalizada para permitir a fixação de uma ou mais dentre as moléculas ou complexos. Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é uma superfície de fundo de uma cavidade de amostra. Em certas modalidades, a superfície funcionalizada compreende um vidro transparente. Em certas modalidades, a superfície funcionalizada compreende sílica infundida ou dióxido de silício. Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com um silano. Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com um polímero carregado ionicamente. Em algumas modalidades, o polímero carregado ionicamente compreende poli(lisina). Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com poli(lisina)-enxerto-poli(etilenoglicol). Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com albumina sérica bovina biotiniliada (BSA).

[00547] Em certas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com um revestimento que compreende grupos nitrodopa. Em certas modalidades, o revestimento compreende grupos de fórmula:



,

em que R^N é uma cadeia de alquila opcionalmente substituída e 〰 é hidrogênio ou um ponto de fixação à superfície. Em algumas modalidades, R^N compreende um polímero. Em algumas modalidades, R^N compreende uma poli(lisina) ou um poli(etilenoglicol). Em algumas modalidades, R^N compreende um poli(etilenoglicol) biotinilado. Em algumas modalidades, o revestimento compreende a copolímero de poli(lisina) que compreende monômeros de lisina, em que os monômeros de lisina compreendem, independentemente, PEG, PEG biotinilado, grupos nitrodopa, grupos fosfonato ou silanos. Em certas modalidades, o revestimento compreende um polímero de fórmula (**P**):



(**P**)

em algumas modalidades, X é −OMe, um grupo biotina, fosfonato ou silano. Em algumas modalidades, cada um dentre i, j, k e l é independentemente um número inteiro entre 0 e 100, inclusivo.

[00548] Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com um silano que compreende uma cadeia de alquila. Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com um silano que compreende uma cadeia de alquila opcionalmente substituída. Em algumas modalidades, a superfície é funcionalizada com um silano que compreende uma cadeia de cadeia de poli(etilenoglicol). Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com um silano que compreende um grupo de acoplamento. Por exemplo, o grupo de acoplamento pode compreender porções químicas, tais como grupos amina, grupos carboxila, grupos hidroxila, grupos de sulfidrila, metais, quelantes e semelhantes. Alternativamente, os mesmos podem incluir elementos de aglutinação específicos, tais como biotina, avidina, estreptavidina, neutravidina, lectinas, etiquetas SNAP™ ou substratos dos mesmos, peptídeos ou proteínas associativos ou aglutinantes, anticorpos ou fragmentos de anticorpo, ácidos nucleicos ou análogos de ácido ou similares. Adicional ou alternativamente, o grupo de acoplamento pode ser usado para acoplar um grupo adicional que é usado para acoplar ou aglutinar com a molécula de interesse que pode, em alguns casos, incluir tanto grupos funcionais químicos quanto elementos de aglutinação específicos. A título de exemplo, um grupo de acoplamento, por exemplo, biotina, pode ser depositado em uma superfície do substrato e ativado seletivamente em uma dada área. Um agente aglutinante intermediário, por exemplo, estreptavidina, pode, então, ser acoplado ao primeiro grupo de acoplamento. A molécula de interesse que, neste exemplo específico seria biotinilada, é, então, acoplada à estreptavidina.

[00549] Em algumas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com um silano que compreende biotina ou um análogo do mesmo. Em algumas modalidades, a superfície é funcionalizada com um silano que compreende uma cadeia de poli(etileno) glicol, em

que a cadeia de poli(etilenoglicol) compreende biotina. Em certas modalidades, a superfície funcionalizada é funcionalizada com uma mistura de silanos, em que pelo menos um tipo de silano compreende biotina e pelo menos um tipo de silano não compreende biotina. Em algumas modalidades, a mistura compreende cerca de 10 vezes menos, cerca de 25 vezes menos, cerca de 50 vezes menos, cerca de 100 vezes menos, cerca de 250 vezes menos, cerca de 500 vezes menos ou cerca de 1000 vezes menos silano biotinilado do que o silano que não compreende biotina.

[00550] A Figura 10-3 retrata um processo exemplificativo não limitador para preparar a cavidade de amostra superfície do chip fabricado (por exemplo, dispositivo integrado) para iniciação de uma reação de sequenciamento. A cavidade de amostra é retratada com uma superfície de fundo (retângulo sem sombra) e paredes laterais (retângulos verticais sombreados). As paredes laterais podem ser dotadas de múltiplas camadas (por exemplo, Al, Al_2O_3, Ti, TiO_2, TiN). Na etapa (a) as paredes laterais são depositadas com uma camada de barreira de Al_2O_3. A camada de barreira de Al_2O_3 é, então, revestida, na etapa (b), com grupos fosfonato de PEG, por exemplo, tratando-se a superfície com um ou mais ácidos fosfônicos de PEG. Na etapa (c), a superfície de fundo é funcionalizada, por exemplo, com uma mistura de silano de PEG e silano de PEG biotinilado. Os ovais representam grupos de biotina individuais que podem fornecer locais para uma fixação de uma única molécula ou complexo, tal como um complexo de polimerase. Na etapa (d), um complexo de polimerase é fixado a um grupo biotina na superfície de fundo. A polimerase pode ser fixada através de um agente aglutinante, tal como estreptavidina e uma etiqueta de biotina no complexo de polimerase. O complexo de polimerase pode compreender, ainda, um ácido nucleico de modelo e iniciador (não mostrado). A etapa (e) retrata a iniciação de uma reação de sequenciamento por

exposição do complexo de polimerase imobilizado a nucleotídeos identificados de modo luminescente.

I. POLIMERASES

[00551] O termo "polimerase', conforme usado no presente documento, geralmente se refere a qualquer enzima (ou enzima de polimerização) que pode catalisar uma reação de polimerização. Exemplos de polimerases incluem, sem limitação, uma polimerase de ácido nucleico, uma transcriptase ou uma ligase. Uma polimerase pode ser uma enzima de polimerização.

[00552] Modalidades direcionadas a extensão de ácido nucleico de molécula única (por exemplo, para sequenciamento de ácido nucleico) podem usar qualquer polimerase que possa sintetizar um ácido nucleico complementar a uma molécula de ácido nucleico alvo. Em algumas modalidades, uma polimerase pode ser uma polimerase de DNA, uma polimerase de RNA, uma transcriptase inversa e/ou um mutante ou forma alterada de uma ou mais das mesmas.

[00553] Modalidades direcionadas a sequenciamento de ácido nucleico de molécula única podem usar qualquer polimerase que possa sintetizar um ácido nucleico complementar a um ácido nucleico alvo. Exemplos de polimerases incluem, porém, sem limitação, uma polimerase de DNA, uma polimerase de RNA, uma polimerase termoestável, uma polimerase de tipo selvagem, uma polimerase modificada, polimerase de DNA I de E. coli, polimerase de DNA T7, polimerase de DNA T4 bacteriófaga, polimerase de DNA φ29 (psi29), polimerase Taq, polimerase Tth, polimerase Tli, polimerase Pfu, polimerase Pwo, polimerase VENT, polimerase DEEPVENT, polimerase EX-Taq, polimerase LA-Taq, polimerase Sso, polimerase Poc, polimerase Pab, polimerase Mth, polimerase ES4, polimerase Tru, polimerase Tac, polimerase Tne, polimerase Tma, polimerase Tca, polimerase Tih, polimerase Tfi, polimerases Taq Platinum, polimerase Tbr, polimerase Tfl, polimerase

Tth, polimerase Pfutubo, polimerase Pyrobest, polimerase Pwo, polimerase KOD, polimerase Bst, polimerase Sac, fragmento de Klenow, polimerase com 3’ a 5’ de atividade de exonuclease e variantes, produtos modificados e derivados das mesmas. Em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase de subunidade única. Exemplos não limitadores de polimerases de DNA e suas propriedades são descritos em detalhe em, dentre outros lugares, DNA Replication, segunda edição, Kornberg e Baker, W. H. Freeman, Nova Iorque, N.I. (1991).

[00554] Mediante o pareamento de base entre uma nucleobase de um ácido nucleico alvo e o dNTP complementar, a polimerase incorpora o dNTP na cadeia de ácido nucleico recém-sintetizada formando-se uma ligação de fosfodiéster entre a terminação de 3’ de hidroxila da cadeia recém-sintetizada e o fosfato alfa do dNTP. Em exemplos em que o marcador luminescente conjugado ao dNTP é um fluoróforo, sua presença é sinalizada por excitação e um pulso de emissão é detectado durante ou após a etapa de incorporação. Para marcadores de detecção que são conjugados ao fosfato (gama) terminal do dNTP, a incorporação do dNTP na cadeia recém-sintetizada resulta na liberação de fosfatos beta e gama e o marcador de detecção que é livre para se difundir na cavidade de amostra, o que resulta em uma diminuição em emissão detectada do fluoróforo.

[00555] Em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase com processabilidade alta. Entretanto, em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase com processabilidade reduzida. A processabilidade de polimerase geralmente se refere à capacidade de uma polimerase incorporar consecutivamente dNTPs em um modelo de ácido nucleico sem liberar o modelo de ácido nucleico.

[00556] Em algumas modalidades, a polimerase é uma polimerase com baixa atividade de exonuclease de 5′ a 3′ e/ou de exonuclease de 3′ a 5′. Em algumas modalidades, a polimerase é modificada (por

exemplo, por substituição de aminoácido) para ter atividade de exonuclease de 5′ a 3′ e/ou atividade de 3′ a 5′ reduzida em relação a uma polimerase de tipo selvagem correspondente. Exemplos não limitadores adicionais de polimerases de DNA incluem polimerase de DNA 9°Nm™ (New England Biolabs) e um mutante P680G da exopolimerase de Klenow (Tuske entre outros (2000) JBC 275(31):23759-23768). Em algumas modalidades, uma polimerase que tem processabilidade reduzida fornece precisão maior para sequenciar modelos que contêm um ou mais extensões de repetições de nucleotídeo (por exemplo, duas ou mais bases sequenciais do mesmo tipo).

[00557] Modalidades direcionadas a extensão de RNA de molécula única (por exemplo, para sequenciamento de RNA) podem usar qualquer transcriptase inversa que pode sintetizar DNA complementar (cDNA) de um modelo de RNA. Em tais modalidades, uma transcriptase inversa pode funcionar de uma maneira similar à polimerase em que cDNA pode ser sintetizado a partir de um modelo de RNA através da incorporação de dNTPs a um iniciador de transcrição inversa recozido para um modelo de RNA. O cDNA pode, então, participar em uma reação de sequenciamento e sua sequência determinada conforme descrito acima e em outro lugar no presente documento. A sequência determinada do cDNA pode, então, ser usada, através de complementaridade de sequência, para determinar a sequência do modelo de RNA original. Exemplos de transcriptases inversas incluem transcriptase inversa de Vírus de Leucemia Moloney Murine (M-MLV), transcriptase inversa de vírus de mieloblastose aviária (AMV), transcriptase inversa de vírus de imunodeficiência humana (HIV-1) e transcriptase inversa de telomerase.

[00558] A processabilidade, a atividade de exonuclease, a afinidade relativa para tipos diferentes de ácido nucleico ou outra propriedade de uma polimerase de ácido nucleico pode ser aumentada ou diminuída

por alguém versado na técnica por mutação ou outra modificação relativa a uma polimerase de tipo selvagem correspondente.

J. MEDIÇÕES DE TEMPO DE VIDA

[00559] Medições de tempo de vida podem ser realizadas com o uso de um comprimento de onda de energia de excitação para excitar um marcador em uma cavidade de amostra. Uma combinação de marcadores que têm tempos de vida característicos é selecionada para distinguir dentre os marcadores individuais com base nas medições de tempo de vida. Adicionalmente, a combinação de marcadores pode alcançar um estado excitado quando iluminada pela fonte de excitação usada. Um dispositivo integrado configurado para medições de tempo de vida com o uso de uma excitação pode incluir múltiplos pixels posicionados ao longo de uma fileira em que cada cavidade de amostra é configurada para acoplar com o mesmo guia de onda. Um pixel inclui uma cavidade de amostra e um sensor. Uma ou mais microcavidades ou uma grade de alvo podem ser usadas para acoplar o guia de onda à cavidade de amostra para cada pixel.

[00560] Uma fonte de excitação pulsada pode ser uma dentre as fontes de excitação pulsadas com o uso das técnicas descritas acima. Em alguns casos, a fonte de excitação pulsada pode ser um díodo laser de semicondutor configurado para emitir pulsos através de bombeamento elétrico modulado direto do díodo laser. A potência dos pulsos é menor do que 20 dB da potência de pico de pulso em aproximadamente 250 picossegundos após o pico. O intervalo de tempo para cada pulso de excitação está na faixa de 20 a 200 picossegundos. A duração de tempo entre cada pulso de excitação está na faixa de 1 a 50 nanossegundos. Um esquema de como medições exemplificativas podem ser realizadas sé mostrado na Figura 10-4. Uma vez que uma energia de excitação é usada, um filtro de excitação adequado para reduzir a transmissão da energia de excitação para o sensor pode ser

formado no dispositivo integrado, tal como o filtro de excitação de comprimento de onda discutido acima.

[00561] O sensor para cada pixel tem pelo menos uma região fotossensível por pixel. A região fotossensível pode ter dimensões de 5 mícrons por 5 mícrons. Fótons são detectados dentro de intervalos de tempo de quando alcançam o sensor. Aumentar o número de distâncias de tempo pode aprimorar a resolução do histograma registrado de fótons coletados ao longo de uma série de distâncias de tempo e aprimorar a diferenciação dentre diferentes marcadores luminescentes. Em algumas modalidades, elementos de focalização podem ser integrados com o sensor a fim de aprimorar a coleta de fótons emitidos por um marcador em uma cavidade de amostra associada. Tais elementos de focalização podem incluir uma lente de Fresnel conforme mostrado na Figura 10-5. Quando o sensor é configurado para detectar um comprimento de onda específico, os quatro marcadores luminescentes podem emitir luminescência similar ao comprimento de onda específico. Alternativamente, os quatro marcadores luminescentes podem emitir luminescência em diferentes comprimentos de onda.

[00562] Um exemplo de quatro marcadores luminescentes que são característicos com base em medições de tempo de vida são ATRho14, Cy5, AT647N e CF633 conforme mostrado pela plotagem na Figura 10-6. Esses quatro marcadores têm tempos de vida variáveis e produzem histogramas característicos quando pelo menos quatro distâncias de tempo são usadas. A Figura 10-7 contorna um perfil de sinal para cada um desses marcadores através de 16 distâncias de tempo. O perfil de sinal é normalizado para cada marcador. As distâncias de tempo variam em intervalo de tempo a fim de fornecer um perfil de sinal singular para cada um dos marcadores. As Figuras 10-8 e 10-9 ilustram perfis de sinal, tanto contínuos quanto discretos, respectivamente, de outro conjunto exemplificativo de marcadores, ATTO Rho14, D650, ST647 e

CF633, que são característicos com base em medições de tempo de vida. Outros conjuntos de marcadores incluem ATTO Rho14, C647, ST647, CF633; Alexa Fluor647, B630, C640R, CF633; e ATTO Rho14, ATTO 647N, AlexaFluor647, CF633.

K. MEDIÇÕES DE TEMPO DE VIDA ESPECTRAIS

[00563] Medições de tempo de vida podem ser combinadas com medições espectrais de um ou mais marcadores luminescentes. Medições espectrais podem depender do comprimento de onda de luminescência para marcadores individuais e são capturadas com o uso de pelo menos duas regiões de sensor por pixel. Uma estrutura exemplificativa do dispositivo integrado inclui pixels que têm, cada um, um sensor com duas regiões características, sendo cada região configurada para detectar um comprimento de onda diferente. Um filtro de múltiplos comprimentos de onda, tal como aquele mostrado e descrito na Figura 7-7, pode ser usado para transmitir seletivamente uma luz de comprimento de onda diferente para cada região de sensor. Por exemplo, uma região de sensor e uma combinação de filtro podem ser configuradas para detectar luz vermelha enquanto outra região de sensor e combinação de filtro podem ser configuradas para detectar luz verde.

[00564] A combinação de ambas as medições de tempo de vida com medições espectrais pode ser realizada com o uso de um comprimento de onda de energia de excitação para excitar um marcador em uma cavidade de amostra. Uma combinação de marcadores é selecionada tendo pelo menos dois comprimentos de luminescência de onda característicos em que os marcadores que emite em um comprimento de onda têm tempos de vida característicos são selecionados para distinguir dentre os marcadores individuais com base no tempo de vida e nas medições espectrais. Adicionalmente, a combinação de marcadores é selecionada para poder alcançar um estado excitado quando iluminada pela fonte de excitação usada.

[00565] A fonte de excitação é uma fonte de excitação pulsada e pode ser uma dentre as fontes de excitação que usam as técnicas descritas acima. Em alguns casos, a fonte de excitação pulsada pode ser um díodo laser de semicondutor configurado para emitir pulsos através de bombeamento elétrico modulado direto do díodo laser. A potência dos pulsos é menor do que 20 dB e a potência de pico após 250 picossegundos após o pico. A duração de tempo para cada pulso de excitação está na faixa de 20 a 200 picossegundos. O intervalo de tempo entre cada pulso de excitação está na faixa de 1 a 50 nanossegundos. Um esquema de como medições exemplificativas podem ser realizadas é mostrado na Figura 10-10. Uma vez que uma energia de excitação é usada, um filtro de excitação adequado para reduzir a transmissão da energia de excitação para o sensor pode ser usado, tal como o filtro de excitação de comprimento de onda discutido acima com referência à Figura 7-5.

[00566] O sensor para cada pixel tem pelo menos duas regiões fotossensíveis por pixel. Em algumas modalidades, há duas regiões fotossensíveis por pixel. Em outras modalidades, há quatro regiões fotossensíveis por pixel. Cada região fotossensível é configurada para detectar um comprimento de onda ou faixa diferente de comprimentos de onda. Fótons são detectados dentro de intervalos de tempo de quando alcançam o sensor. Aumentar o número de distâncias de tempo pode aprimorar a resolução do histograma registrado de fótons coletados ao longo de uma série de distâncias de tempo e aprimorar a diferenciação dentre diferentes marcadores luminescentes por seus tempos de vida individuais. Em algumas modalidades, há duas distâncias de tempo por região do sensor. Em outras modalidades, há quatro distâncias de tempo por região do sensor.

[00567] Um conjunto exemplificativo de quatro marcadores luminescentes que são característicos com base em medições de tempo de vi-

da são ATTO Rho14, AS635, Alexa Fluor647 e ATTO 647N. Esses quatro marcadores têm dois que emitem em um comprimento de onda similar e outro comprimento de onda similar. Dentro de cada par de marcadores que emitem em um comprimento de onda similar, o par de marcadores tem tempos de vida diferentes e produzem histogramas característicos quando pelo menos quatro distâncias de tempo são usadas. Neste exemplo, ATTO Rho14 e AS635 emitem comprimentos de luminescência de onda similares e têm tempos de vida característicos. Alexa Fluor 647 e ATTO 647N emitem comprimentos de luminescência de onda similares, diferentes dos comprimentos de onda emitidos por ATTO Rho 14 e AS635 e têm tempos de vida característicos. A Figura 10-11 mostra um tempo de vida de plotagem como uma função de comprimento de onda de emissão para esse conjunto de marcadores para ilustrar como cada um desses marcadores é característico com base em uma combinação de tempo de vida e comprimento de onda de emissão. A Figura 10-12 mostra uma plotagem de potência como uma função de comprimento de onda para ATT Rho14, Alexa Fluor 647 e ATT) 647N. A Figura 10-13 mostra plotagens de sinal de fluorescência ao longo do tempo para cada um desses marcadores quando presentes em uma cavidade de amostra com um diâmetro de 135 nm. A Figura 10-14 ilustra o perfil de sinal para esses marcadores através de quatro regiões fotossensíveis e cada região captura quatro distâncias de tempo. Os perfis de sinal são normalizados e são usados para distinguir dentre os marcadores diferentes pelo número relativo de fótons capturados por uma região fotossensível para cada uma das quatro distâncias de tempo. Outros conjuntos de quatro fluoróforos para tais medições de tempo de vida espectrais são ATRho14, D650, ST647, CF633; ATTO Rho14, C647, ST647, CF633; Alexa Fluor 647, B630, C640R, CF633; e ATTO Rho 14, ATTO 647N, Alexa Fluor 647, CF633. A Figura 10-15 mostra uma plotagem do perfil de sinal de intensidade ao longo

do tempo para ATRho14, D650, ST647 e C633. A Figura 10-16 ilustra o perfil de sinal para ATRho14.

L. MEDIÇÕES DE TEMPO DE VIDA DE ENERGIA DE EXCITAÇÃO

[00568] Medições de tempo de vida combinadas com o uso de pelo menos dois comprimentos de onda de energia de excitação podem ser usadas para distinguir entre múltiplos marcadores. Alguns marcadores podem excitar quando um comprimento de onda de excitação é usado e não outro. Uma combinação de marcadores que têm tempos de vida característicos é selecionada para cada comprimento de onda de excitação para distinguir entre os marcadores individuais com base nas medições de tempo de vida. Nessa modalidade, um dispositivo integrado pode ser configurado para ter cada pixel com um sensor que tem uma região e a fonte de excitação externa pode ser configurada para fornecer dois comprimentos de onda de energia de excitação que são lasers de diodo pulsados modulados eletricamente com intercalação temporal.

[00569] A fonte de excitação é uma combinação de pelo menos duas energias de excitação. A fonte de excitação é uma fonte de excitação pulsada e pode ser uma ou mais das fontes de excitação que usa os conjuntos de procedimentos descritos acima. Em alguns casos, a fonte de excitação pulsada pode ser dois diodos laser semicondutores configurados para emitir pulsos através de bombeamento elétrico modulado direto do diodo laser. A potência dos pulsos são 20 dB menores do que a potência de pico de pulso em 250 picossegundos após o pico. O intervalo de tempo para cada pulso de excitação é na faixa de 20 a 200 picossegundos. O intervalo de tempo entre cada pulso de excitação é na faixa de 1 a 50 nanossegundos. Um comprimento de onda de excitação é emitido por um pulso e conhecendo-se o comprimento de onda de excitação um subconjunto de marcadores com tempos de vida característicos é identificado unicamente. Em algumas

modalidades, os pulsos de excitação alternam entre os comprimentos de onda diferentes. Por exemplo, quando dois comprimentos de onda de excitação são usados os pulsos subsequentes alternam entre um comprimento de onda e o outro comprimento de onda. Um esquemático de como medições exemplificativas podem ser realizadas é mostrado na Figura 10-17. Qualquer conjunto de procedimentos adequado para combinar múltiplas fontes de excitação e pulsos intercalados que têm comprimentos de onda diferentes pode ser usado. Exemplos de alguns conjuntos de procedimentos para entregar pulsos de mais do que um comprimento de onda de excitação para uma fileira de cavidades de amostra que são ilustrados são descritos no presente documento. Em algumas modalidades, há uma guia de onda única por uma fileira de cavidades de amostra e há duas fontes de excitação que são combinadas de modo que os pulsos de energia de excitação alternem entre os dois comprimentos de onda de excitação. Em algumas modalidades, há duas guias de onda por uma fileira de cavidades de amostra e cada guia de onda é configurada para portar um de dois comprimentos de onda de excitação. Em outras modalidades, há uma guia de onda única por uma fileira de pixels e um comprimento de onda acopla a uma extremidade da guia de onda e outro comprimento de onda acopla à outra extremidade.

[00570] O sensor para cada pixel tem pelo menos uma região fotossensível por um pixel. A região fotossensível pode ter dimensões de 5 mícrons por 5 mícrons. Os fótons são detectados dentro de intervalos de tempo de quando os mesmos chegam ao sensor. Aumentar o número de intervalos de tempo pode melhorar a resolução do histograma gravado de fótons coletados ao longo de uma série de intervalos de tempo e melhorar a diferenciação entre marcadores luminescentes diferentes. O sensor tem pelo menos dois intervalos de tempo.

[00571] Um conjunto exemplificativo de quatro marcadores lumi-

nescentes que são distinguíveis com base em medições de tempo de vida são Alexa Fluor 546, Cy3B, Alexa Fluor 647 e ATTO 647N. Conforme mostrado na Figura 10-18, o Alexa Fluor 546 e o Cy3B excitam em um comprimento de onda, tal como 532 nm, e têm tempos de vida característicos. O Alexa Fluor 647 e o ATTO 647N excitam em outro comprimento de onda, 640 nm, e têm tempos de vida característicos conforme mostrado na Figura 10-19. Os perfis de sinal normalizados distinguíveis através de 16 intervalos de tempo para o ATTO647N e o CF633, que são ambos excitados em 640 nm, são mostrados na Figura 10-20. Detectando-se um fóton após um comprimento de onda de excitação conhecido, um desses dois pares de marcadores pode ser determinado com base no comprimento de onda de excitação prévio e cada marcador para um par é identificado com base em medições de tempo de vida.

VI. ETAPAS DE FABRICAÇÃO

[00572] O dispositivo integrado acima pode ser fabricado de qualquer forma adequada. A seguir é apresentada uma descrição da fabricação de vários componentes do dispositivo integrado, que pode ser combinada de qualquer forma com conjuntos de procedimentos conhecidos na técnica, para criar um dispositivo integrado adequado.

A. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE CAVIDADE DE AMOSTRA

[00573] Uma cavidade de amostra (por exemplo, nanopassagem) pode ser fabricada de qualquer forma adequada. Em algumas modalidades, uma cavidade de amostra pode ser fabricada com o uso de processos de fotolitografia padrões e conjuntos de procedimentos de gravação. Uma cavidade de amostra pode ser formada em uma camada que tem um metal (por exemplo, Al, TiN) ou qualquer material adequado compatível com processamento de fotolitografia. A Figura 11-1 ilustra um método exemplificativo para fabricar uma cavidade de amostra de um dispositivo integrado. A camada 11-112 forma uma ca-

vidade de amostra e pode incluir um metal tal como Al ou TiN. A camada 11-110 pode atuar como uma camada dielétrica e pode ser formada a partir de qualquer substrato dielétrico adequado, tal como SiO_2 ou nitreto de silício. Uma etapa do método inclui depositar a camada 11-112 diretamente no substrato 11-110. Em algumas modalidades, camadas adicionais podem ser depositadas entre a camada 11-112 e a camada 11-110. A camada 11-112 pode ser depositada em qualquer espessura adequada, e em algumas modalidades, a espessura pode determinar a altura da cavidade de amostra resultante. A espessura da camada 11-112 pode ser aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm ou aproximadamente 150 nm. Um revestimento antirreflexo (ARC) 11-122 é, então, depositado na parte superior da camada 11-112. A máscara de gravação 11-120 (por exemplo, máscara de gravação fotorresistente) é depositada na ARC 11-122. Conjuntos de procedimentos fotolitográficos convencionais são usados para estampar um furo na máscara de gravação 11-120 e na camada ARC 11-122. O furo estampado pela máscara de gravação 11-120 pode ter um diâmetro de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm ou aproximadamente 150 nm. A estampa de furo é, então, transferida para a camada subjacente 11-112 com o uso de uma gravação, por exemplo, conjuntos de procedimentos de gravação com íon reativo, para formar a cavidade de amostra. A gravação pode parar na superfície da camada 11-110, ou a gravação pode criar uma concavidade na camada 11-110 sob o furo na camada 11-112. Conjuntos de procedimentos convencionais são usados para decapar a máscara de gravação 11-120 e ARC 11-122 da camada 11-112. A cavidade de amostra pode ter um diâmetro de t de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm ou aproximadamente 150 nm.

[00574] Alternativamente, uma cavidade de amostra pode ser fabricada com o uso de processos de fotolitografia padrões e conjuntos de

procedimentos de desprendimento. A Figura 11-2 ilustra um método exemplificativo de formação de uma cavidade de amostra com o uso de conjuntos de procedimentos de desprendimento. A cavidade de amostra é formada na camada 11-212, que pode incluir um metal (por exemplo, Al, Au, Cr). A camada 11-212 é formada sobre a camada de substrato 11-210, que pode incluir qualquer material adequado tal como um dielétrico (por exemplo, SiO_2). A deposição da camada 11-212 pode ocorrer separadamente e após o processo fotolitográfico. A primeira etapa no processo de fabricação por desprendimento mostrado na Figura 11-2 pode envolver depositar o revestimento antirreflexo (ARC) 11-222 no substrato 11-210 seguido pela máscara de gravação fotorresistente 11-220 diretamente na parte superior do substrato 11-210. Conjuntos de procedimentos fotolitográficos convencionais são usados para estampar o fotorresistente de modo que um pilar 11-230 de resistente seja deixado para trás. O pilar pode ter qualquer tamanho e formato adequados que podem corresponder a uma cavidade de amostra resultante. O pilar pode ter um diâmetro de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm ou aproximadamente 150 nm. Tais conjuntos de procedimentos podem incluir dissolver o resistente e a camada ARC ao redor do pilar para fora do substrato. A etapa seguinte pode envolver depositar a camada 11-212 diretamente na parte superior do pilar de resistente e do substrato, criando um pilar coberto. Em outras modalidades, camadas adicionais podem ser depositadas antes ou após a deposição da camada 11-212. Como um exemplo não limitante, TiN pode ser depositado na camada 11-212 formada de Al, seguido opcionalmente por uma deposição de Al_2O_3. A camada 11-212 pode ser depositada em qualquer espessura adequada, e em algumas modalidades pode ter uma espessura de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm ou aproximadamente 150 nm. Para formar a cavidade de amostra, o pilar coberto pode ser decapado por um sol-

vente no caso em que o fotorresistente é usado ou por gravação seletiva no caso que em máscaras de gravação de duras de dióxido de silício ou nitreto de silício são usadas. A cavidade de amostra pode ter um diâmetro de t de aproximadamente 50 nm, aproximadamente 100 nm ou aproximadamente 150 nm.

[00575] Alternativamente, uma cavidade de amostra pode ser fabricada com o uso de processos de fotolitografia padrões e um conjunto de procedimentos de desprendimento alternativo. A Figura 11-3 ilustra uma modalidade exemplificativa de formação de uma cavidade de amostra de um dispositivo integrado. Uma camada de máscara de gravação dura 11-314 é depositada no substrato 11-310. A camada de máscara de gravação dura 11-314 pode incluir Ti ou qualquer outro material adequado. O substrato 11-310 pode incluir um dielétrico (por exemplo, SiO_2) ou qualquer outro material adequado. Uma camada de ARC 11-322 é, então, depositada na camada de máscara de gravação dura 11-314 seguida pela camada fotorresistente 11-320. Conjuntos de procedimentos fotolitográficos convencionais são usados para estampar o fotorresistente de modo que um pilar 11-320 de resistente seja formado. Essa estampa de pilar fotorresistente é usada como uma máscara de gravação para gravar a camada ARC 11-322 e a camada de máscara de gravação dura 11-314. A camada fotorresistente 11-320 e a ARC 11-322 são, então, decapadas, e o pilar 11-330 de máscara de gravação dura é deixado para trás. Conjuntos de procedimentos convencionais podem ser usados para dissolver o fotorresistente e a camada ARC remanescentes para fora do pilar. A etapa seguinte pode envolver depositar a camada 11-312 diretamente na parte superior do pilar 11-330 criando um pilar coberto. Para formas a cavidade de amostra, o pilar coberto é decapado por uma gravação de peróxido de hidrogênio, ou outra gravação adequada, que corroa a camada 11-314, "desprenda" a capa e resulte em uma cavidade de

amostra em camada 11-312.

[00576] Em algumas modalidades, a cavidade de amostra pode ser fabricada para atenuar a transmissão de plasmon através da cavidade de amostra de qualquer forma adequada. Por exemplo, a cavidade de amostra pode ser fabricada em uma pilha multicamada. A pilha multicamada pode incluir, porém, sem limitações, uma camada de metal depositada em um substrato, uma camada absorvente e/ou uma camada de superfície. A camada de superfície pode ser uma camada de passivação. A pilha multicamada pode ser fabricada de qualquer forma adequada. Conjuntos de procedimentos de estampagem e gravação convencionais podem ser usados. Uma camada de metal pode ser depositada em um substrato. Alternativamente, uma camada absorvente pode ser depositada na camada de metal. Alternativamente, uma camada de passivação de superfície pode ser depositada na pilha de camada absorvente/camada de metal. Uma camada fotorresistente e antirreflexo podem ser depositadas na camada superior da pilha multicamada. A camada fotorresistente pode ser estampada com as dimensões da cavidade de amostra. A pilha multicamada pode ser gravada diretamente para formar a cavidade de amostra.

[00577] As camadas absorventes podem incluir quaisquer materiais absorventes adequados. Exemplos não limitantes incluem nitreto de silício, TiN, aSi, TaN, Ge e/ou Cr. Variantes dos materiais citados também são possíveis, tal como Si_3N_4. A camada de metal e a camada de superfície podem ser feitas de quaisquer materiais adequados. Por exemplo, Al, AlSi ou AlCu podem ser usados para a camada de metal. A camada de superfície pode ser feita de Al ou Al_2O_3, por exemplo. A cavidade de amostra na pilha pode ser fabricada com o uso dos processos descritos acima.

[00578] Adicional e/ou alternativamente, uma camada refletiva pode ser depositada diretamente na parte superior do substrato antes de

depositar a pilha multicamada para controlar o foco do feixe de luz durante a fotolitografia. Uma camada refletiva pode ser depositada diretamente na parte superior do substrato e estampada com as dimensões da cavidade de amostra. Opcionalmente, uma camada de revestimento antirreflexo seguida por uma camada de fotorresistente pode ser depositada na parte superior da camada de revestimento refletiva estampada e estampada para deixar um pilar de ARC e fotorresistente em um local no substrato. Uma pilha multicamada pode, então, ser depositada na parte superior do pilar, camada de refletiva e substrato. O pilar coberto pode ser removido com o uso de um processo de desprendimento, conforme descrito acima, para formar uma cavidade de amostra no local do substrato em que o pilar estava.

[00579] De maneira similar, um pilar de Ti pode ser usado para criar a cavidade de amostra. A primeira etapa pode envolver depositar uma camada de Ti no substrato, seguida por uma camada de revestimento antirreflexo e uma camada de fotorresistente. A camada de Ti pode ser estampada e gravada para formar um pilar de Ti. A pilha multicamada pode ser depositada na parte superior de pilar de Ti e substrato. Por fim, o pilar de Ti pode ser removido formando uma cavidade de amostra em um local do substrato correspondente a onde o pilar de Ti estava.

[00580] Quaisquer métodos de deposição adequados podem ser usados. Por exemplo, PVD, CVD, pulverização catódica, ALD, deposição por feixe de elétron e/ou evaporação térmica podem ser usadas para depositar uma ou mais camadas. O ambiente de deposição pode ser controlado para impedir oxidação das camadas entre as deposições. Por exemplo, o ambiente pode ser mantido em um alto vácuo e/ou estado de baixo oxigênio durante e entre as deposições de uma ou mais camadas.

B. CAMADA DE CAVIDADE DE AMOSTRA COM DECLIVES

[00581] A camada de cavidade de amostra pode incluir declives de

modo que a cavidade de amostra (por exemplo, nanopassagem) seja posicionada a uma certa distância da guia de onda. Qualquer conjunto de procedimentos adequado para formar declives na camada de cavidade de amostra pode ser usado. Um conjunto de procedimentos inclui litografia em escala de cinza usada para formar um resistente com topografia seguido por gravação para transferir a topografia para a camada de óxido. Após a camada de óxido ter a topografia de declive, a cavidade de amostra e/ou outras estruturas podem ser formadas. A Figura 11-5 ilustra uma modalidade exemplificativa de formação de uma camada de cavidade de amostra com declives. A guia de onda 11-820 é formada dentro da camada de material circundante 11-810, e o resistente 11-830 é estampado em uma superfície da camada de material circundante 11-810. A estampagem do resistente 11-830 pode ter qualquer tamanho ou formato adequado. A superfície da camada 11-810 é gravada para formar um formato de declive desejado com base na estampagem do resistente 11-830. A camada de cavidade de amostra 11-812 é depositada na superfície gravada da camada 11-810 por qualquer combinação dos conjuntos de procedimentos descritos no presente documento para formar uma camada de cavidade de amostra 11-810 com uma porção que tem a cavidade de amostra 11-832 posicionada a uma distância da guia de onda 11-820 para fornecer acoplamento adequado entre a guia de onda 11-820 e a cavidade de amostra 11-832.

[00582] Outro conjunto de procedimentos para formar uma camada de cavidade de amostra com declives pode incluir o uso de litografia em escala de cinza para formar a topografia em uma camada de óxido para expor a guia de onda e, então, o óxido é depositado com uma espessura controlada, seguido pela formação da cavidade de amostra e/ou outras estruturas. A Figura 11-6 ilustra uma modalidade exemplificativa de formação de uma camada de cavidade de amostra com de-

clives. A guia de onda 11-920 é formada dentro da camada de material circundante 11-910. A superfície da camada 11-910 é gravada para expor a guia de onda 11-920 com o uso de litografia em escala de cinza. A camada 11-910 é reformada com espessura controlada. Componentes, tais como as estruturas plasmônicas de superfície (não mostradas), podem ser formados. A camada de cavidade de amostra 11-912 que forma a cavidade de amostra 11-932 é formada sobre a camada 11-910.

[00583] Em algumas modalidades, a matriz inteira de cavidades de amostra é formada em uma região de declive do substrato. Por exemplo, a distância entre a camada de metal inferior da cavidade de amostra e a guia de onda pode ser aproximadamente 600 nm para fora da região em que as cavidades de amostra são formadas, mas pode ser reduzida para aproximadamente 350 nm onde uma matriz de cavidade de amostra é localizada. Dessa maneira, onde uma pluralidade de dispositivos integrados está sendo formada em uma pastilha, o local de cada dispositivo integrado na pastilha pode ser identificado visualmente pelo declive na superfície superior da pastilha associada a cada dispositivo integrado individual que é formado.

C. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE GRADE CONCÊNTRICA (ALVO)

[00584] Uma grade concêntrica, ou alvo, pode ser fabricada de qualquer forma adequada. Em algumas modalidades, uma grade concêntrica pode ser fabricada com o uso de processos de fotolitografia padrões e conjuntos de procedimentos de gravação. Qualquer material adequado dielétrico, tal como SiO_2 ou nitreto de silício, pode ser usado para formar a grade concêntrica. Na modalidade ilustrada na Figura 11-7, uma camada de SiO_2 11-1010 é usada para fazer a grade concêntrica. A primeira etapa no processo de fabricação pode envolver depositar uma máscara de gravação dura 11-1014 diretamente na parte superior da camada de SiO_2 11-1010. A próxima etapa de 11-1001 no

processo de fabricação pode envolver depositar uma camada fotorresistente 11-1020 diretamente na parte superior de uma camada de revestimento antirreflexo (ARC) 11-1022 na máscara de gravação dura, que pode incluir silício. Conjuntos de procedimentos fotolitográficos convencionais são usados para criar a estampa de alvo na máscara de gravação dura tal como por estampagem da grade concêntrica no fotorresistente pela etapa 11-1003 e gravação da estampa de resistente na camada ARC e máscara de gravação dura pela etapa 11-1005. A estampa de alvo é, então, transferida para a camada de SiO_2 subjacente com o uso de gravação, por exemplo, conjuntos de procedimentos de gravação com íon reativo para formar a grade concêntrica pela etapa 11-1007. A espessura da grade concêntrica pode ser qualquer espessura adequada. Na modalidade ilustrada na Figura 11-7, a profundidade de gravação é aproximadamente 80 nm. Conjuntos de procedimentos convencionais são usados para decapar os resíduos de resistente e da máscara de gravação e limpar a superfície da grade concêntrica pela etapa 11-1009. A cavidade de amostra na camada 11-1012 pode ser fabricada diretamente na parte superior da grade concêntrica com o uso dos processos de desprendimento ou gravação pela etapa 11-1011. Em outras modalidades, outras camadas podem ser depositadas entre a grade concêntrica e a cavidade de amostra.

[00585] Alternativamente, em algumas modalidades, a cavidade de amostra pode ser posicionada no centro da grade concêntrica. Esse alinhamento preciso da cavidade de amostra pode ser alcançado de qualquer forma adequada. Na modalidade ilustrada na Figura 11-8, o posicionamento da cavidade de amostra é alcançado com o uso de um processo de fabricação autoalinhado. A primeira etapa pode envolver formar a grade concêntrica de acordo com os conjuntos de procedimentos descritos acima. No entanto, na Figura 11-8, uma máscara de gravação dura de Ti 11-1114 é depositada na parte superior do subs-

trato de SiO_2 11-1110 pela etapa 11-1101. A estampa de alvo é transferida para a camada de Ti com o uso de gravação, por exemplo, gravação com íon reativo, pela etapa 11-1103. Uma camada resistente 11-1120 e uma camada de revestimento antirreflexo (ARC) 11-1122 são depositadas sobre as duas lacunas centrais na camada de Ti para cobrir as lacunas e o pilar de Ti central pela etapa 11-1105. A estampa de alvo é, então, transferida para o substrato de SiO_2 com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais de gravação para formar a grade concêntrica pela etapa 11-1107. A camada de Ti é, então, removida com o uso de uma gravação úmida isotrópica pela etapa 11-1109, por exemplo, com o uso de peróxido, mas deixando o pilar de Ti central 11-1116 no lugar. A camada resistente é, então, decapada com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais. A camada de metal de cavidade de amostra é, então, depositada na parte superior da grade concêntrica e do pilar de Ti. Por fim, o pilar de Ti coberto de metal é removido com o uso de um processo de desprendimento que deixa uma cavidade de amostra centralizada precisamente em relação à grade concêntrica pela etapa 11-1111.

[00586] O alinhamento preciso da cavidade de amostra pode ser alcançado de várias outras formas. Na modalidade ilustrada na Figura 11-9, o posicionamento da cavidade de amostra é alcançado com o uso de um processo de fabricação autoalinhado alternativo. A primeira etapa pode envolver depositar a camada de cavidade de amostra (por exemplo, Al, Ti) 11-1212 diretamente na parte superior do substrato de grade concêntrica de SiO_2 11-1210 pela etapa 11-1201. Uma máscara de gravação dura 11-1214 pode, então, ser depositada na parte superior da camada 11-1212. A estampa de alvo é transferida para a camada 11-1212 com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais de gravação pela etapa 11-1203. Uma camada resistente 11-1220 e uma camada de revestimento antirreflexo 11-1222 são depositadas

sobre a lacuna central na camada 11-1212 para cobrir a posição em que a cavidade de amostra deve ser formada pela etapa 11-1205. A estampa de alvo é, então, transferida para o substrato de SiO_2 com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais de gravação para formar a grade concêntrica pela etapa 11-1207. Uma camada de metal adicional é depositada na parte superior da camada 11-1212 de modo que o metal preencha as cavidades no substrato de SiO_2 11-1210 e cubra a camada resistente 11-1214 pela etapa 11-1209. Na modalidade ilustrada na Figura 11-9, Al é usado como a camada de metal adicional, mas outros metais adequados compatíveis com processos fotolitográficos podem ser usados. Por fim, o pilar coberto de metal resistente 11-1230 é removido com o uso de um processo de desprendimento deixando uma nanopassagem centralizada precisamente em relação à grade concêntrica pela etapa 11-1211.

D. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE MICROCAVIDADE

[00587] Uma microcavidade pode ser fabricada de qualquer forma adequada. Em algumas modalidades, uma microcavidade pode ser fabricada com o uso de processos de fotolitografia padrões e conjuntos de procedimentos de gravação. A microcavidade pode incluir nitreto de silício. A primeira etapa no processo de fabricação pode envolver depositar nitreto de silício em um filme de óxido. A camada de nitreto de silício pode ser estampada e gravada para formar a estrutura da microcavidade. Após o nitreto de silício ser gravado, um óxido é depositado sobre o recurso de nitreto de silício e polido completamente, tal como por meio de CMP. A camada de cavidade de amostra com uma cavidade de amostra pode ser fabricada acima ou próxima à microcavidade. A microcavidade pode ser deslocada da cavidade de amostra. A Figura 11-10 ilustra dois projetos de fabricação possíveis para uma estrutura da microcavidade deslocada.

E. ACOPLADOR DE GRADE GUIA DE ONDA ABAIXO DA CAMADA

REFLETORA

[00588] A camada refletora sob o acoplador de grade pode ser formada de qualquer forma adequada. A camada refletora pode ser uma camada de metal a uma distância controlada do acoplador de grade guia de onda a fim de melhorar o acoplamento de energia de excitação na guia de onda. Um processo de fabricação exemplificativo inclui formar uma reentrância em uma camada de óxido no local de acoplador de grade com o uso de litografia e/ou gravação. O material refletor é depositado e preenche a vala. Uma camada resistente é formada sobre o refletor e litografia e gravação são usadas para remover o excesso de material refletor. O óxido é formado sobre o refletor, tal como através de PECVD, para formar uma superfície plana para a fabricação de guia de onda.

F. FILTRO DE EXCITAÇÃO

[00589] Um filtro de excitação pode ser formado alternando-se camadas de material refrativo de índice alto e baixo. Quaisquer materiais refrativos de índice baixo adequados podem ser usados. Materiais de índice refrativo baixo exemplificativos incluem dióxido de silício formado com o uso de PVD, PECVD, LPCVD, ALD e/ou conjuntos de procedimentos de evaporação. Qualquer material refrativo de índice alto adequado pode ser usado. Materiais refrativos de índice alto exemplificativos incluem silício, nitreto de silício, dióxido de titânio e pentóxido de tântalo.

G. DEFLETOR

[00590] Um defletor pode ser formado em um pixel entre o sensor e a cavidade de amostra para bloquear e/ou absorver luz difusa, tal como luz de excitação a partir da guia de onda, de ser detectada pelo sensor. Um conjunto de procedimentos é depositar uma camada absorvente sobre uma seção elevada da camada de óxido, em que a seção elevada se sobrepõe ao sensor, seguido por polimento por meio

de CMP. Outro conjunto de procedimentos é depositar um filme fino absorvente sobre a camada de óxido e, então, usar litografia e conjuntos de procedimentos de gravação para formar furos na camada absorvente sobre o sensor.

H. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE LENTES: LENTE REFRATIVA

[00591] Uma matriz de lentes refrativas pode ser criada de qualquer forma adequada para melhorar a eficiência de focalização de excitação na e coleta de luz de emissão da cavidade de amostra. Em algumas modalidades, uma matriz de lentes refrativas pode ser uma matriz "sem lacunas" para minimizar "zonas mortas" na matriz de lentes. Na modalidade ilustrada na Figura 11-11, uma matriz de microlentes refrativas é mostrada sem nenhuma lacuna entre as lentes individuais. Em algumas modalidades, fabricar uma matriz "sem lacunas" pode envolver duas etapas de gravação. Uma primeira gravação pode estabelecer a profundidade da topografia de microlente pela etapa 11-1801. Uma segunda gravação pode seguir a primeira gravação para eliminar as lacunas planas entre as microlentes individuais pela etapa 11-1803 de modo que uma lente pare na borda em que outra lente começa. A soma da primeira e segunda gravações define o comprimento focal. Na modalidade ilustrada na Figura 11-12, uma vista superior de uma matriz de microlentes é mostrada após a primeira gravação HF(1), após a segunda gravação HF(2), após a matriz de microlentes ser revestida com um material de nitreto de silício de índice refrativo mais alto (3), e após o material de índice refrativo alto ser polido e aplanado (4).

[00592] Cada uma das lentes refrativas na matriz de lentes refrativas pode ser fabricada de qualquer forma adequada. Uma matriz de lentes refrativas exemplificativo é ilustrada na Figura 11-13, em que uma camada de nanopassagem 11-2007 é fabricada na parte superior de uma camada espaçadora transparente 11-2001, que fica na parte superior de uma camada de lente dielétrica 11-2003, que fica na parte

superior de um substrato 11-2005. Em algumas modalidades, uma lente refrativa pode ser fabricada com o uso de processos de fotolitografia padrões e conjuntos de procedimentos de gravação. Qualquer material dielétrico adequado, tal como SiO_2 ou nitreto de silício, pode ser usado para formar a lente refrativa. Na modalidade ilustrada na Figura 11-14, nitreto de silício é usado para preencher a topografia do substrato de SiO_2. A primeira etapa 11-2101 no processo de fabricação pode envolver a deposição de uma máscara de gravação dura 11-2114 diretamente na parte superior de um substrato de SiO_2 11-2110. Qualquer metal adequado pode ser usado para a máscara de gravação dura 11-2114 que não dissolva durante o mesmo processo de gravação usado para a camada de SiO_2. Por exemplo, Cr é usado, mas outros metais são possíveis. A próxima etapa pode envolver a aplicação de uma camada fotorresistente 11-2120 na parte superior da máscara de gravação dura 11-2114. Conjuntos de procedimentos fotolitográficos convencionais são usados para criar uma estampa circular na máscara de gravação dura pela etapa 11-2103. A estampa circular é, então, transferida para a camada de Cr subjacente com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais de gravação, tais como conjuntos de procedimentos de gravação com íon reativo, por exemplo. A camada de SiO_2 é gravada com o uso de qualquer conjunto de procedimentos gravação seletiva adequado que possa gravar o SiO_2, mas não a máscara de gravação dura. Por exemplo, uma gravação úmida isotrópica com o uso de HF é usada para criar uma superfície côncava na camada de SiO_2. A máscara de gravação dura 11-2114 é, então, removida com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais de gravação pela etapa 11-2105. Opcionalmente, uma segunda gravação úmida com o uso de HF é realizada para eliminar as lacunas entre as lentes. Para criar a lente refrativa, a cavidade na camada de SiO_2 é preenchida com uma camada de material de índice refrativo alto 11-2118, tal

como nitreto de silício, pela etapa 11-2107. Por fim, a superfície superior da lente é aplanada com conjuntos de procedimentos convencionais pela etapa 11-2109, tal como polimento mecânico químico, por exemplo. Uma camada espaçadora 11-2124 pode ser depositada na parte superior da camada 11-2118 pela etapa 11-2111. Por exemplo, uma camada espaçadora feita de ORMOCER^{TM} pode ser revestida repuxada na parte superior da camada de nitreto de silício. Alternativamente, uma camada de SiO_2 pode ser depositada. A cavidade de amostra pode ser fabricada diretamente na parte superior da lente refrativa. Em outras modalidades, outras camadas podem ser depositadas entre a lente refrativa e a cavidade de amostra.

[00593] Alternativamente, cada lente refrativa pode incluir uma camada antirreflexo para melhorar adicionalmente a eficiência óptica. Em algumas modalidades, uma camada antirreflexo pode revestir uma parte inferior, parte superior ou todos os lados de uma lente. Na modalidade ilustrada na Figura 11-15, uma cavidade de SiO_2 11-1810 é gravada pela etapa 11-1801, uma camada antirreflexo 11-1822 é depositada na cavidade gravada pela etapa 11-1803, e uma camada de nitreto de silício 11-1818 é depositada para preencher a cavidade primeiro. A camada de nitreto de silício é polida por meio de CMP pela etapa 11-1807 e uma segunda camada antirreflexo 11-1826 é depositada na parte superior da camada de nitreto de silício polida pela etapa 11-1809. Camadas adicionais podem ser depositadas na parte superior da camada antirreflexo, tal como a camada espaçadora descrita acima e mostrada como camada 11-1824 em Figura 11-18. As camadas antirreflexo podem ter os seguintes parâmetros: índice de refração, n_C = sqrt($n_{óxido}$, $n_{nitreto}$)= sqrt(1,46*1,91) =1,67; faixa de índice refrativo de 1,67 a 1,75; e, espessura t = $\lambda/(4*n_C)$ = 675 nm/(1,670*4) =101,1 nm. A camada antirreflexo pode ser depositada de qualquer forma adequada. Por exemplo, pode ser usado PECVD. Alternativa-

mente, pode ser usado LPCVD.

I. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE LENTE: LENTE DE FRESNEL

[00594] Um elemento óptico difrativo (DOE) pode ter qualquer formato adequado e pode ser fabricado de qualquer forma adequada para melhorar a focalização de luminescência nos sensores CMOS e a classificação dos fótons de luminescência. Em algumas modalidades, o DOE pode incluir uma seção de uma lente de Fresnel. Conforme ilustrado nas Figuras 11-16 a 11-20, o DOE é caracterizado como uma seção quadrada deslocada do centro de uma lente de Fresnel. Conforme ilustrado na Figura 11-17, o DOE pode compreender duas camadas de célula de unidade em que a primeira camada 11-2301 contém recursos "pequenos" e a segunda camada 11-2303 contém recursos "grandes". As camadas de célula de unidade podem ter qualquer afastamento adequado, e podem adicionalmente ter afastamento variável de acordo com o projeto óptico da lente de Fresnel. Conforme ilustrado no exemplo na Figura 11-17, a camada de DOE pequeno tem um afastamento de 220 nm e a camada de DOE grande tem um afastamento de 440 nm. A camada de DOE grande pode ser sobreposta à camada de DOE pequeno (ou vice-versa) para criar uma óptica difrativa multinível. A Figura 11-17 ilustra um exemplo de uma matriz de Fresnel deslocada 11-2405, em que marcadores fiduciais grandes circundam a lente de Fresnel deslocada. Adicionalmente, a matriz de Fresnel deslocada pode ser posicionada na parte superior do sensor para fornecer focalização e separação espectral de luminescência no sensor.

[00595] Alternativamente, um elemento óptico difrativo (DOE) pode ser embutido sob a nanopassagem para melhorar a focalização da energia de excitação na e a coleta de luminescência da nanopassagem. Em algumas modalidades, a lente de Fresnel embutida posicionada sob a nanopassagem e a lente de Fresnel deslocada posiciona-

da sobre o sensor podem ter uma estrutura escalonada com um período variável e tamanho de degrau variável. Em outras modalidades, apenas a lente de Fresnel deslocada posicionada sobre o sensor pode ter um período variável e tamanho de degrau variável. Essas lentes difrativas podem ser fabricadas com o uso de processos de fotolitografia padrões e conjuntos de procedimentos de gravação. Conforme ilustrado na Figura 11-18, a estampa de lente difrativa 11-2501 é caracterizada como tendo uma estrutura escalonada que compreende degraus grandes (estampa grande) e degraus pequenos (estampa pequena) em cada degrau maior, em que ambos têm um período decrescente quando visualizados da esquerda para a direita. O processo de fabricação para a lente difrativa escalonada de período variável pode envolver a gravação dos degraus grandes primeiro, seguida por gravação dos degraus pequenos, conforme ilustrado na Figura 11-19, que podem proteger os cantos dos degraus grandes durante a segunda gravação. Uma abordagem alternativa é gravar os degraus pequenos primeiro em um substrato plano, seguido pela gravação dos degraus grandes, conforme ilustrado na Figura 11-23. Qualquer material dielétrico adequado, tal como SiO_2 ou nitreto de silício, TiO_2 ou Ta_2O_5, pode ser usado para formar a camada de preenchimento para a lente difrativa e a camada escalonada. Na modalidade ilustrada na Figura 11-26, nitreto de silício é usado para fazer a camada de preenchimento e SiO_2 é usado para fazer a camada escalonada.

[00596] A primeira etapa no processo de fabricação da camada de SiO_2 escalonada pode envolver depositar uma máscara de gravação dura 11-2214 diretamente na parte superior de uma camada de SiO_2 11-2210 seguida por uma camada antirreflexo 11-2222 seguida por uma camada fotorresistente 11-2220 pela etapa 11-2201. Qualquer material adequado pode ser usado para a máscara de gravação dura. Por exemplo, a-Si pode ser usado para a máscara de gravação dura

mostrada na Figura 11-26, mas outros materiais são possíveis. A próxima etapa pode envolver a aplicação de um ARC e/ou uma camada fotorresistente na parte superior da máscara de gravação dura de a-Si. Conjuntos de procedimentos fotolitográficos convencionais podem ser usados para criar a estampa binária grande de período variável. As estampas são transferidas para a camada de SiO_2 subjacente com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais de gravação, tais como conjuntos de procedimentos de gravação com íon reativo, por exemplo. Conforme mostrado na Figura 11-19, a camada de SiO_2 11-2210 é gravada pela etapa 11-2203. A camada de SiO_2 11-2210 é decapada e limpa pela etapa 11-2205 com o uso de conjuntos de procedimentos convencionais.

[00597] A profundidade de gravação de um degrau grande de lente difrativa pode ser qualquer profundidade adequada que atinja o comprimento focal desejado. Na modalidade ilustrada na Figura 11-19, essa profundidade de gravação na camada de SiO_2 é aproximadamente 684 nm para o degrau grande. Conjuntos de procedimentos convencionais são, então, usados para decapar os resíduos de resistente e de máscara de gravação e limpar a superfície da camada de SiO_2. A próxima etapa pode envolver gravar os degraus pequenos em cada degrau grande. Na modalidade ilustrada na Figura 11-19, cada um dos degraus grandes compreende quatro degraus menores.

[00598] Uma segunda máscara de gravação dura de Si 11-2244 é, então, depositada na camada de SiO_2 1estampada 1-2310 pela etapa 11-2207. Uma camada ARC 11-2342 é, então, depositada na parte superior da camada de Si 11-2610 seguida por uma camada de máscara de gravação fotorresistente 11-2640. A segunda de estampa binária pequena de período variável é transferida para o fotorresistente e/ou a camada ARC pela etapa 11-2209, e a camada de SiO_2 11-2210 é gravada para formar uma lente de Fresnel.

[00599] Em uma modalidade alternativa, as etapas de fabricação são similares àquelas descritas na Figura 11-19, no entanto, dois degraus pequenos são gravados por degrau grande deixando um total de quatro degraus. Em outras modalidades, qualquer número de etapas pode ser usado. Os degraus pequenos são, então, gravados na camada de SiO_2 11-2210. A espessura de um degrau pequeno de lente difrativa pode ser qualquer espessura adequada.

[00600] Estágios adicionais no processo de fabricação que seguem a criação da camada de SiO_2 escalonada 11-2810 pela etapa 11-2801 podem envolver preencher as cavidades pela etapa 11-2803 com qualquer material de lente de índice alto adequado 11-2818, tal como nitreto de silício, por exemplo, e depositar uma camada transparente 11-2828 para criar uma "lente de Fresnel embutida", conforme ilustrado na Figura 11-20. A estrutura escalonada usada para a "lente de Fresnel embutida" pode ter aproximadamente os mesmos recursos e/ou recursos de tamanho menor que a estrutura escalonada usada para a lente de Fresnel deslocada. Qualquer método para depositar o nitreto de silício pode ser usado tal como PECVD, por exemplo. Opcionalmente, a camada de nitreto de silício pode ser uniformemente polida até o degrau superior do material de SiO_2 ser exposto pela etapa 11-2805. Alternativamente, a camada de nitreto de silício 11-2818 é polida uniformemente, mas o material de SiO_2 não é exposto. Na modalidade ilustrada na Figura 11-21, a estrutura escalonada 11-2910 é formada pela etapa 11-2901, e preenchida com um material de índice alto 11-2918 pela etapa 11-2903, e polido pela etapa 11-2905. Uma segunda camada 11-2928 de SiO_2 é, então, depositada por meio de PECVD na parte superior da camada de nitreto de silício polida 11-2918 e polida por meio de CMP pela etapa 11-2907. Em algumas modalidades, a camada espaçadora 11-2928 pode ter uma espessura igual ao comprimento focal que o material da camada espaçadora.

Adicionalmente, outras camadas espaçadoras transparentes adequadas podem ser depositadas na parte superior da camada de nitreto de silício pela etapa 11-2909. A camada de cavidade de amostra pode, então, ser fabricada na parte superior da camada espaçadora transparente e/ou das camadas adicionais.

[00601] Alternativamente, na modalidade ilustrada na Figura 11-22, a camada escalonada 11-3018 para a lente difrativa é feita de nitreto de silício. A camada de nitreto de silício 11-3018 pode ser depositada em qualquer espessura adequada na parte superior de substrato 11-3010 seguida pela máscara de gravação 11-3014, a camada ARC 11-3022 e a camada fotorresistente 11-3020. Na modalidade ilustrada na Figura 11-22, a camada de nitreto de silício tem aproximadamente 1 μm de espessura pela etapa 11-3001. Os processos de fabricação podem ser similares ao descrito acima em relação à criação da camada de lente difrativa em de período variável, escalonada, de SiO_2. Opcionalmente, uma máscara dura diferente pode ser usada para criar a camada escalonada de nitreto de silício pela etapa 11-3003. A camada escalonada de nitreto de silício pode ter aproximadamente os mesmos recursos e/ou recursos de tamanho menor que a camada escalonada de SiO_2. Após a camada escalonada de nitreto de silício ser feita, a camada de nitreto de silício pode ser revestida com qualquer material dielétrico adequado 11-3028. Na modalidade ilustrada na Figura 11-30, a camada de nitreto de silício é revestida com a camada transparente (por exemplo, SiO_2) 11-3028 pela etapa 11-3005. A camada de SiO_2 pode ser depositada com o uso de processos de deposição convencionais tal como PECVD, por exemplo. A camada de SiO_2 pode, então, ser polida para criar uma superfície plana lisa. A camada de cavidade de amostra pode, então, ser fabricada na parte superior da camada de SiO_2 e/ou das camadas adicionais.

[00602] Certos recursos da óptica difrativa podem exigir um certo

grau de uniformidade e/ou precisão durante o processo de fabricação para produzirem uma estrutura com as propriedades ópticas desejadas. Por exemplo, a profundidade de gravação dos degraus grande e pequeno pode exigir um certo grau de precisão. Em algumas modalidades, uma profundidade de gravação dentro de 50 ou 10% do objetivo pode ser exigida para alcançar a eficiência de potência desejada na cavidade de amostra de ponto focal. Adicionalmente, a gravação dos recursos de lente pode exigir um certo grau de uniformidade. Por exemplo, uniformidade de gravação dentro de 5% (ou 50 nm) é exigida para alcançar o comprimento focal desejado.

[00603] Qualquer uma das lentes descritas acima pode ser fabricada com o uso de quaisquer processos de deposição e gravação adequados para criar propriedades ópticas melhoradas. A título de exemplo e não de limitação, pode ser usado PECVD. Os parâmetros de deposição podem ser regulados de qualquer forma adequada para reduzir autoluminescência, reduzir absorção de luminescência da lente e/ou criar um índice alto de refração. Por exemplo, uma autoluminescência e uma absorção de lente reduzidas podem ser alcançadas reduzindo-se a densidade de ligações Si-Si, que podem formar nanocristais de silício, durante a deposição de nitreto de silício. Em algumas modalidades, os gases de entrada e suas razões podem ser modificados para reduzir a densidade de ligações Si-Si e nanocristais de silício. Por exemplo, SiH_4 e N_2 podem ser usados e suas razões ajustadas de qualquer forma adequada para reduzir a densidade de nanocristais de Si. Em outras modalidades, SiH_4 e NH_3 podem ser usados e suas razões ajustadas de qualquer forma adequada para reduzir a densidade de ligações Si-Si e nanocristais de silício. Por exemplo, a razão entre NH_3 e SiH_4 pode ser pelo menos 10:1. Ademais, regulagem das frequências que controlam o plasma durante PECVD pode ser usada para melhorar as propriedades ópticas. Por exemplo, a razão entre fre-

quência baixa (por exemplo, abaixo de 0,5 MHz) e frequência alta (por exemplo, acima de 10 MHz) pode ser pelo menos 1:1.

[00604] Ademais, os parâmetros de deposição descritos acima podem regular o índice de refração de lente para melhorar as propriedades ópticas. Em algumas modalidades, o índice de refração para uma lente de nitreto de silício pode ser menor do que n=1,92 e associado a um comprimento de onda de 633 nm para um efeito de autoluminescência baixo adequado e/ou uma perda de absorção baixa adequada. As qualidades reguladas descritas acima podem ser relacionadas, proporcionais, correlacionadas, associadas a e/ou dependentes entre si. Por exemplo, um índice de refração de n=1,92 é indicativo de uma luminescência baixa e perda de absorção baixa que é relacionada a uma densidade baixa de ligações Si-Si e nanocristais de silício para uma lente feita de nitreto de silício.

[00605] Vários aspectos do presente pedido podem ser usados isoladamente, em combinação, ou em uma variedade de matrizes não discutidas especificamente nas modalidades descritas anteriormente e, portanto, não são limitados em sua aplicação aos detalhes e disposição de componentes apresentados na descrição precedente ou ilustrados nos desenhos. Por exemplo, os aspectos descritos em uma modalidade podem ser combinados de qualquer maneira com aspectos descritos em outras modalidades.

[00606] Além disso, a invenção pode ser incorporada como um método, do qual pelo menos um exemplo foi fornecido. Os atos realizados como parte do método podem ser ordenados de qualquer forma adequada. Consequentemente, podem ser concebidas modalidades nas quais atos são realizados em uma ordem diferente da ilustrada, que podem incluir realizar alguns atos simultaneamente, mesmo se mostrados como atos sequenciais nas modalidades ilustrativas.

[00607] O uso de termos ordinais tais como "primeiro", "segundo",

"terceiro", etc., nas reivindicações para modificar um elemento de reivindicação não conota por si próprio qualquer prioridade, precedência ou ordem de um elemento de reivindicação sobre outro ou a ordem temporal em que os atos de um método são realizados, mas são usados meramente como identificações para distinguir um elemento de reivindicação que tem um certo nome de outro elemento que tem um mesmo nome (mas usa o termo ordinal) para distinguir os elementos de reivindicação.

[00608] Além disso, a fraseologia e terminologia usadas no presente documento têm o propósito de descrição e não devem ser consideradas limitantes. O uso de "incluir", "compreender", ou "ter", "conter", "envolver", e variações dos mesmos no presente documento, são destinadas a abranger os itens listados depois dos mesmos e equivalentes dos mesmos, bem como itens adicionais.

REIVINDICAÇÕES

1. Dispositivo integrado **caracterizado pelo fato de que** compreende:

pelo menos uma guia de onda configurada para propagar energia de excitação;

um acoplador de grade (4-326) configurado para receber energia de excitação incidente em uma superfície do dispositivo integrado e acoplar a energia de excitação na pelo menos uma guia de onda;

uma pluralidade de pixels, em que um pixel dentre a pluralidade de pixels compreende:

uma cavidade de amostra (11-932) formada na superfície e configurada para receber energia de excitação de pelo menos uma guia de onda; e

pelo menos um sensor posicionado para receber luminescência da cavidade de amostra (11-932) e gerar pelo menos um sinal que fornece informações de identificação da amostra com base na luminescência recebida, em que um sensor do pelo menos um sensor é configurado para agregar, em pelo menos duas caixas de tempo, carreadores de carga gerados por fótons recebidos da luminescência emitida da cavidade de amostra (11-932).

2. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** o pelo menos um sinal é indicativo de um parâmetro temporal da luminescência recebida.

3. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pelo fato de que** o parâmetro temporal é um tempo de vida associado à luminescência da amostra.

4. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** um sensor do pelo menos um sensor é configurado adicionalmente para agregar carreadores de carga nos pelo

menos dois compartimentos em diferentes intervalos de tempo com relação a um tempo após um pulso de energia de excitação ser entregue à cavidade de amostra (11-932) e gera um sinal indicativo do número relativo de fótons que chegou dentro de cada um dos intervalos de tempo diferentes.

5. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** o pelo menos um sinal é indicativo de um espectro da luminescência, um comprimento de onda característico da luminescência e/ou um espectro de absorção da amostra.

6. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato de que** o dispositivo integrado compreende ainda uma camada refletora disposta próxima a um lado do acoplador de grade (4-326) e posicionada para refletir energia de excitação passando através do acoplador de grade (4-326) em direção ao acoplador de grade (4-326).

7. Dispositivo integrado **caracterizado pelo fato de que** compreende:

uma região de pixel (7-508) que compreende:

uma pluralidade de pixels, um pixel dentre a pluralidade de pixels tendo:

uma cavidade de amostra (11-932) disposta em uma superfície de substrato (5-105) do dispositivo integrado, em que a cavidade de amostra (11-932) é configurada para receber uma amostra;

pelo menos um sensor configurado para receber luminescência da cavidade de amostra (11-932), em que um sensor do pelo menos um sensor é configurado para agregar, em pelo menos duas caixas de tempo, carreadores de carga gerados por fótons recebidos da luminescência emitida da cavidade de amostra (11-932); e

pelo menos uma guia de onda para entregar pul-

sos de energia de excitação a uma proximidade da cavidade de amostra (11-932); e

uma região de acoplamento de fonte de excitação (4-201) compreendendo:

um componente de acoplamento incluindo um acoplador de grade (4-326) disposto abaixo da superfície de substrato (5-105), em que o acoplador de grade é (4-326) configurado para receber energia de excitação incidente na superfície de substrato (5-105) de uma fonte de energia de excitação externa e acoplada a energia de excitação ao pelo menos uma guia de onda.

8. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** a cavidade de amostra (11-932) é configurada para isolar uma molécula de um espécime que contém uma pluralidade de moléculas.

9. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** a região de acoplamento de fonte de excitação (4-201) inclui adicionalmente uma camada refletora posicionada para refletir energia de excitação em direção ao acoplador de grade (4-326).

10. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo fato de que** a camada refletora é disposta próxima a um lado do acoplador de grade (4-326) e posicionada para refletir energia de excitação que passa pelo acoplador de grade (4-326) em direção ao acoplador de grade (4-326).

11. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado pelo fato de que** a camada refletora inclui pelo menos um furo e a região de acoplamento de fonte de excitação (4-201) inclui adicionalmente pelo menos um sensor de monitoramento posicionado para receber energia de excitação através do pelo menos um furo na camada refletora e medir uma intensidade da energia de excitação recebida.

12. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado pelo fato de que** a intensidade da energia de excitação recebida fornece um sinal como parte de um ciclo de retorno para um processo de alinhamento da energia de excitação ao acoplador de grade (4-326).

13. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** o pixel compreende adicionalmente pelo menos um elemento de acoplamento entre a cavidade de amostra (11-932) e a pelo menos uma guia de onda para acoplar a energia de excitação da pelo menos uma guia de onda à cavidade de amostra (11-932).

14. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo fato de que** o pelo menos um elemento de acoplamento é uma microcavidade (6-418).

15. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado pelo fato de que** o pelo menos um elemento de acoplamento é uma grade do tipo alvo (6-910).

16. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** o pixel compreende adicionalmente um defletor (3-240) para suprimir a energia de excitação de ser detectada por meio do pelo menos um sensor.

17. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** a região de pixel (7-508) compreende adicionalmente pelo menos um filtro de excitação (7-500) posicionado entre a pelo menos uma guia de onda e o pelo menos um sensor para filtrar seletivamente energia de excitação enquanto transmite energia de luminescência da cavidade de amostra (11-932).

18. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** o acoplador de grade (4-326) tem uma largura que afunila em uma direção de propagação de luz ao lon-

go da pelo menos uma guia de onda.

19. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** a cavidade de amostra (11-932) compreende uma nanoabertura formada em um material metálico.

20. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado pelo fato de que** compreende adicionalmente uma grade de anel concêntrico que compreende uma pluralidade de anéis formados a partir do material metálico, em que a nanoabertura é localizada dentro de um anel mais interno dentre a pluralidade de anéis.

21. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** a pelo menos uma guia de onda é configurada para fornecer a energia de excitação a uma região de excitação dentro da cavidade de amostra (11-932), e uma amostra localizada dentro da região de excitação emite luminescência em resposta à energia de excitação que ilumina a região de excitação.

22. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** a pelo menos uma guia de onda é configurada para entregar energia de excitação a uma proximidade de uma cavidade de amostra (11-932) para cada pixel de uma porção de pixels dentre a pluralidade de pixels.

23. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** o pixel dentre a pluralidade de pixels compreende adicionalmente pelo menos uma estrutura de acoplamento de excitação (5-220) configurada para se acoplar a pelo menos uma guia de onda e energia de excitação direta a uma proximidade de uma cavidade de amostra (11-932).

24. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** o pixel dentre a pluralidade de pixels compreende adicionalmente pelo menos um elemento de acoplamento de energia de superfície configurado para se acoplar à energia de

emissão emitida por uma amostra localizada dentro de uma cavidade de amostra (11-932).

25. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** a profundidade de uma cavidade de amostra (11-932) da pluralidade de cavidades de amostra é entre 50 nm e 500 nanômetros.

26. Dispositivo integrado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado pelo fato de que** paredes laterais de uma cavidade de amostra (11-932) da pluralidade de cavidades de amostra são afuniladas.

27. Sistema **caracterizado pelo fato de que** compreende:

um módulo de fonte de excitação (9-110) que compreende uma fonte de excitação (9-106) configurada para emitir pulsos de energia de excitação que tem uma primeira duração de tempo; e

um dispositivo integrado como definido na reivindicação 1 que inclui:

uma cavidade de amostra (11-932) disposta em uma superfície do dispositivo integrado e configurada para receber uma amostra que, quando acoplada aos pulsos de energia de excitação, emite luminescência;

um sensor que detecta a luminescência ao longo de uma segunda duração de tempo, em que a segunda duração de tempo ocorre após a primeira duração de tempo, em que o sensor é configurado para agregar em pelo menos duas caixas de tempo, carreadores de carga gerados pelos fótons recebidos da luminescência emitida da cavidade de amostra (11-932);

uma primeira trajetória de energia ao longo da qual os pulsos de energia de excitação se movem da fonte de excitação (9-106) a um componente de acoplamento de fonte de energia;

uma segunda trajetória de energia ao longo da qual o

pulso de energia de excitação se move do componente de acoplamento de fonte de energia à cavidade de amostra (11-932); e

uma terceira trajetória de energia ao longo da qual a luminescência se move da cavidade de amostra (11-932) ao sensor.

28. Método de detecção de presença de uma molécula em uma amostra, o método **caracterizado pelo fato de que** compreende:

introduzir uma amostra identificada com um dentre uma pluralidade de marcadores luminescentes em uma cavidade de amostra (11-932) disposta em uma superfície de um dispositivo integrado como definido na reivindicação 1, em que pelo menos uma porção da pluralidade de marcadores luminescentes tem diferentes valores de tempo de vida luminescente;

irradiar a cavidade de amostra (11-932) com pulsos de luz, em que o dispositivo integrado compreende pelo menos uma guia de onda configurada para propagar pulsos de luz à cavidade de amostra (11-932);

agregar em pelo menos duas caixas de tempo, carreadores de carga gerados pelos fótons emitidos a partir da cavidade de amostra (11-932) e recebido por um sensor do dispositivo integrado, em que o sensor é posicionado para receber luz da cavidade de amostra (11-932); e

determinar identidade de um marcador luminescente da pluralidade de marcadores luminescentes com base em pelo menos um sinal indicativo dos carreadores agregados de carga.

29. Dispositivo integrado **caracterizado pelo fato de que** compreende:

uma cavidade de amostra (11-932) configurada para receber uma amostra identificada com pelo menos um dentre uma pluralidade de marcadores luminescentes, cada um dentre pelo menos alguns da pluralidade de marcadores luminescentes têm um valor de

tempo de vida luminescente diferente, em que a cavidade de amostra (11-932) é disposta em uma superfície do dispositivo integrado;

pelo menos uma guia de onda configurada para propagar pulsos de energia de excitação óptica à cavidade de amostra (11-932); e

um sensor configurado para detectar luminescência emitida a partir da cavidade de amostra (11-932) ao longo de uma pluralidade de durações de tempo e agrega carreadores de carga gerados pela luminescência detectada em pelo menos duas caixas de tempo associadas à pluralidade de durações de tempo, em que a pluralidade de durações de tempo é selecionada para diferenciar entre pelo menos alguns da pluralidade de marcadores luminescentes.

30. Dispositivo integrado **caracterizado pelo fato de que** compreende:

uma cavidade de amostra (11-932) disposta em uma superfície do dispositivo integrado e configurada para receber uma amostra identificada com pelo menos um dentre uma pluralidade de marcadores luminescentes, em que cada um dentre a pluralidade de marcadores luminescentes emite luminescência dentro de uma pluralidade de faixas espectrais e uma porção da pluralidade de marcadores luminescentes que emitem luminescência em uma dentre a pluralidade de faixas espectrais tem, cada um, diferentes valores de tempo de vida luminescente;

pelo menos uma guia de onda configurada para propagar pulsos de energia de excitação óptica à cavidade de amostra (11-932); e

uma pluralidade de sensores posicionada para receber luz da cavidade de amostra (11-932), em que cada sensor da pluralidade de sensores é configurado para detectar luminescência para uma da pluralidade de faixas espectrais ao longo da pluralidade de durações de

tempo e agrega carreadores de carga gerados pela luminescência em pelo menos duas caixas de tempo associadas à pluralidade de durações de tempo, a pluralidade de durações de tempo sendo selecionada para diferenciar entre a porção da pluralidade de marcadores luminescentes.

31. Sistema **caracterizado pelo fato de que** compreende:

uma pluralidade de fontes de excitação configuradas para emitir uma pluralidade de energias de excitação, em que cada uma dentre a pluralidade de fontes de excitação emite pulsos de uma dentre a pluralidade de energias de excitação;

um dispositivo integrado como definido na reivindicação 1 que inclui:

uma cavidade de amostra (11-932) disposta em uma superfície do dispositivo integrado e configurada para receber uma amostra identificada com pelo menos um dentre uma pluralidade de marcadores luminescentes, em que uma porção da pluralidade de marcadores luminescentes emite luminescência depois de ser iluminada por uma dentre a pluralidade de energias de excitação tem diferentes valores de tempo de vida;

pelo menos uma guia de onda configurada para propagar pulsos de energia de excitação óptica à cavidade de amostra (11-932); e

um sensor posicionado para receber luz da cavidade de amostra (11-932) e configurado para detectar luminescência a partir de um dentre a pluralidade de marcadores luminescentes ao longo de uma pluralidade de durações de tempo após um pulso de uma dentre a pluralidade de energias de excitação e agrega carreadores de carga produzidos dentro da pluralidade de durações de tempo em diferentes caixas de tempo, em que temporização dos pulsos da pluralidade de energias de excitação e a pluralidade de durações de tempo se dife-

renciam entre a pluralidade de marcadores luminescentes.

32. Método de formação de um dispositivo integrado como definido na reivindicação 1 **caracterizado pelo fato de que** compreende:

formar uma pluralidade de regiões de sensor, em que uma região de sensor dentre a pluralidade de regiões de sensor inclui uma pluralidade de sensores, e cada de pelo menos alguns da pluralidade de sensores é configurado para agregar em pelo menos duas caixas de tempo, carreadores de carga gerados pelos fótons recebidos;

formar uma pluralidade de cavidades de amostra disposta em uma superfície do dispositivo integrado e configurada para receber uma amostra, em que uma cavidade de amostra (11-932) dentre a pluralidade de cavidades de amostra se alinha a uma correspondente dentre a pluralidade de regiões de sensor; e

formar pelo menos uma guia de onda configurada para propagar pulsos de energia de excitação óptica a pelo menos uma cavidade de amostra (11-932) da pluralidade de cavidades de amostra.

33. Método de análise de um espécime, o método **caracterizado pelo fato de que** compreende:

depositar o espécime em uma superfície de um dispositivo integrado como definido na reivindicação 1 que tem uma pluralidade de pixels, em que cada pixel tem uma cavidade de amostra (11-932) disposta em uma superfície do dispositivo integrado e configurada para receber uma amostra identificada com um primeiro marcador de uma pluralidade de marcadores e uma região de sensor que tem pelo menos um sensor;

alinhar o dispositivo integrado a um instrumento que tem pelo menos uma fonte de energia de excitação para acoplar a energia de excitação a uma cavidade de amostra (11-932) de um primeiro pixel e conjunto de circuitos de leitura para receber sinais de leitura do pelo

menos um sensor da região de sensor do primeiro pixel;

iluminar o primeiro marcador com energia de excitação, pelo menos em parte, por pelo menos uma guia de onda configurada para propagar pulsos de energia de excitação à cavidade de amostra (11-932); e

detectar, a partir dos sinais de leitura do pelo menos um sensor da região de sensor do primeiro pixel, um tempo de vida da energia de emissão gerada a partir de uma emissão pelo primeiro marcador, em que o pelo menos um sensor é posicionado para receber luz da cavidade de amostra (11-932) e é configurado para agregar, em pelo menos duas caixas de tempo, carreadores de carga de fótons recebidos de energia de emissão emitida pela amostra.

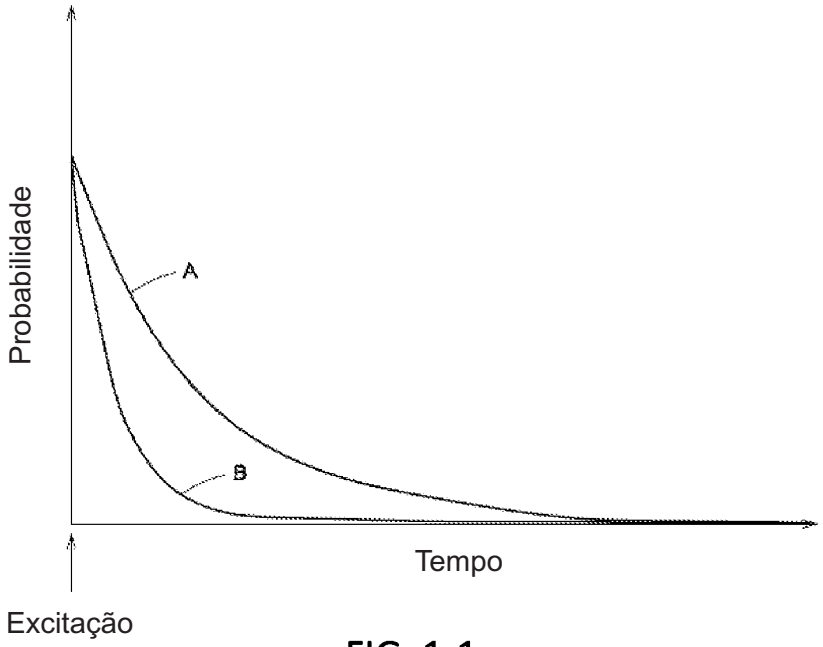


FIG. 1-1

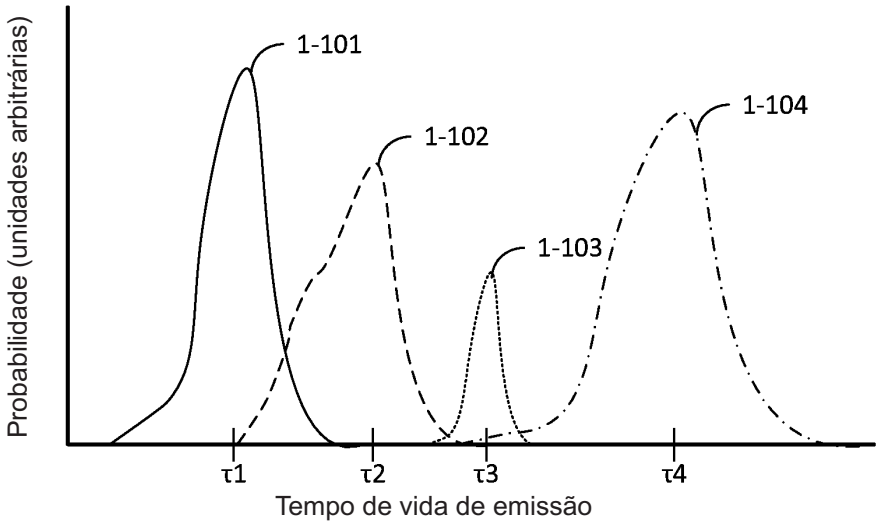


FIG. 1-2A

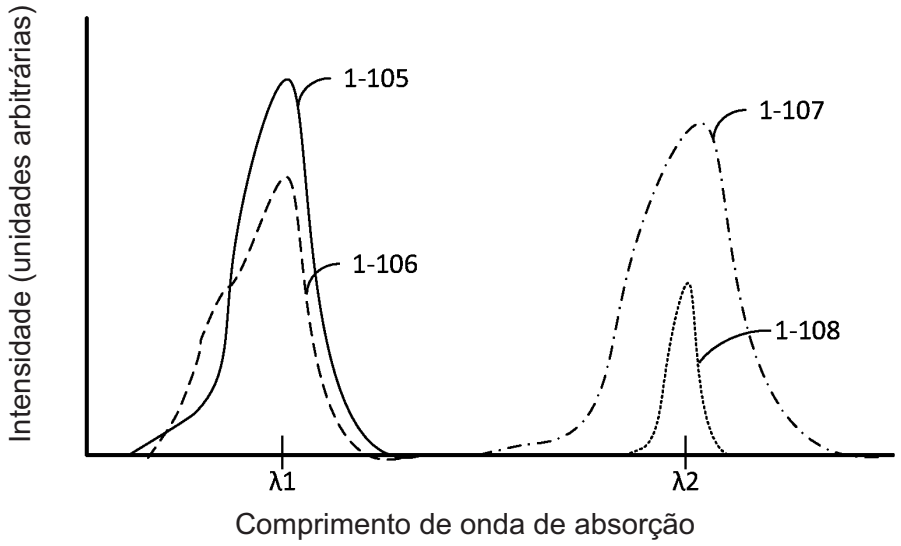


FIG. 1-2B

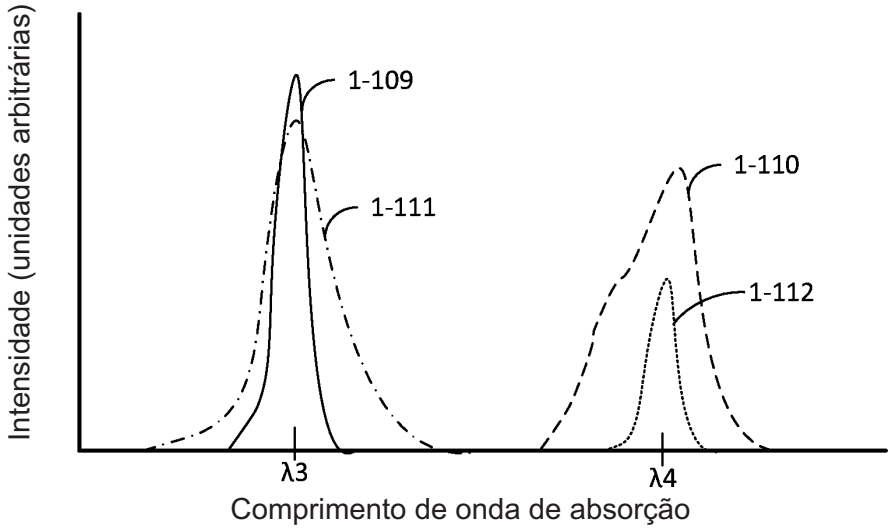


FIG. 1-2C

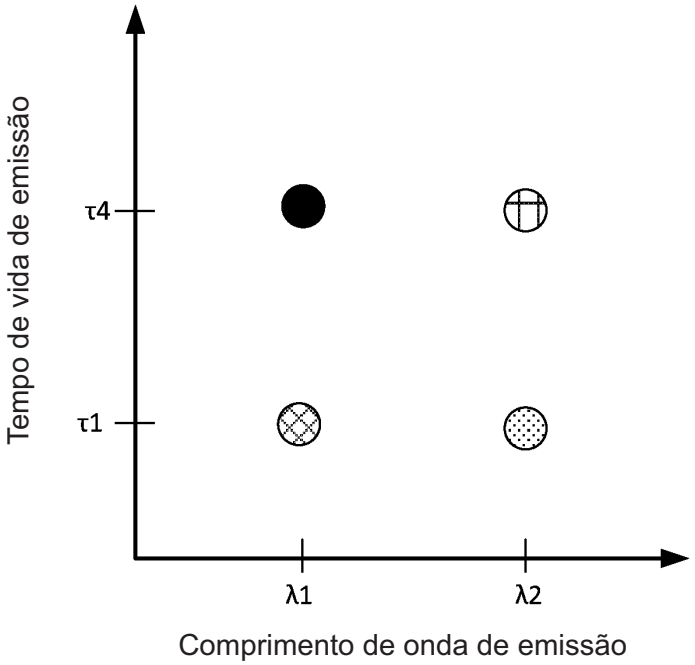


FIG. 1-3A

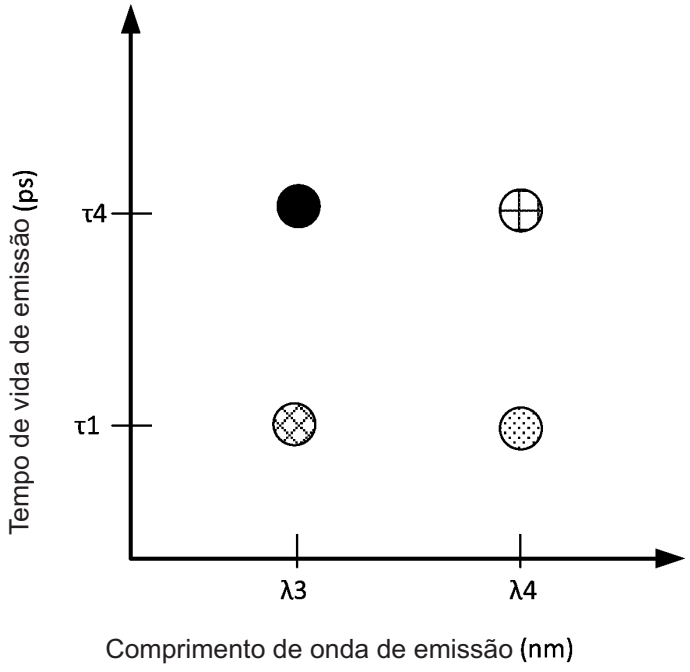


FIG. 1-3B

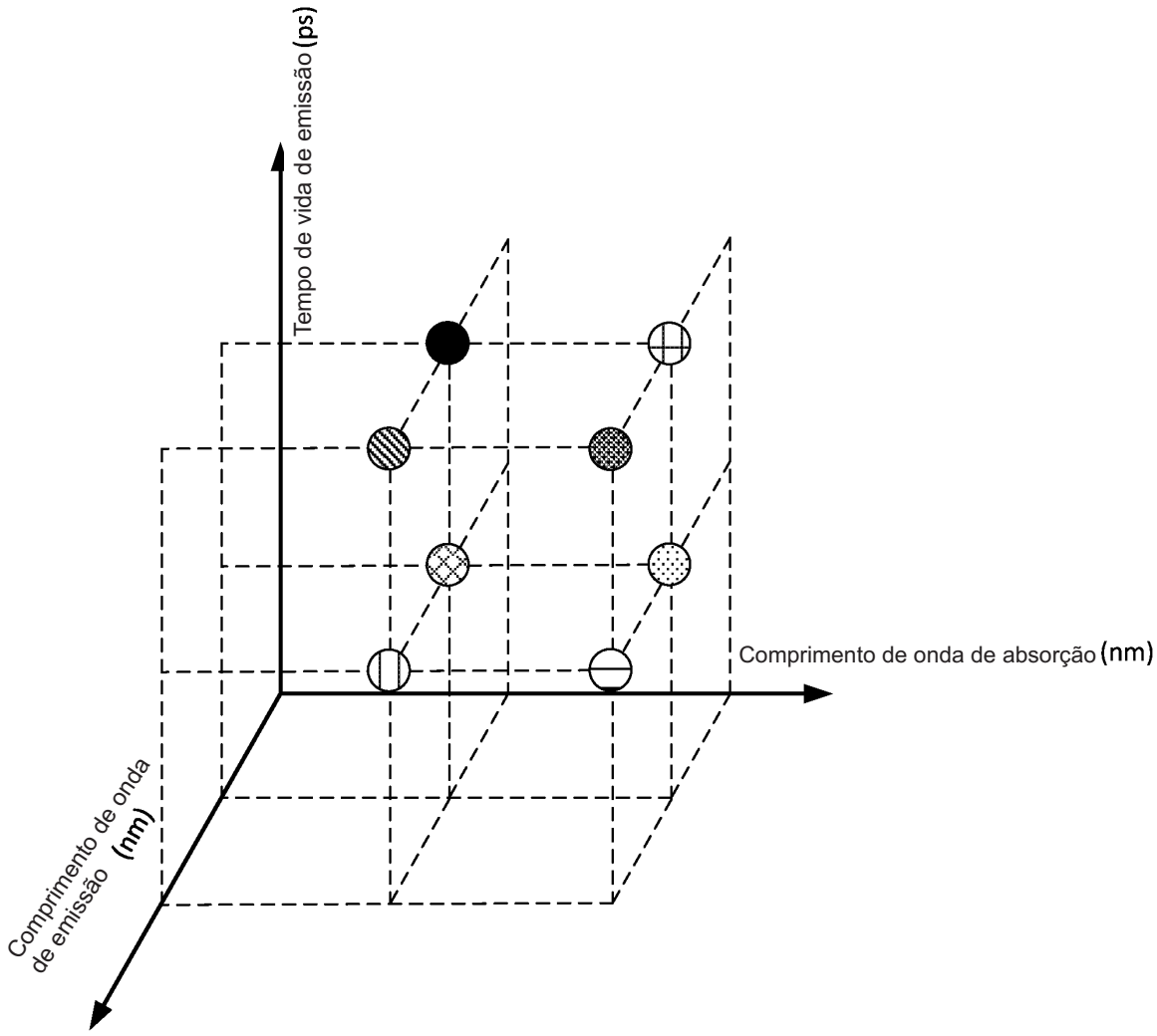

Tempo de vida de emissão (ps)
Comprimento de onda de absorção (nm)
Comprimento de onda de emissão (nm)

FIG. 1-4

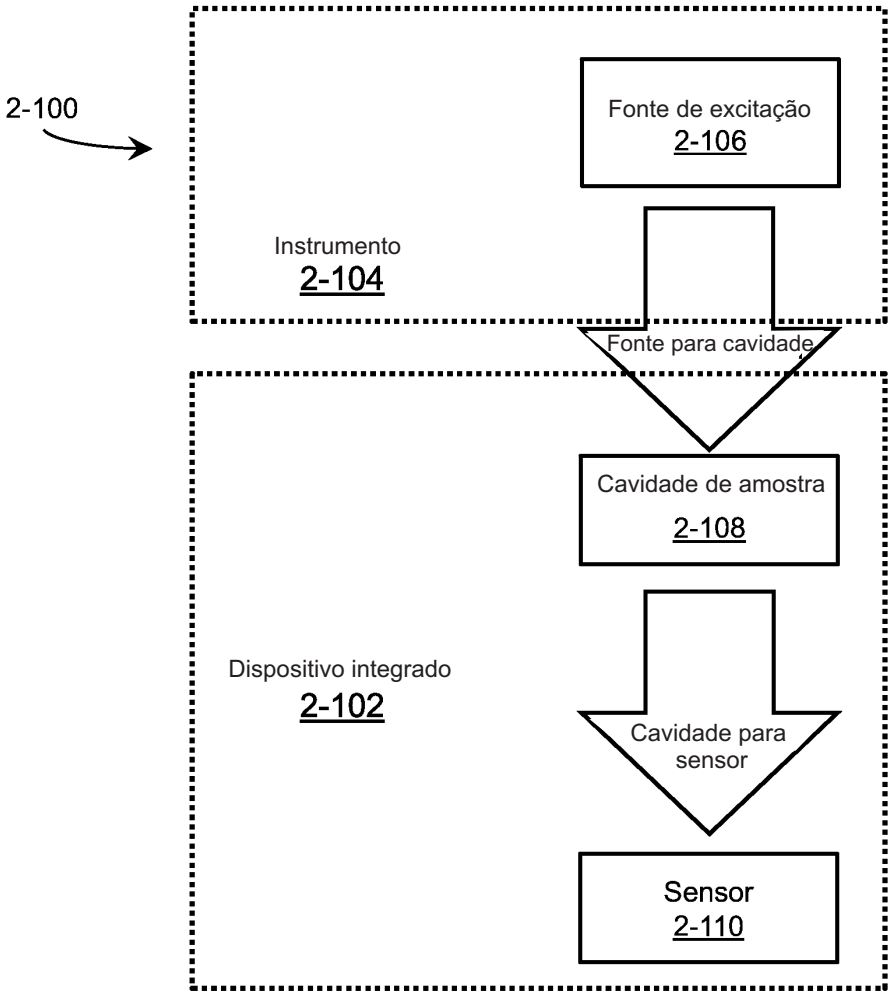

2-100
Fonte de excitação
2-106
Instrumento
2-104
Fonte para cavidade
Cavidade de amostra
2-108
Dispositivo integrado
2-102
Cavidade para sensor
Sensor
2-110

FIG. 2-1A

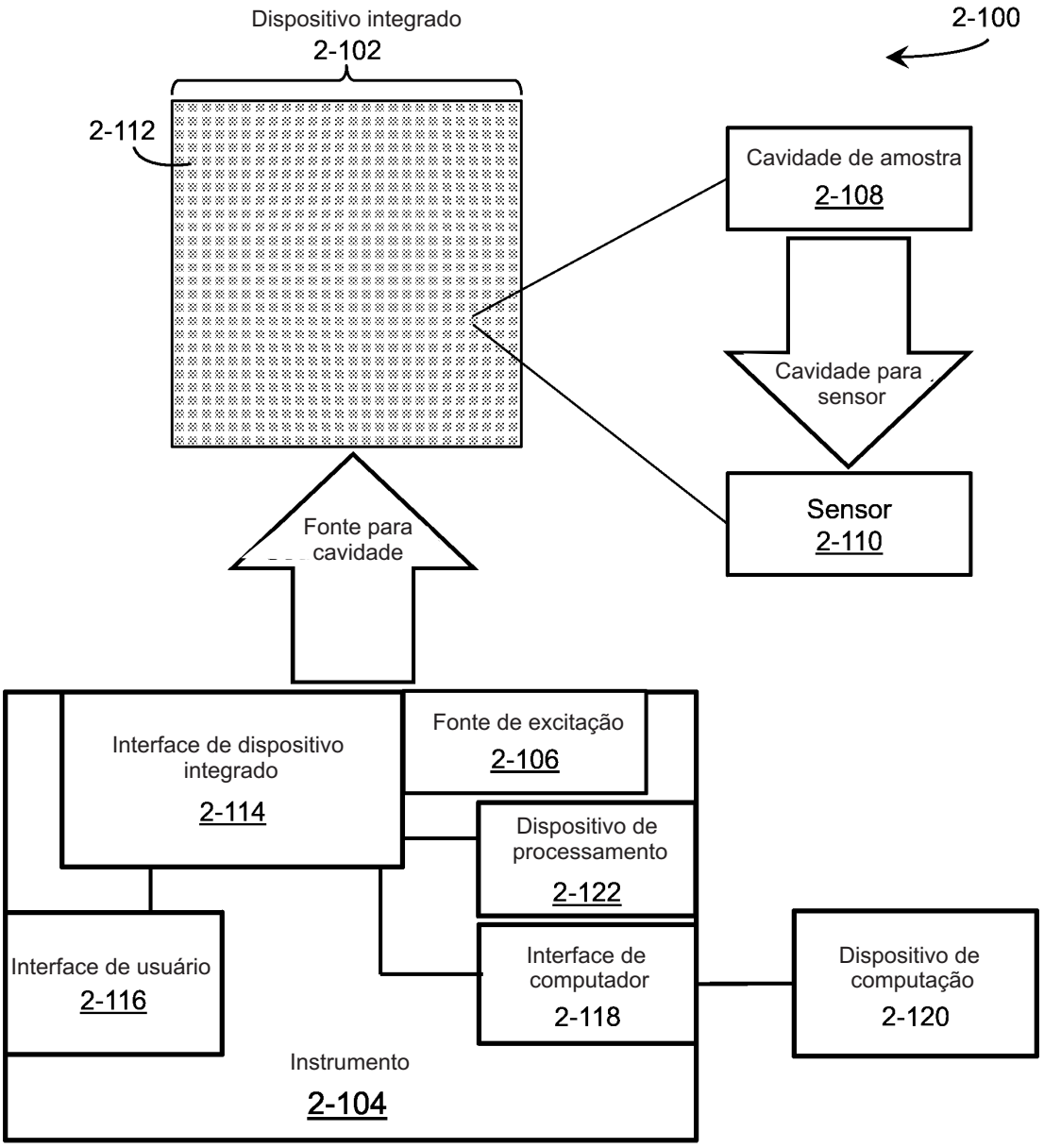

Dispositivo integrado
2-102
2-100
2-112
Cavidade de amostra
2-108
Cavidade para sensor
Sensor
2-110
Fonte para cavidade
Interface de dispositivo integrado
2-114
Fonte de excitação
2-106
Dispositivo de processamento
2-122
Interface de usuário
2-116
Interface de computador
2-118
Dispositivo de computação
2-120
Instrumento
2-104

FIG. 2-1B

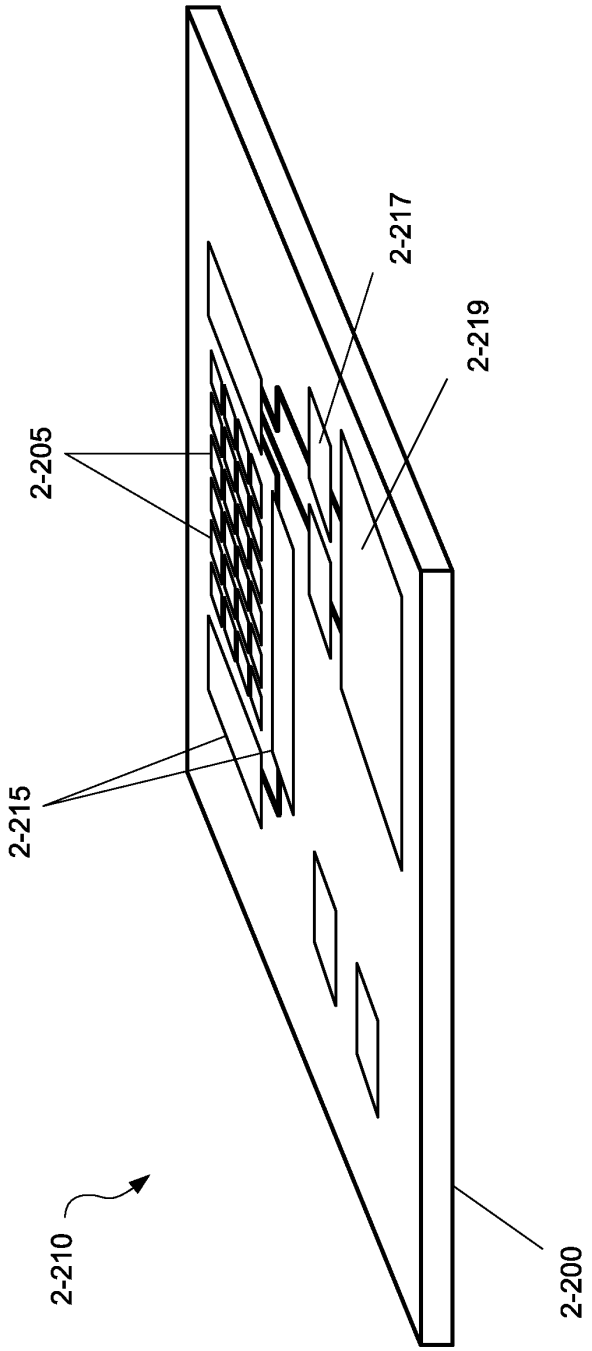


FIG. 2-2

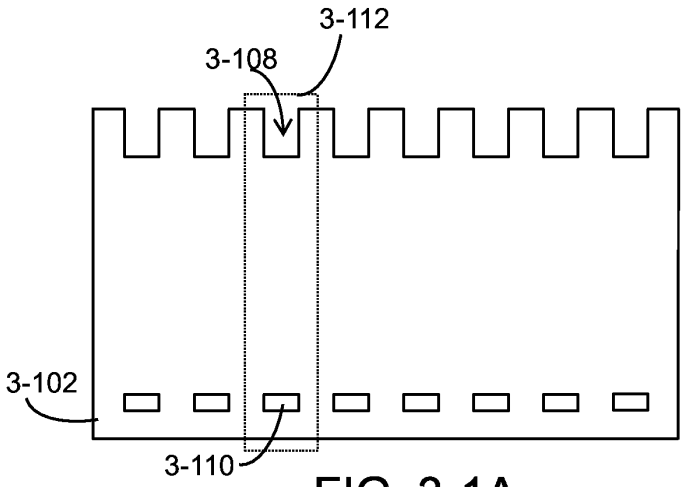


FIG. 3-1A

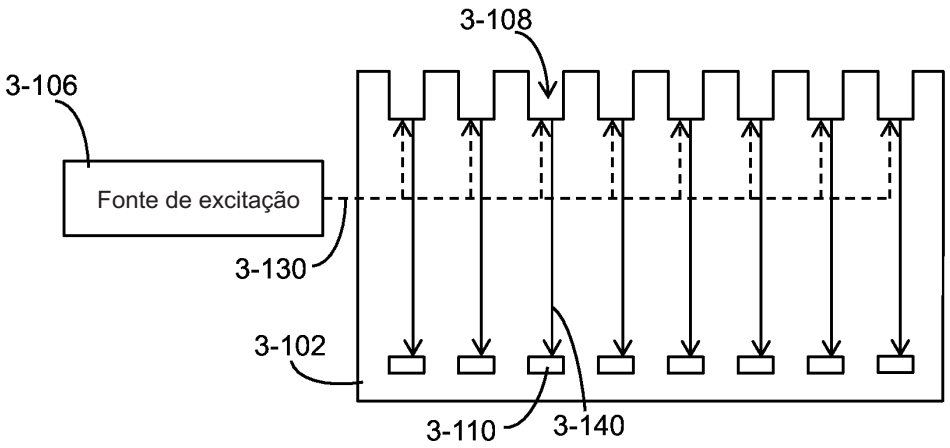


FIG. 3-1B

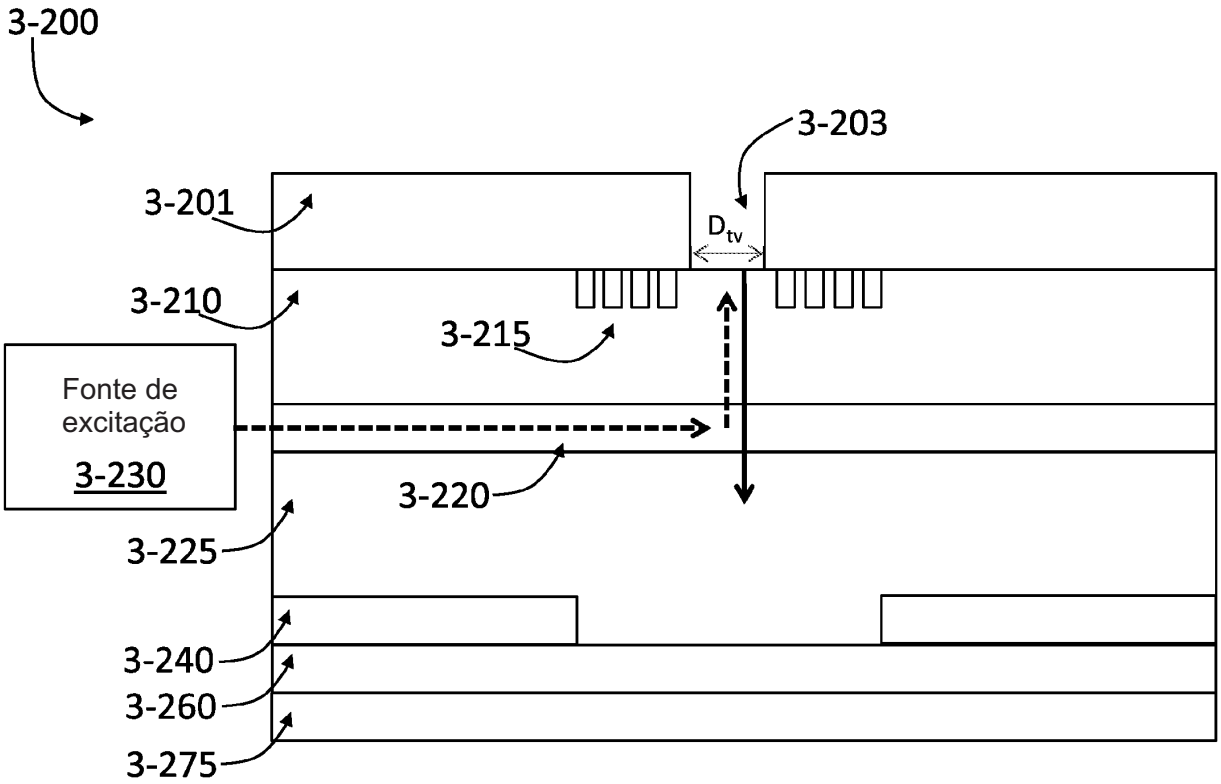

3-200
3-203
3-201
D_{tv}
3-210
3-215
Fonte de excitação
3-230
3-220
3-225
3-240
3-260
3-275

FIG. 3-2

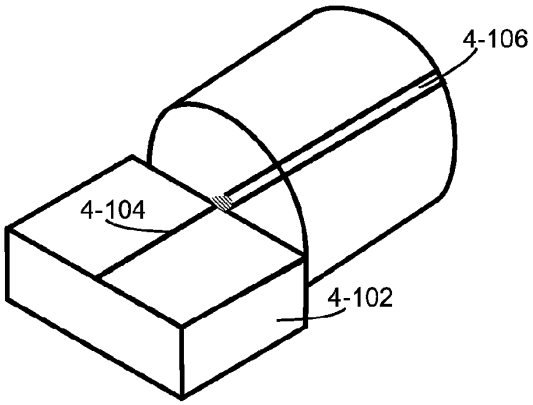


FIG. 4-1A

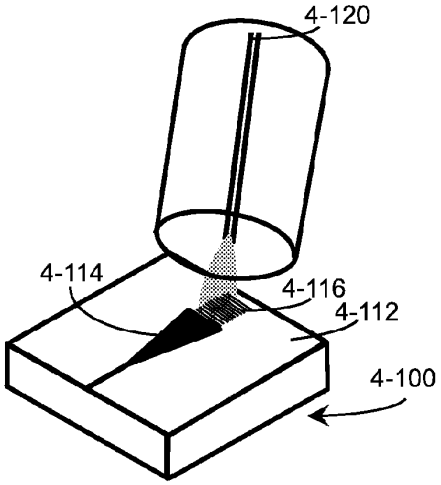


FIG. 4-1B

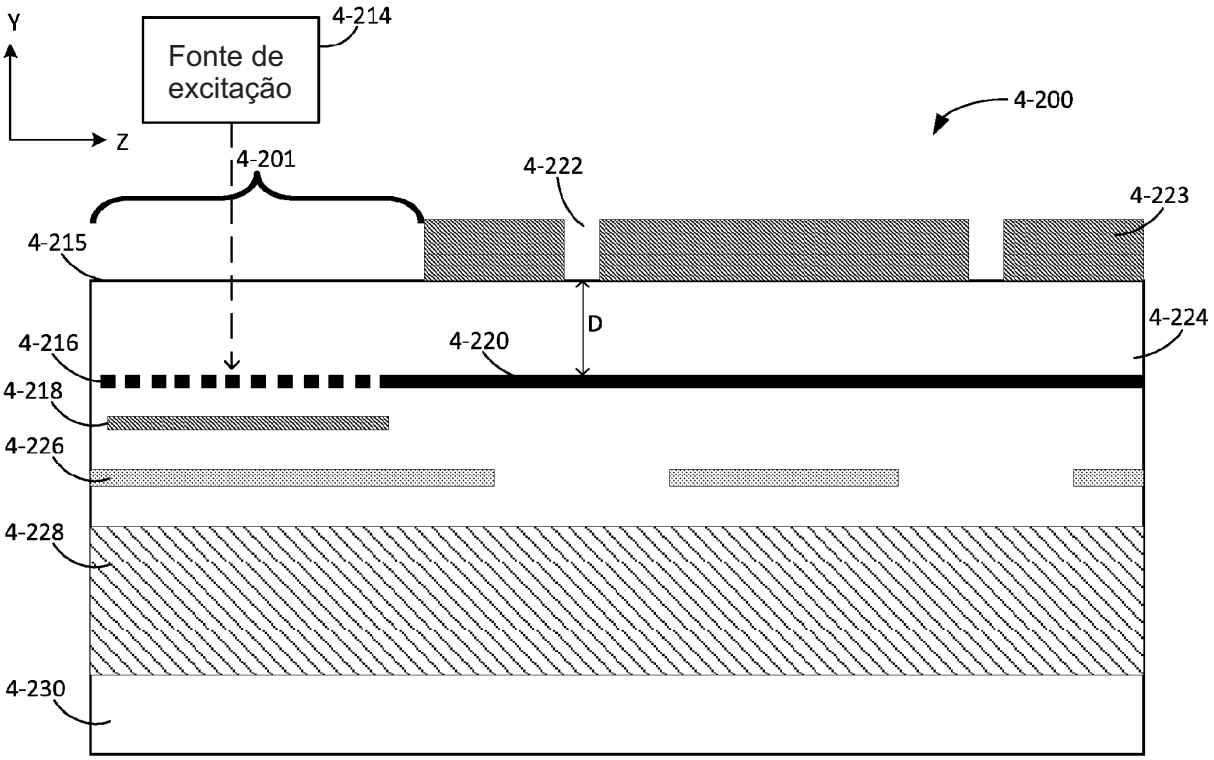


FIG. 4-2

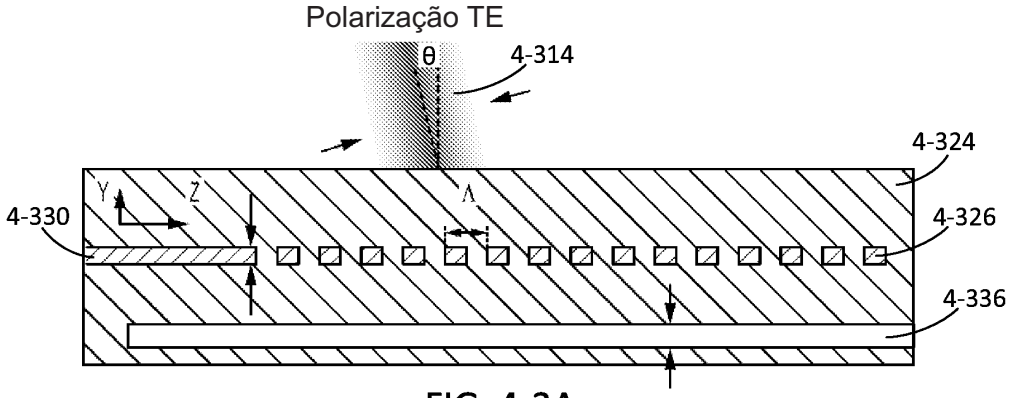


FIG. 4-3A

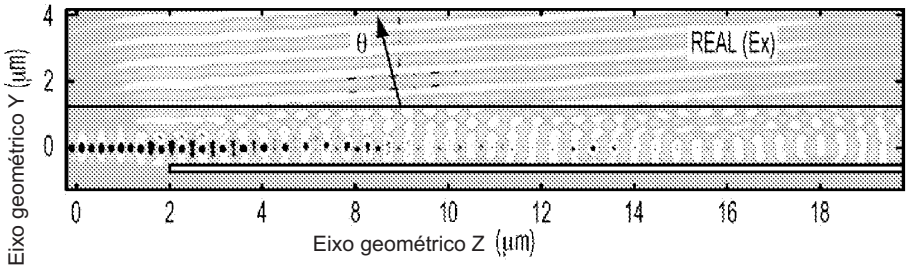


FIG. 4-3B

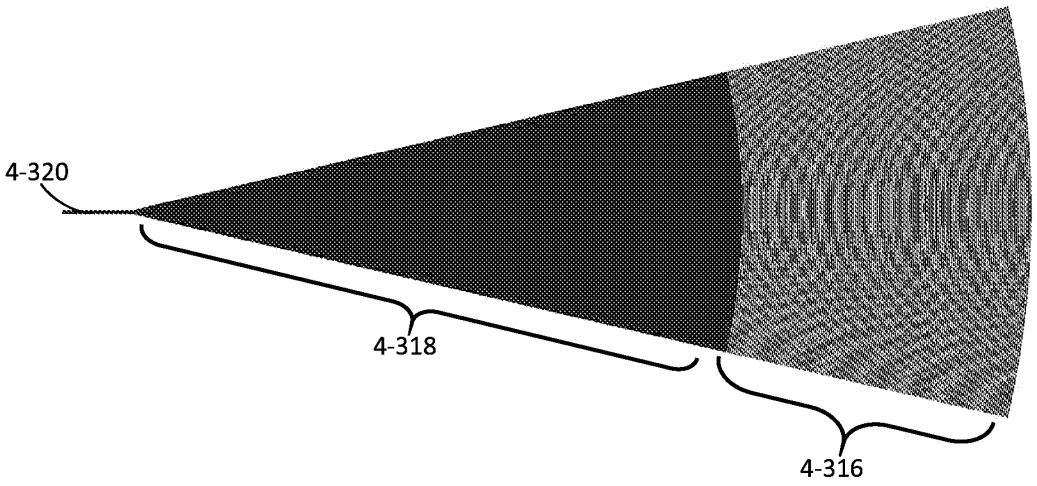


FIG. 4-3C

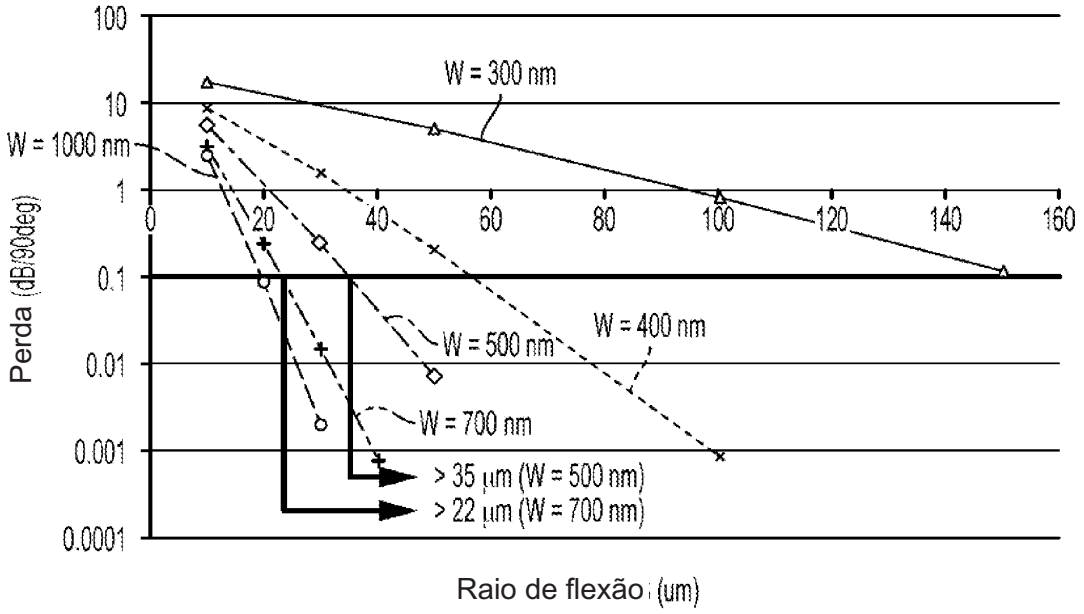

100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
Perda (dB/90deg)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Raio de flexão (um)
W = 300 nm
W = 1000 nm
W = 500 nm
W = 400 nm
W = 700 nm
> 35 μm (W = 500 nm)
> 22 μm (W = 700 nm)

FIG. 4-4

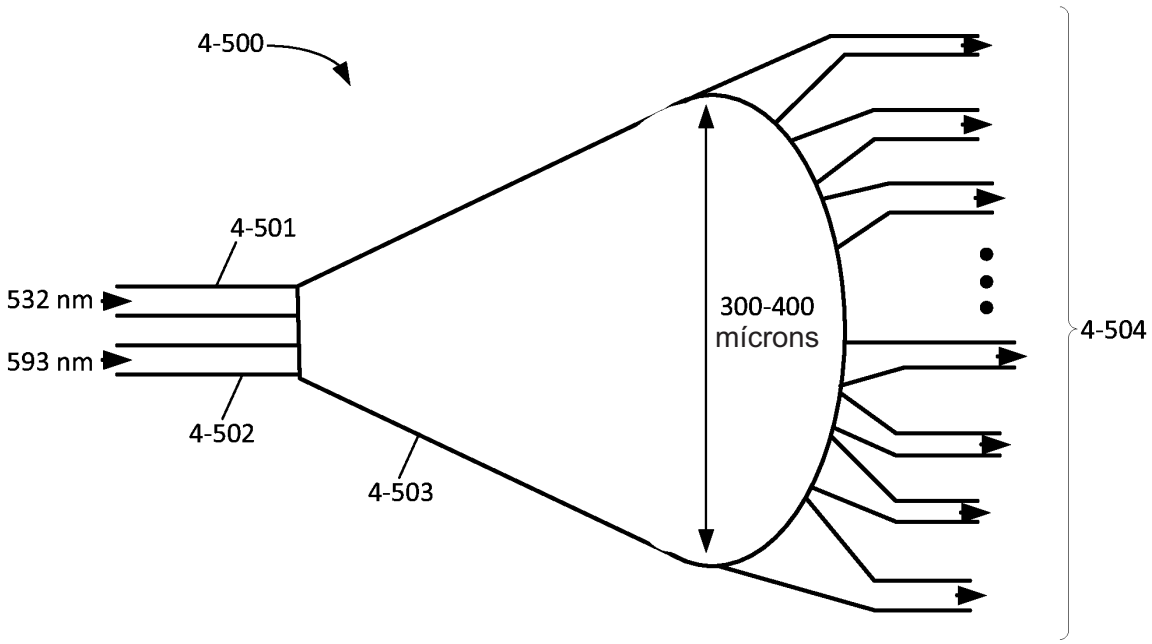

4-500
4-501
532 nm
593 nm
4-502
4-503
300-400
mícrons
4-504

FIG. 4-5

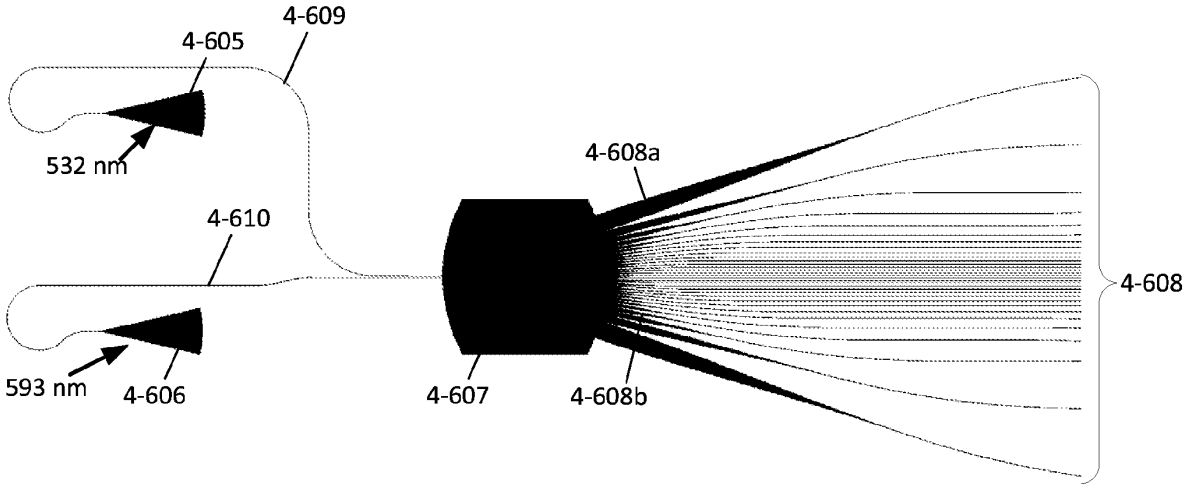


FIG. 4-6

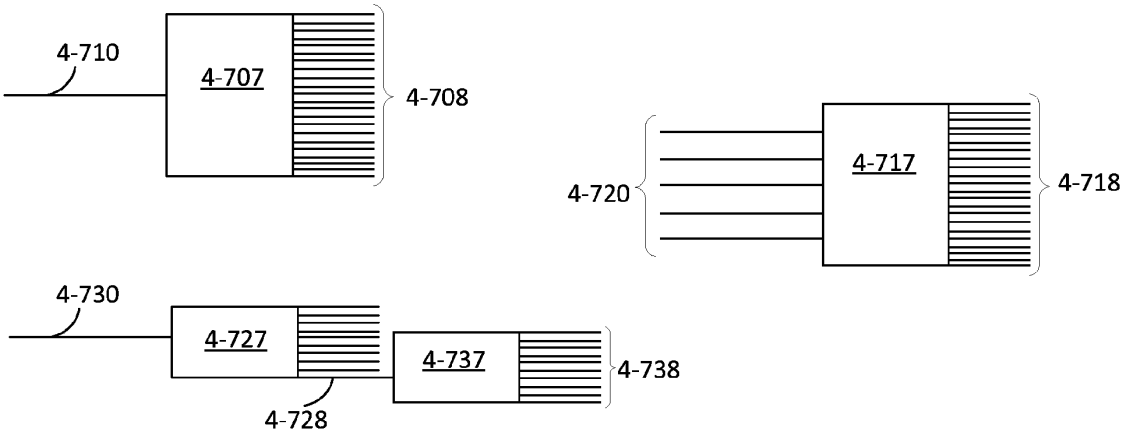


FIG. 4-7

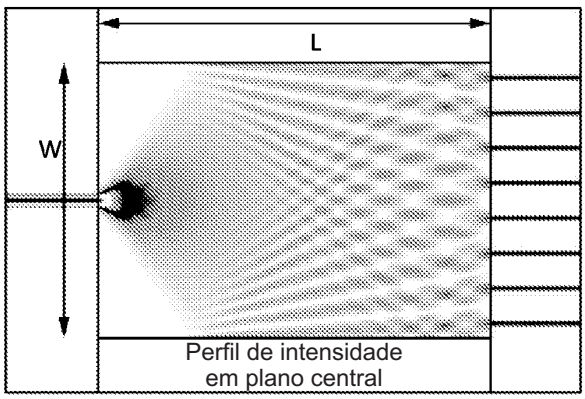


FIG. 4-8

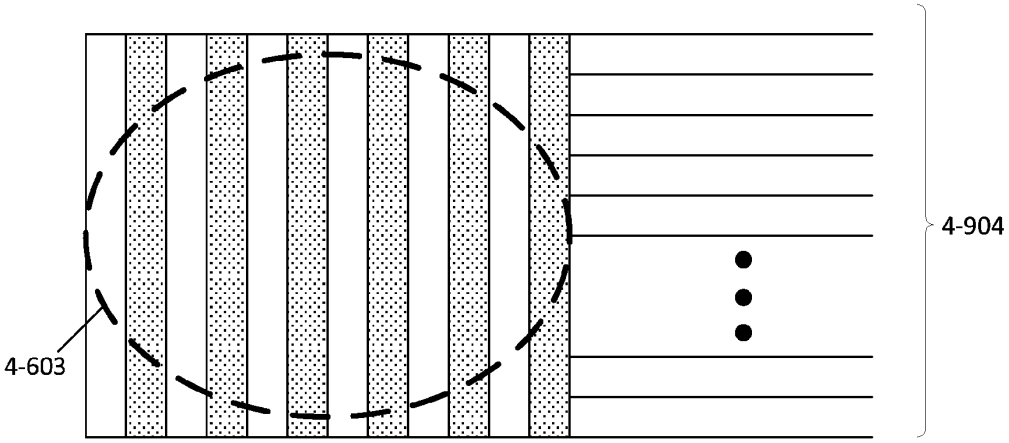


FIG. 4-9A

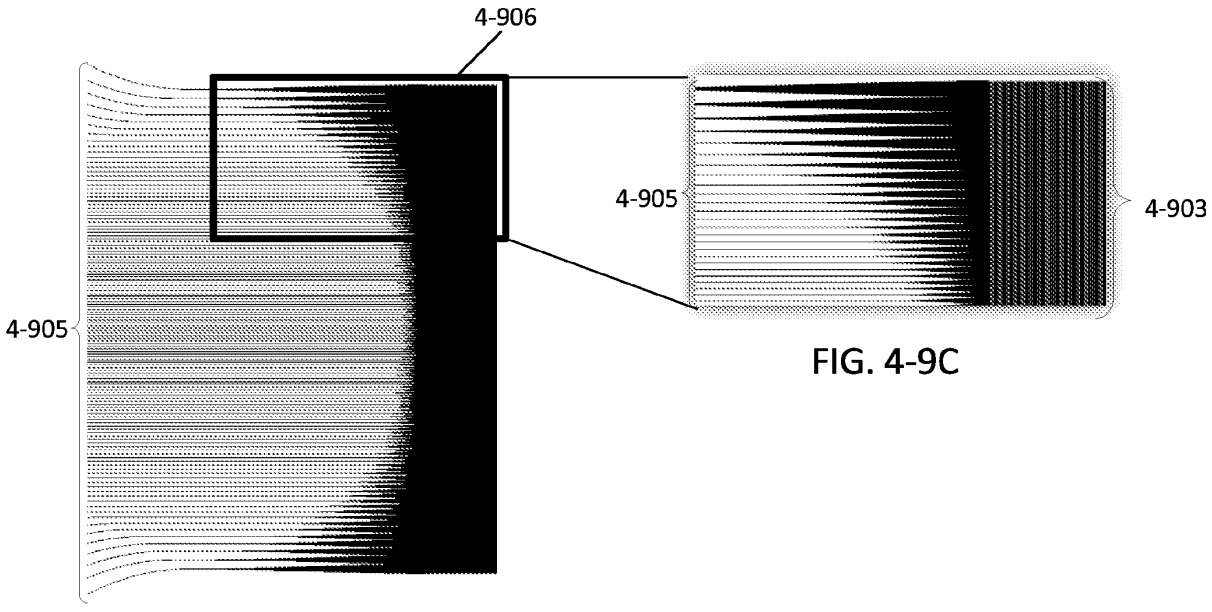


FIG. 4-9C

FIG. 4-9B

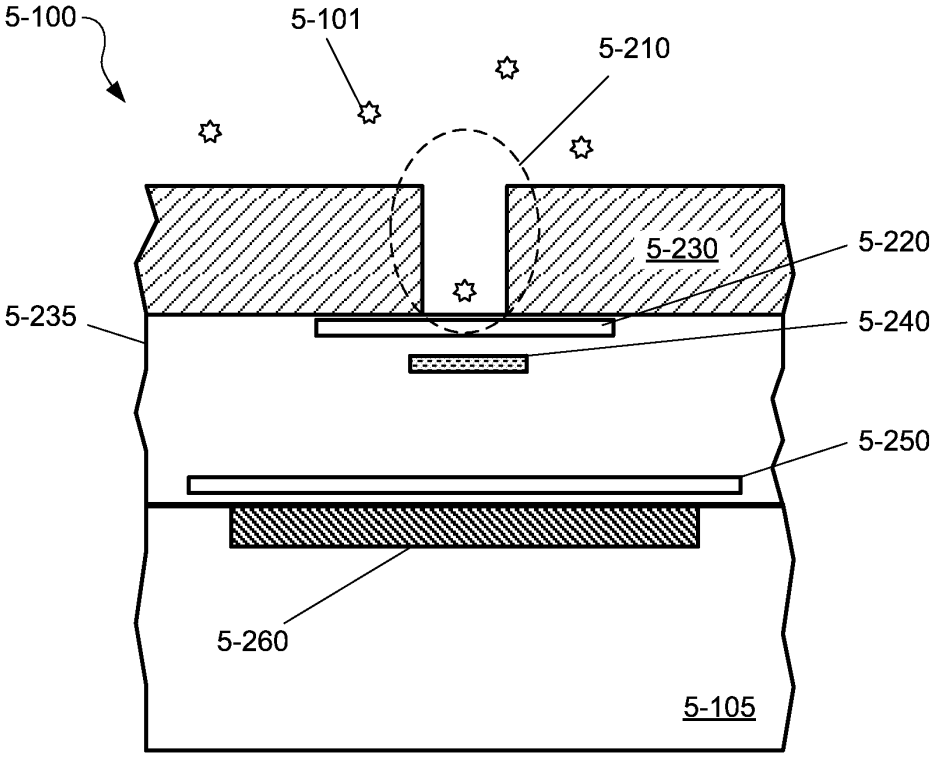

5-100
5-101
5-210
5-230
5-220
5-235
5-240
5-250
5-260
5-105

FIG. 5-1

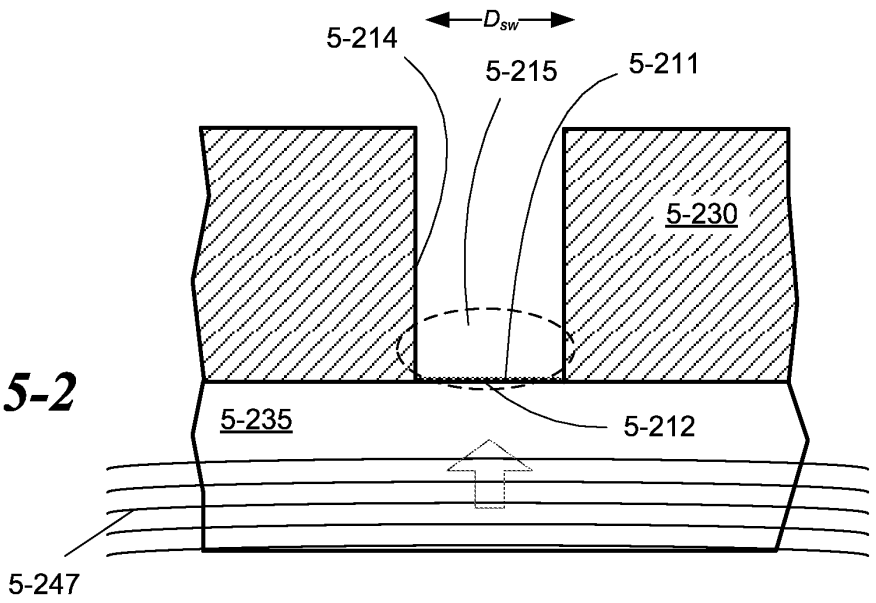

D_{sw}
5-214
5-215
5-211
5-230
5-235
5-212
5-247

FIG. 5-2

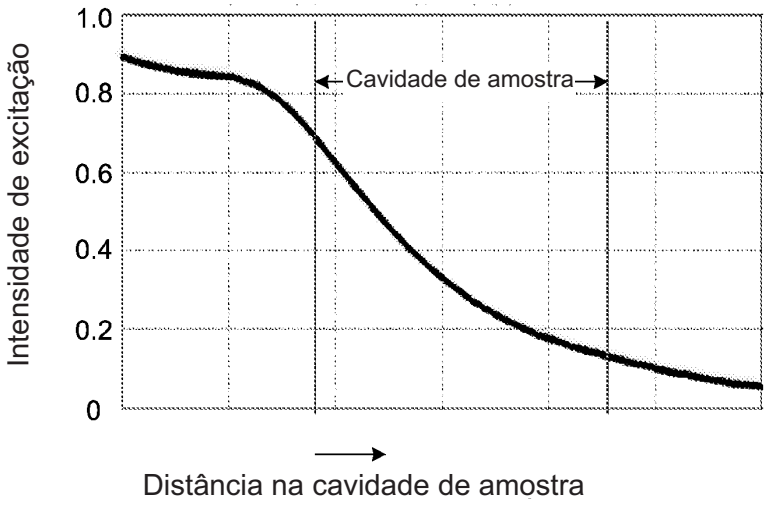


FIG. 5-3

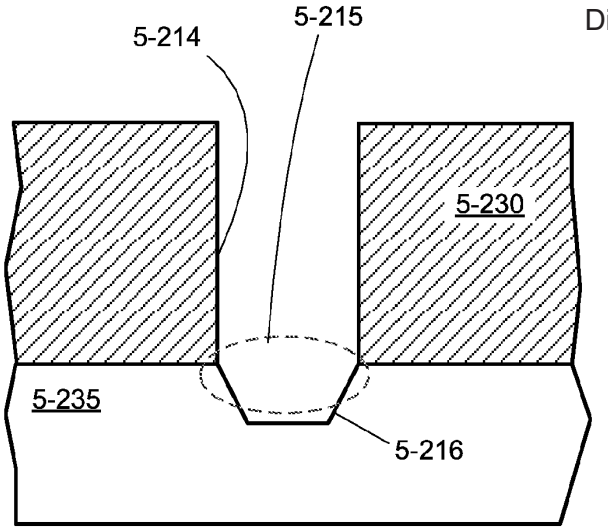


FIG. 5-4

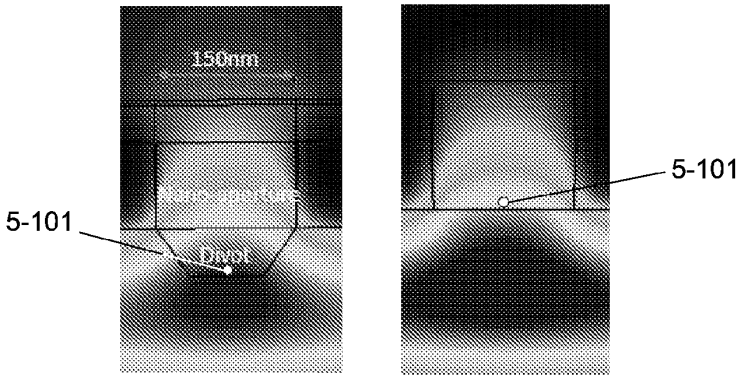


FIG. 5-5

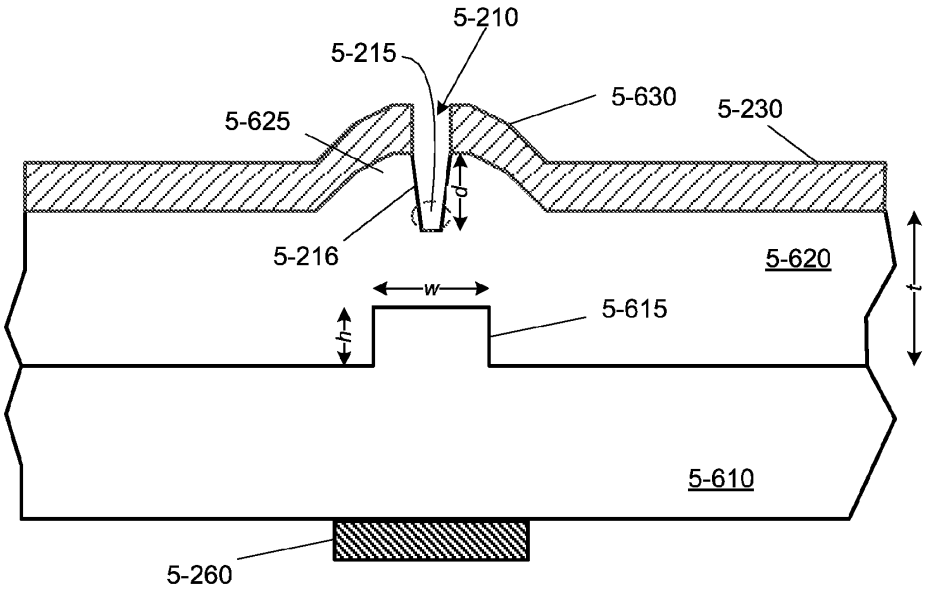


FIG. 5-6A

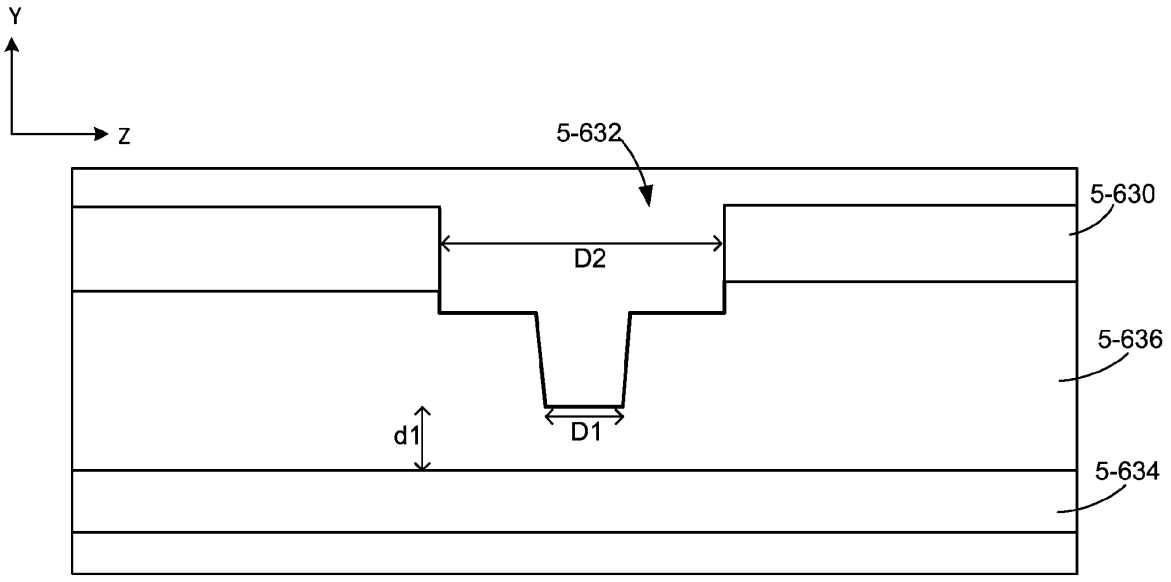


FIG. 5-6B

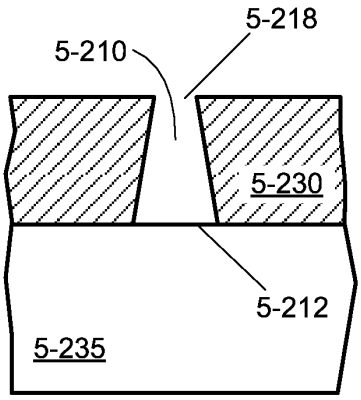


FIG. 5-7A

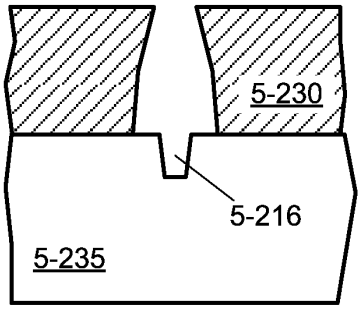


FIG. 5-7B

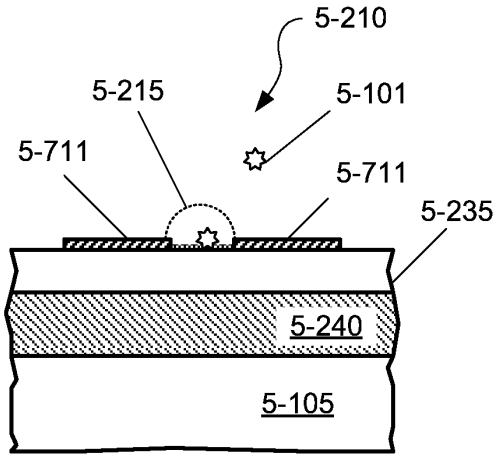


FIG. 5-7C

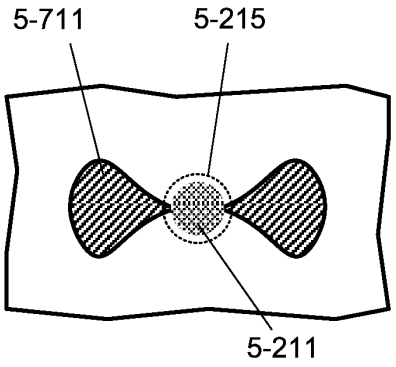


FIG. 5-7D

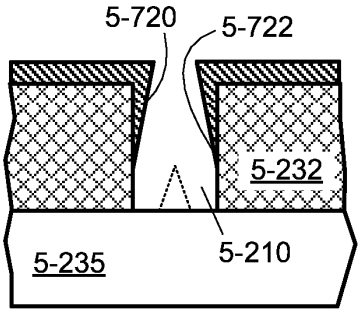


FIG. 5-7E

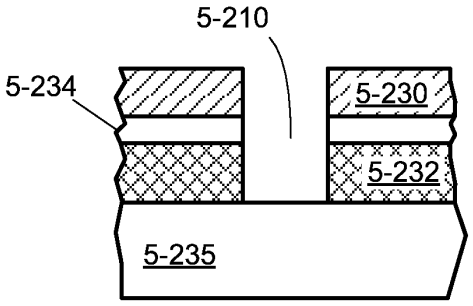


FIG. 5-7F

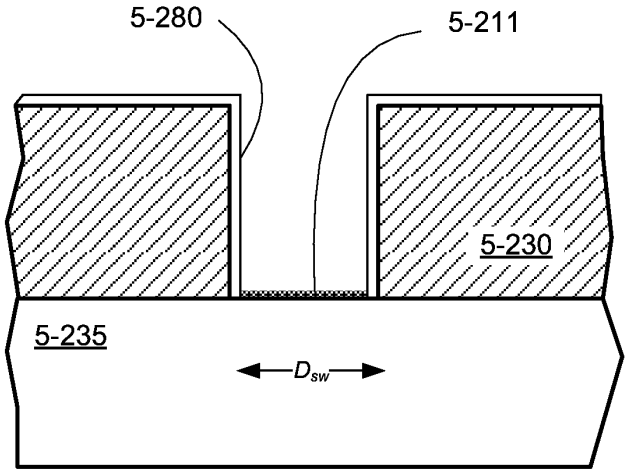


FIG. 5-8

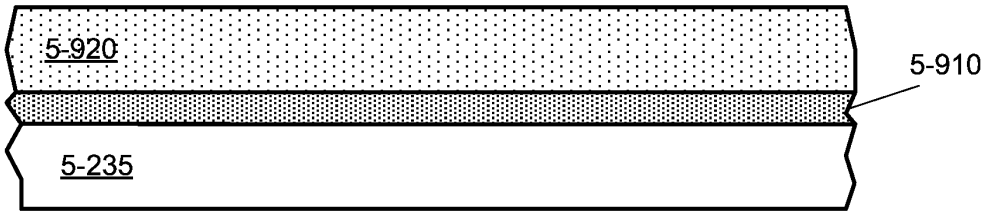


FIG. 5-9A

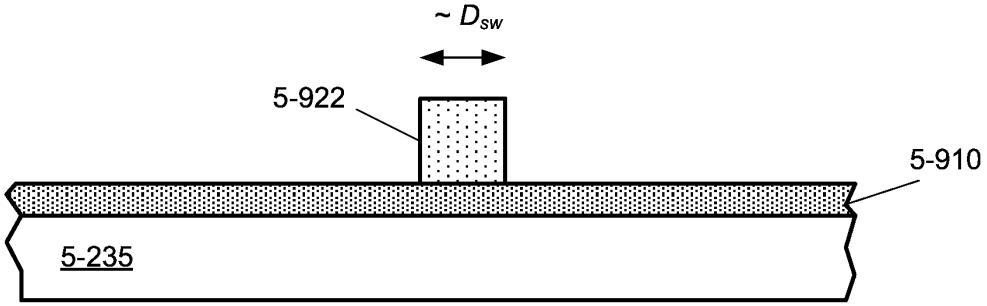


FIG. 5-9B

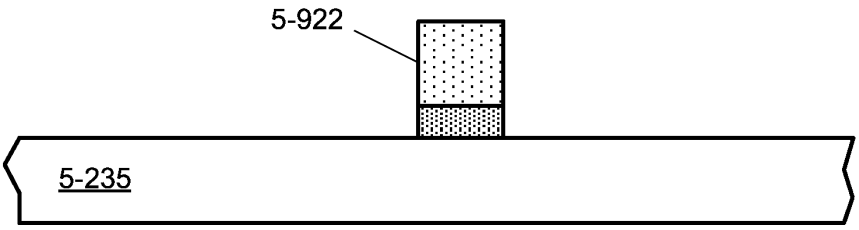


FIG. 5-9C

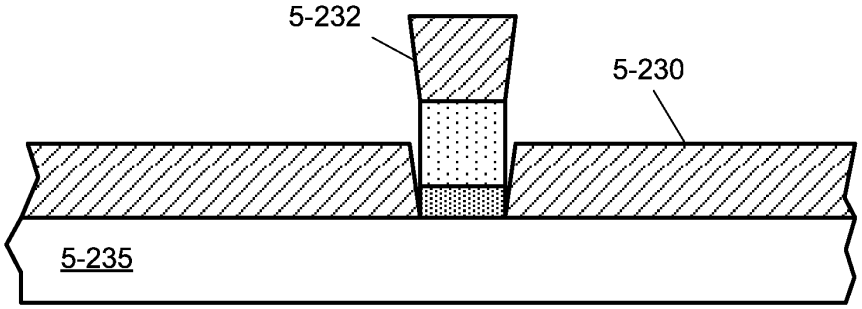


FIG. 5-9D

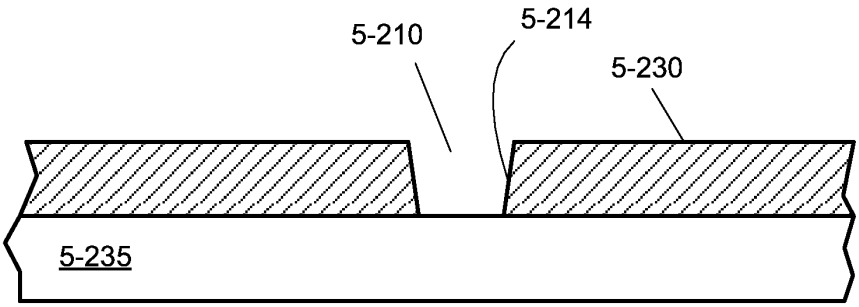


FIG. 5-9E

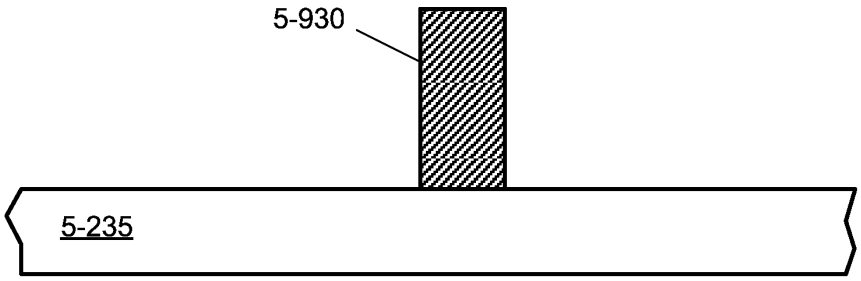


FIG. 5-9F

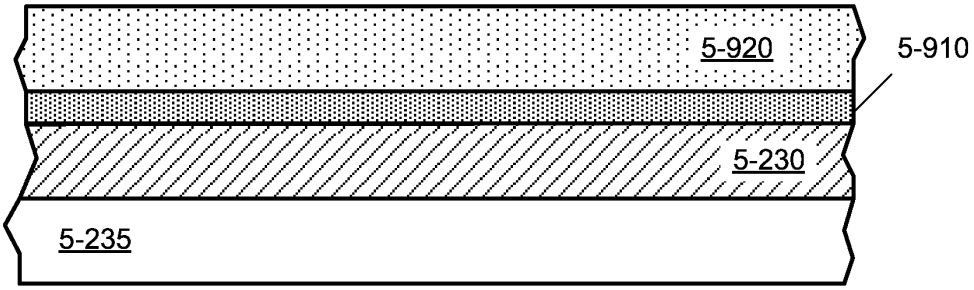


FIG. 5-10A

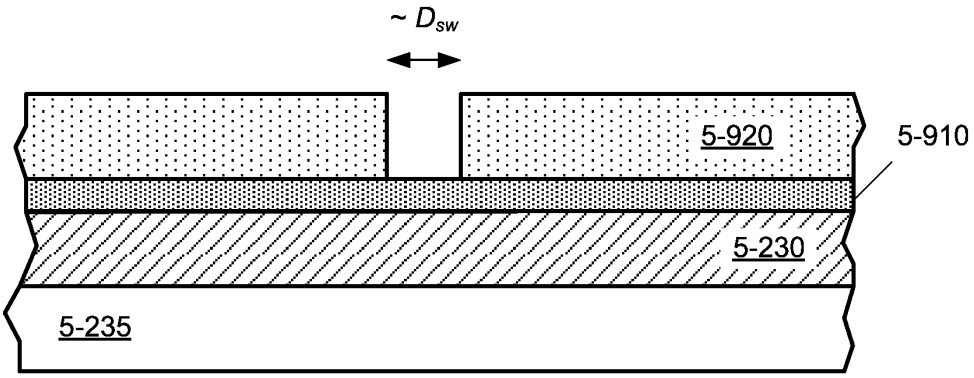


FIG. 5-10B

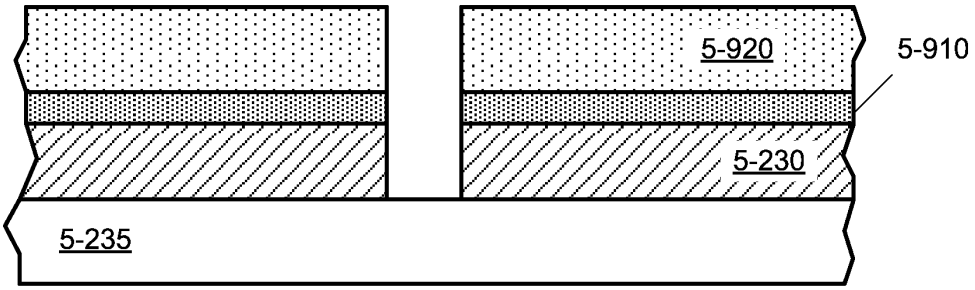


FIG. 5-10C

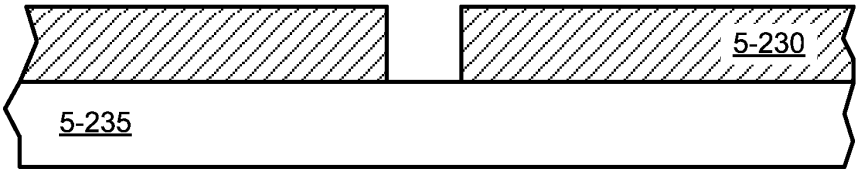


FIG. 5-10D

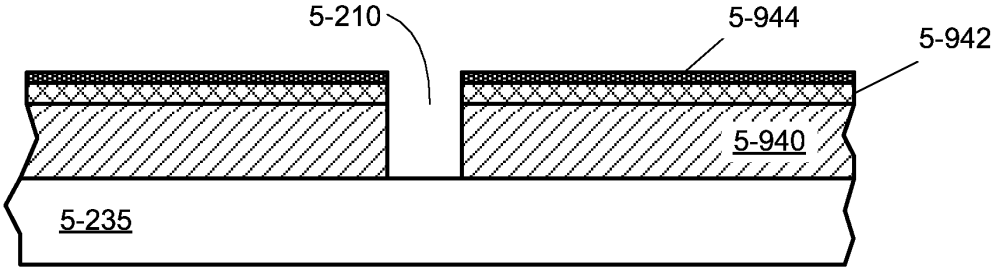


FIG. 5-11

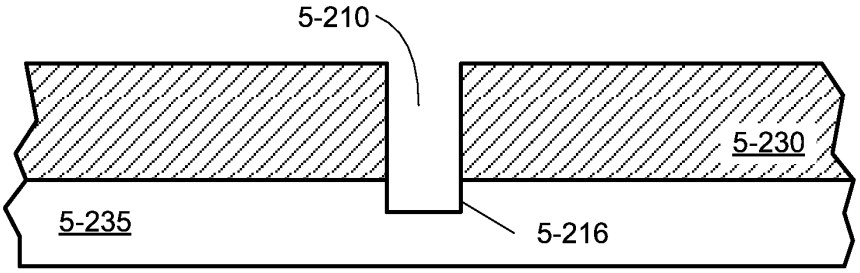


FIG. 5-12

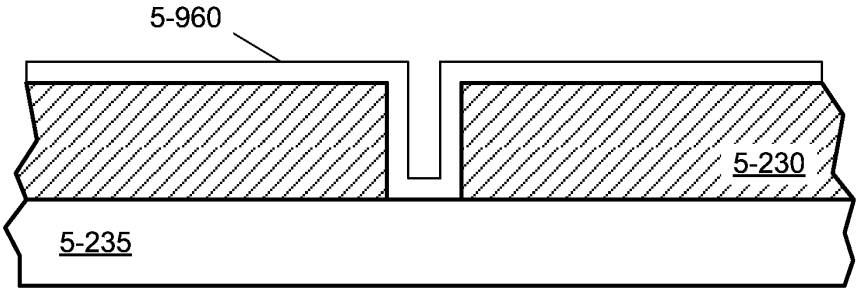


FIG. 5-13A

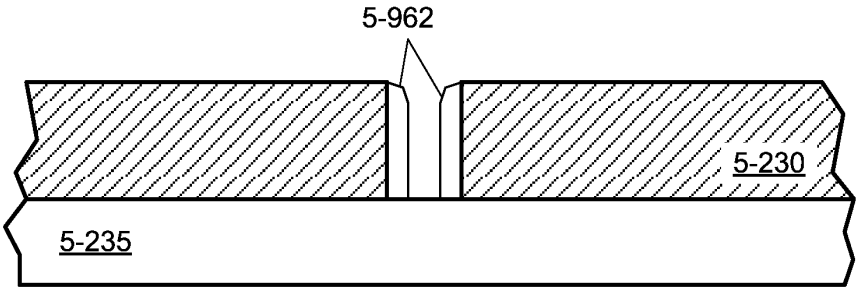


FIG. 5-13B

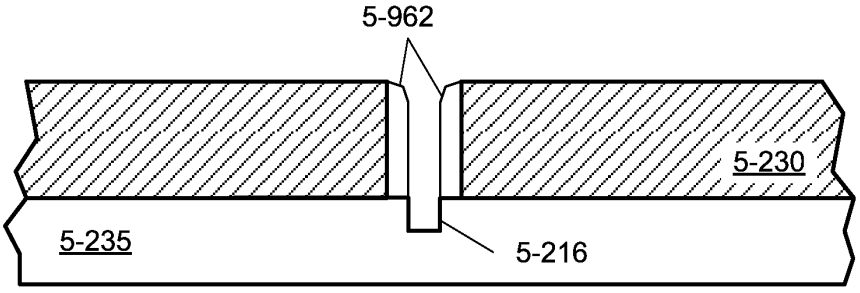


FIG. 5-13C

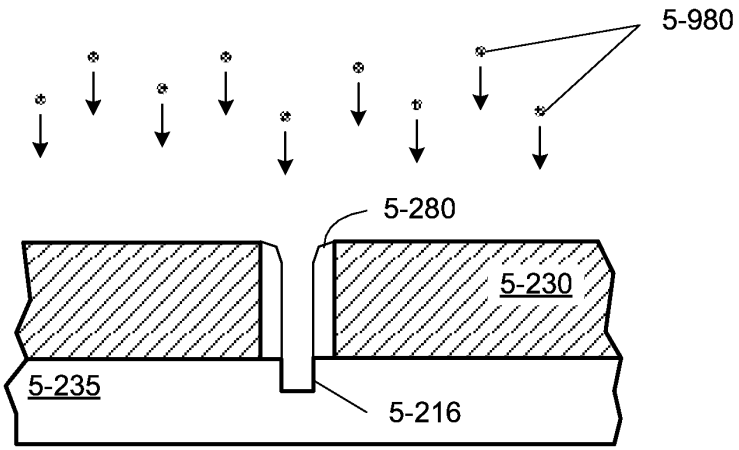


FIG. 5-14A

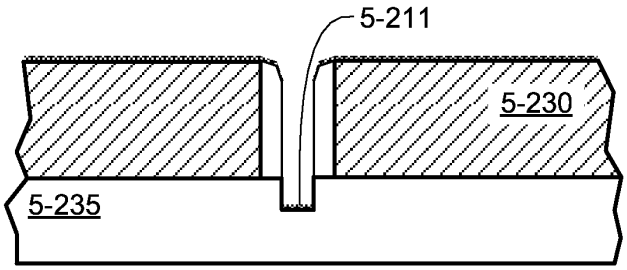


FIG. 5-14B

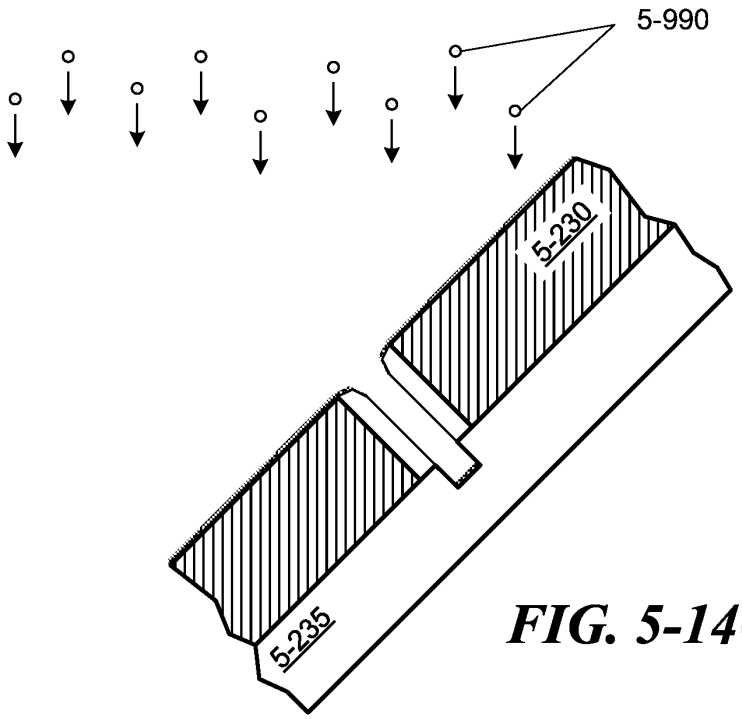


FIG. 5-14C

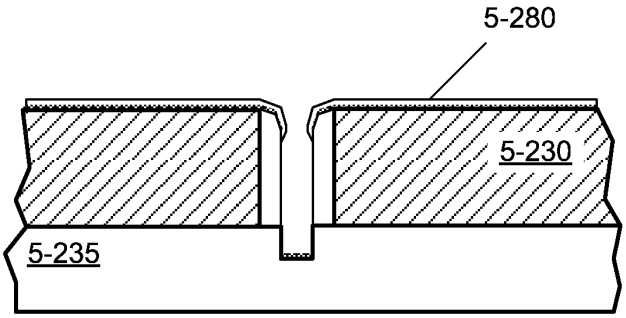


FIG. 5-14D

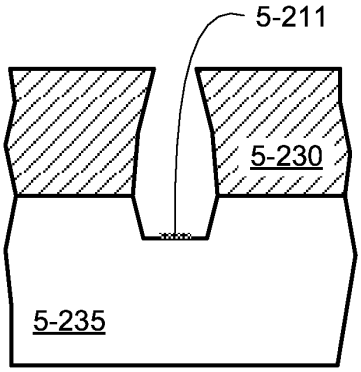


FIG. 5-15

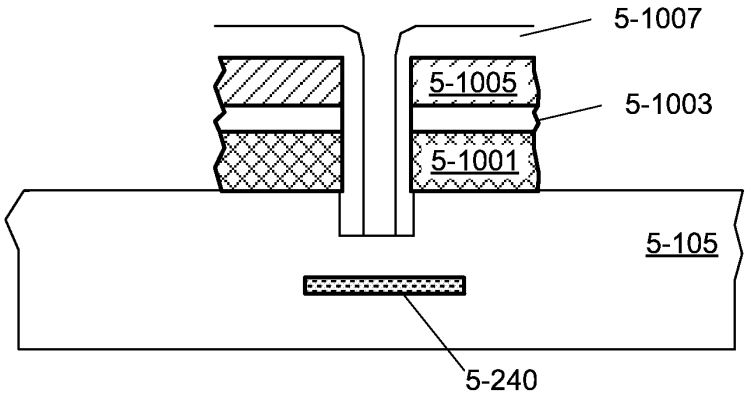


FIG. 5-16

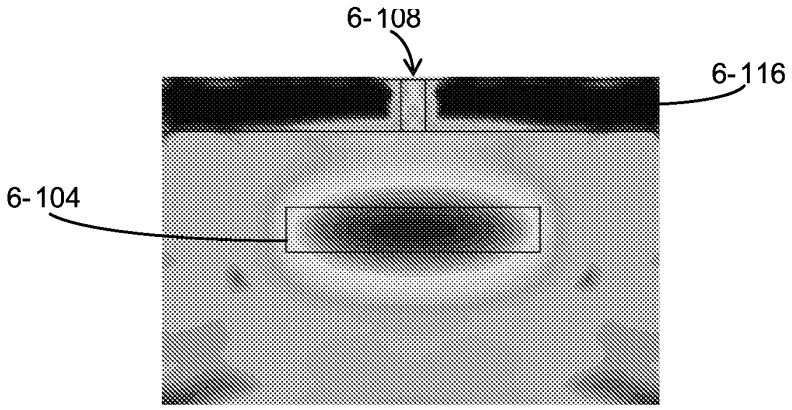


FIG.6-1A

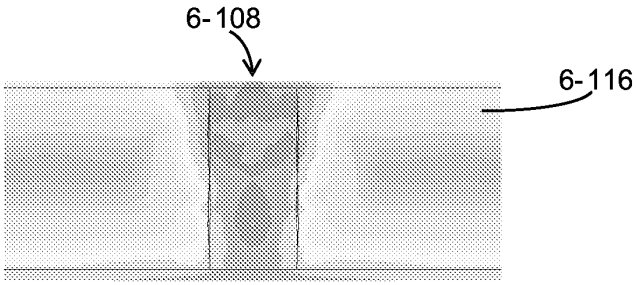


FIG.6-1B

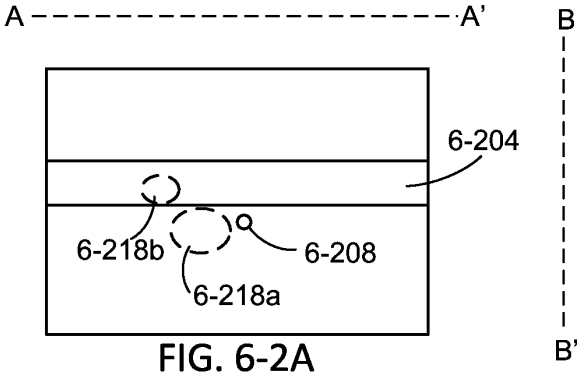


FIG. 6-2A

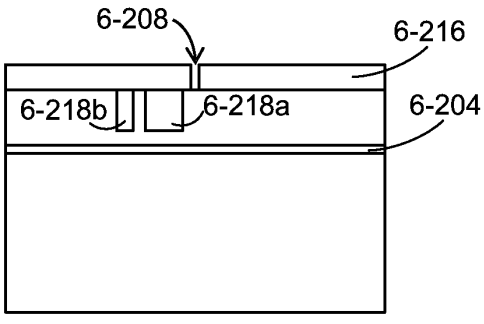


FIG. 6-2B

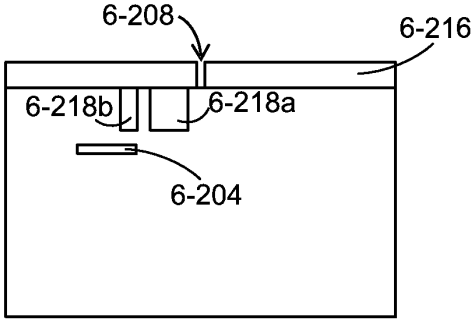


FIG. 6-2C

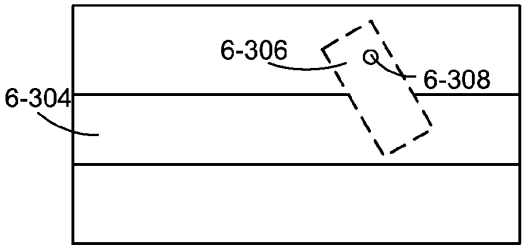


FIG. 6-3A

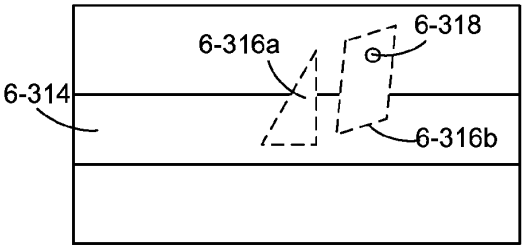


FIG. 6-3B

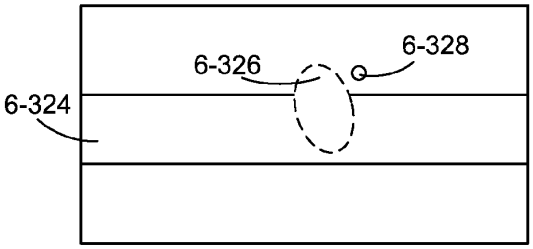


FIG. 6-3C

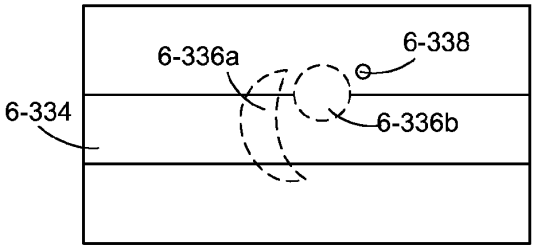


FIG. 6-3D

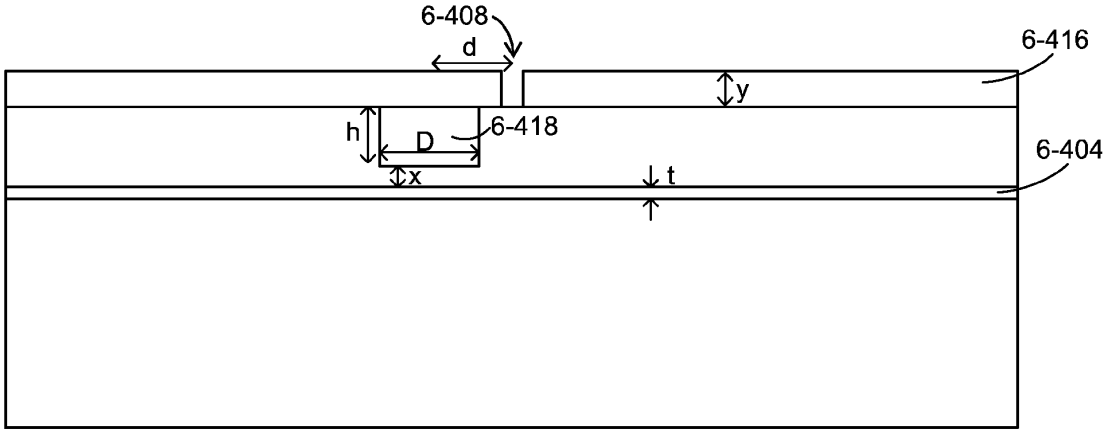


FIG. 6-4

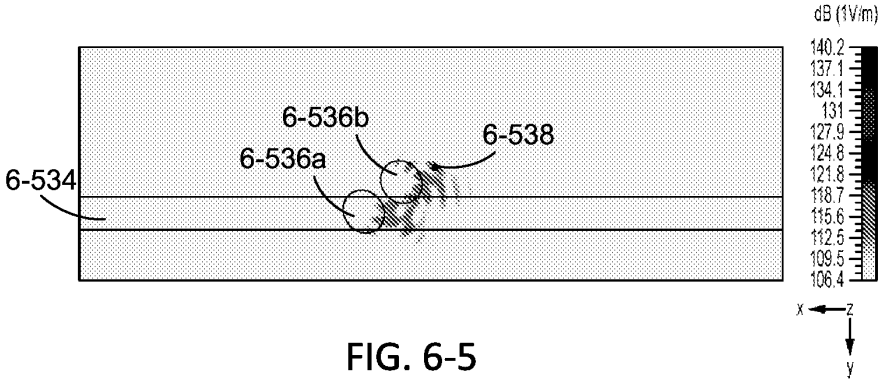


FIG. 6-5

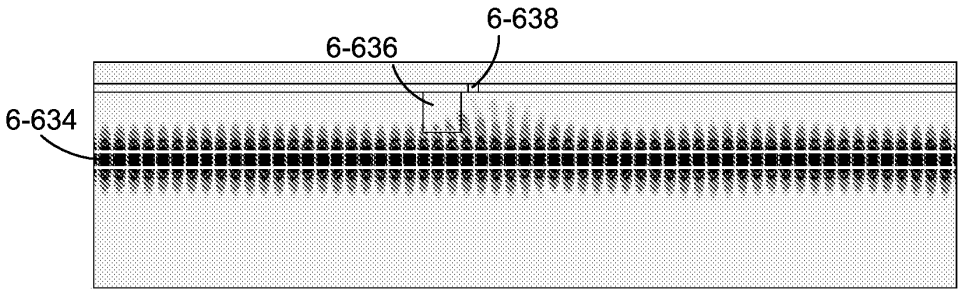


FIG. 6-6A

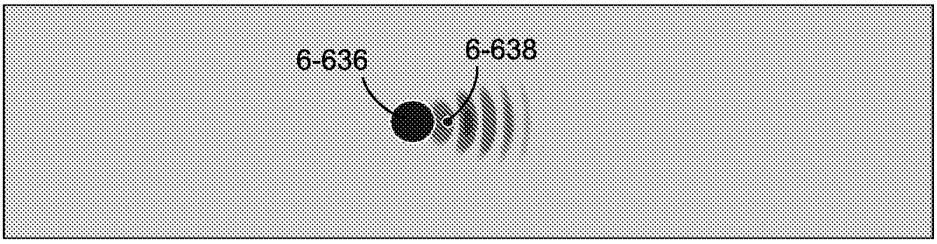


FIG. 6-6B

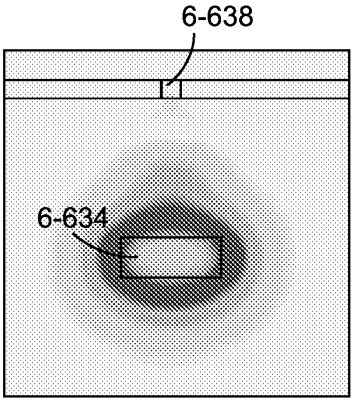


FIG. 6-6C

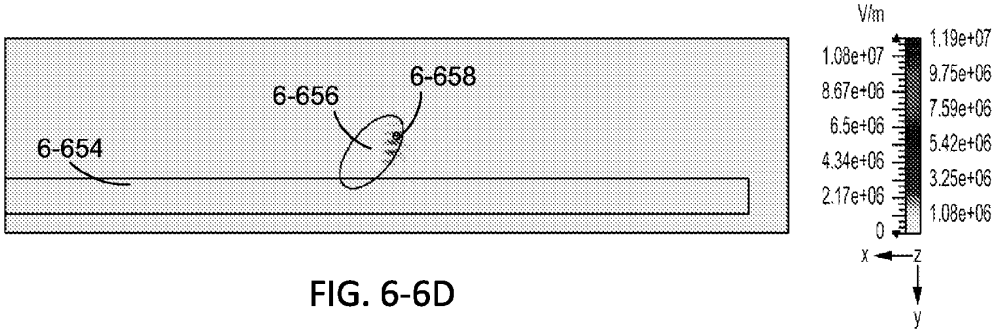


FIG. 6-6D

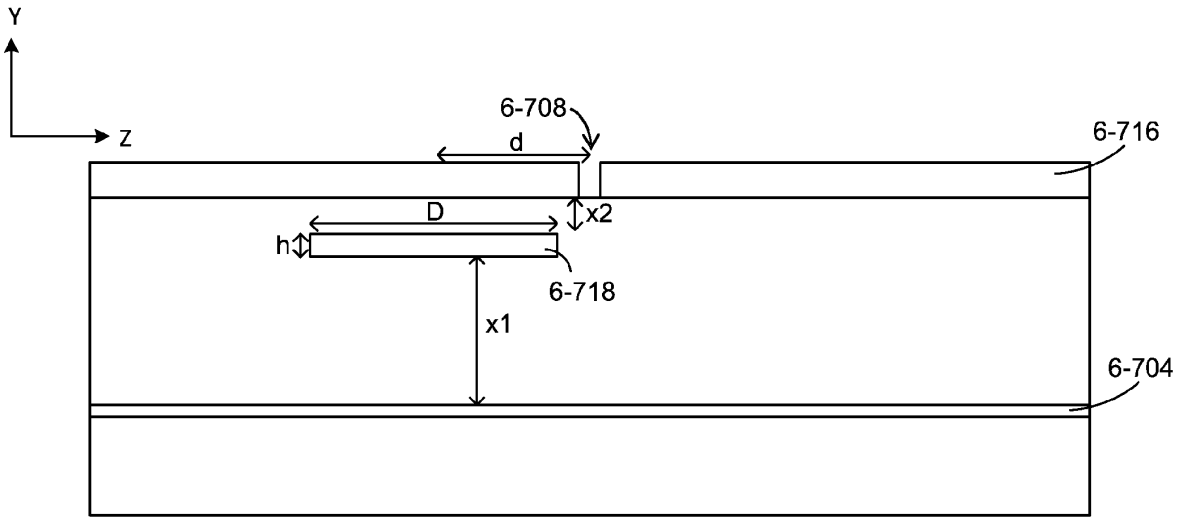


FIG. 6-7A

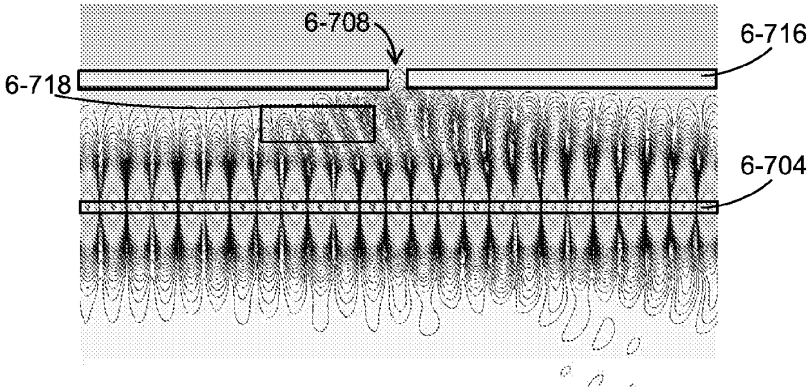


FIG. 6-7B

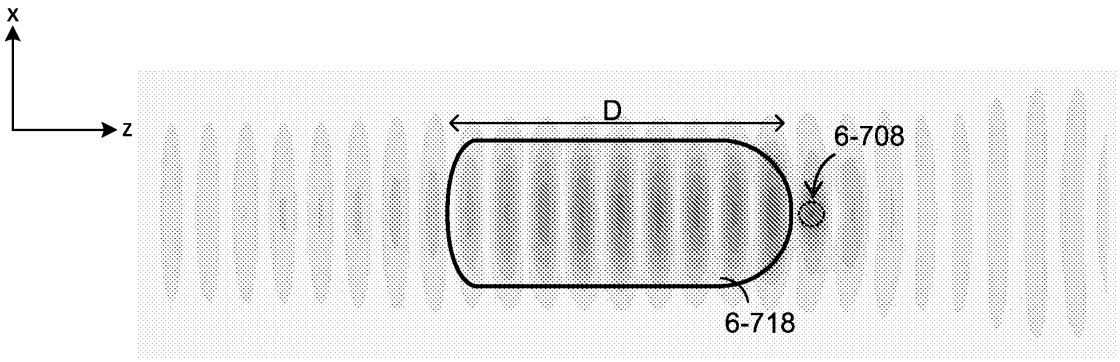


FIG. 6-7C

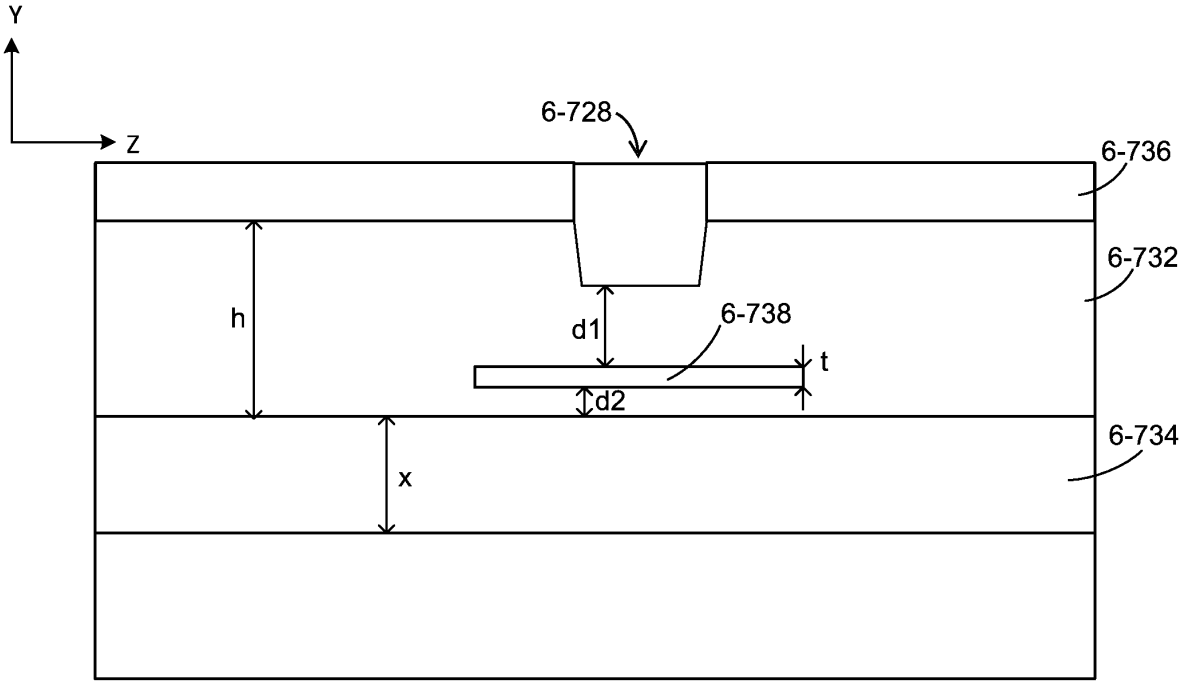


FIG. 6-7D

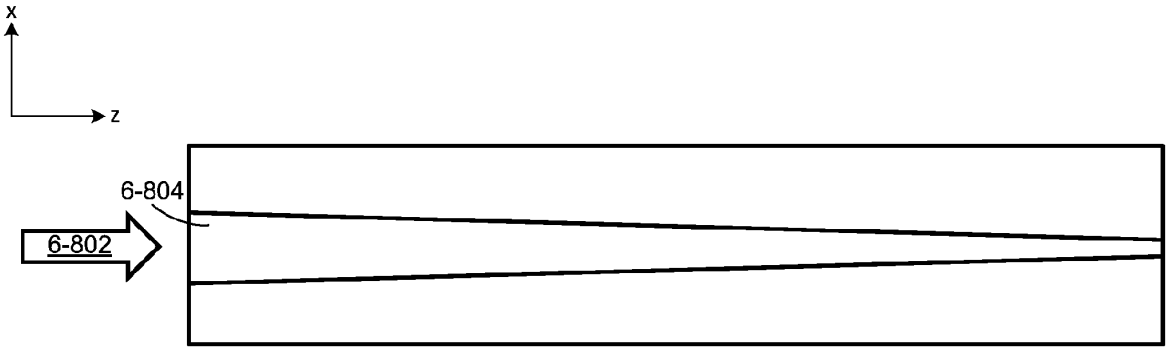


FIG. 6-8A

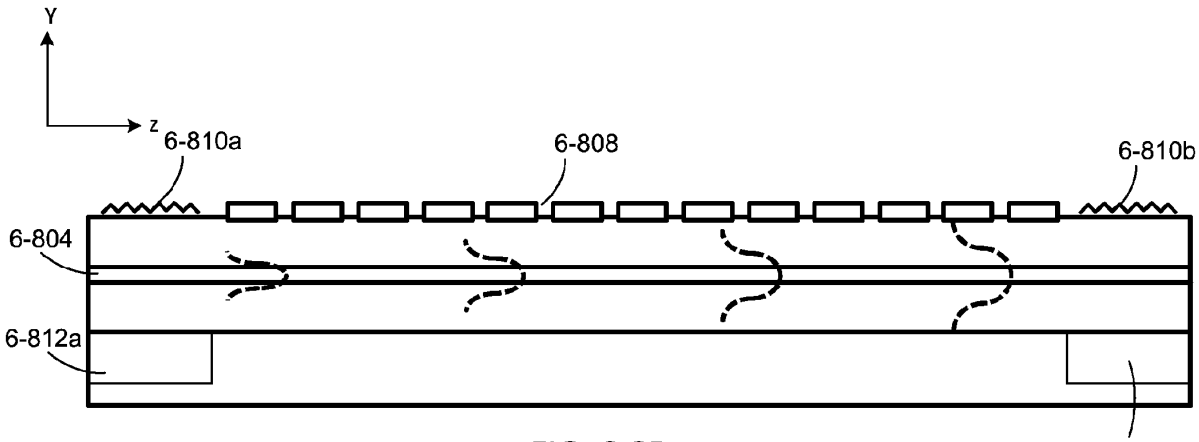


FIG. 6-8B

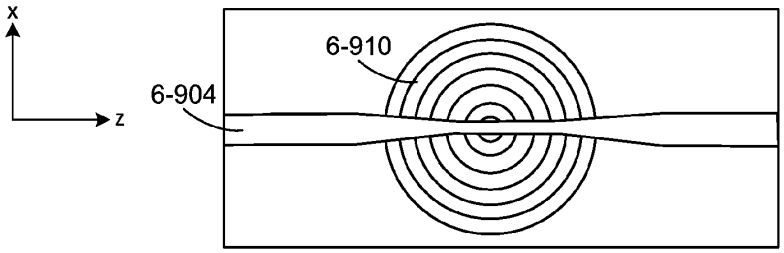


FIG. 6-9A

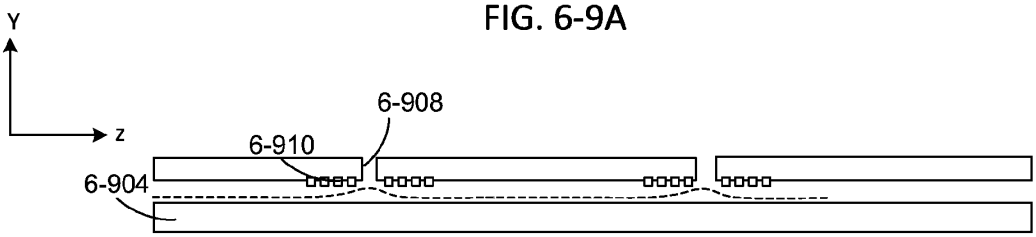


FIG. 6-9B

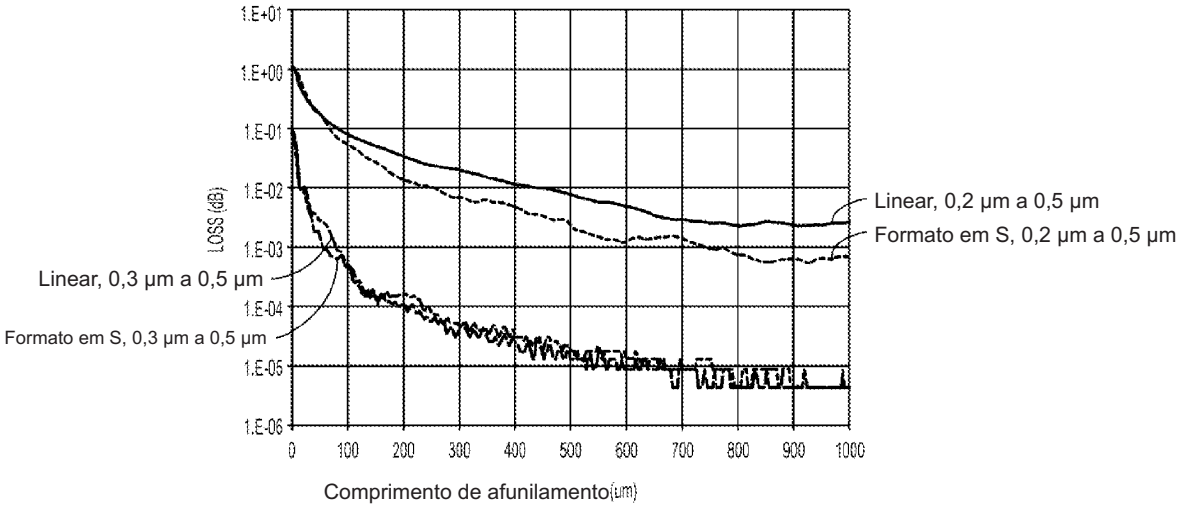


FIG. 6-10

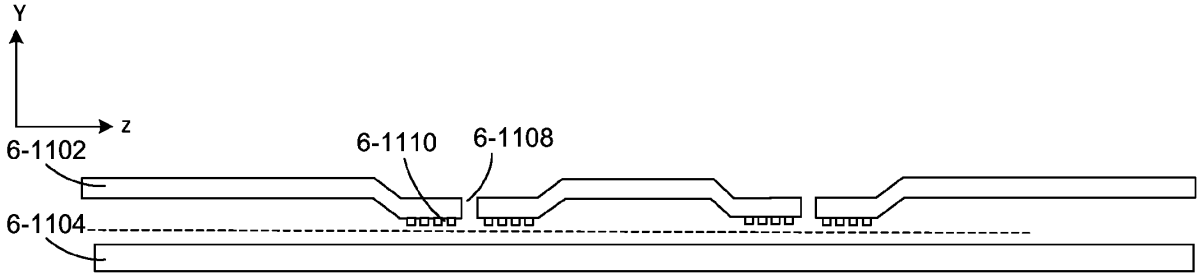


FIG. 6-11A

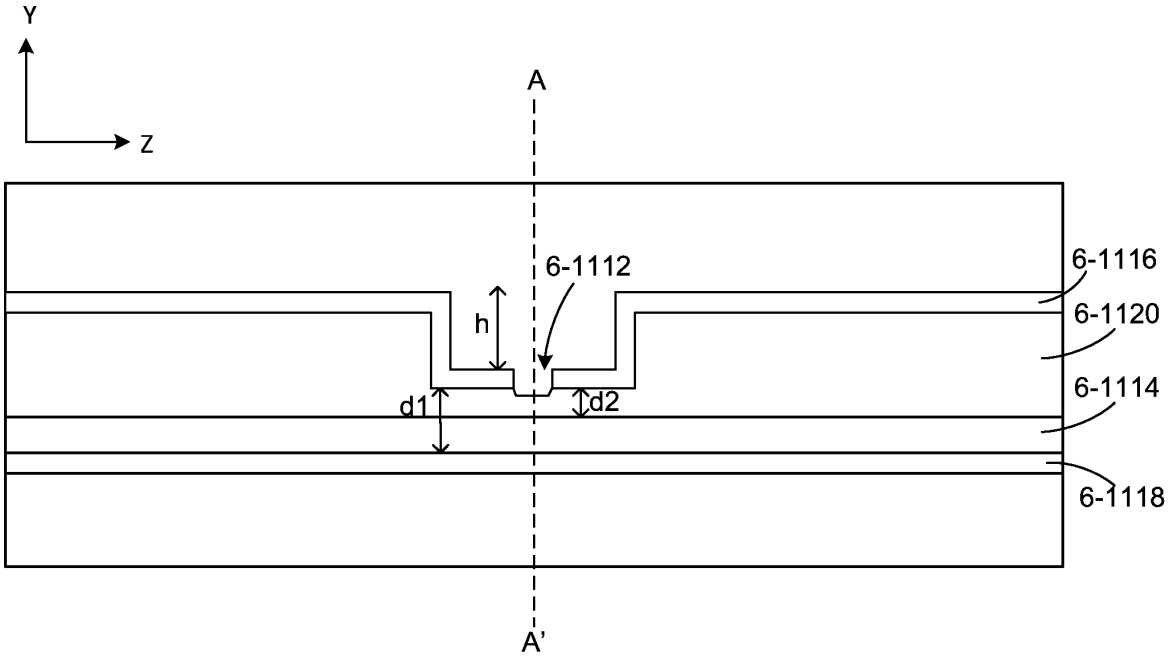


FIG. 6-11B

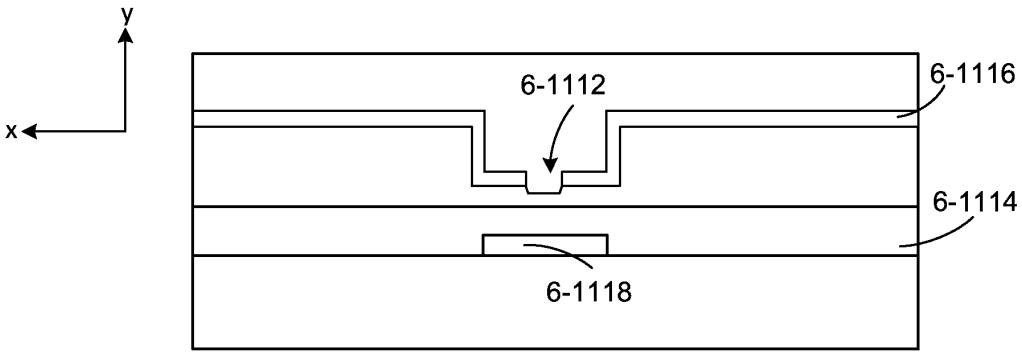


FIG. 6-11C

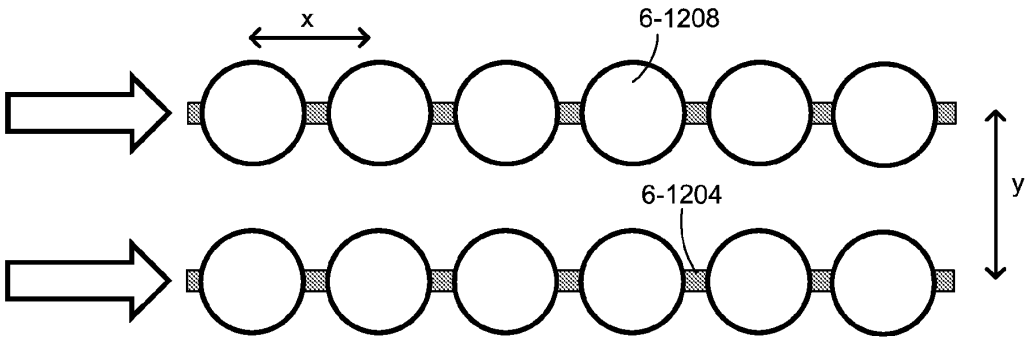


FIG. 6-12

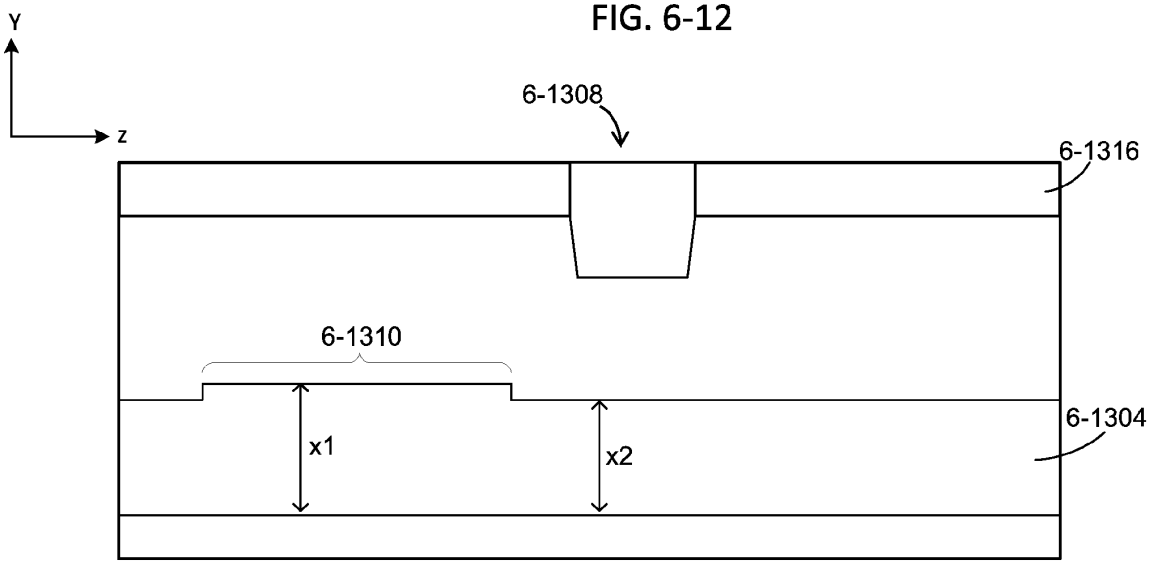


FIG. 6-13

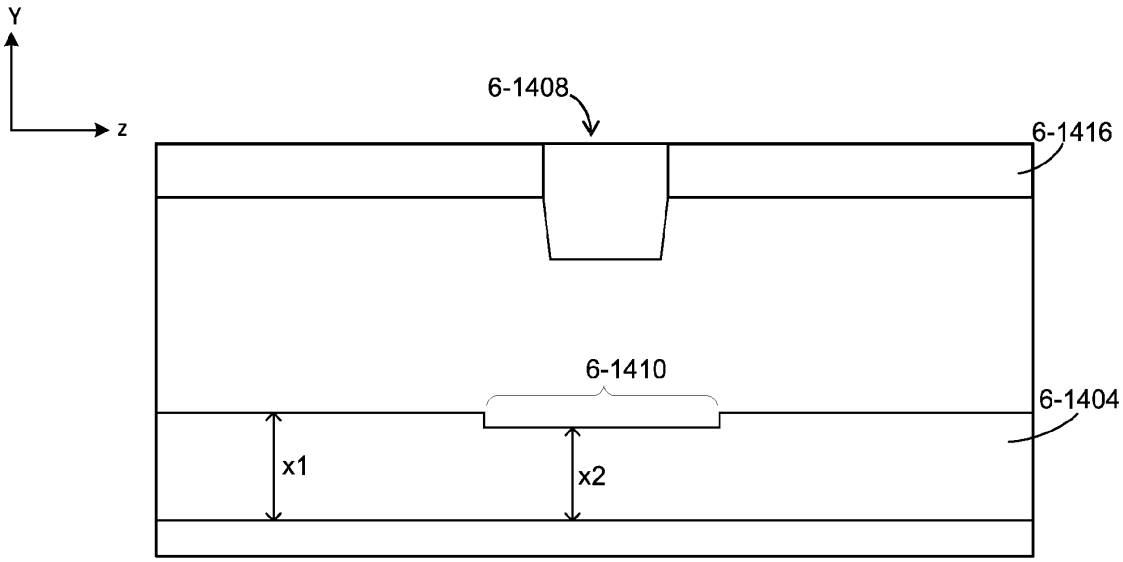


FIG. 6-14

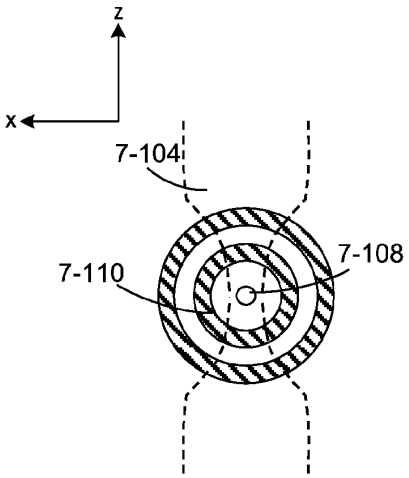


FIG. 7-1A

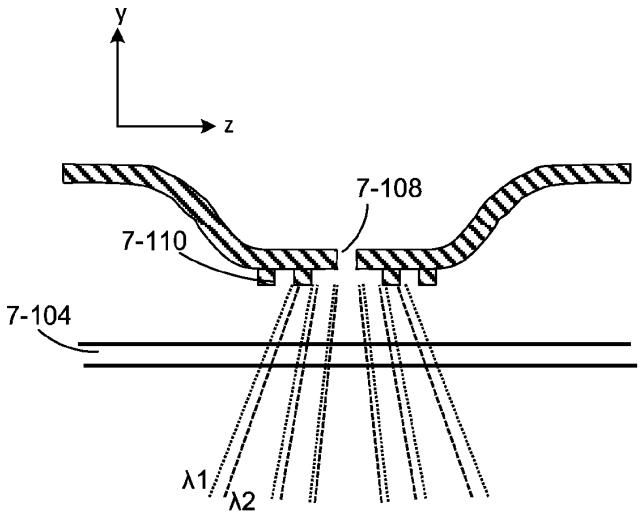


FIG. 7-1B

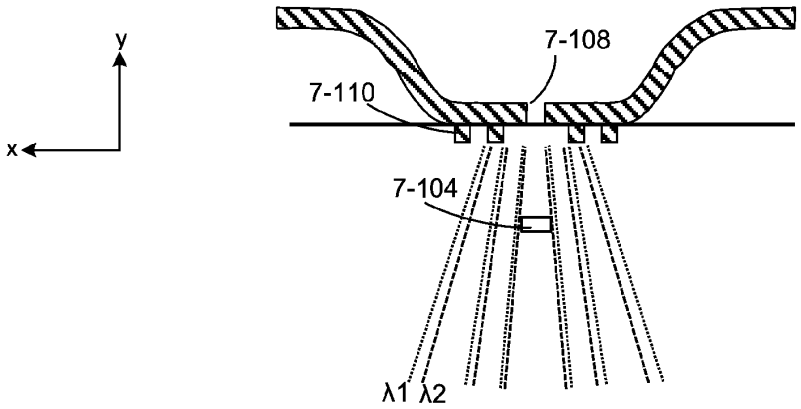


FIG. 7-1C

36/97

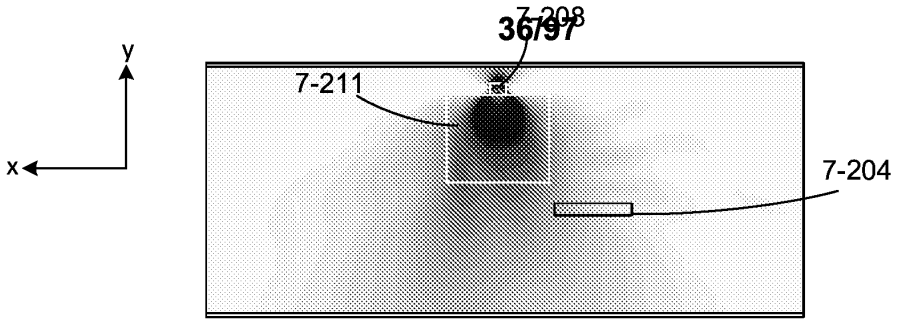


FIG. 7-2A

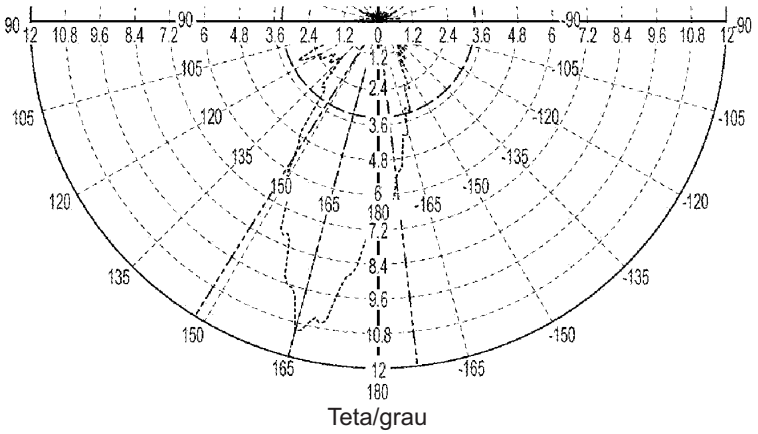


FIG. 7-2B

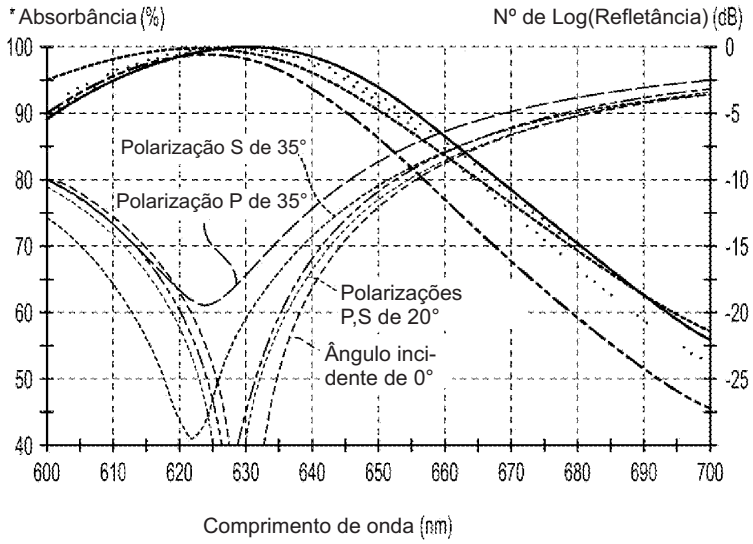


FIG. 7-3

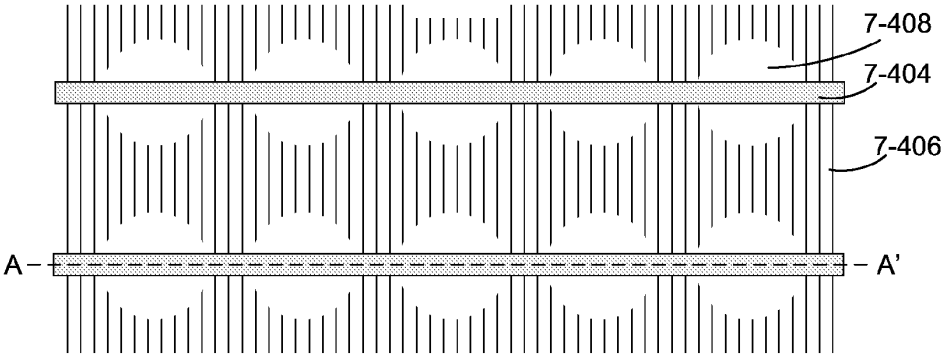


FIG. 7-4A

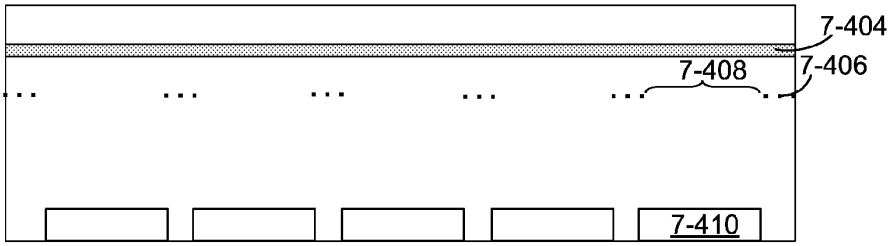


FIG. 7-4B

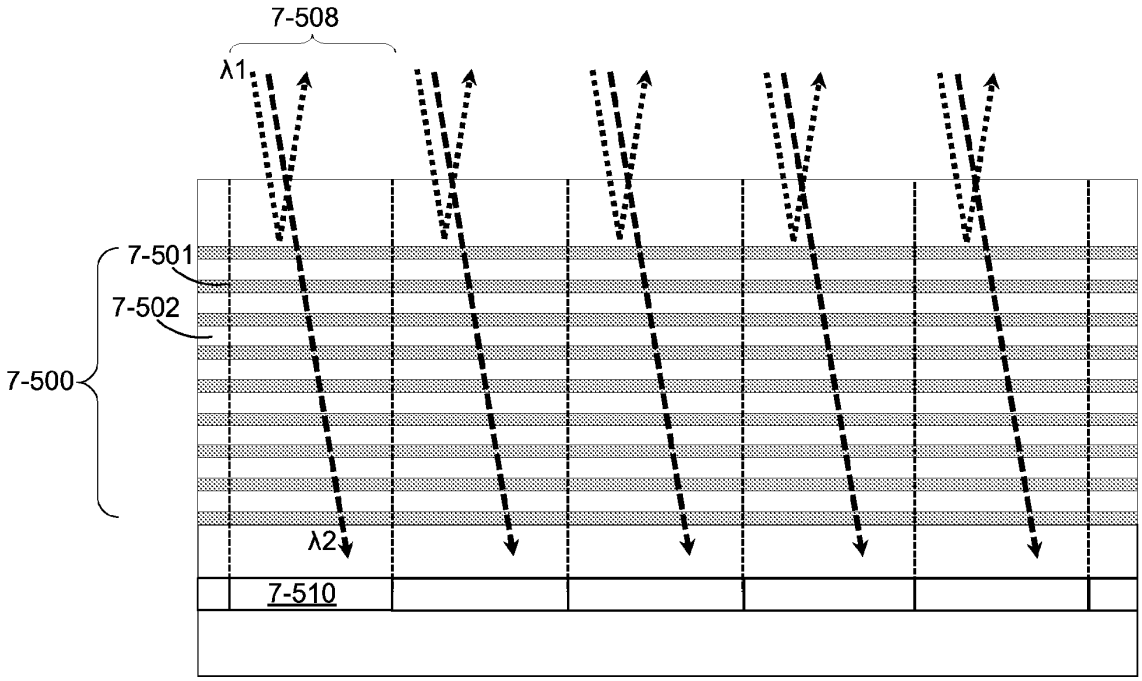


FIG. 7-5

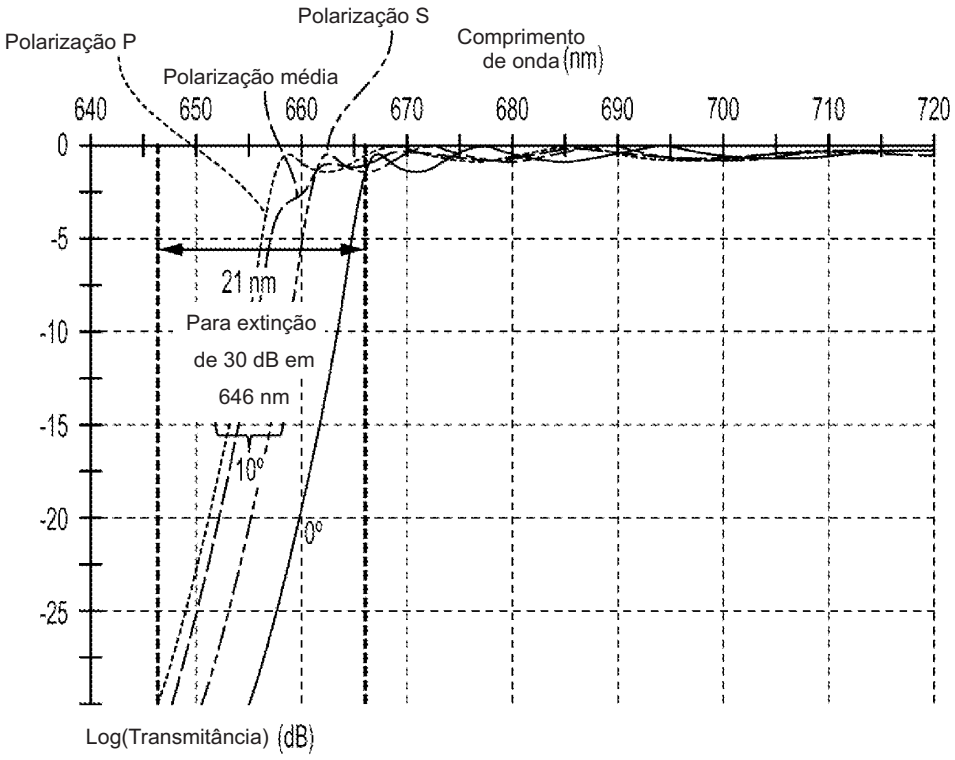

Polarização P
Polarização S
Polarização média
Comprimento de onda (nm)
640
650
660
670
680
690
700
710
720
0
-5
-10
-15
-20
-25
21 nm
Para extinção de 30 dB em 646 nm
10°
0°
Log(Transmitância) (dB)

FIG. 7-6

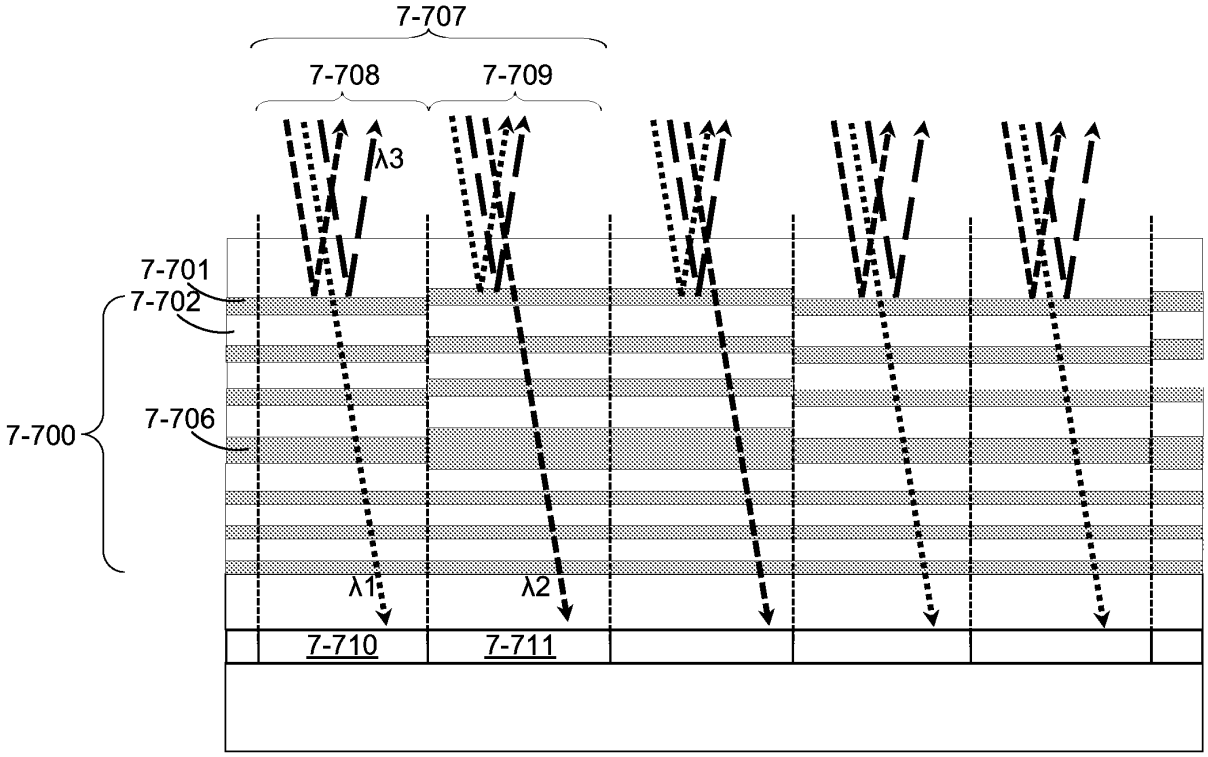

7-707
7-708
7-709
λ3
7-701
7-702
7-706
7-700
λ1
λ2
7-710
7-711

FIG. 7-7

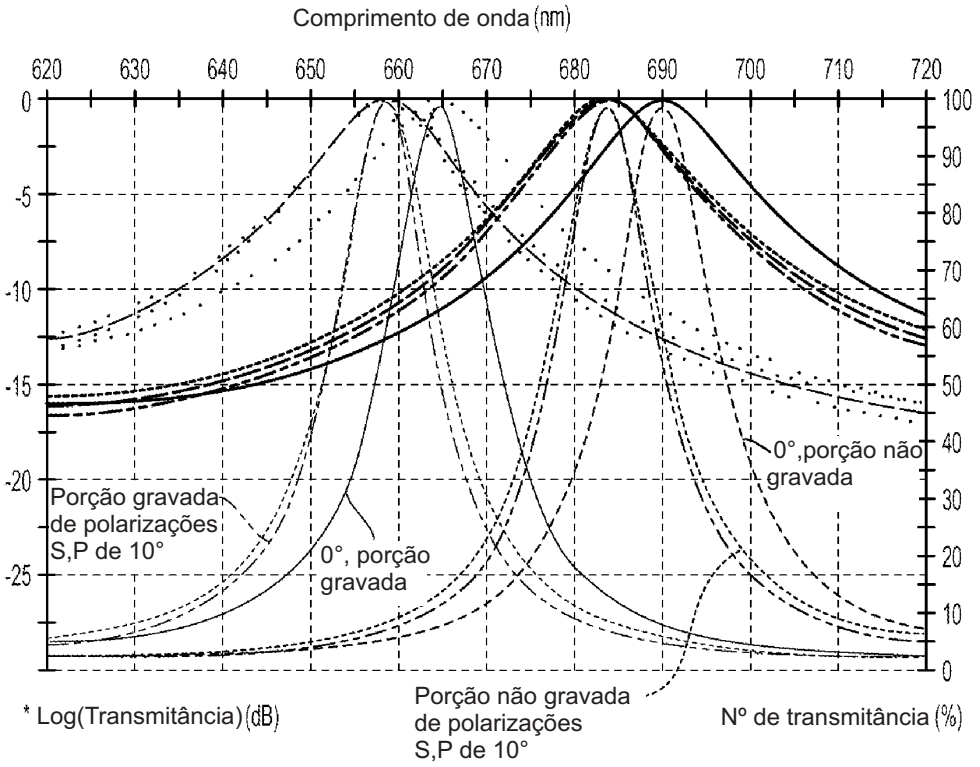

Comprimento de onda (nm)
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
0
-5
-10
-15
-20
-25
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Porção gravada de polarizações S,P de 10°
0°, porção gravada
0°,porção não gravada
Porção não gravada de polarizações S,P de 10°
* Log(Transmitância) (dB)
Nº de transmitância (%)

FIG. 7-8

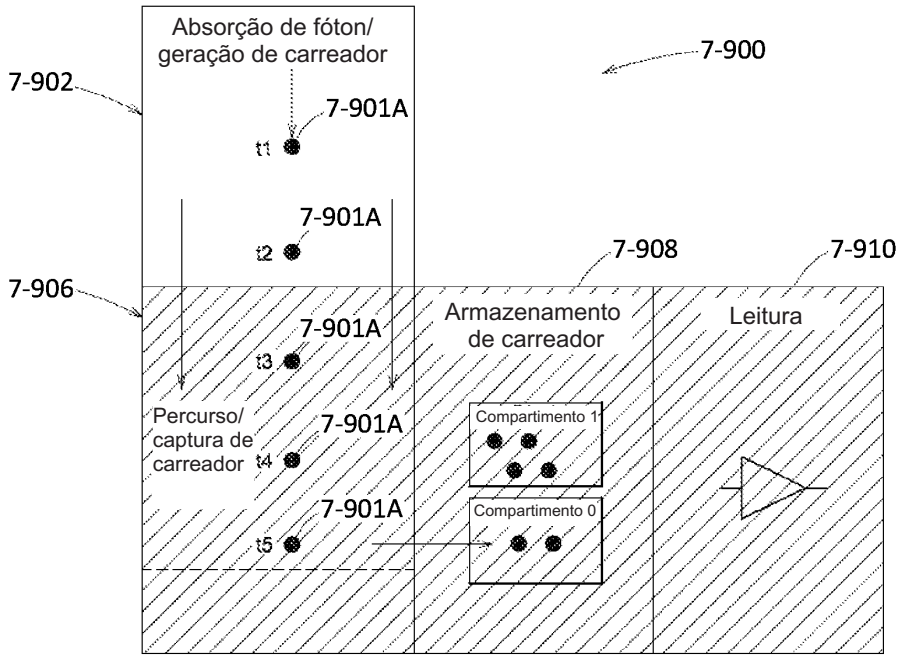


FIG. 7-9A

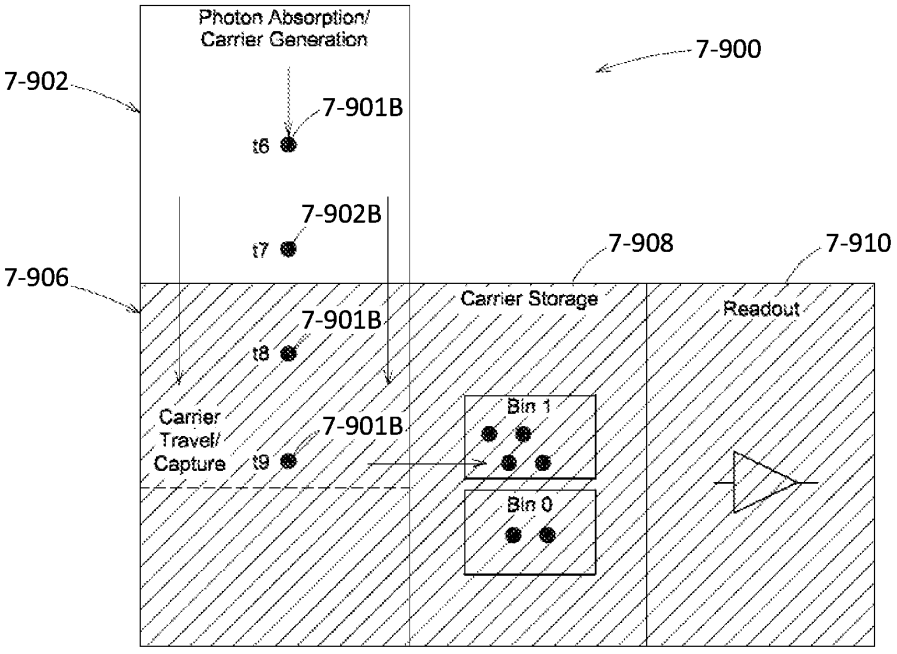


FIG. 7-9B

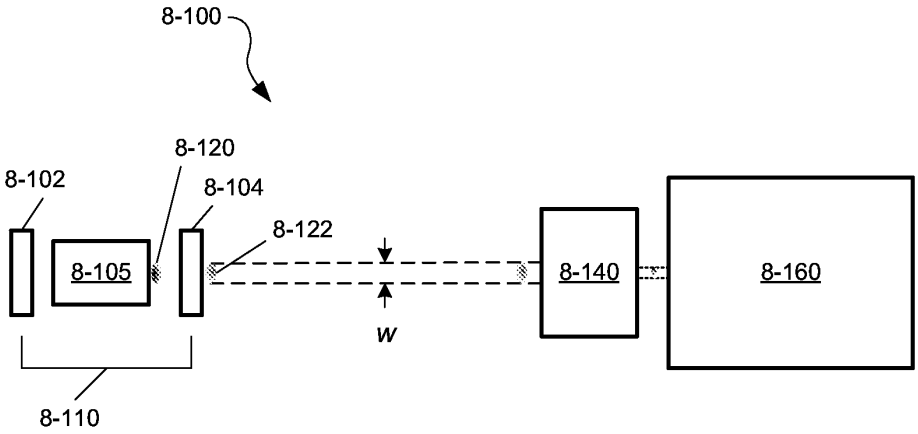


FIG. 8-0A

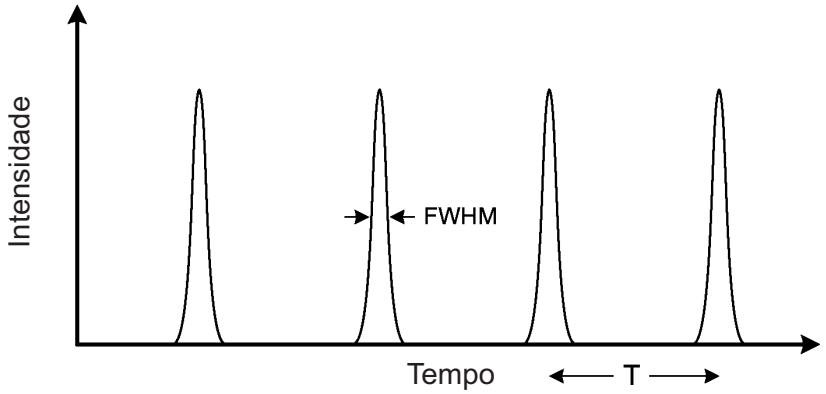


FIG. 8-0B

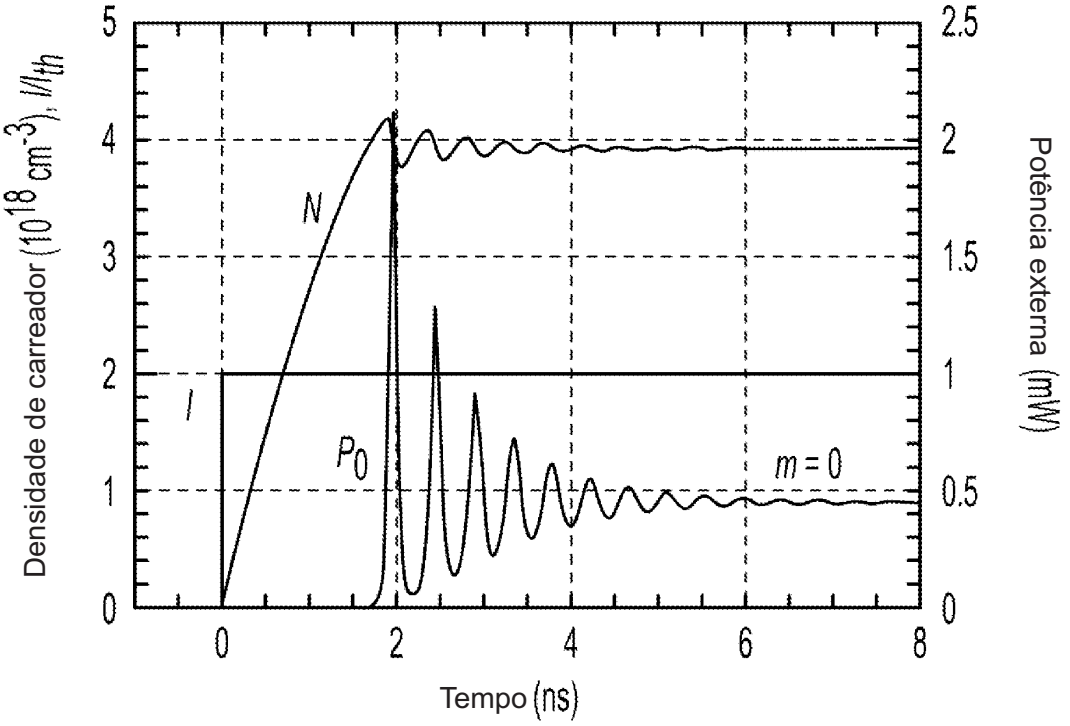

Densidade de carreador (10^{18} cm^{-3}), I/I_{th}
Potência externa (mW)
Tempo (ns)
N
I
P_0
m = 0
0
1
2
3
4
5
0
0.5
1
1.5
2
2.5
0
2
4
6
8

FIG. 8-1

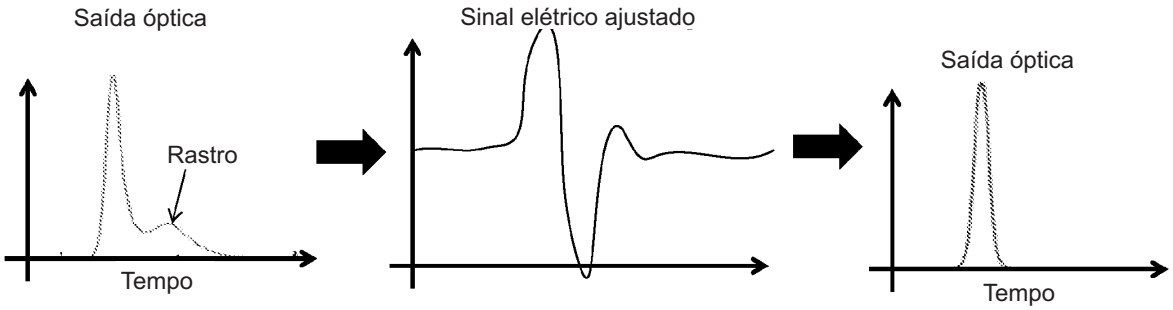

Saída óptica
Rastro
Tempo
Sinal elétrico ajustado
Saída óptica
Tempo

FIG. 8-2

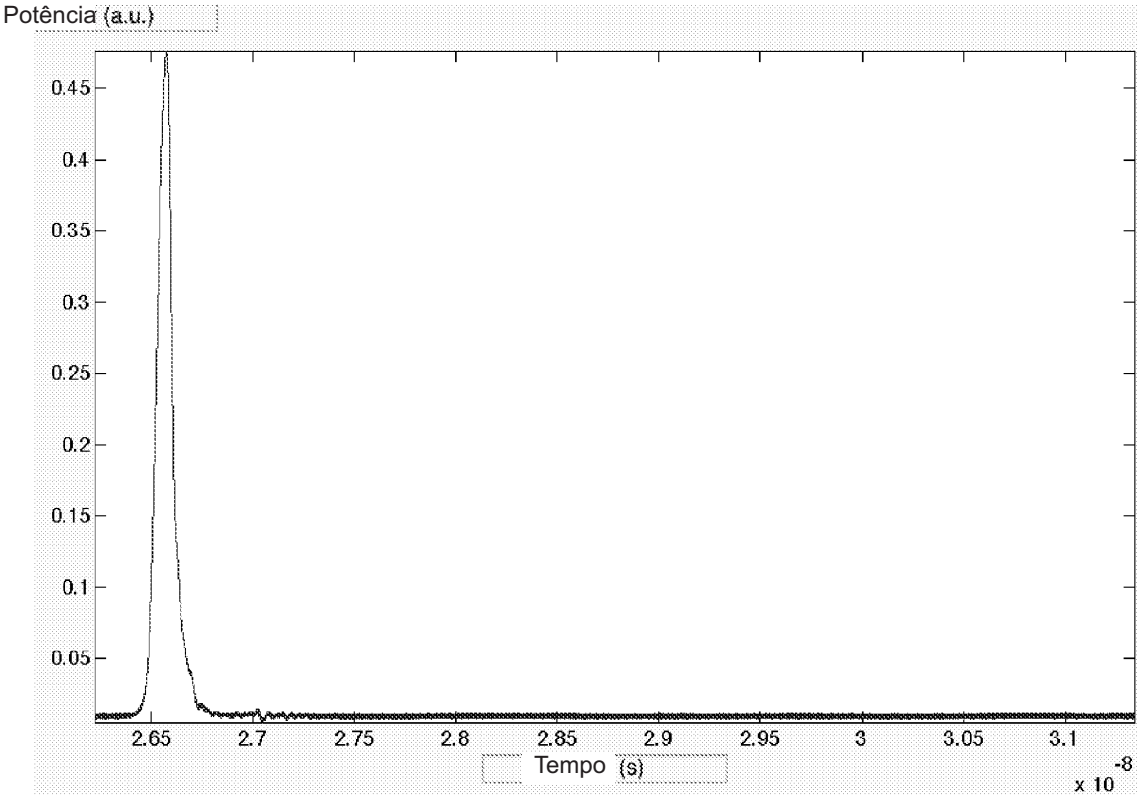

Potência (a.u.)
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
2.65
2.7
2.75
2.8
2.85
2.9
2.95
3
3.05
3.1
Tempo (s)
x 10 -8

FIG. 8-3

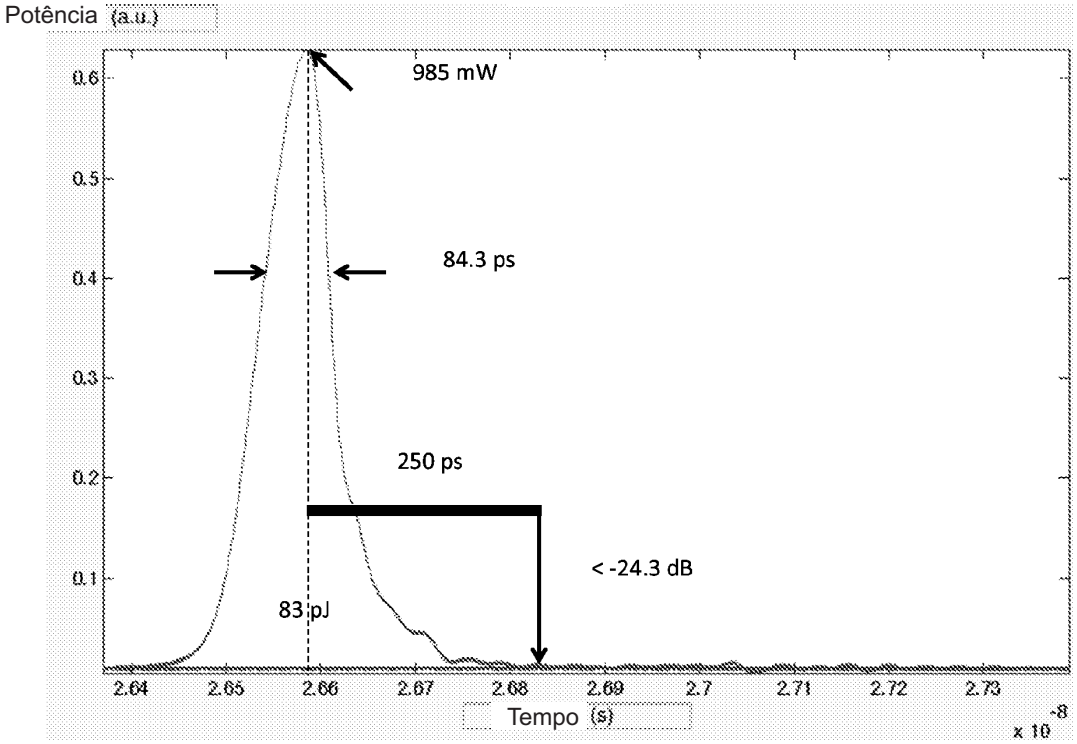

Potência (a.u.)
985 mW
84.3 ps
250 ps
< -24.3 dB
83 pJ
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
2.64
2.65
2.66
2.67
2.68
2.69
2.7
2.71
2.72
2.73
Tempo (s)
x 10^-8

FIG. 8-4

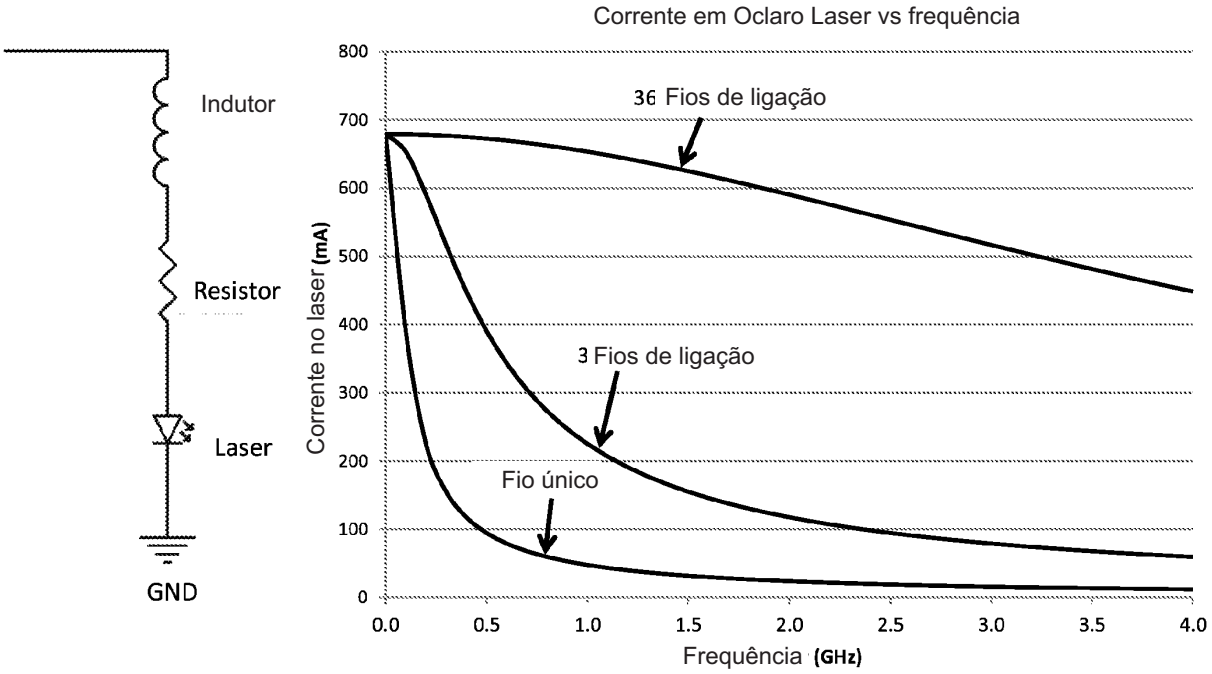

Indutor
Resistor
Laser
GND
Corrente em Oclaro Laser vs frequência
36 Fios de ligação
3 Fios de ligação
Fio único
Corrente no laser (mA)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
Frequência (GHz)

FIG. 8-5

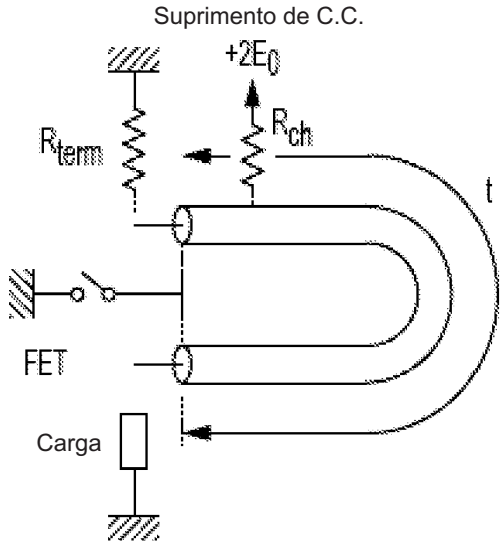


FIG. 8-6A

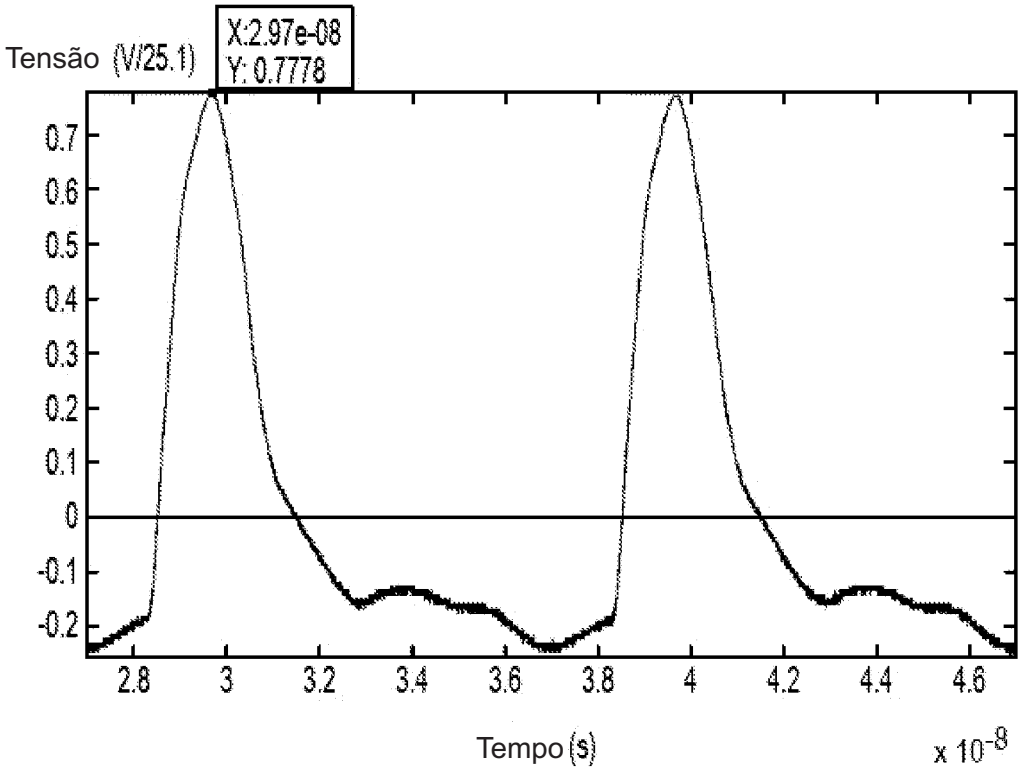


FIG. 8-6B

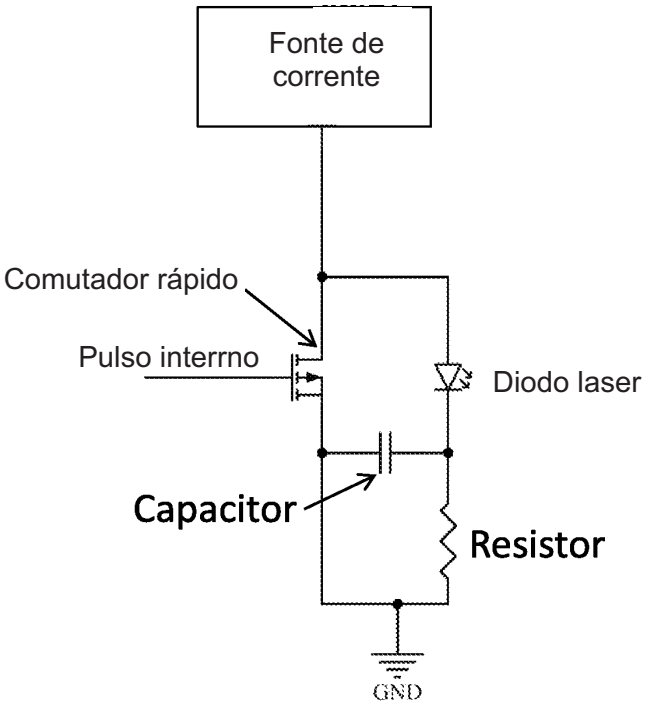

Fonte de corrente
Comutador rápido
Pulso interrno
Diodo laser
Capacitor
Resistor
GND

FIG. 8-7

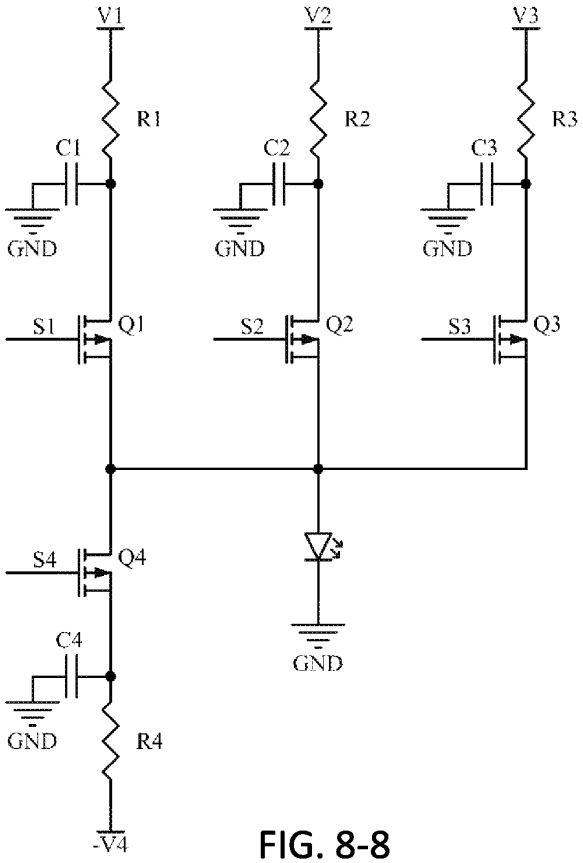

V1
V2
V3
R1
R2
R3
C1
C2
C3
GND
GND
GND
S1
Q1
S2
Q2
S3
Q3
S4
Q4
C4
GND
GND
R4
-V4

FIG. 8-8

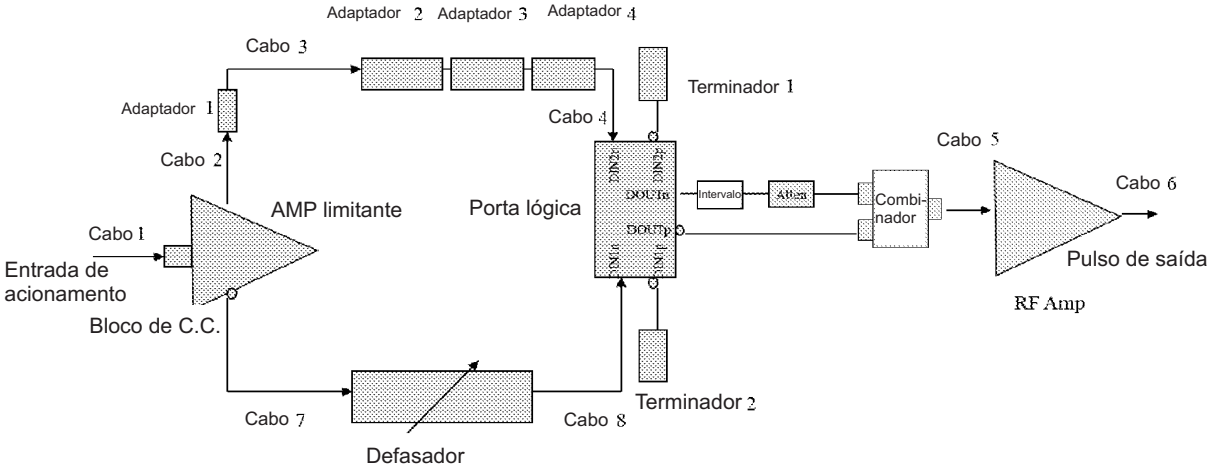


FIG. 8-9A

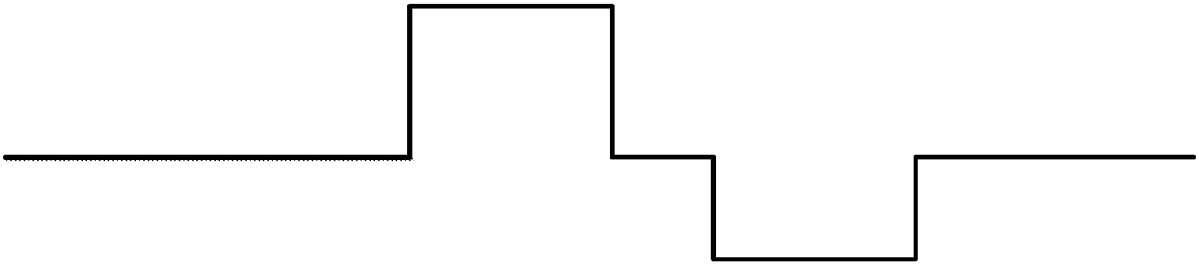


FIG. 8-9B

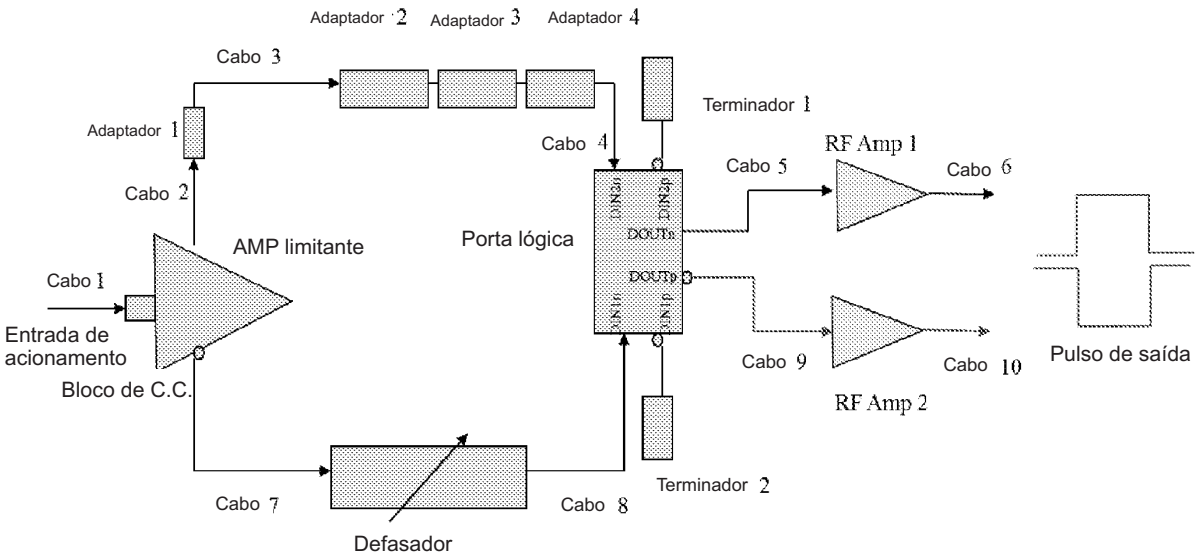


FIG. 8-10A

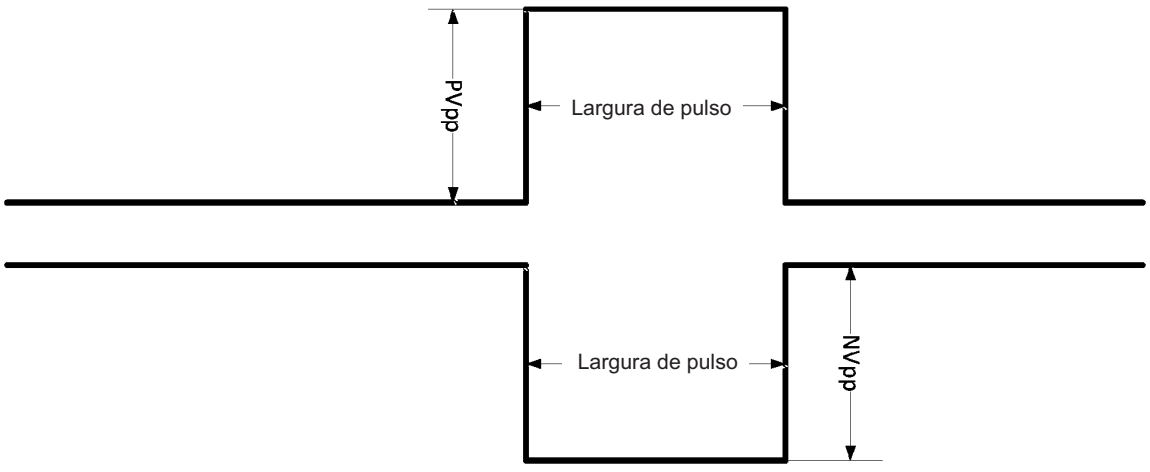


FIG. 8-10B

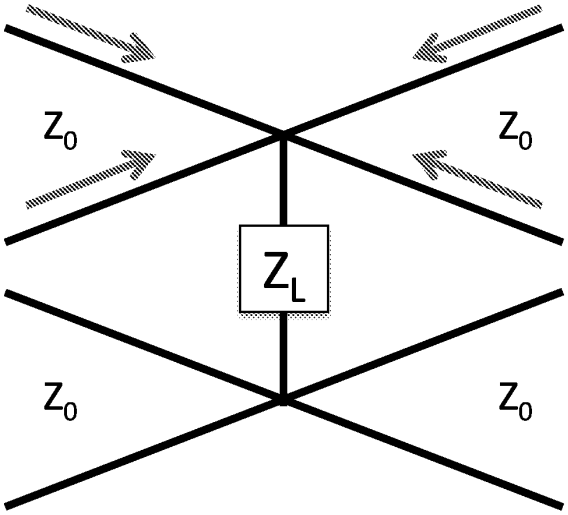


FIG. 8-11A

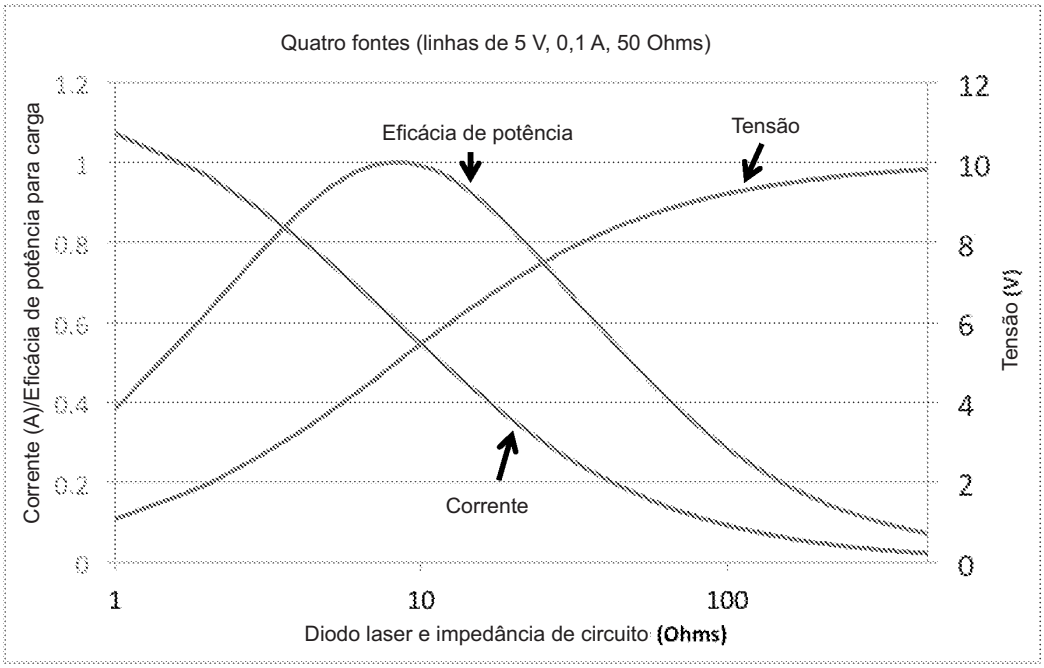


FIG. 8-11B

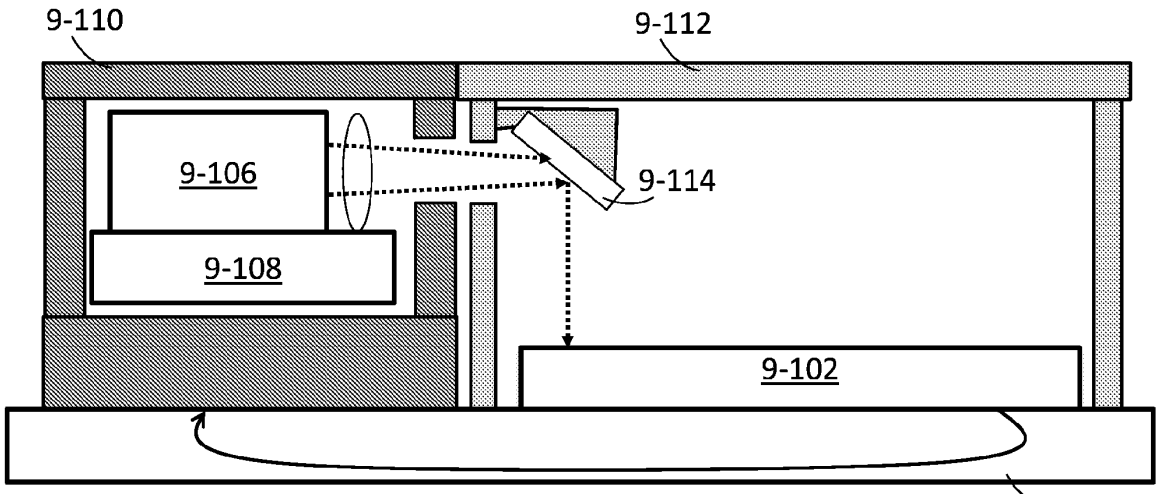

9-110
9-112
9-106
9-114
9-108
9-102
9-116

FIG. 9-1

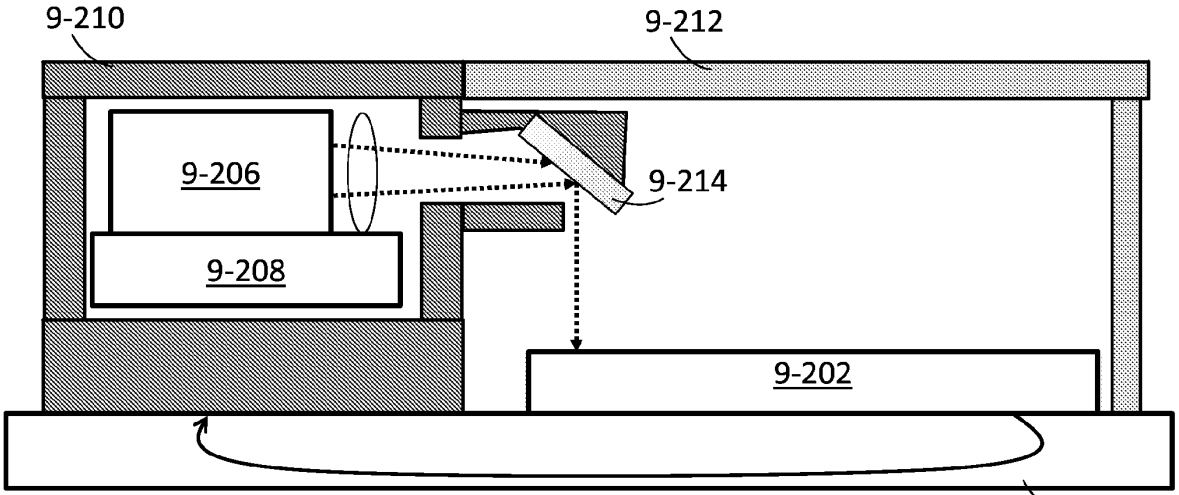

9-210
9-212
9-206
9-214
9-208
9-202
9-216

FIG. 9-2

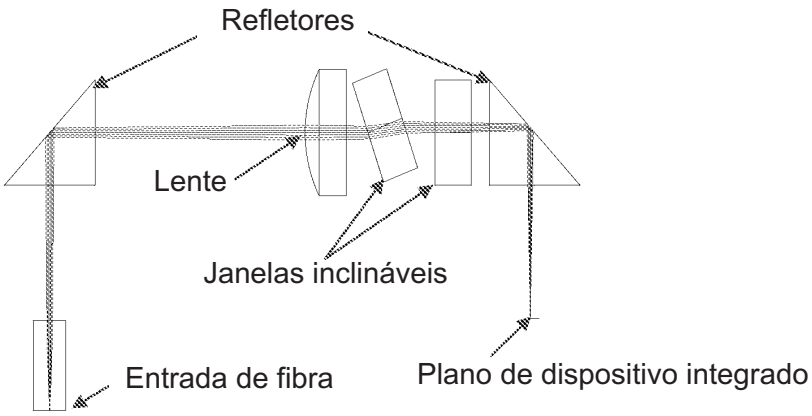

Refletores
Lente
Janelas inclináveis
Entrada de fibra
Plano de dispositivo integrado

FIG. 9-3

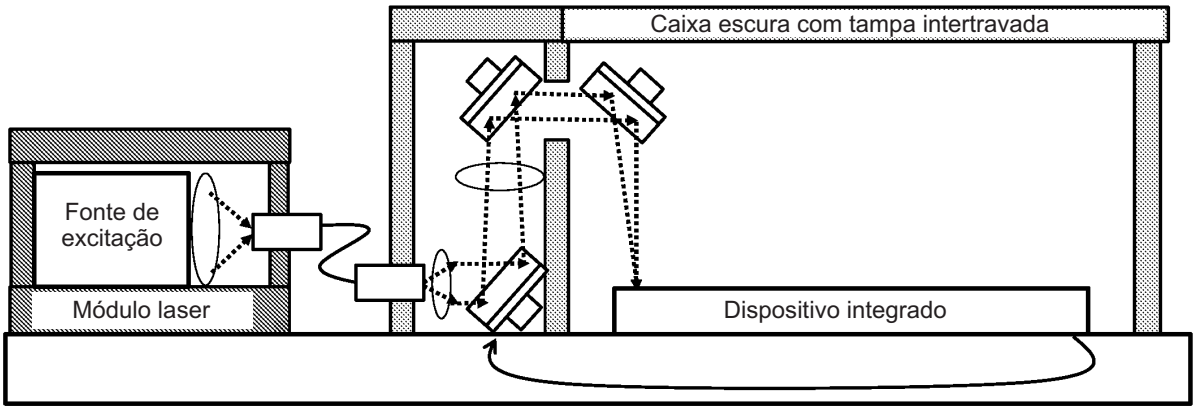

Caixa escura com tampa intertravada
Fonte de excitação
Módulo laser
Dispositivo integrado

FIG. 9-4

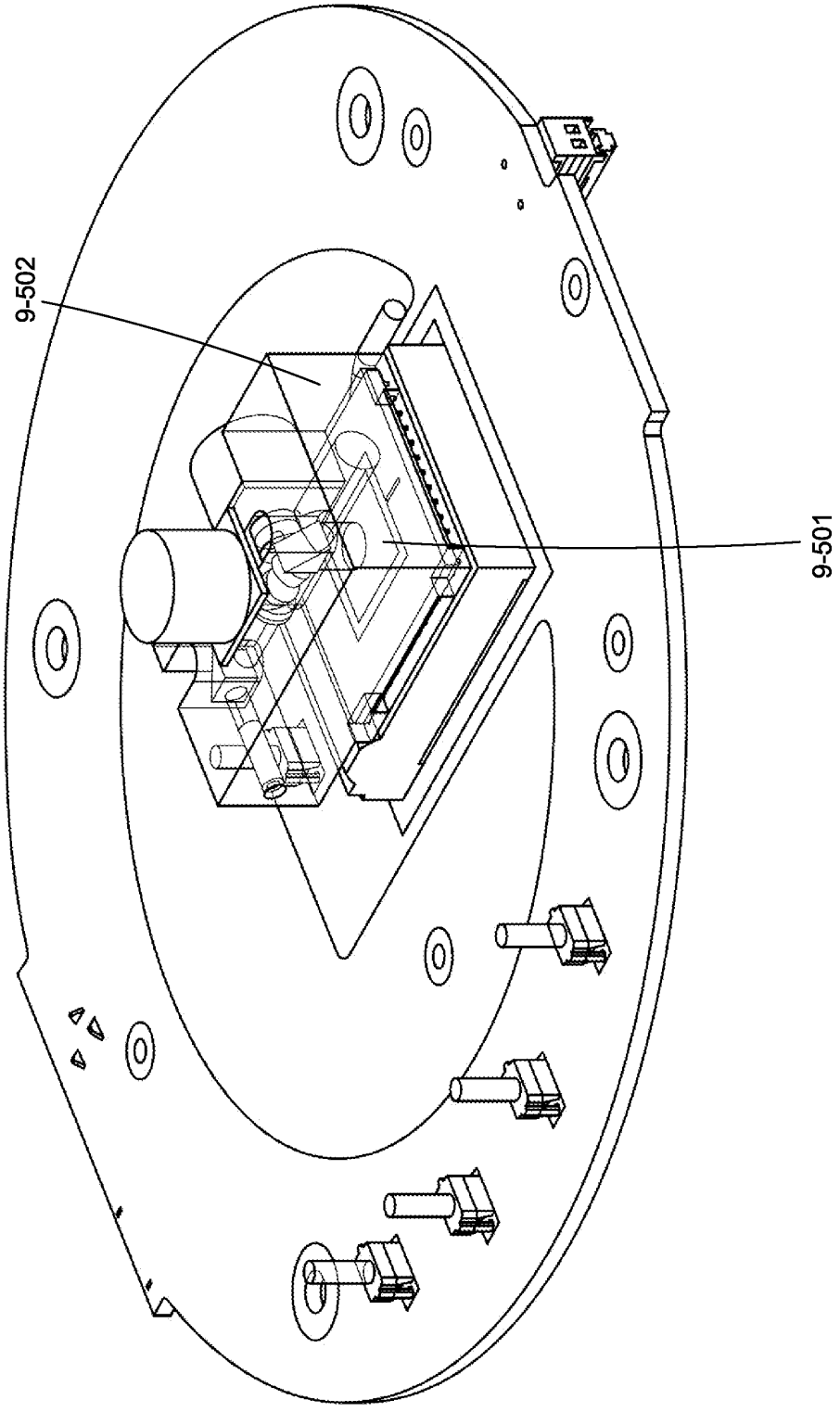


FIG. 9-5

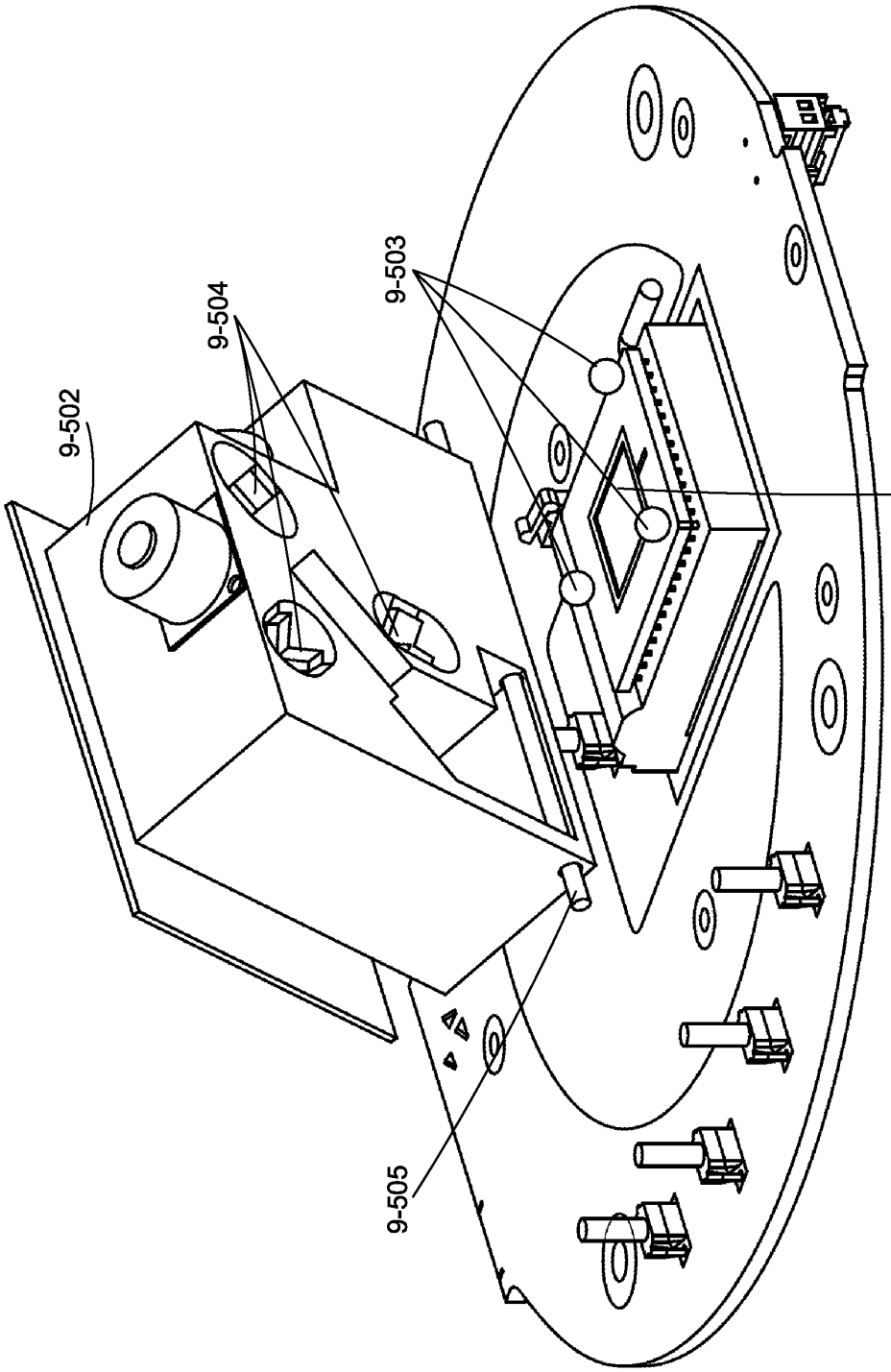


FIG. 9-6

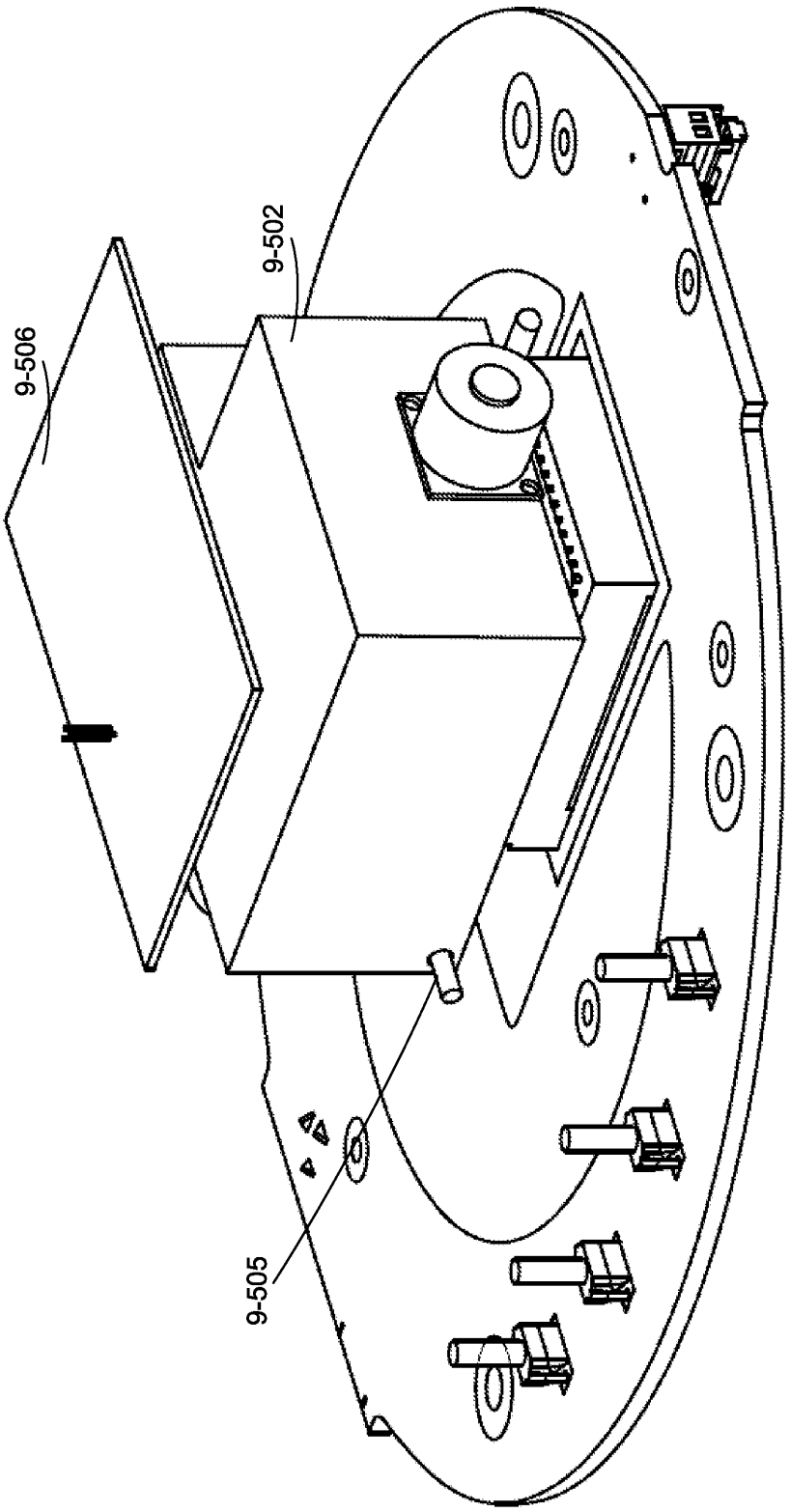


FIG. 9-7

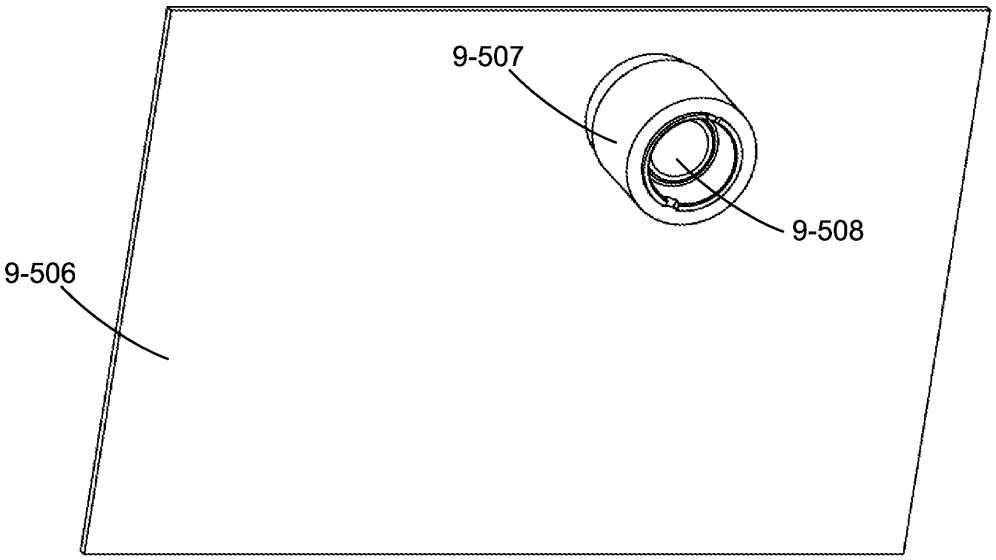


FIG. 9-8

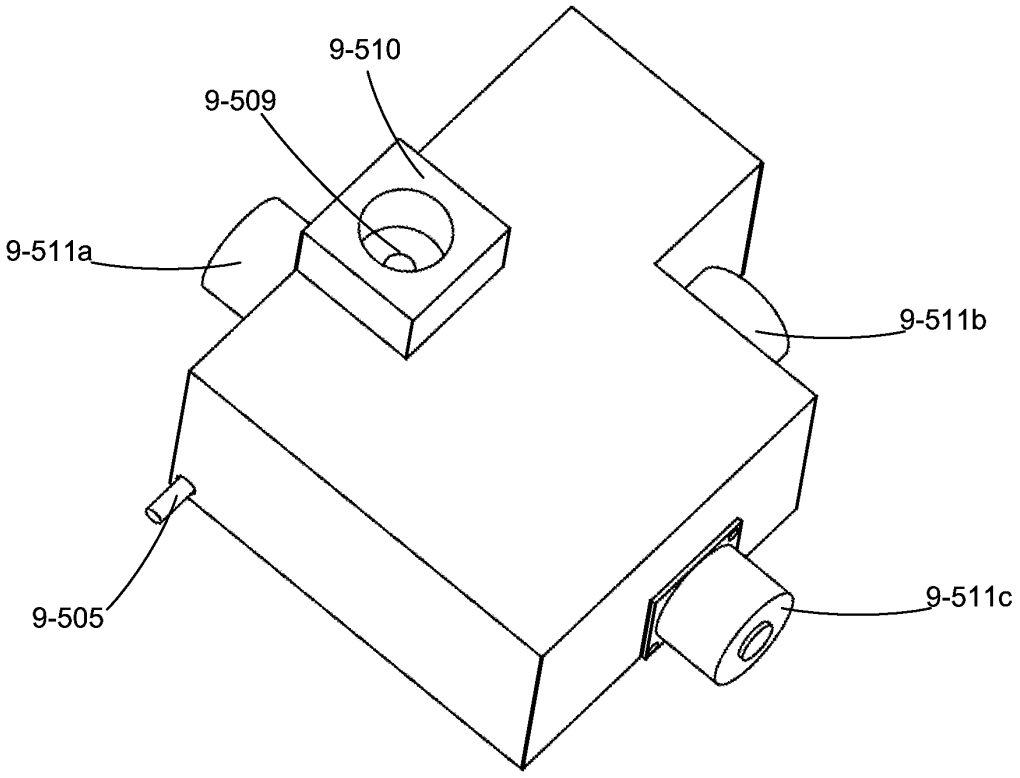


FIG. 9-9

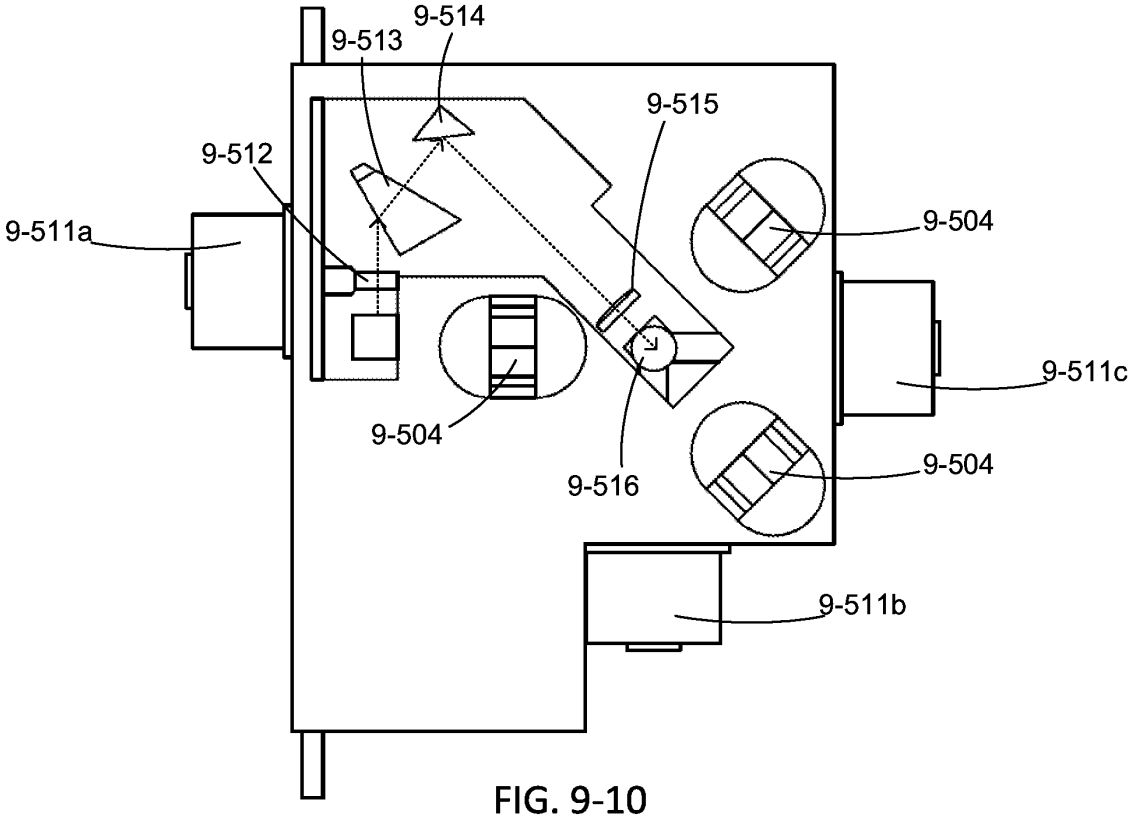


FIG. 9-10

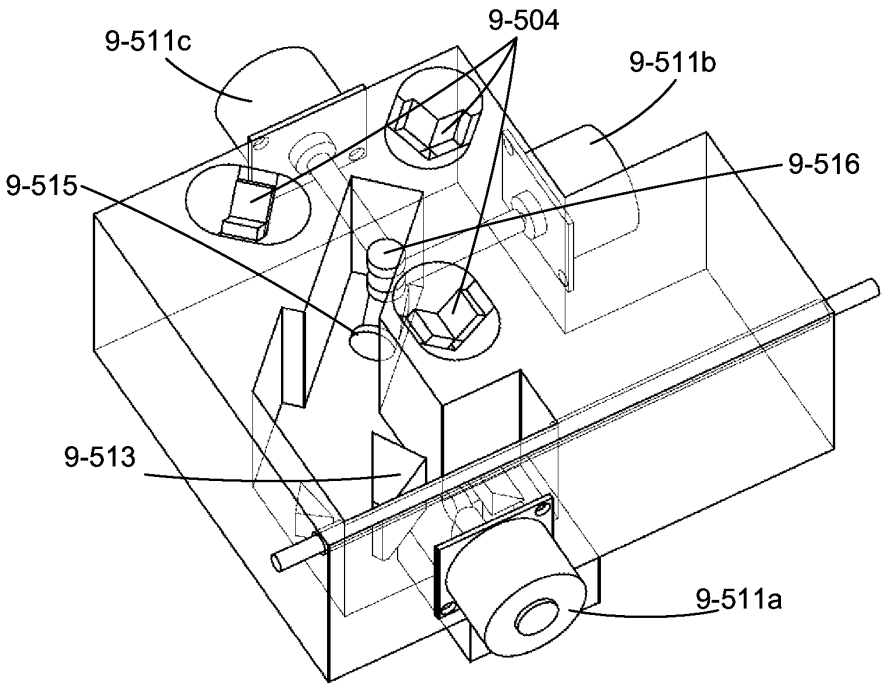


FIG. 9-11

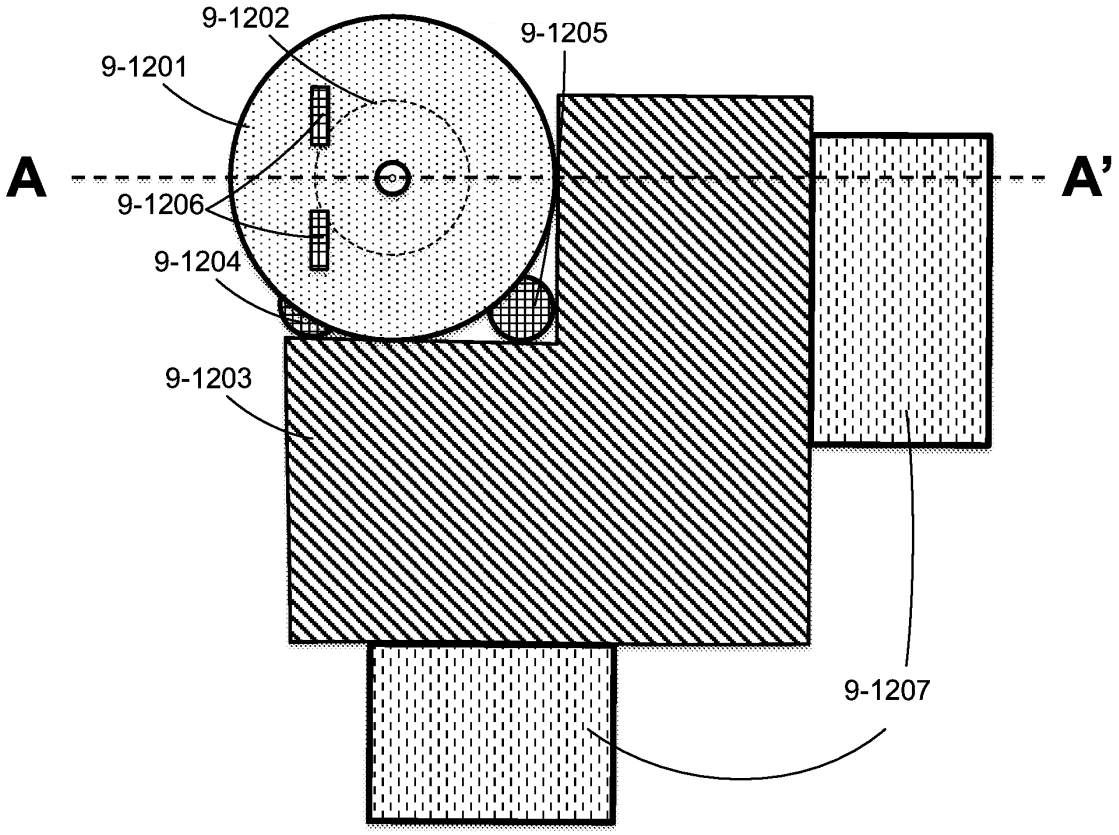


FIG. 9-12

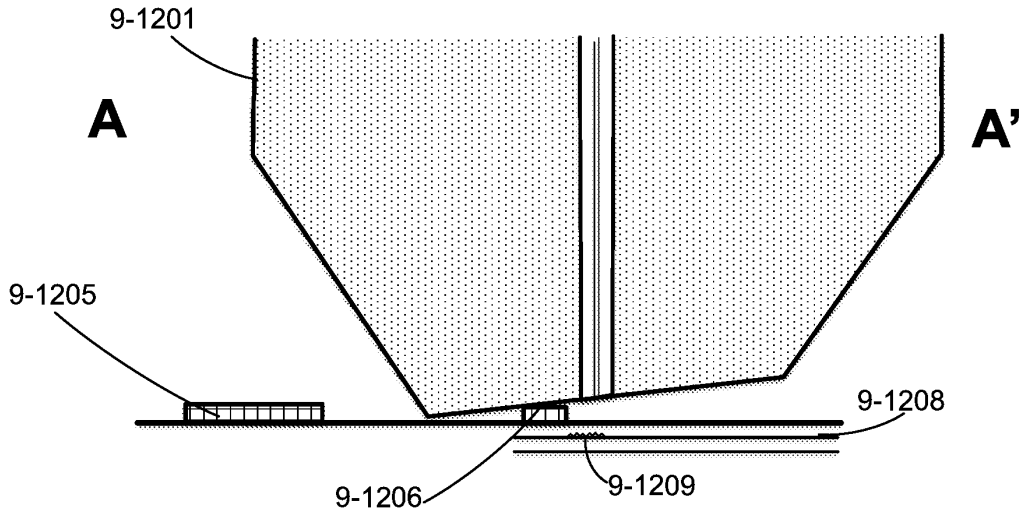


FIG. 9-13

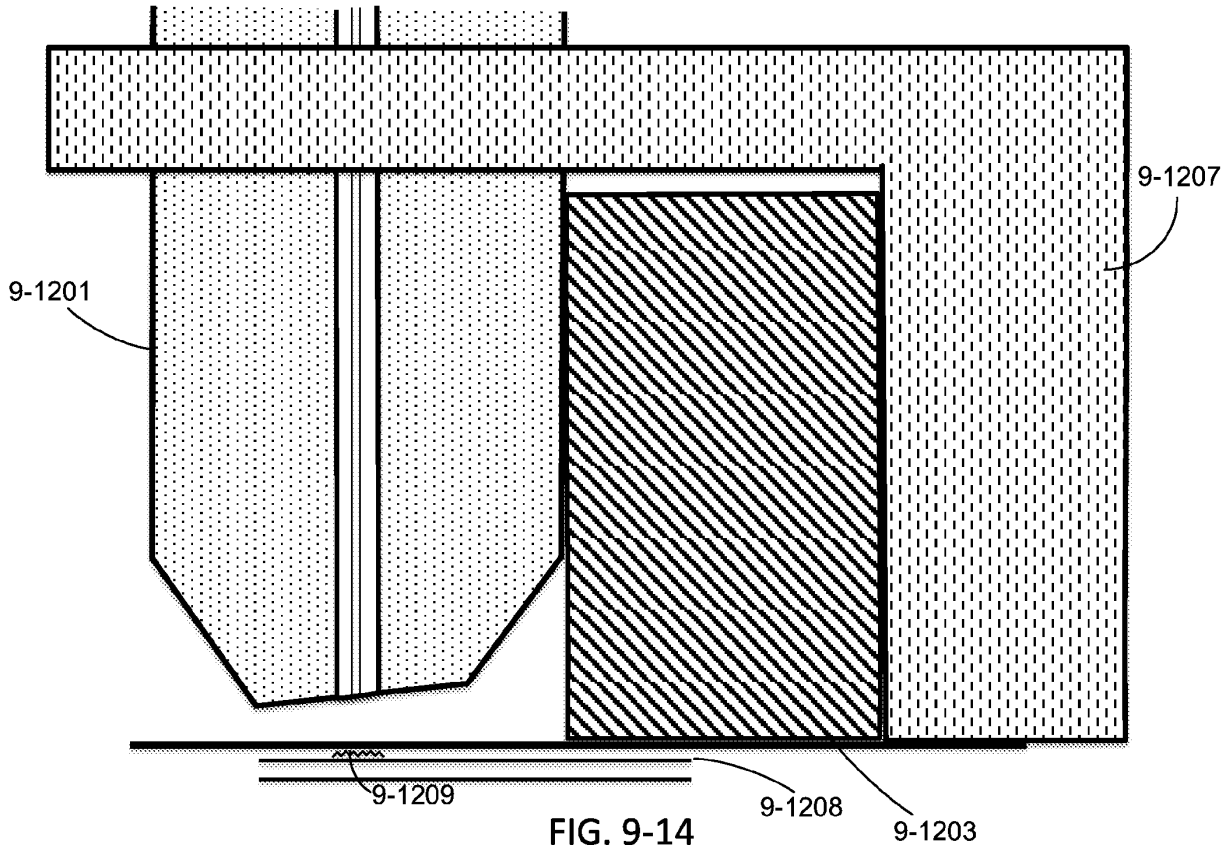


FIG. 9-14

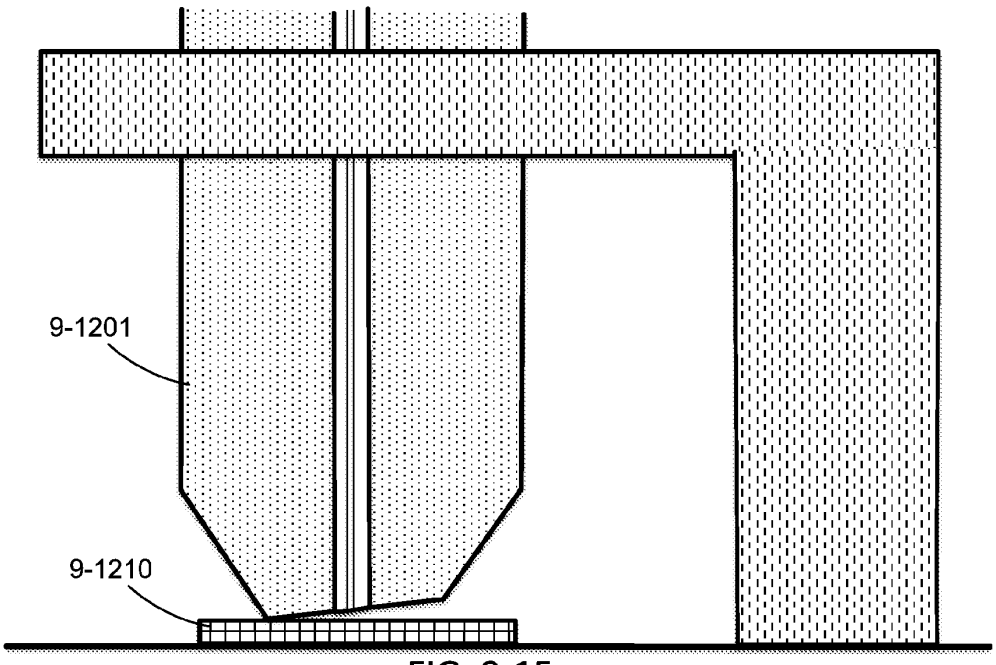


FIG. 9-15

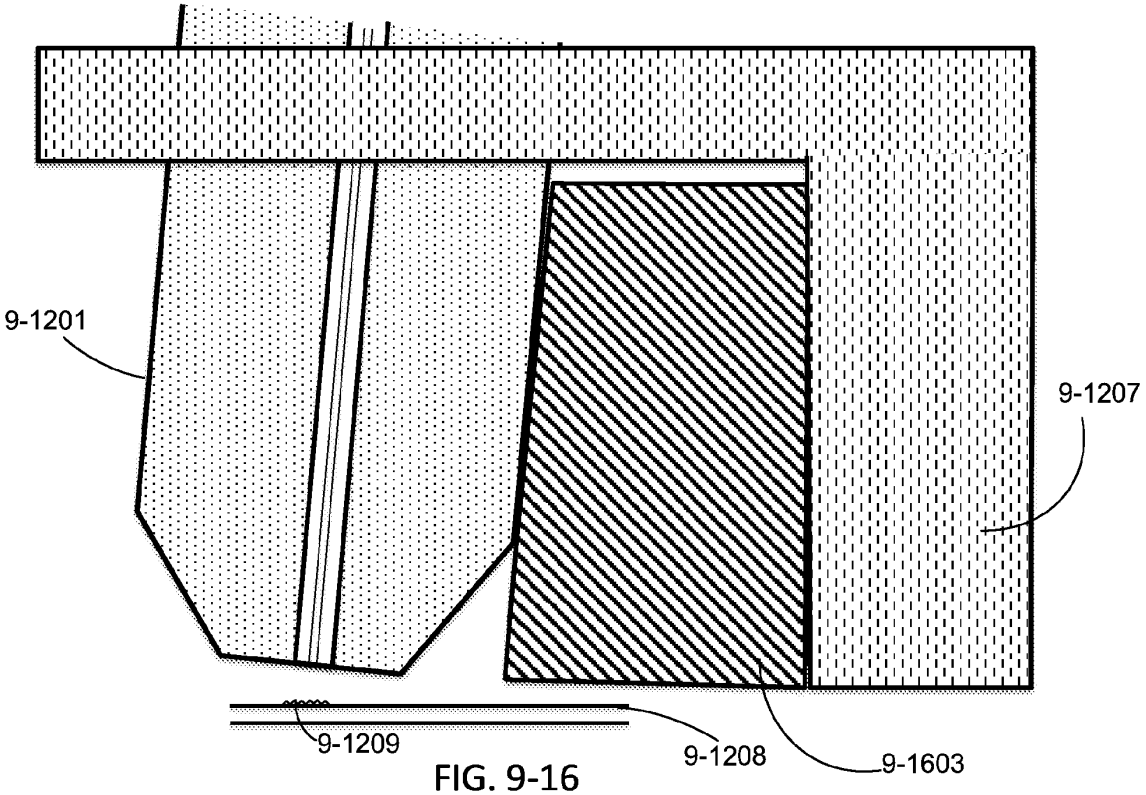


FIG. 9-16

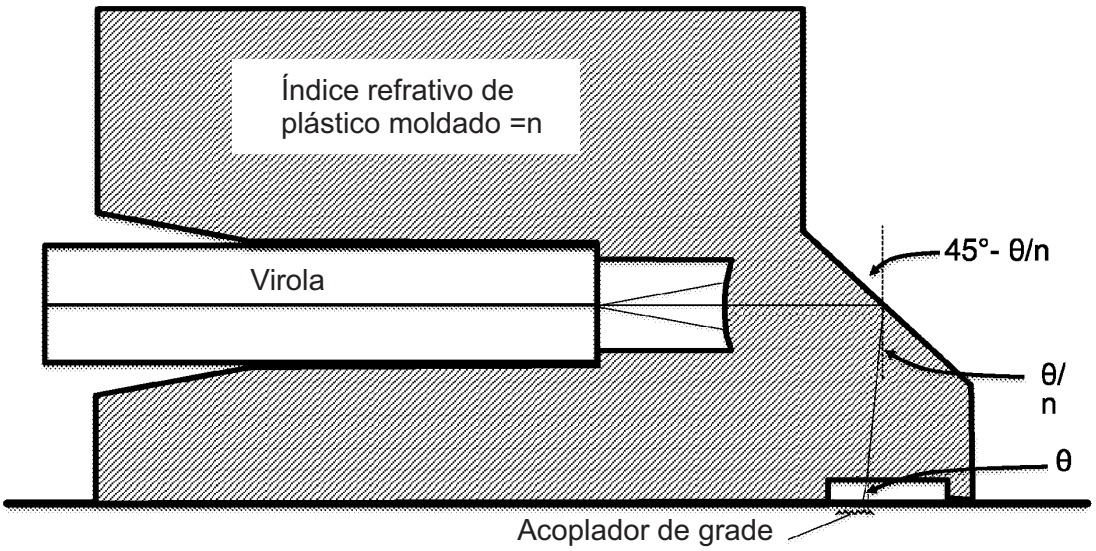


FIG. 9-17

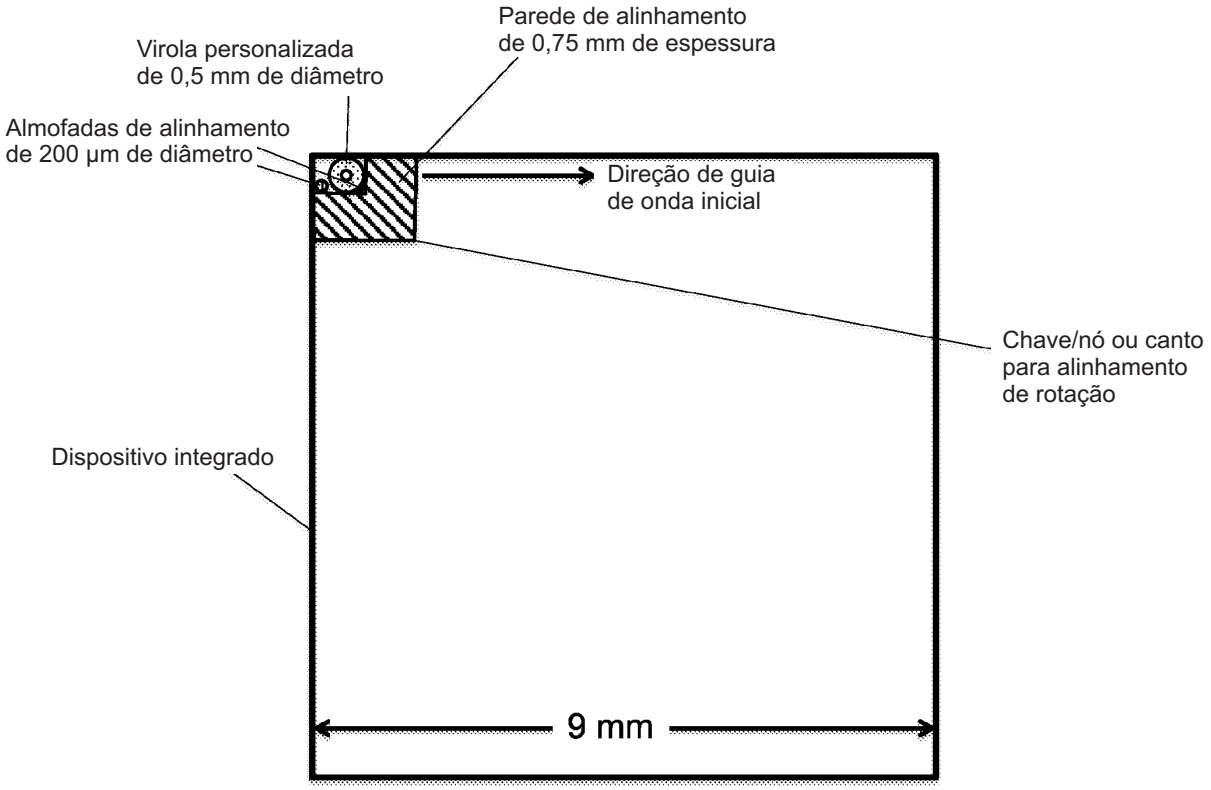


FIG. 9-18

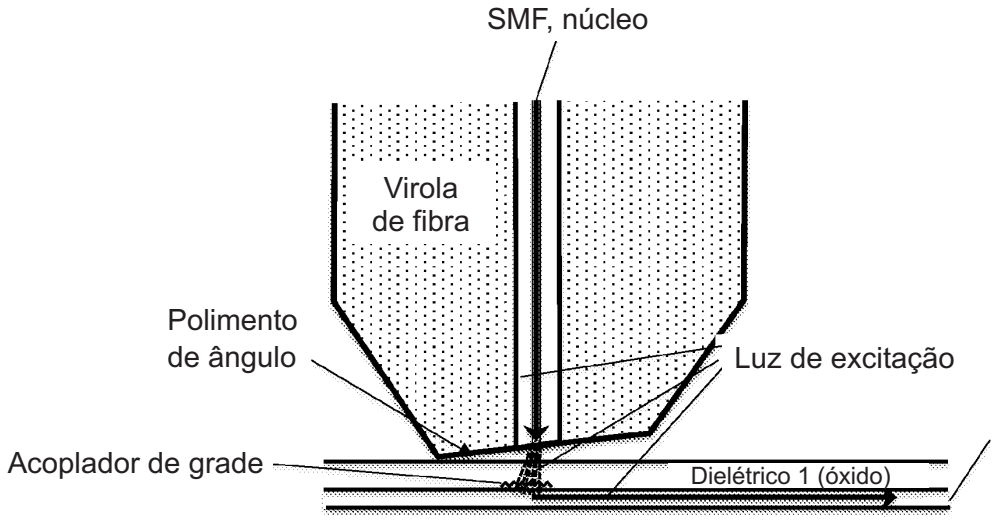


FIG. 9-19

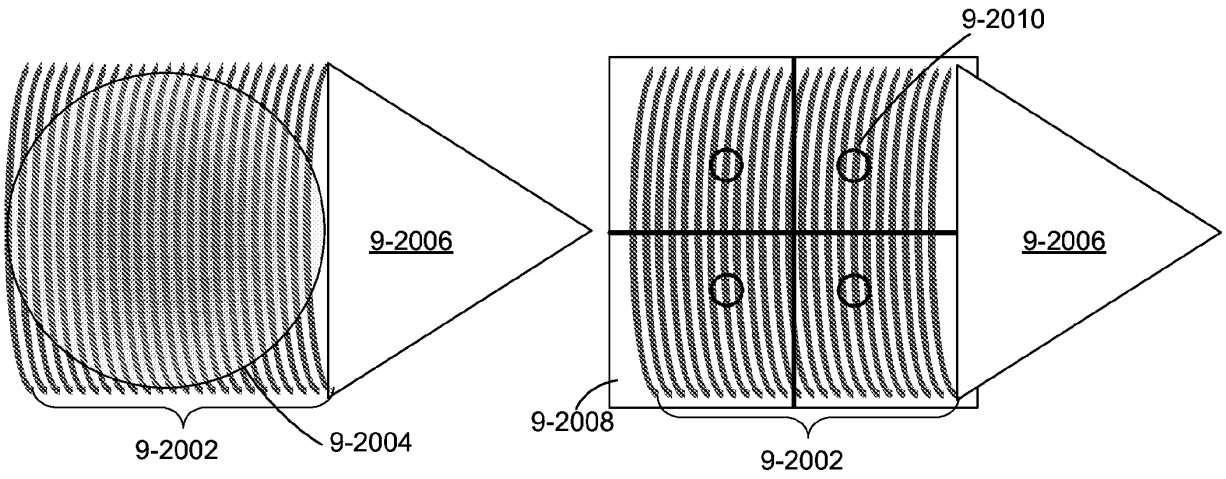


FIG. 9-20

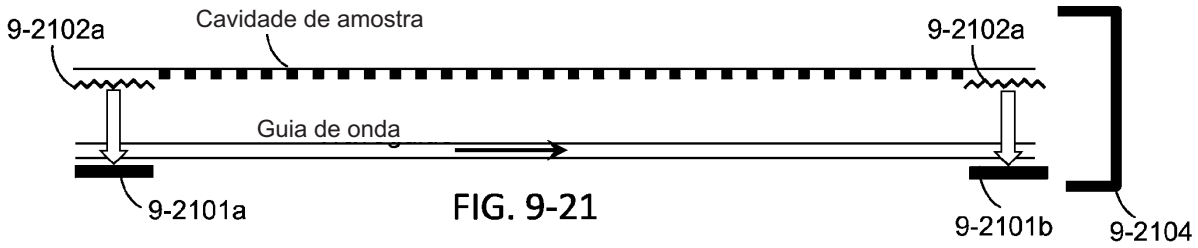


FIG. 9-21

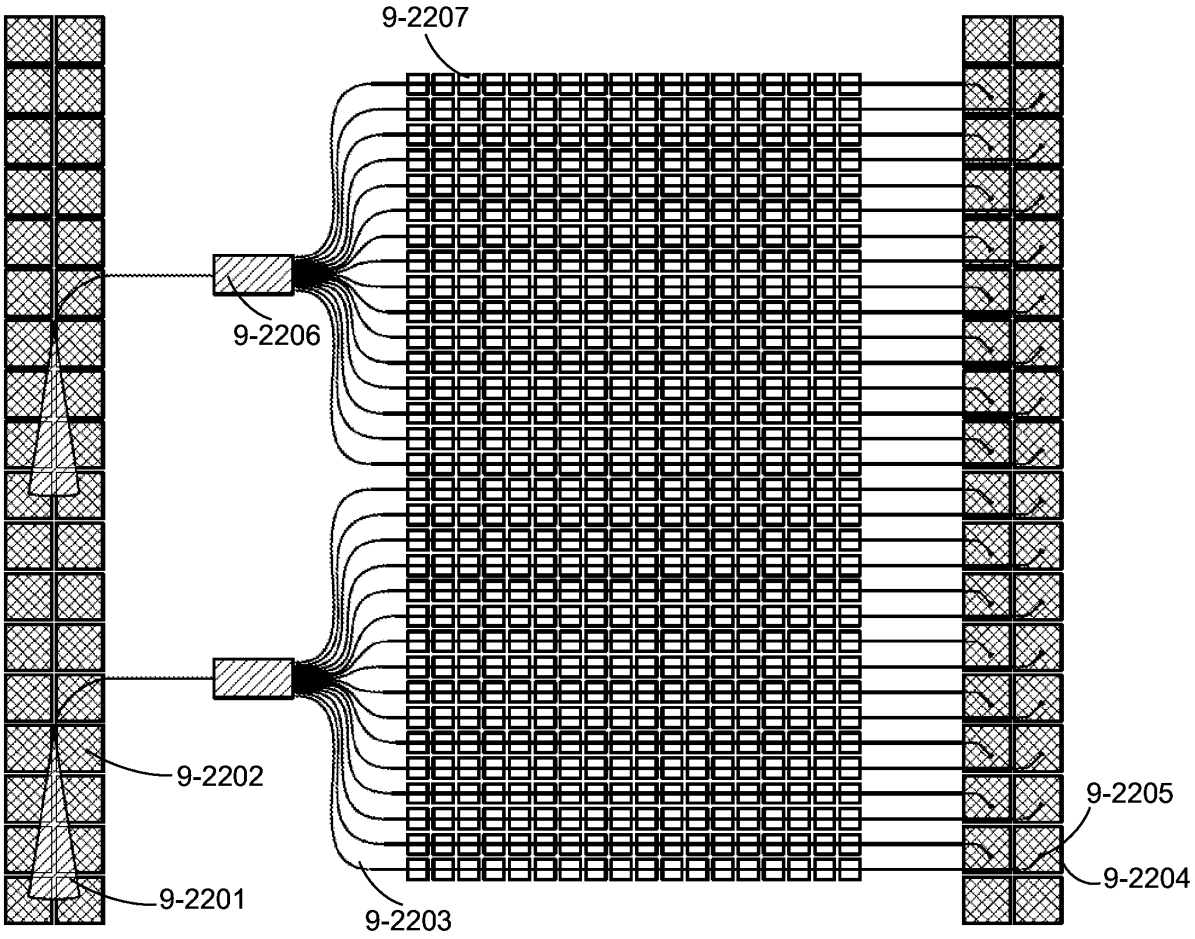


FIG. 9-22

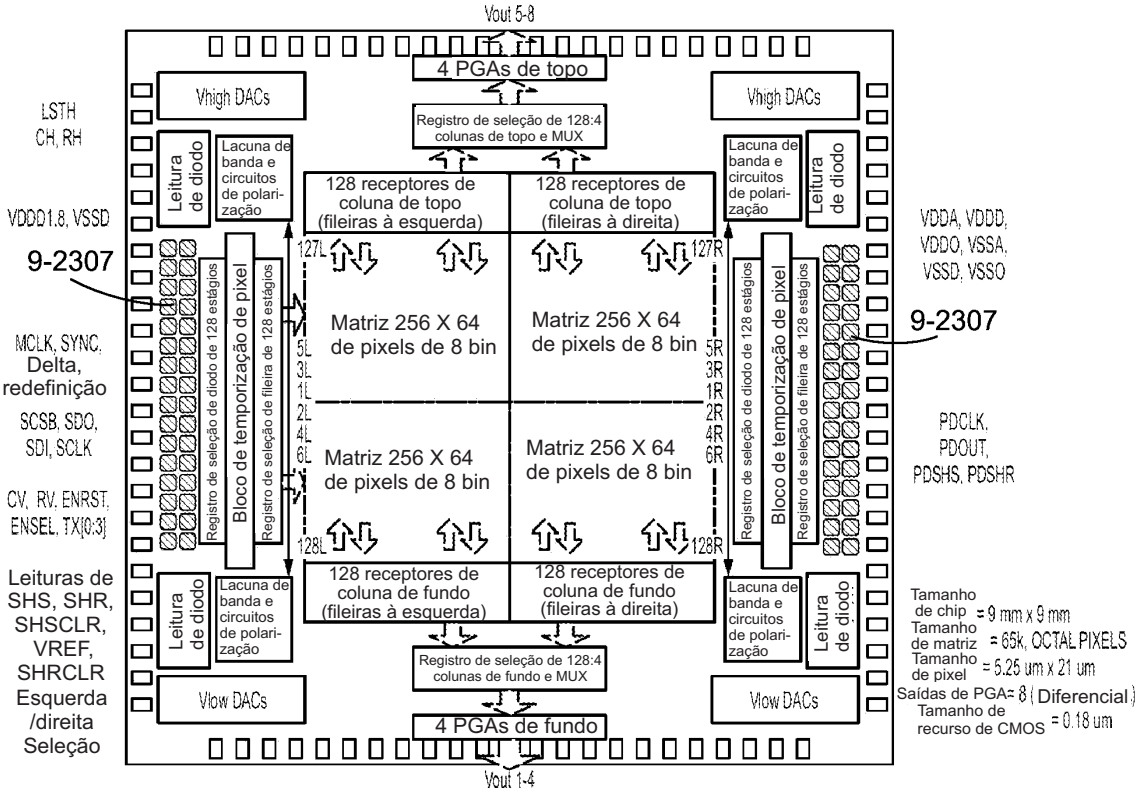


FIG. 9-23

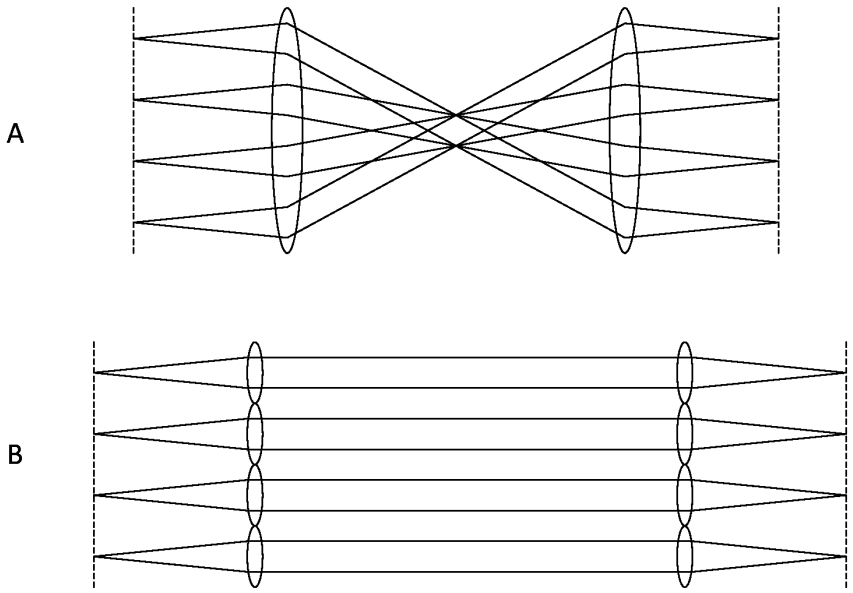


FIG. 9-24

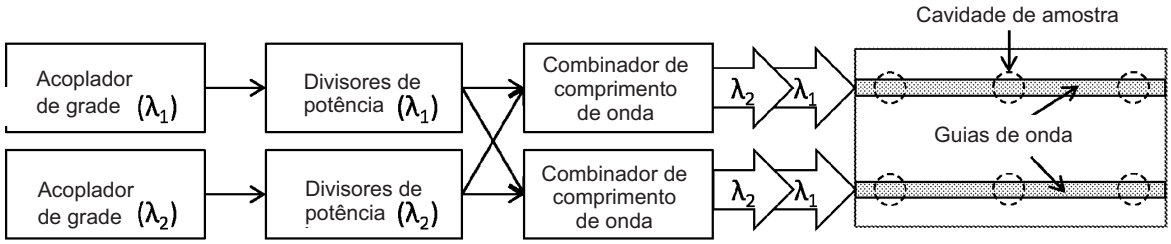


FIG. 9-25A

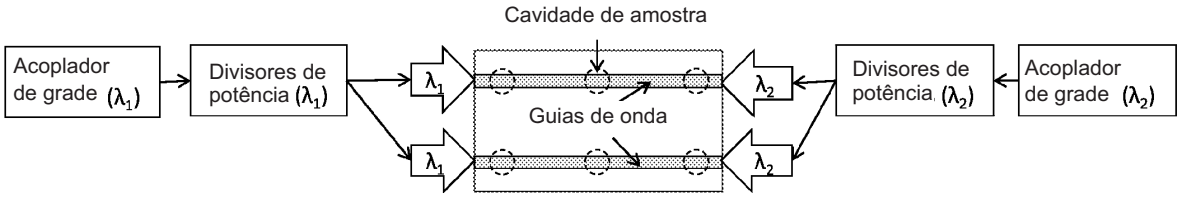


FIG. 9-25B

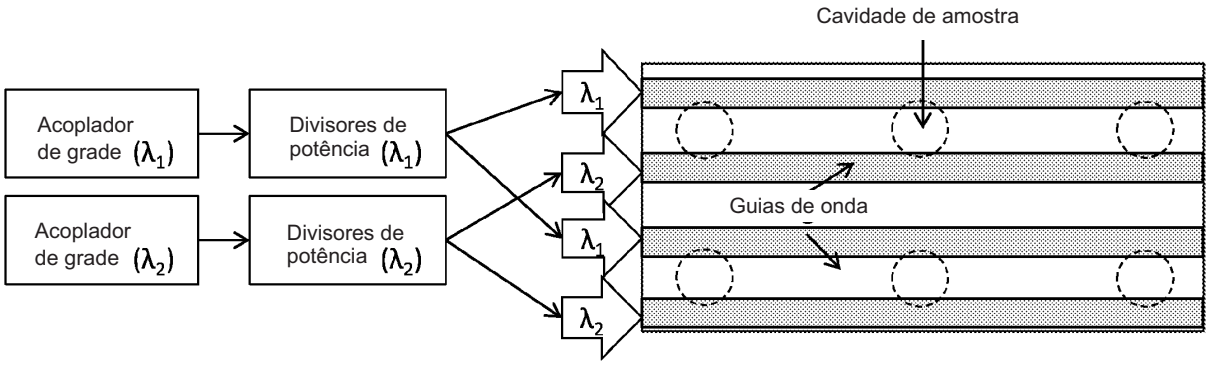


FIG. 9-25C

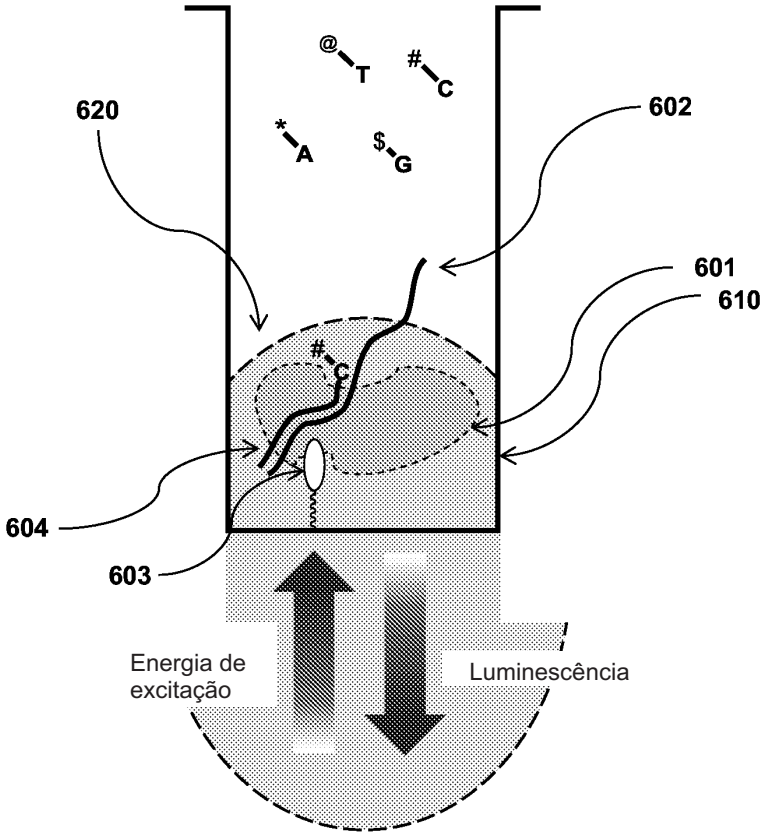

@T
#C
620
602
*A
$G
601
610
#C
604
603
Energia de
excitação
Luminescência

FIG. 10-1

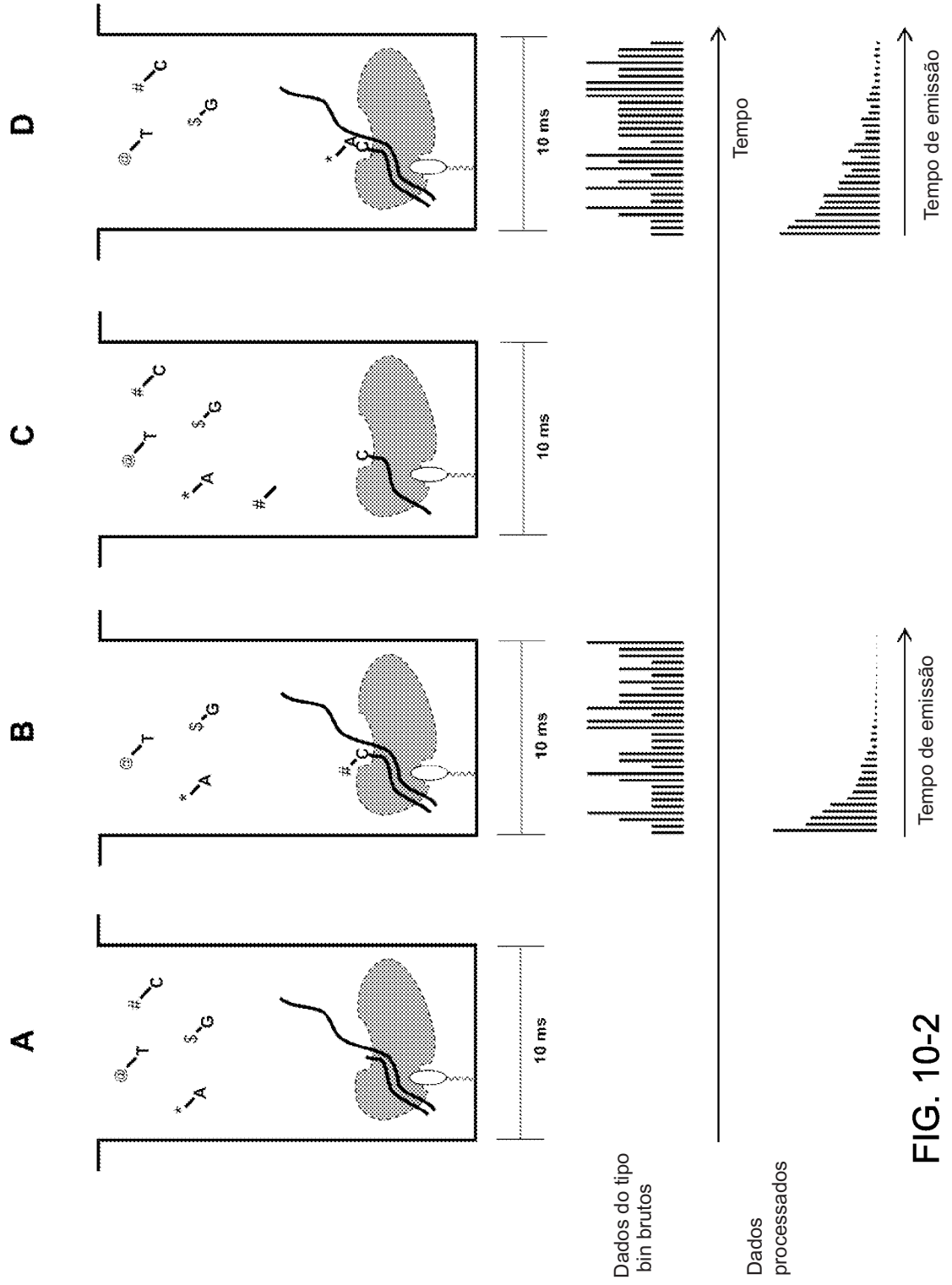

A
B
C
D
10 ms
10 ms
10 ms
10 ms
Dados do tipo bin brutos
Tempo
Dados processados
Tempo de emissão
Tempo de emissão

FIG. 10-2

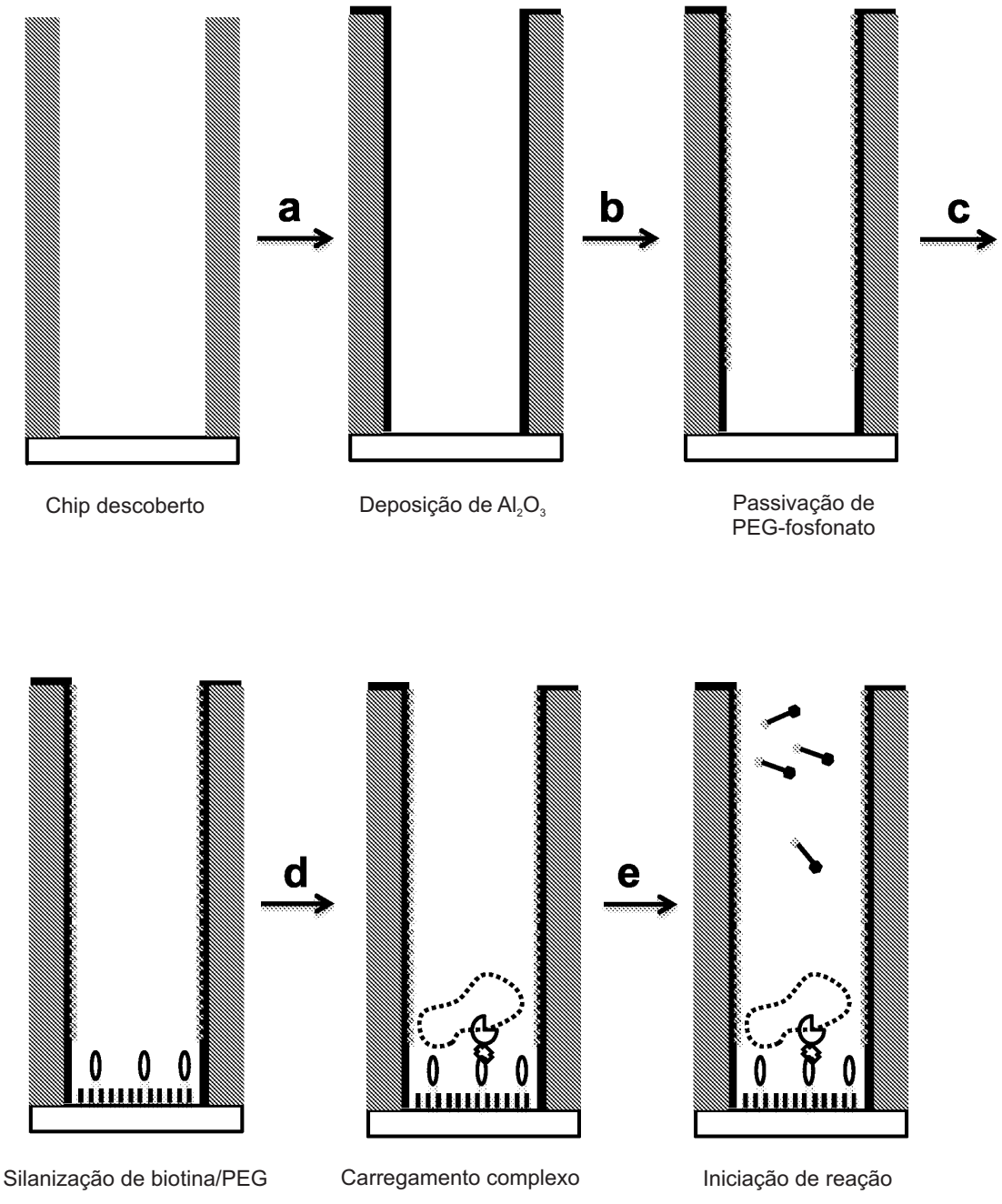

a
b
c
Chip descoberto
Deposição de Al_2O_3
Passivação de PEG-fosfonato
d
e
Silanização de biotina/PEG
Carregamento complexo
Iniciação de reação

FIG. 10-3

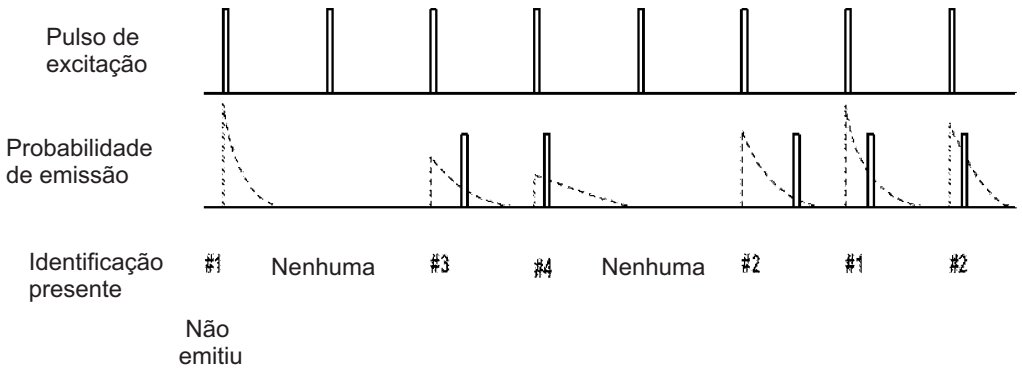


FIG. 10-4

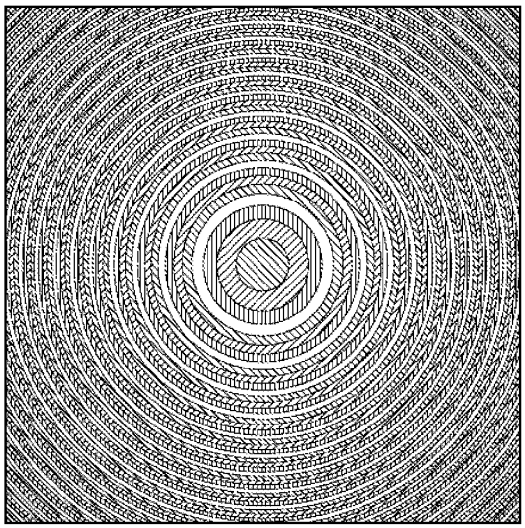


FIG. 10-5

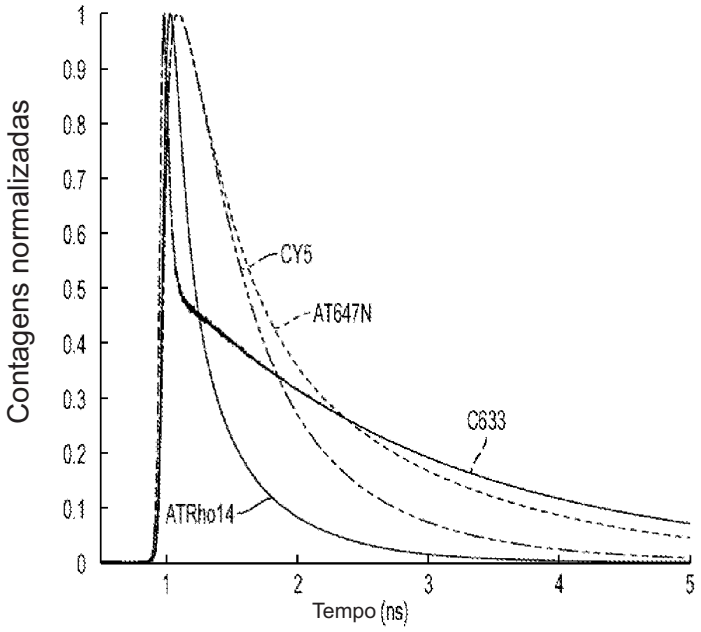


FIG. 10-6

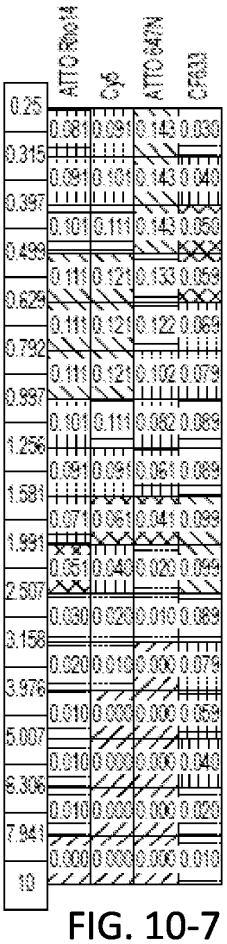


FIG. 10-7

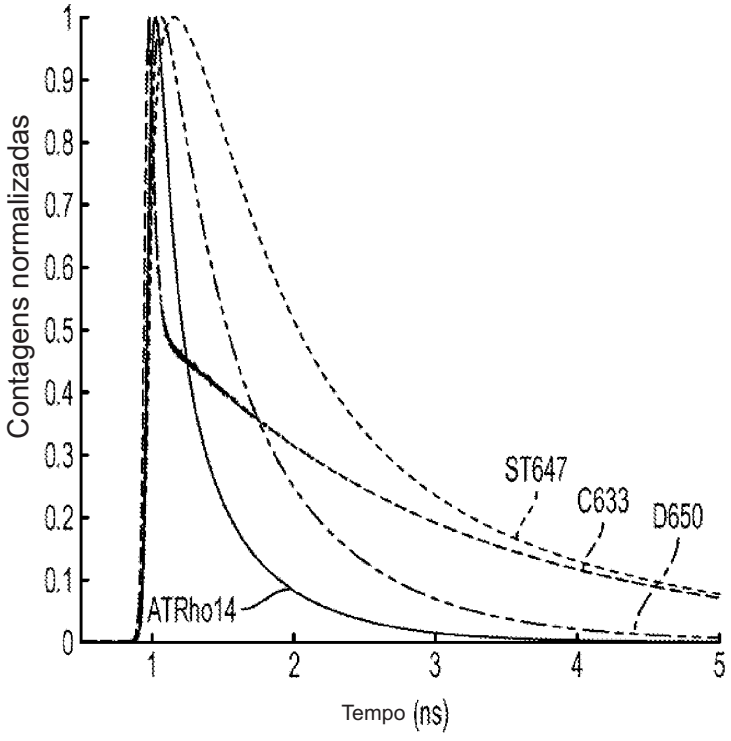


FIG. 10-8

Exc.	ATTO Rho14	D650	ST647	CF633
Exc.				
Exc.				
0.25	0.384	0.287	0.170	0.130
0.51	0.131	0.129	0.090	0.060
0.667	0.182	0.208	0.180	0.140
1.057	0.131	0.198	0.230	0.220
1.915	0.020	0.030	0.050	0.060
2.227	0.040	0.050	0.100	0.120
3.163	0.000	0.000	0.010	0.020
3.319	0.081	0.069	0.140	0.210
7.609	0.000	0.000	0.010	0.010
7.999	0.010	0.010	0.010	0.010
8.701	0.000	0.000	0.000	0.000
8.857	0.010	0.010	0.000	0.010
9.247	0.010	0.010	0.010	0.010
9.91				

FIG. 10-9

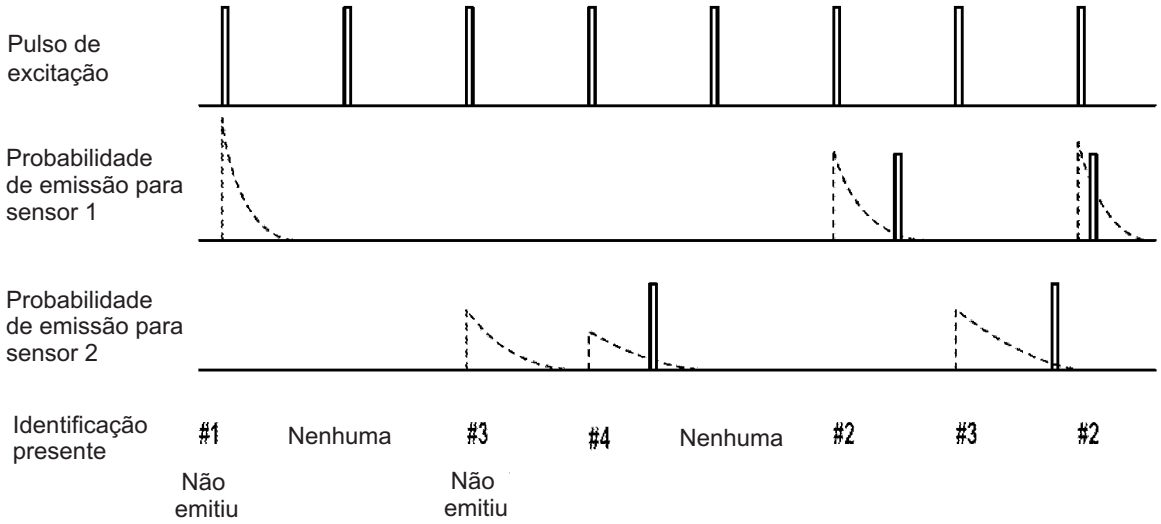


FIG. 10-10

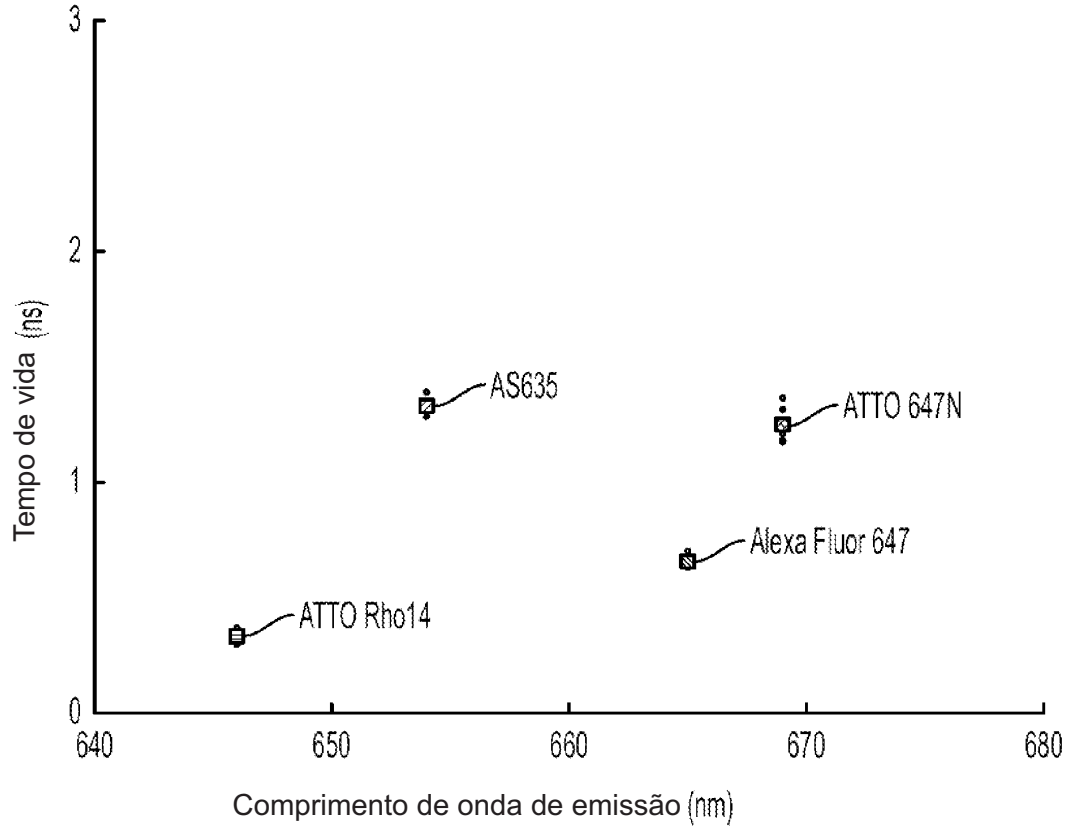


FIG. 10-11

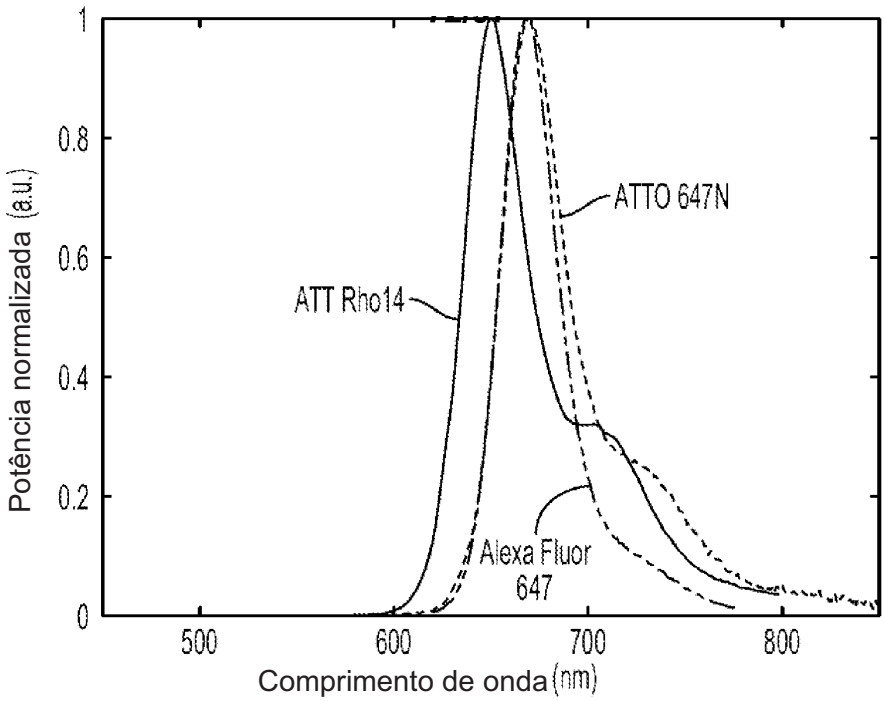


FIG. 10-12

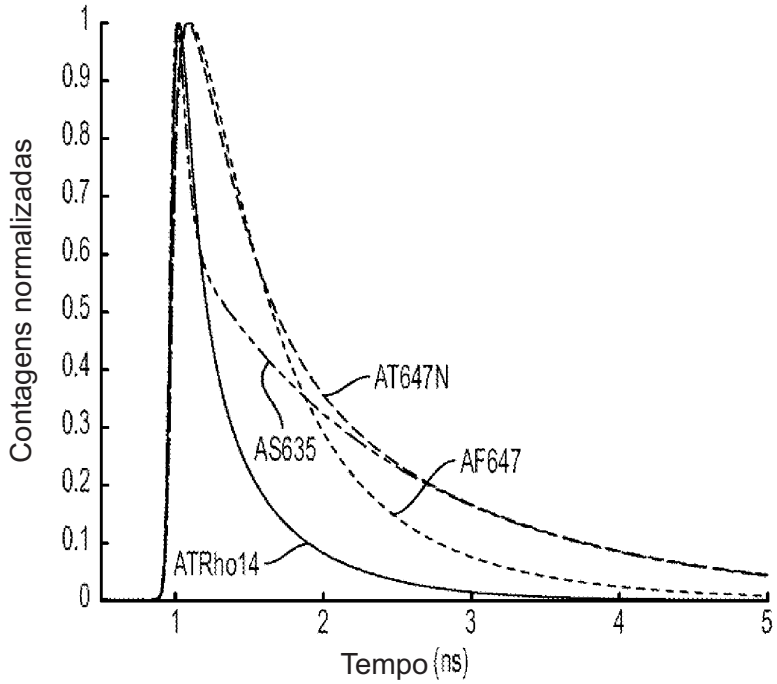


FIG. 10-13

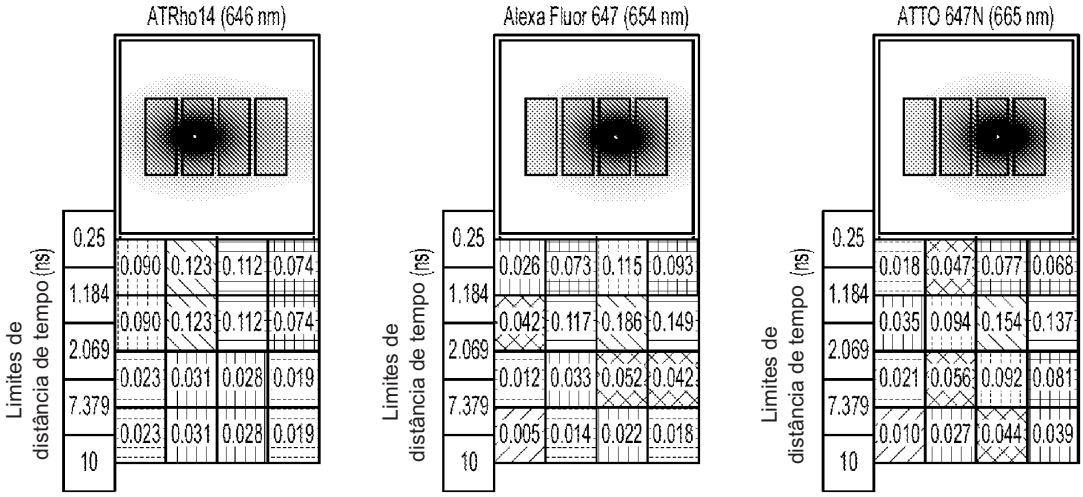


FIG. 10-14

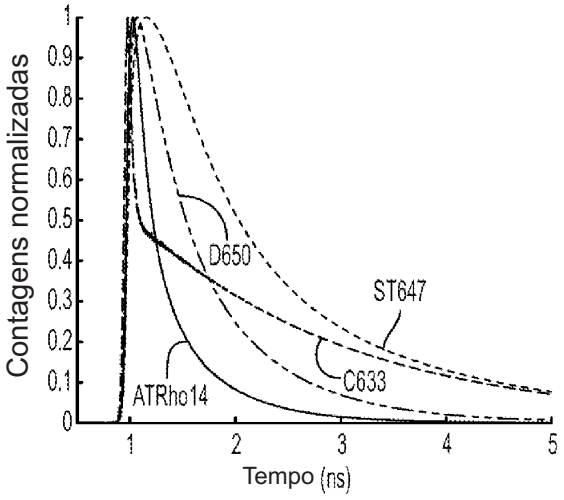


FIG. 10-15

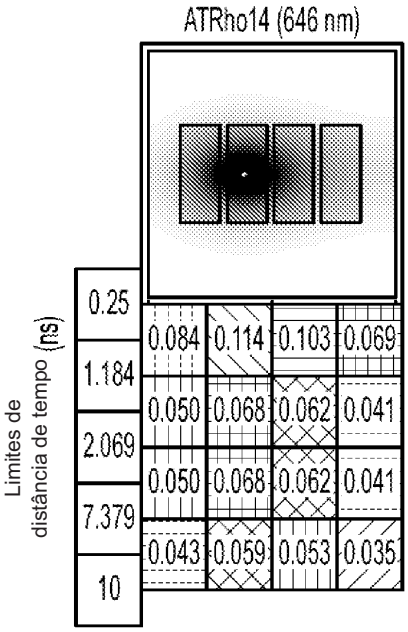


FIG. 10-16

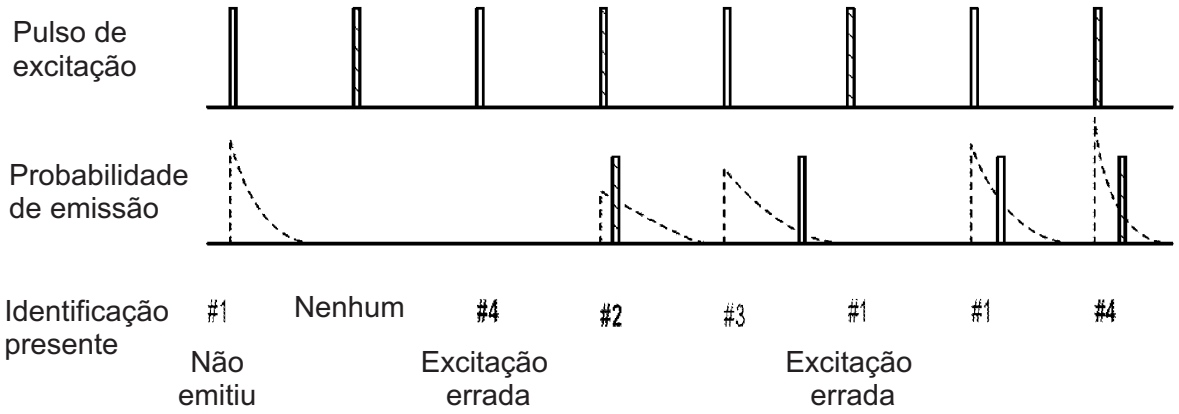


FIG. 10-17

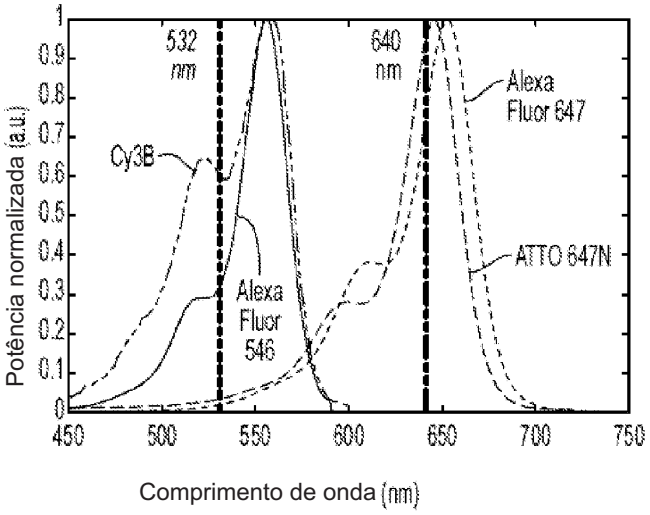


FIG. 10-18

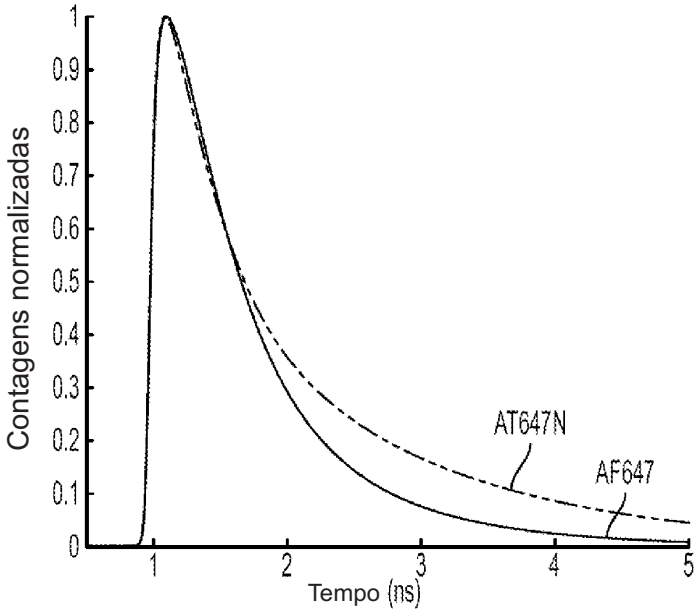


FIG. 10-19

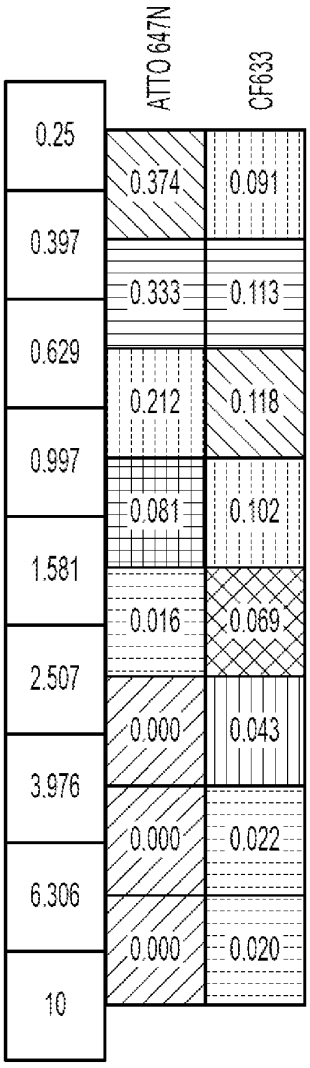


FIG. 10-20

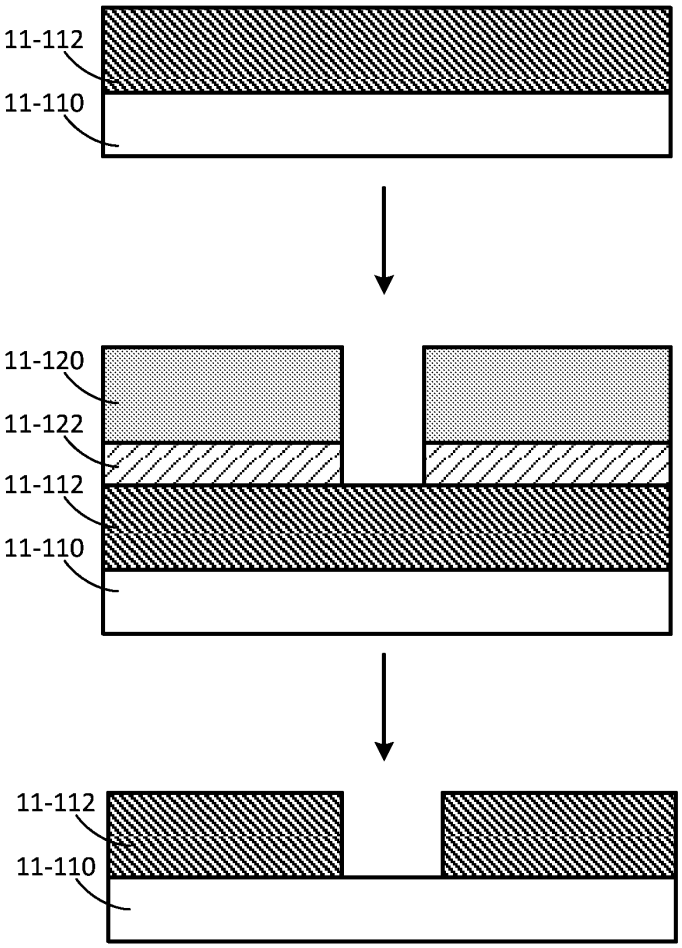


FIG. 11-1

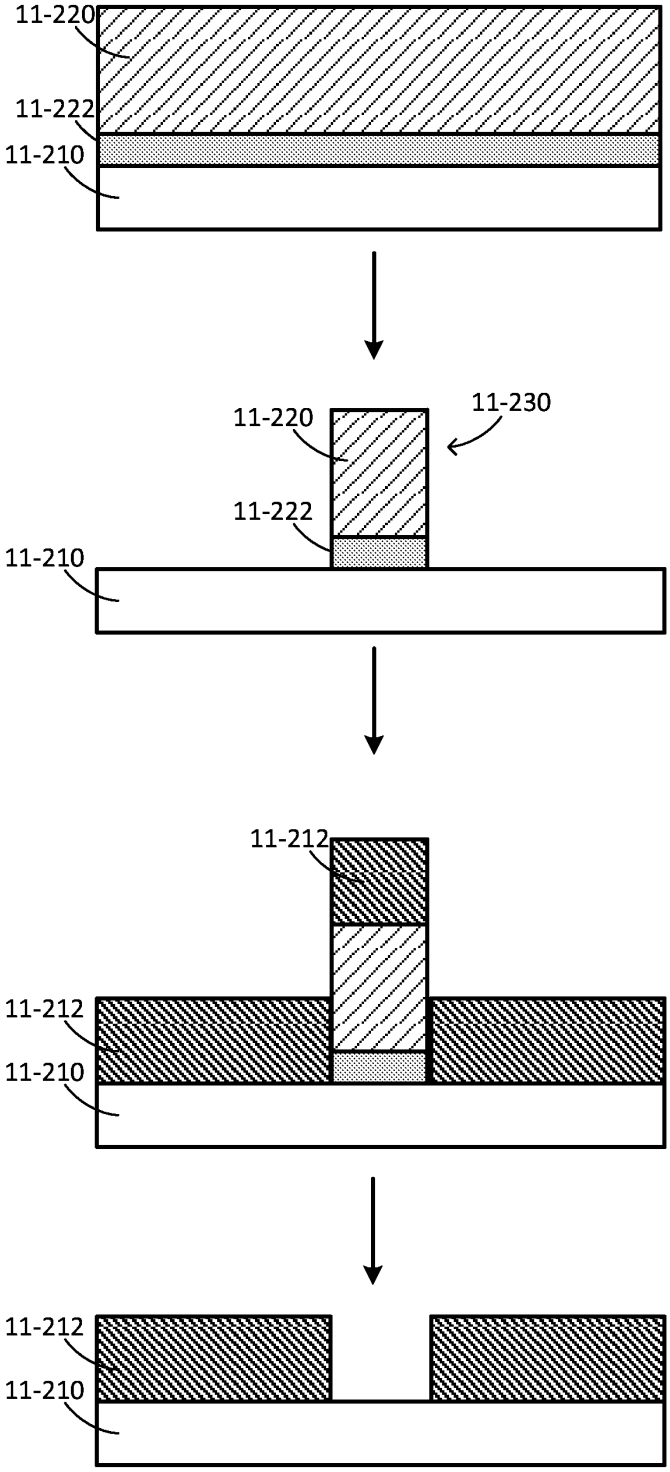

11-220
11-222
11-210
11-220
11-230
11-222
11-210
11-212
11-212
11-210
11-212
11-210

FIG. 11-2

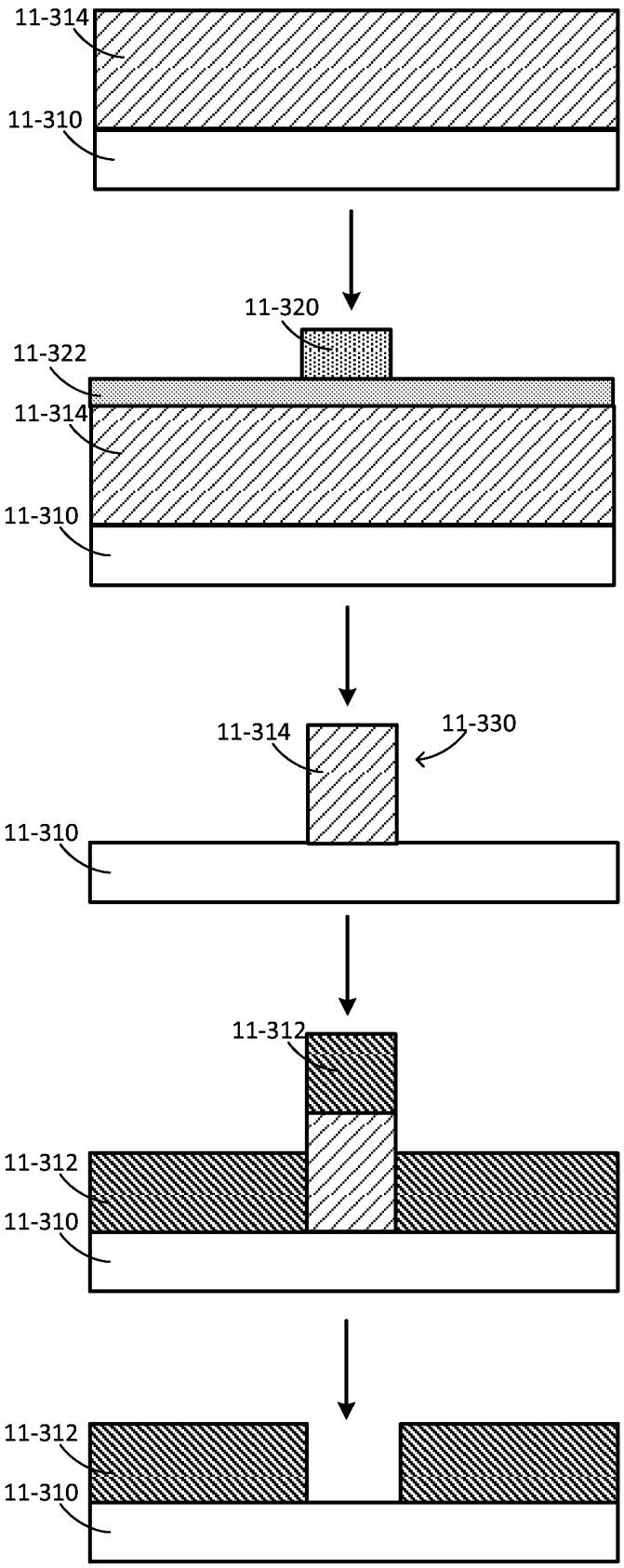

11-314
11-310
11-320
11-322
11-314
11-310
11-314
11-330
11-310
11-312
11-312
11-310
11-312
11-310

FIG. 11-3

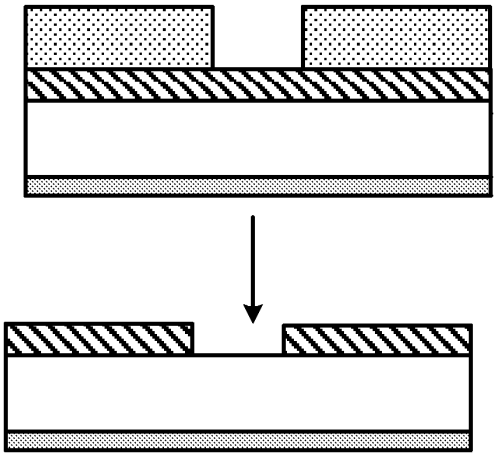


FIG. 11-4A

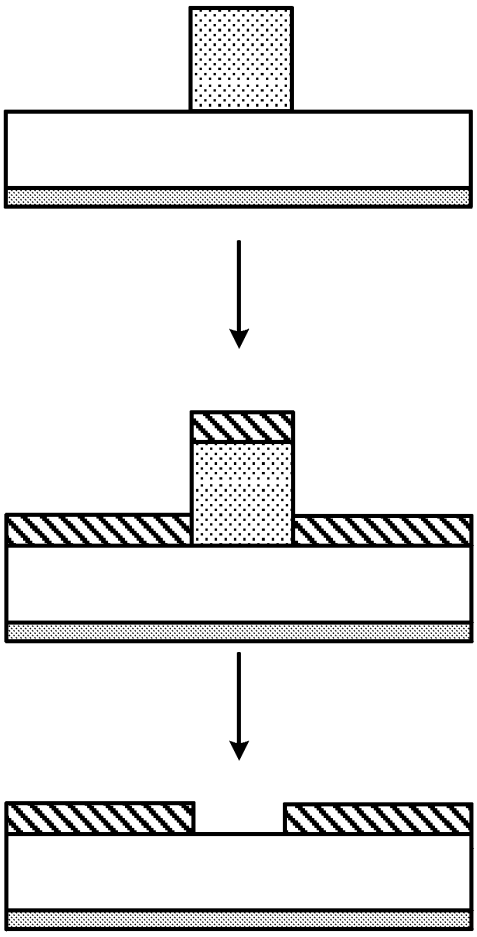


FIG. 11-4B

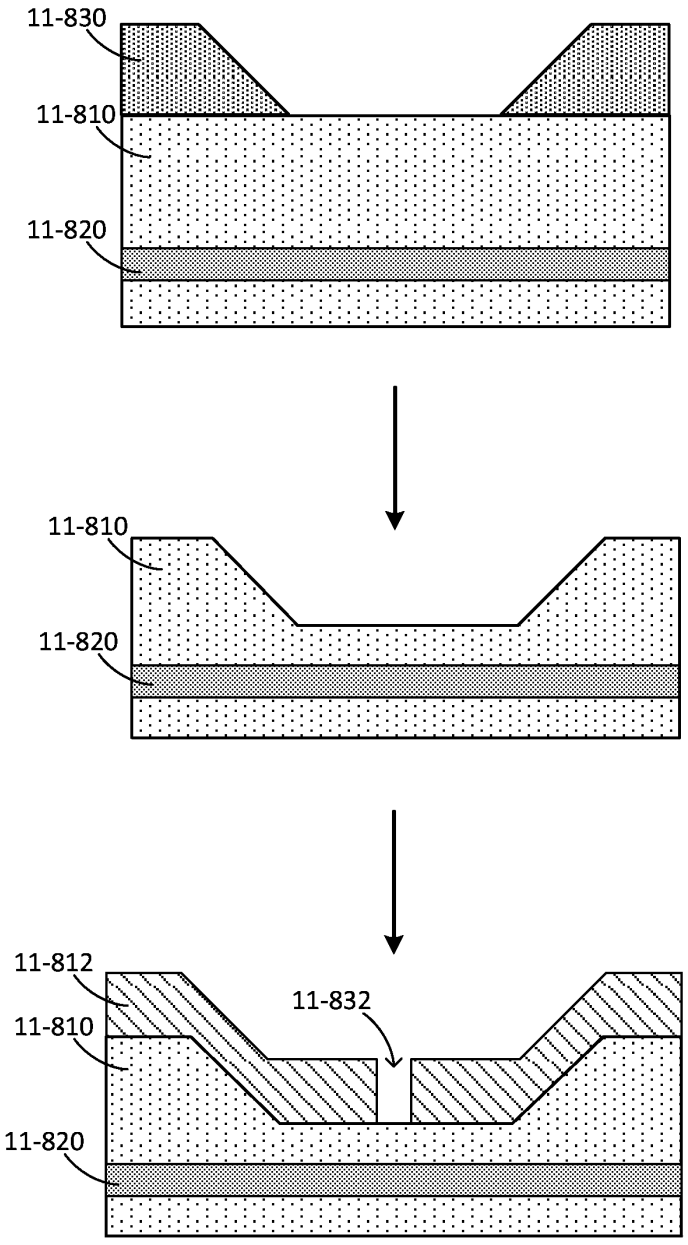


FIG. 11-5

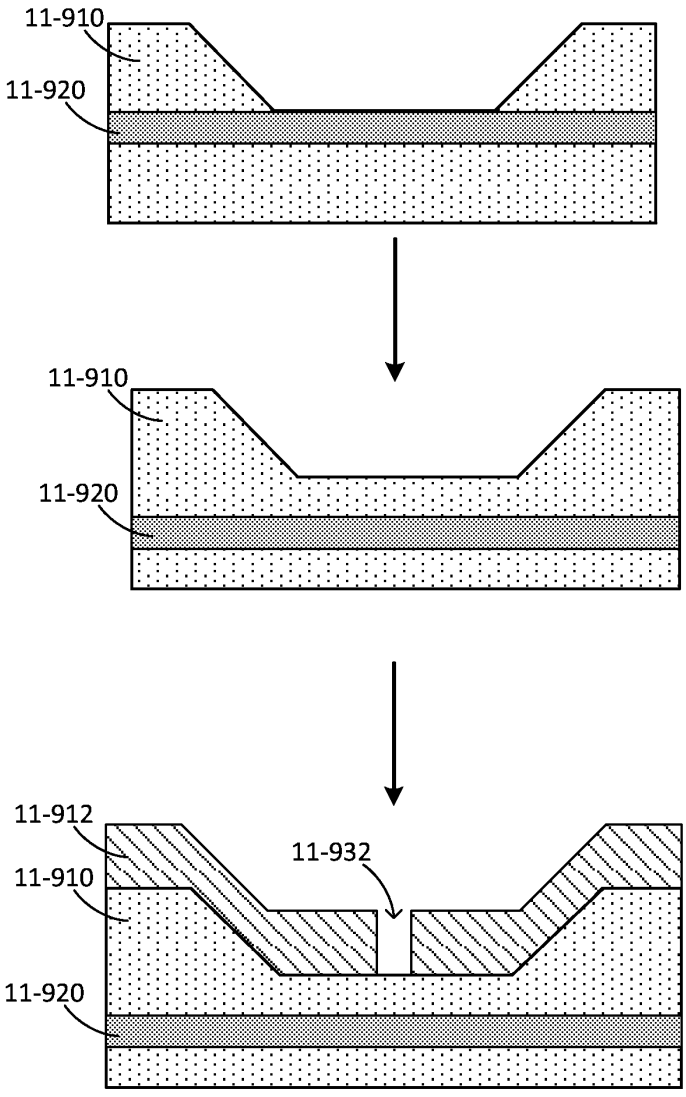


FIG. 11-6

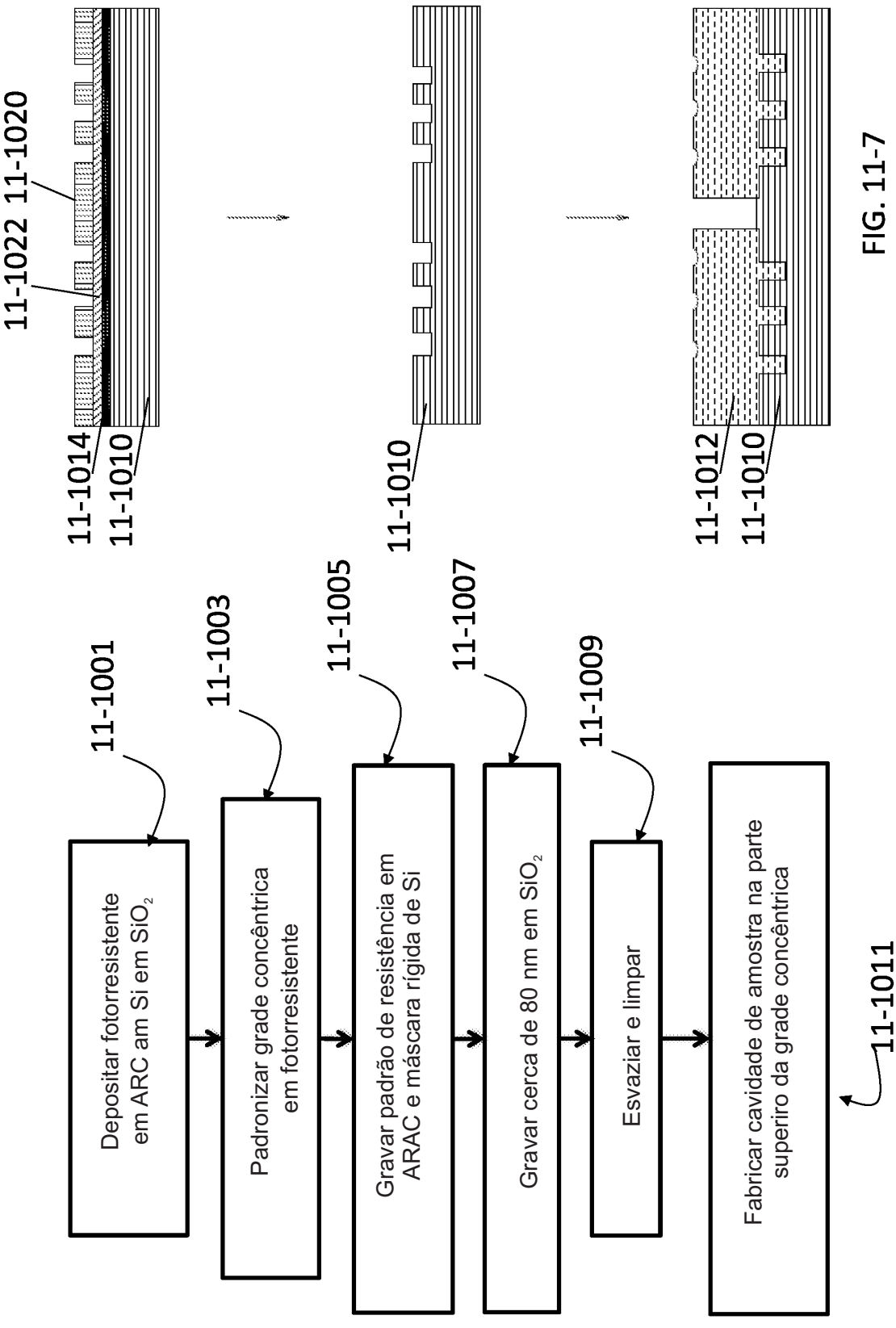

11-1001
Depositar fotorresistente em ARC am Si em SiO_2
11-1003
Padronizar grade concêntrica em fotorresistente
11-1005
Gravar padrão de resistência em ARAC e máscara rígida de Si
11-1007
Gravar cerca de 80 nm em SiO_2
11-1009
Esvaziar e limpar
Fabricar cavidade de amostra na parte superiro da grade concêntrica
11-1011
11-1022
11-1020
11-1014
11-1010
11-1010
11-1012
11-1010

FIG. 11-7

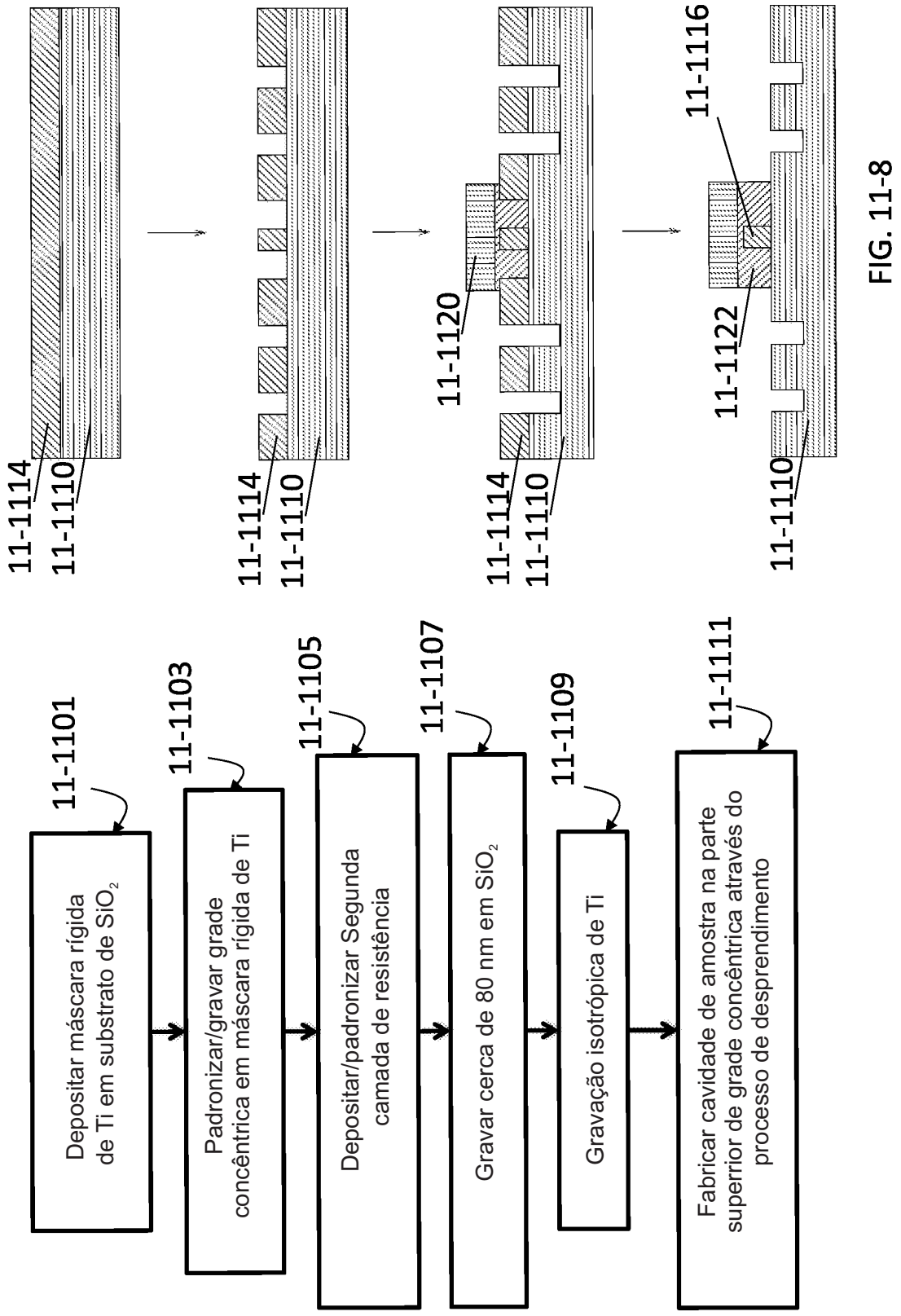

11-1101
Depositar máscara rígida de Ti em substrato de SiO_2
11-1103
Padronizar/gravar grade concêntrica em máscara rígida de Ti
11-1105
Depositar/padronizar Segunda camada de resistência
11-1107
Gravar cerca de 80 nm em SiO_2
11-1109
Gravação isotrópica de Ti
11-1111
Fabricar cavidade de amostra na parte superrior de grade concêntrica através do processo de desprendimento
11-1114
11-1110
11-1120
11-1122
11-1116

FIG. 11-8

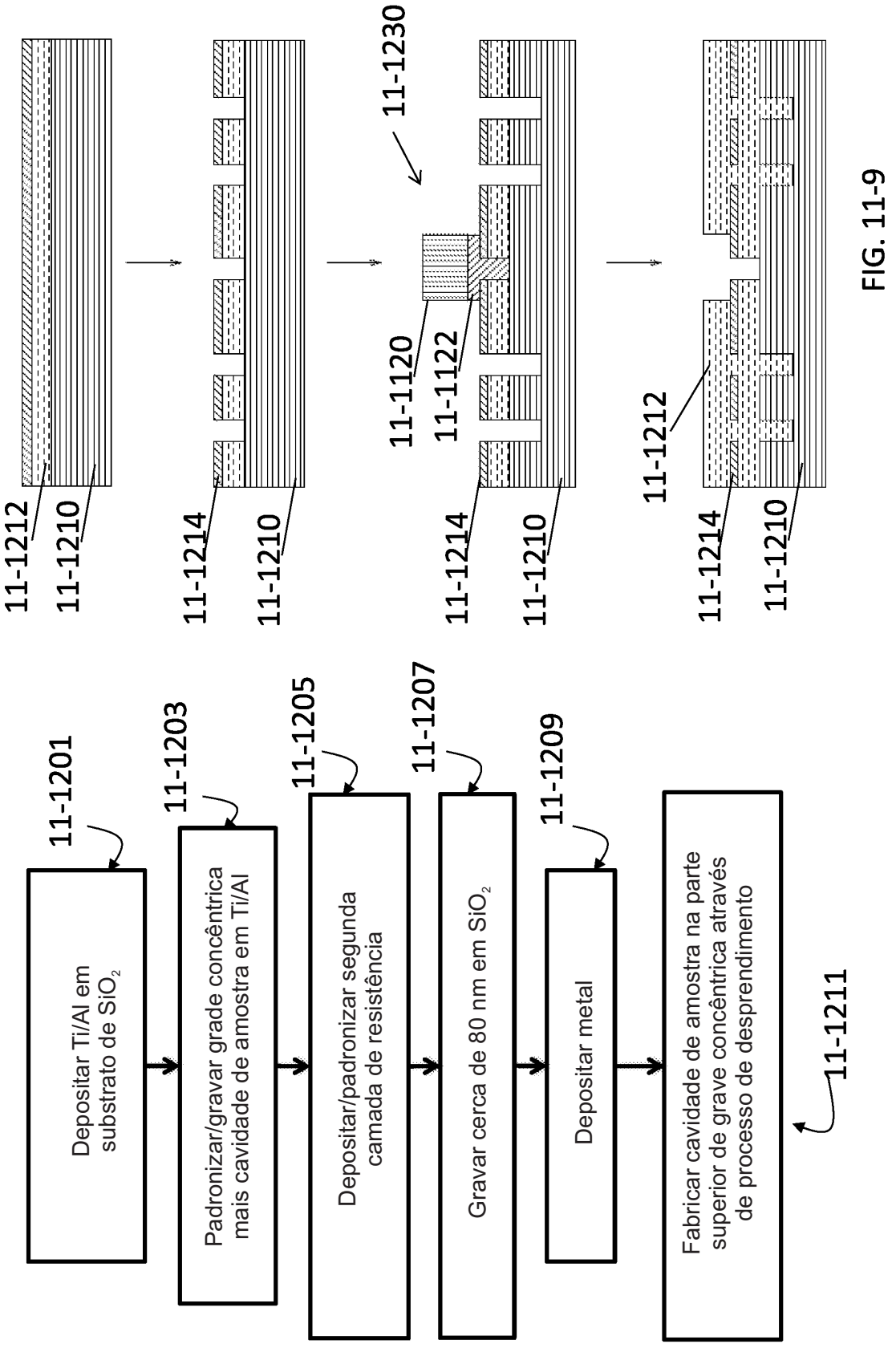
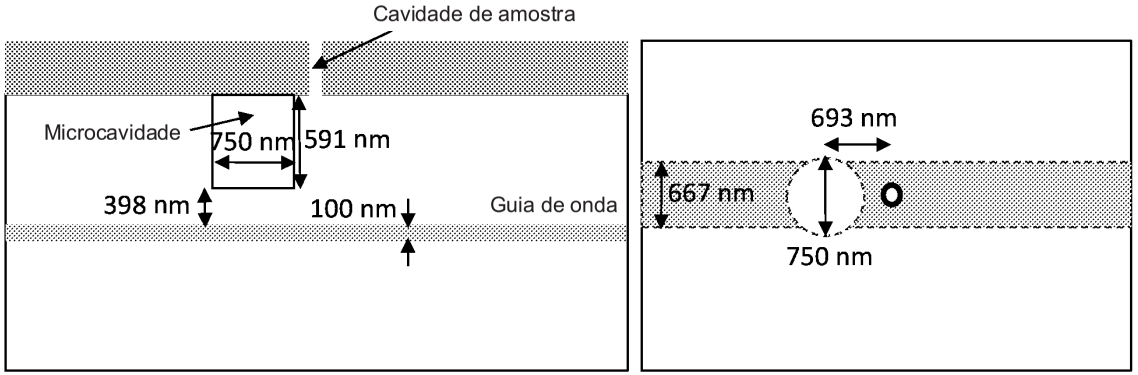
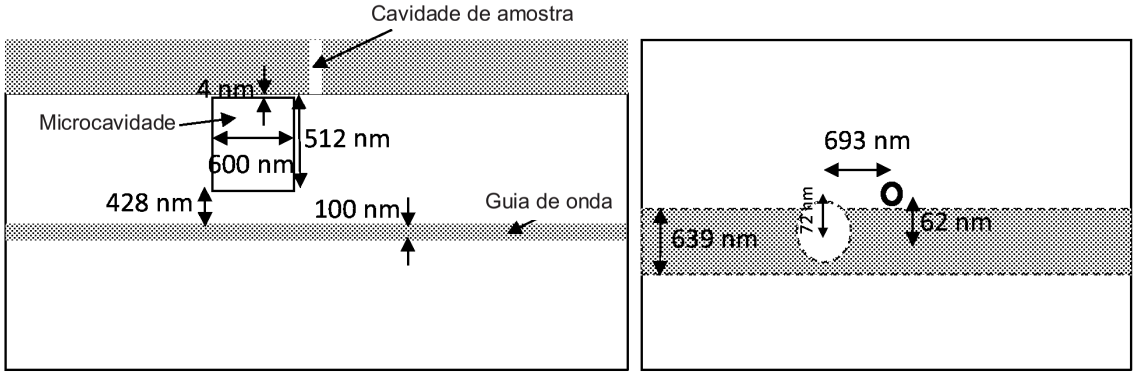

11-1201
Depositar Ti/Al em substrato de SiO_2
11-1203
Padronizar/gravar grade concêntrica mais cavidade de amostra em Ti/Al
11-1205
Depositar/padronizar segunda camada de resistência
11-1207
Gravar cerca de 80 nm em SiO_2
11-1209
Depositar metal
11-1211
Fabricar cavidade de amostra na parte superior de grave concêntrica através de processo de desprendimento
11-1212
11-1210
11-1214
11-1210
11-1230
11-1120
11-1122
11-1214
11-1210
11-1212
11-1214
11-1210

FIG. 11-9



Transmitido **/64-pixels**	**51%**
Metal / 21 µm de pixel	13.5%
Dielétrico	1.8e-3
Retorno	2.2e-4
Perda de radiação	6.9e-5
Total/21um-pixel	6.9e-4
Metal/64-pixels	0.28%
Intensidade normalizada	16%
Intensidade n/perda	0.763%
Área eficaz **(um^2)/p**	2.728
Densidade de pixel	85



Transmitido **/64-pixels**	**30%**
Metal / 21 µm de pixel	11.4%
Dielétrico	2.63e-3
Retorno	1.58e-4
Perda de radiação	3.62e-4
Total/21um-pixel	3.60e-3
Metal/64-pixels	0.67%
Intensidade normalizada	35%
Intensidade n/perda	1.19%
Área eficaz **(um^2)/p**	1.767
Densidade de pixel	26

FIG. 11-10

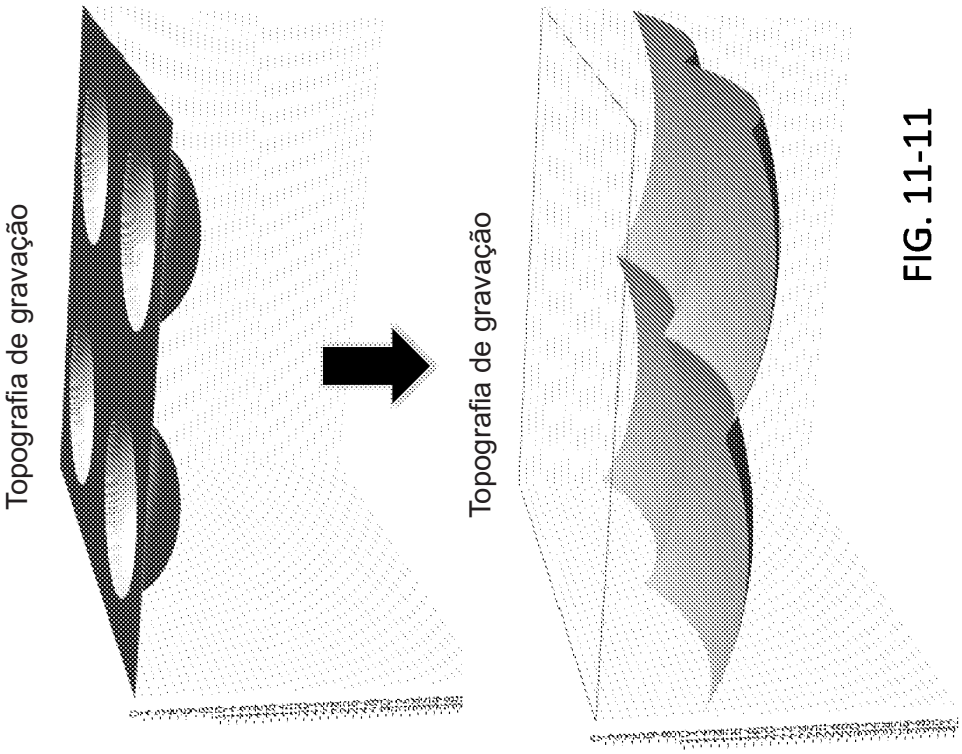
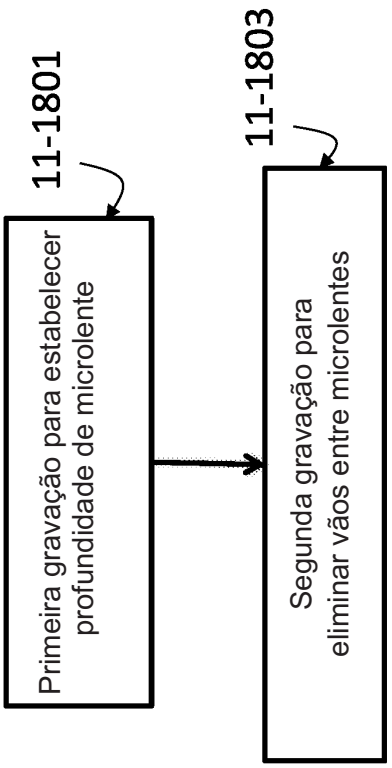

Topografia de gravação
Topografia de gravação

FIG. 11-11


11-1801
Primeira gravação para estabelecer profundidade de microlente
11-1803
Segunda gravação para eliminar vãos entre microlentes

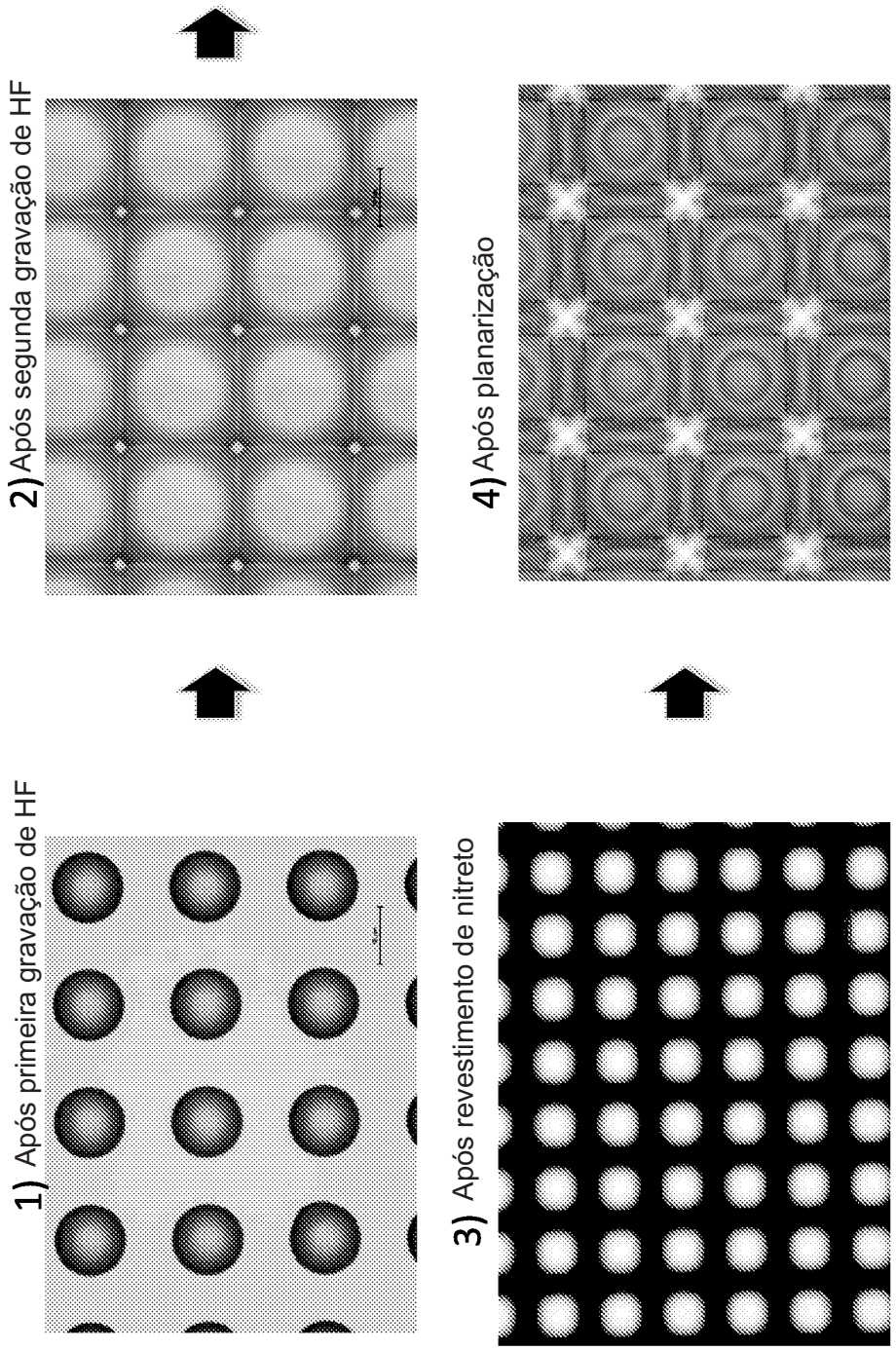

1) Após primeira gravação de HF
2) Após segunda gravação de HF
3) Após revestimento de nitreto
4) Após planarização

FIG. 11-12

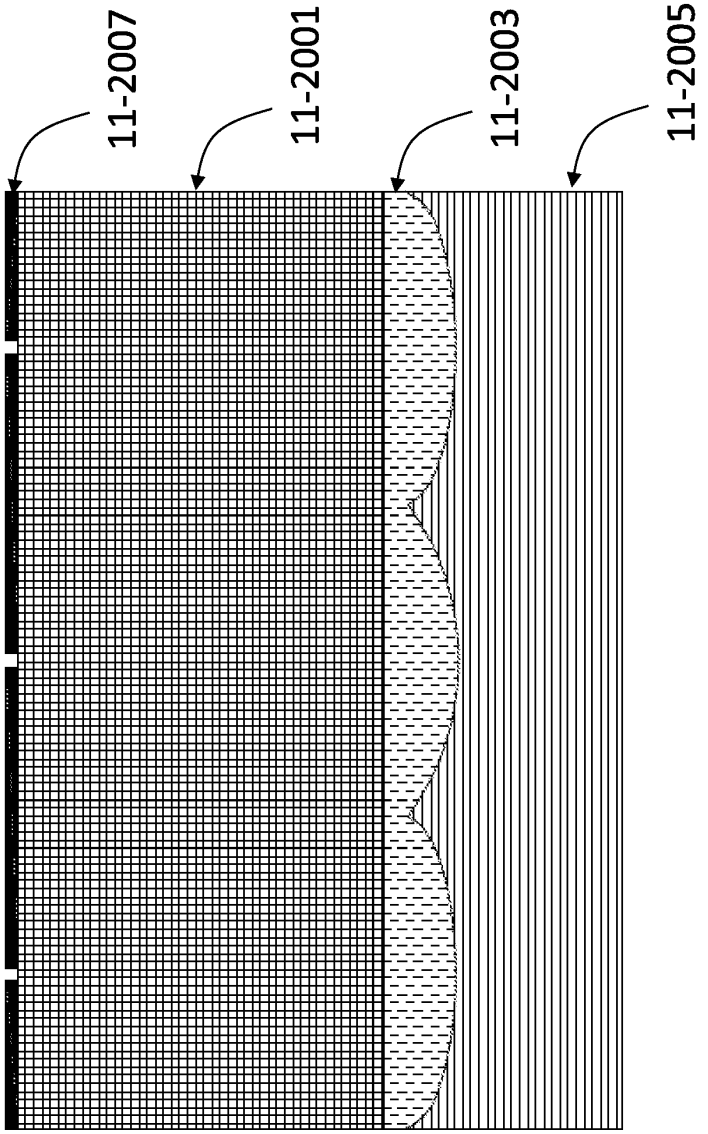


FIG. 11-13

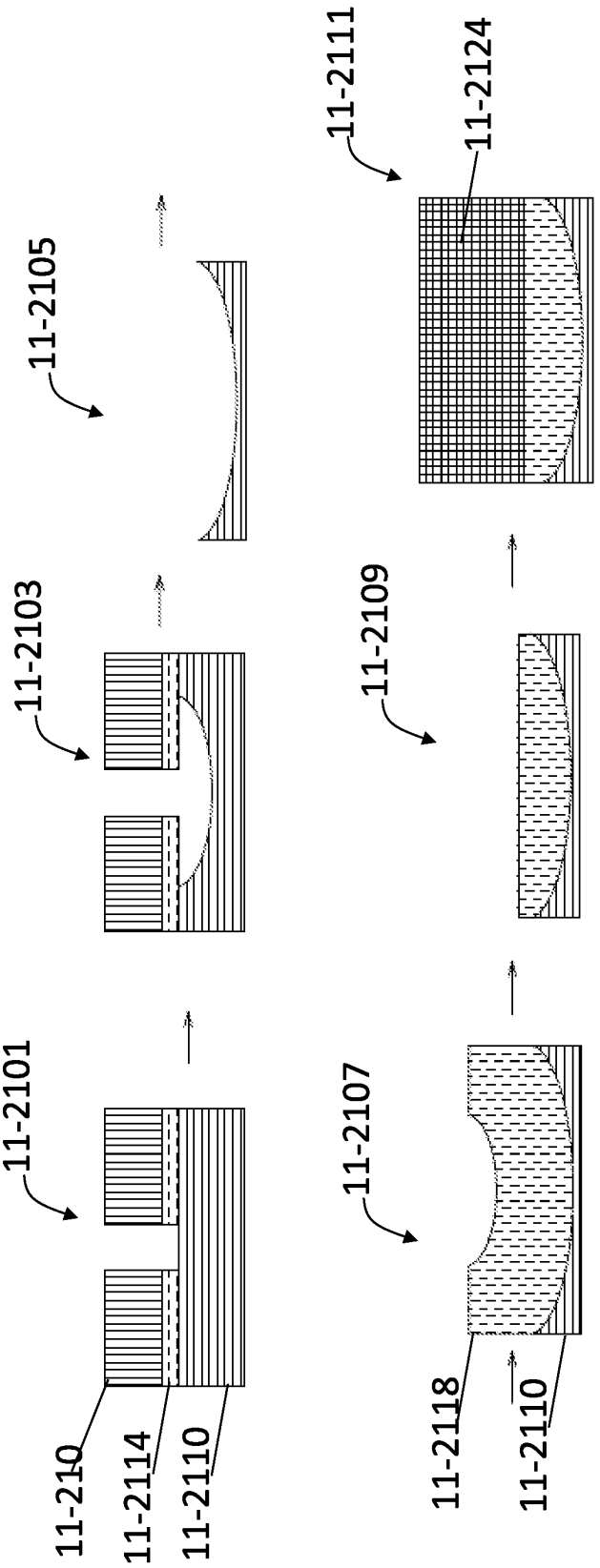
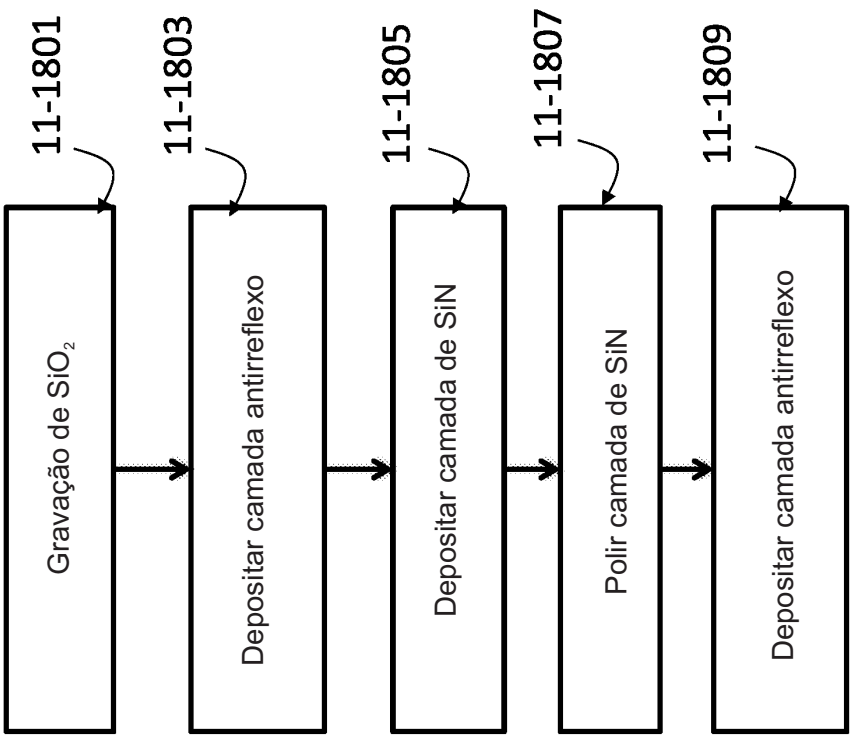

11-2101
11-2103
11-2105
11-2107
11-2109
11-2111
11-210
11-2114
11-2110
11-2118
11-2110
11-2124

FIG. 11-14


11-1801
Gravação de SiO_2
11-1803
Depositar camada antirreflexo
11-1805
Depositar camada de SiN
11-1807
Polir camada de SiN
11-1809
Depositar camada antirreflexo

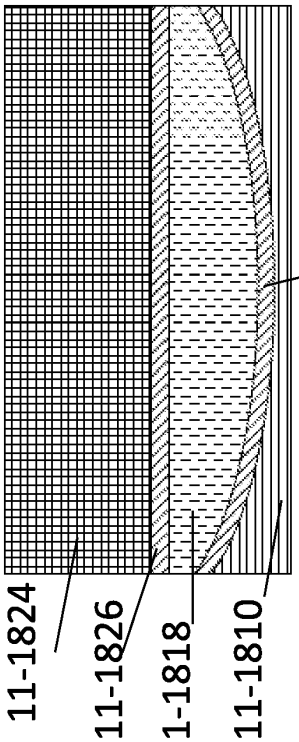

11-1822
11-1824
11-1826
11-1818
11-1810

FIG. 11-15

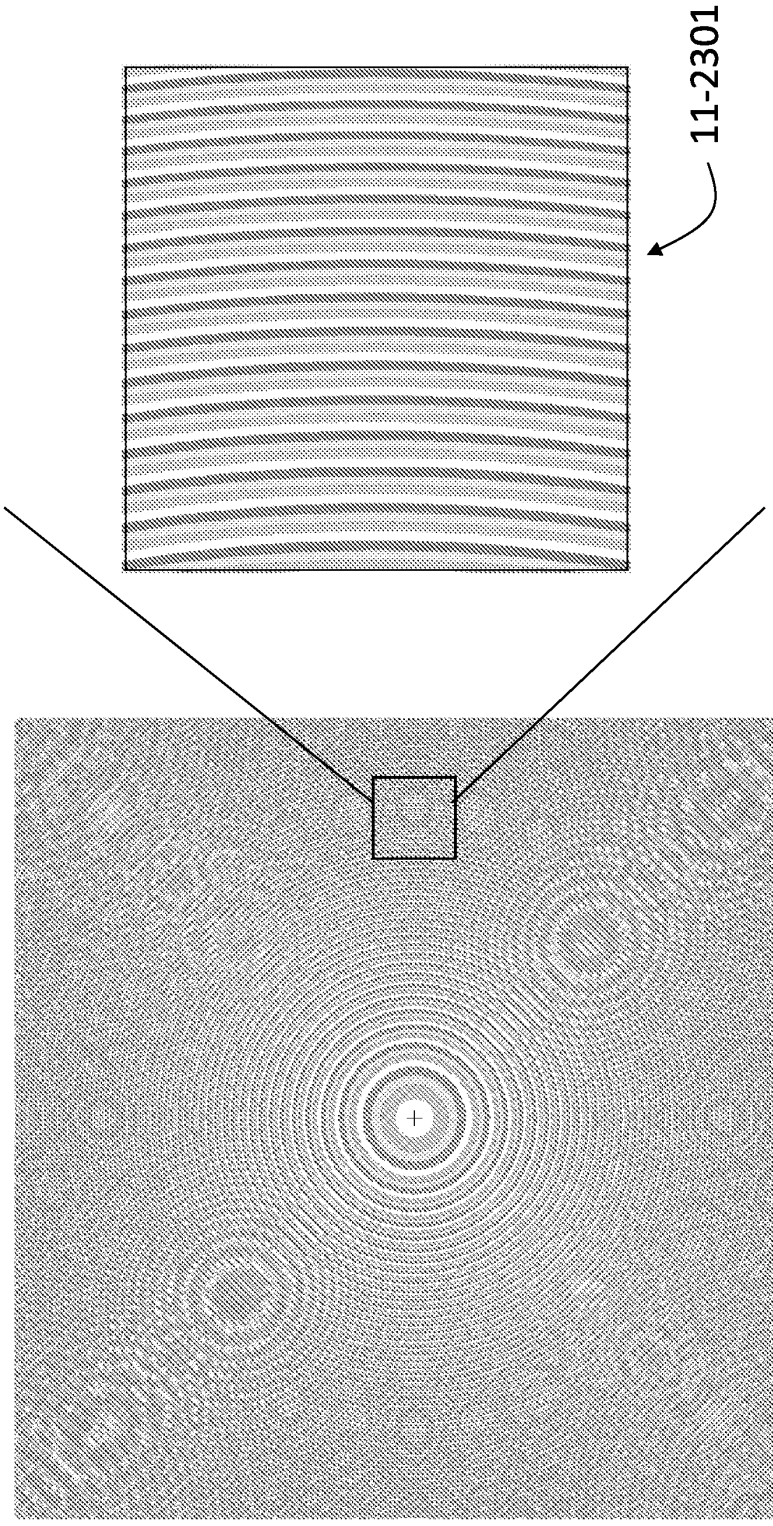


FIG. 11-16

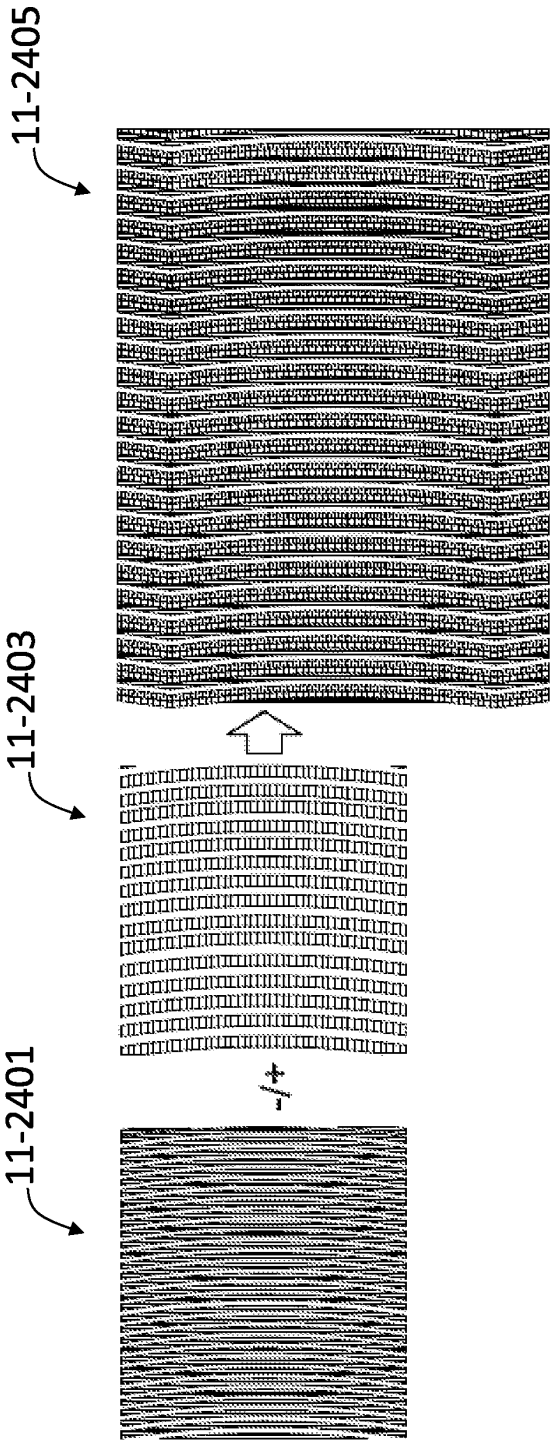


FIG. 11-17

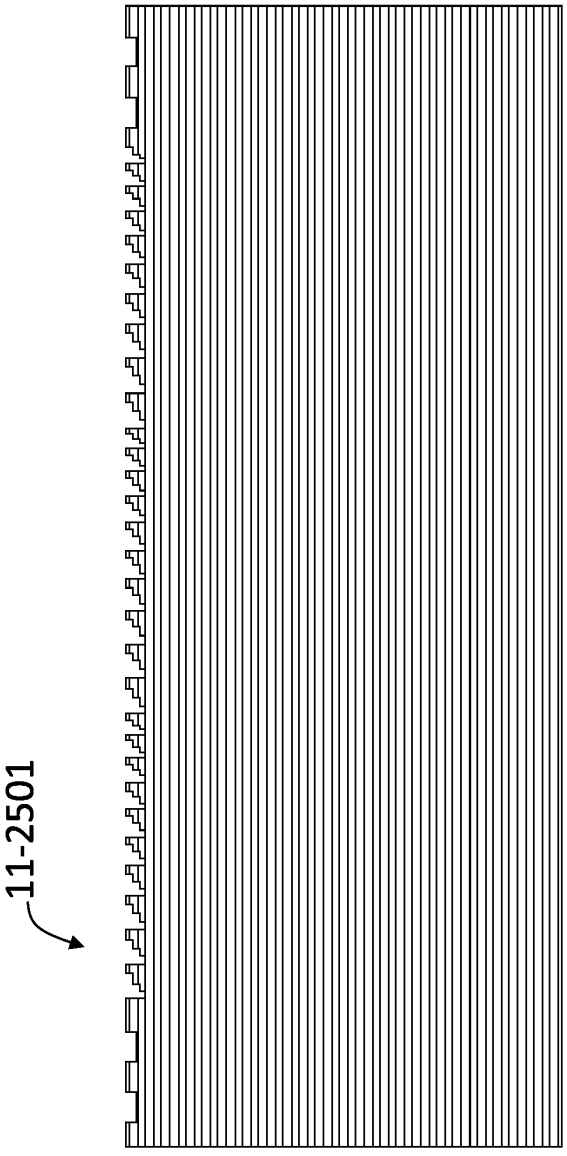


FIG. 11-18

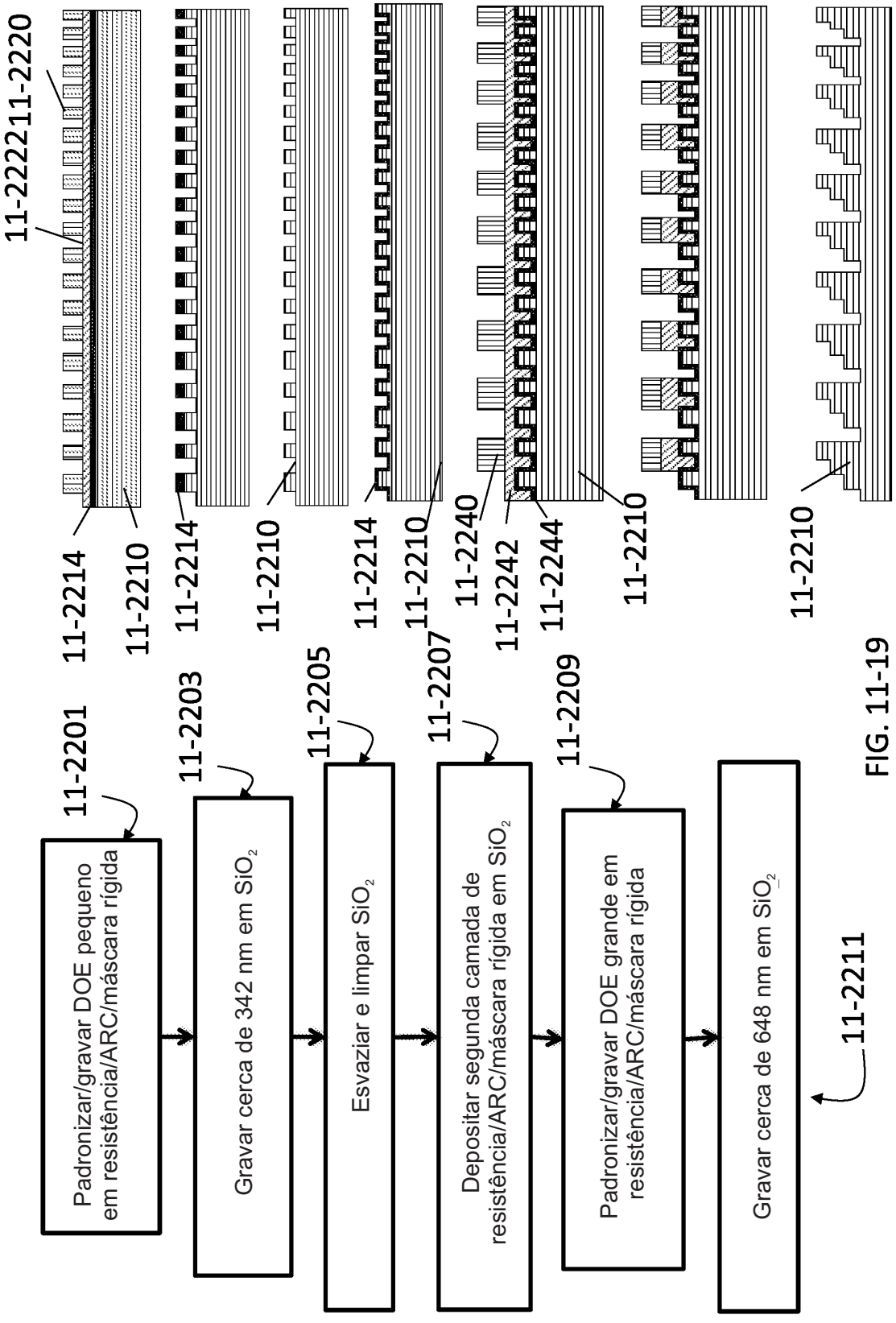

11-2201
Padronizar/gravar DOE pequeno em resistência/ARC/máscara rígida
11-2203
Gravar cerca de 342 nm em SiO_2
11-2205
Esvaziar e limpar SiO_2
11-2207
Depositar segunda camada de resistência/ARC/máscara rígida em SiO_2
11-2209
Padronizar/gravar DOE grande em resistência/ARC/máscara rígida
11-2211
Gravar cerca de 648 nm em SiO_2
11-2214
11-2210
11-2214
11-2210
11-2214
11-2210
11-2240
11-2242
11-2244
11-2210
11-2210
11-2220
11-2222

FIG. 11-19

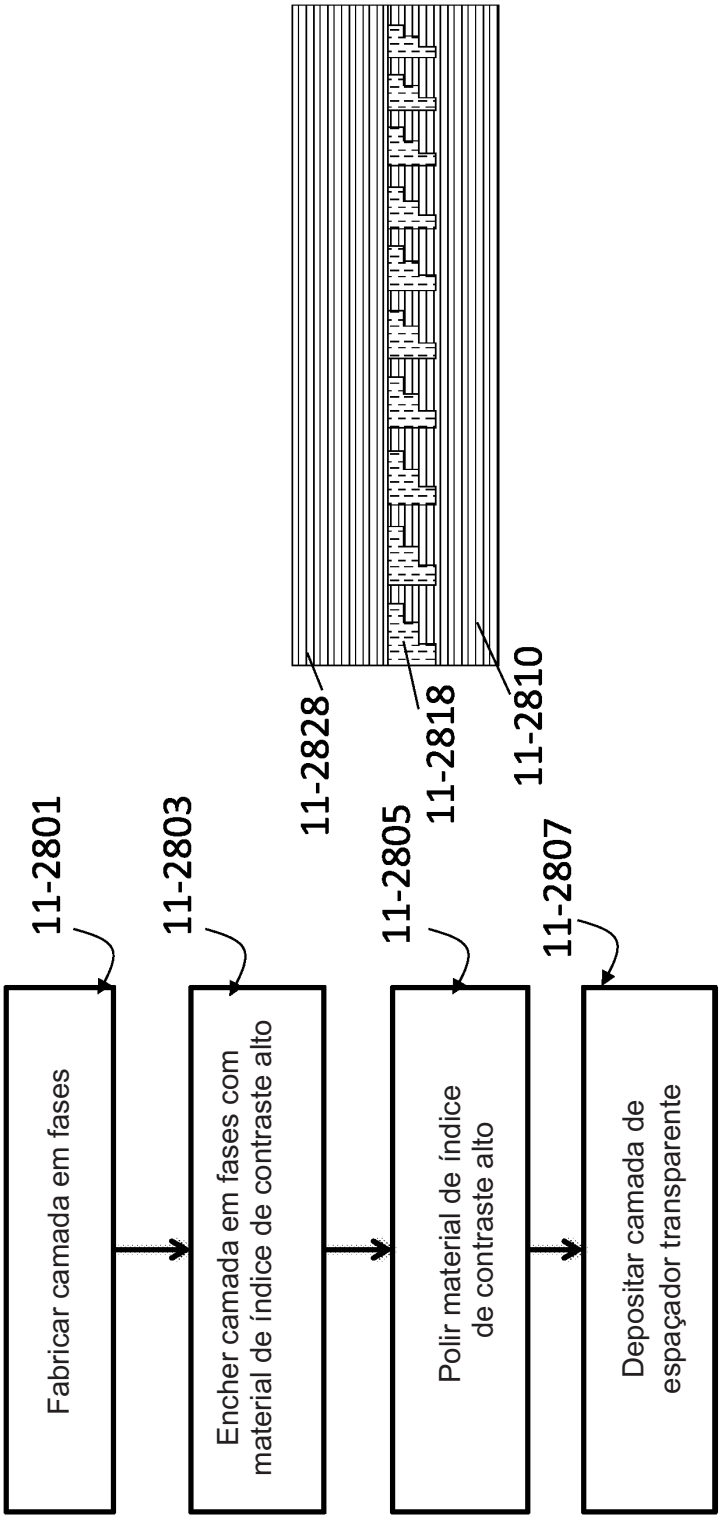

11-2801
Fabricar camada em fases
11-2803
Encher camada em fases com material de índice de contraste alto
11-2805
Polir material de índice de contraste alto
11-2807
Depositar camada de espaçador transparente
11-2828
11-2818
11-2810

FIG. 11-20

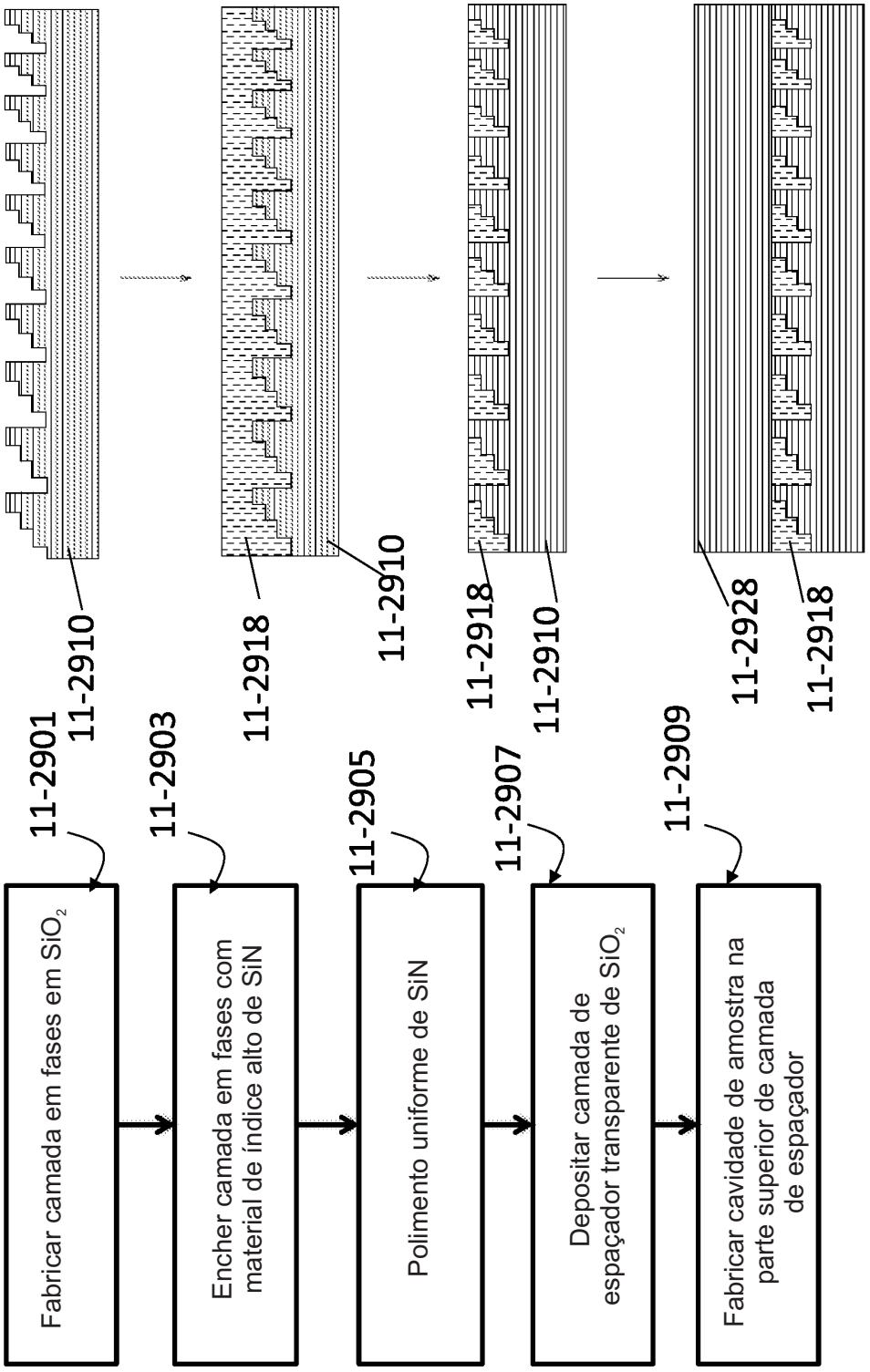
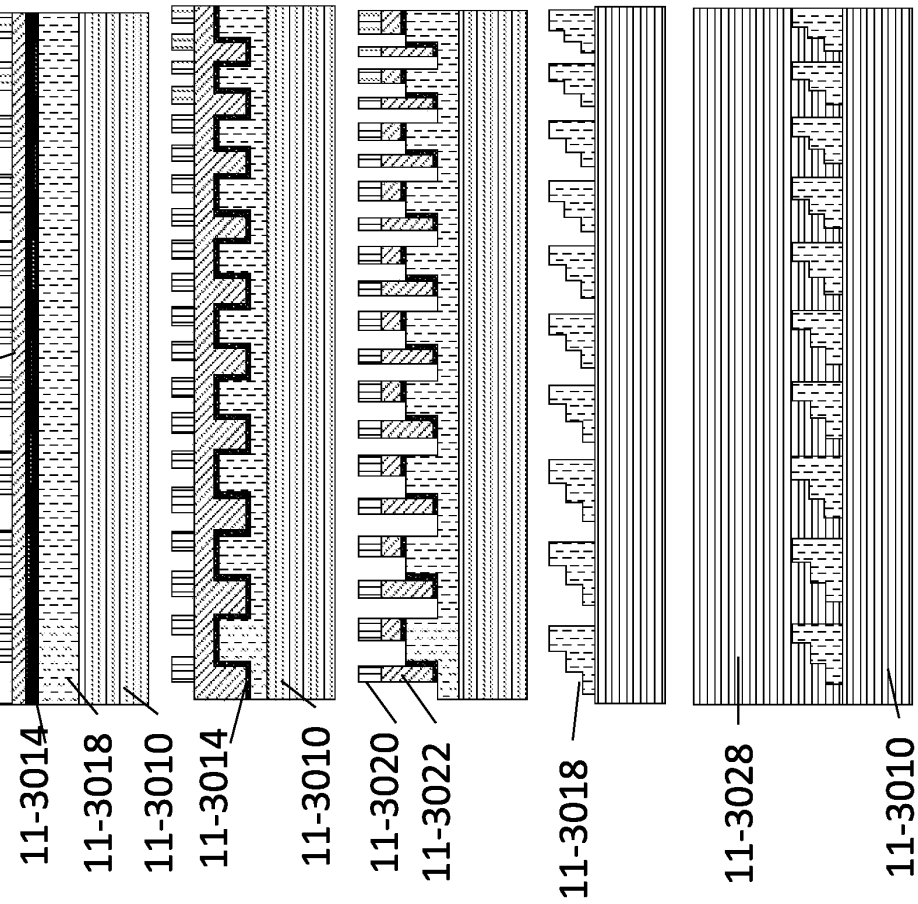

11-2901
11-2910
11-2903
11-2918
11-2905
11-2910
11-2907
11-2918
11-2909
11-2928
11-2918
Fabricar camada em fases em SiO_2
Encher camada em fases com material de índice alto de SiN
Polimento uniforme de SiN
Depositar camada de espaçador transparente de SiO_2
Fabricar cavidade de amostra na parte superior de camada de espaçador

FIG. 11-21


11-3022
11-3020
11-3014
11-3018
11-3010
11-3014
11-3010
11-3020
11-3022
11-3018
11-3028
11-3010

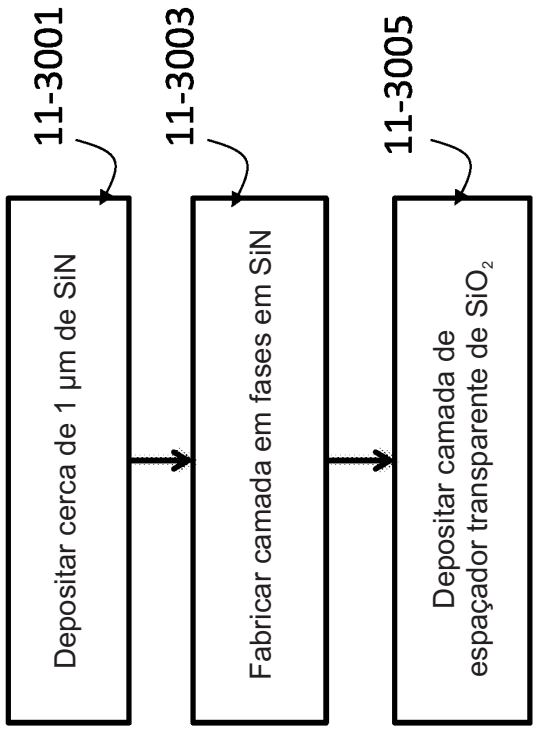

11-3001
Depositar cerca de 1 µm de SiN
11-3003
Fabricar camada em fases em SiN
11-3005
Depositar camada de espaçador transparente de SiO_2

FIG. 11-22