

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 923 759**

51 Int. Cl.:

G01N 27/414 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

H01L 29/78 (2006.01)

H01L 29/423 (2006.01)

H01L 27/088 (2006.01)

C12Q 1/6874 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2007** **E 17167536 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2022** **EP 3285067**

54 Título: **Aparato para medir analitos utilizando matrices de FET**

30 Prioridad:

14.12.2006 US 870073 P

10.07.2007 US 948748 P

16.08.2007 US 956324 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
30.09.2022

73 Titular/es:

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)

5823 Newton Drive

Carlsbad, CA 92008, US

72 Inventor/es:

ROTHBERG, JOHNATHAN M;

HINZ, WOLFGANG;

JOHNSON, KIM L y

BUSTILLO, JAMES

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 923 759 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aparato para medir analitos utilizando matrices de FET

5 Campo de la divulgación

La presente divulgación está dirigida en general a un aparato novedoso relacionado con la detección y medición de uno o más analitos a través de sensores electrónicos.

10 Antecedentes

Los dispositivos y componentes electrónicos han encontrado numerosas aplicaciones en química y biología (más generalmente, "ciencias de la vida"), especialmente para la detección y medición de diversos aspectos de las reacciones químicas y la composición de sustancias. Uno de estos dispositivos electrónicos se conoce como transistor de efecto de campo sensible a iones, a menudo denominado en la literatura relevante como ISFET (o pHFET). Los ISFET se han explorado convencionalmente, principalmente en la comunidad académica y de investigación, para facilitar la medición de la concentración de iones de hidrógeno de una solución (comúnmente denominada "pH").

20 Más específicamente, un ISFET es un dispositivo de transformación de impedancia que funciona de manera similar a un MOSFET (Transistor de Efecto de Campo de Semiconductor de Óxido de Metal), y está particularmente configurado para medir selectivamente la actividad iónica en una solución (por ejemplo, los iones de hidrógeno en la solución son el "analito"). Una teoría detallada del funcionamiento de un ISFET se proporciona en el documento "Thirty years of ISFETOLOGY: what happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years," de P. Bergveld, Sens. Actuators, 88 (2003), págs. 1-20.

La figura 1 ilustra una sección transversal de un ISFET 50 de tipo p (canal p) fabricado con un proceso CMOS (Semiconductor de Óxido de Metal Complementario) convencional. La fabricación de ISFET de tipo P se basa en un sustrato de silicio de tipo p 52, en el que se forma un pocillo de tipo n 54 que forma un "cuerpo" de transistor. Las regiones S y D de tipo p (p+) altamente dopadas, que constituyen una fuente 56 y un drenaje 58 del ISFET, se forman dentro del pocillo de tipo n 54. Una región B de tipo n (n+) altamente dopada también se forma dentro del pocillo de tipo n para proporcionar una conexión de cuerpo conductor (o "en masa") 62 al pocillo de tipo n. Una capa de óxido 65 está dispuesta por encima de las regiones de conexión de fuente, drenaje y cuerpo, a través de las cuales se hacen aberturas para proporcionar conexiones eléctricas (a través de conductores eléctricos) a estas regiones; por ejemplo, el contacto metálico 66 sirve como conductor para proporcionar una conexión eléctrica al drenaje 58, y el contacto metálico 68 sirve como conductor para proporcionar una conexión común a la fuente 56 y al pocillo tipo n 54, a través de la conexión del cuerpo altamente conductivo 62. Se forma una puerta de polisilicio 64 sobre la capa de óxido en una ubicación sobre una región 60 del pocillo tipo n 54, entre la fuente 56 y el drenaje 58. Debido a que está dispuesta entre la puerta de polisilicio 64 y el cuerpo del transistor (es decir, el pocillo de tipo n), la capa de óxido 65 a menudo se denomina "óxido de puerta".

Al igual que un MOSFET, el funcionamiento de un ISFET se basa en la modulación de la concentración de carga provocada por una capacitancia MOS (Metal-Óxido-Semiconductor) constituida por la puerta de polisilicio 64, el óxido de puerta 65 y la región 60 del pocillo tipo n 54 entre la fuente y el drenaje. Cuando se aplica una tensión negativa a través de las regiones de puerta y fuente ($V_{GS} < 0$ Voltios), se crea un "canal p" 63 en la interfaz de la región 60 y el óxido de puerta 65 agotando esta área de electrones. Este canal p 63 se extiende entre la fuente y el drenaje, y la corriente eléctrica se conduce a través del canal p cuando el potencial puerta-fuente V_{GS} es lo suficientemente negativo como para atraer agujeros desde la fuente al canal. El potencial puerta-fuente en el que el canal 63 comienza a conducir corriente se denomina tensión de umbral V_{TH} del transistor (el transistor conduce cuando V_{GS} tiene un valor absoluto mayor que la tensión umbral V_{TH}). La fuente se denomina así porque es la fuente de los portadores de carga (agujeros para un canal p) que fluyen a través del canal 63; del mismo modo, el drenaje es donde los portadores de carga salen del canal 63.

55 En el ISFET 50 de la Figura 1, el pocillo de tipo n 54 (cuerpo del transistor), a través de la conexión del cuerpo 62, está forzado a polarizarse al mismo potencial que la fuente 56 (es decir, $V_{SB} = 0$ voltios), como visto por el contacto de metal 68 conectado tanto a la fuente 56 como a la conexión del cuerpo 62. Esta conexión evita la polarización directa de la región fuente p+ y el pocillo de tipo n, y por lo tanto facilita el confinamiento de los portadores de carga al área de la región 60 en la que se puede formar el canal 63. Cualquier diferencia de potencial entre la fuente 56 y el cuerpo/pocillo tipo n 54 (una tensión V_{SB} de fuente a cuerpo distinto de cero) afecta la tensión umbral V_{TH} del ISFET de acuerdo con una relación no lineal, y comúnmente se denomina como el "efecto de cuerpo", que en muchas aplicaciones es indeseable.

65 Como también se muestra en la Figura 1, la puerta de polisilicio 64 del ISFET 50 está acoplada a múltiples capas metálicas dispuestas dentro de una o más capas de óxido adicionales 75 dispuestas sobre el óxido de puerta 65 para formar una estructura de "puerta flotante" 70. La estructura de puerta flotante se llama así porque está aislada

eléctricamente de otros conductores asociados con el ISFET; es decir, está intercalado entre el óxido de puerta 65 y una capa de pasivación 72. En el ISFET 50, la capa de pasivación 72 constituye una membrana sensible a los iones que da lugar a la sensibilidad a los iones del dispositivo; es decir, la presencia de iones en una "solución de analito" 74 (una solución que contiene iones de interés) en contacto con la capa de pasivación 72, particularmente en un área sensible 78 por encima de la estructura de puerta flotante 70, altera las características eléctricas del ISFET para modular una corriente que fluye a través del canal p 63 entre la fuente 56 y el drenaje 58. La capa de pasivación 72 puede comprender cualquiera de una variedad de materiales diferentes para facilitar la sensibilidad a iones particulares; por ejemplo, las capas de pasivación que comprenden nitruro de silicio u oxinitruro de silicio generalmente brindan sensibilidad a la concentración de iones de hidrógeno (pH) en la solución de analito 74, mientras que las capas de pasivación que comprenden cloruro de polivinilo que contiene valinomicina brindan sensibilidad a la concentración de iones de potasio en la solución de analito (se conocen materiales adecuados para las capas de pasivación y sensibles a otros iones como sodio, plata, hierro, bromo, yodo, calcio y nitrato, por ejemplo).

Con respecto a la sensibilidad de los iones, surge una diferencia de potencial eléctrico, comúnmente denominada "potencial de superficie", en la interfaz sólido/líquido de la capa de pasivación 72 y la solución de analito 74 en función de la concentración de iones en el área sensible 78 debido a una reacción química (por ejemplo, que típicamente implica la disociación de los grupos de superficie de óxido por los iones en la solución de analito en las proximidades del área sensible 78). Este potencial de superficie, a su vez, afecta la tensión umbral V_{TH} del ISFET; por lo tanto, es la tensión umbral V_{TH} del ISFET el que varía con los cambios en la concentración de iones en la solución de analito 74 en la proximidad del área sensible 78.

La Figura 2 ilustra una representación del circuito eléctrico del ISFET de canal p 50 que se muestra en la Figura 1. Con referencia nuevamente a la Figura 1, un electrodo de referencia 76 (un electrodo de Ag/AgCl convencional) en la solución de analito 74 determina el potencial eléctrico de la mayor parte de la propia solución de analito y es análogo al terminal de puerta de un MOSFET convencional, como se muestra en la Figura 2. En una región operativa lineal o no saturada del ISFET, la corriente de drenaje I_D se da como:

$$I_D = \beta (V_{GS} - V_{TH} - \frac{1}{2} V_{DS}) V_{DS}, \quad (1)$$

donde V_{DS} es la tensión entre el drenaje y la fuente, y β es un parámetro de transconductancia (en unidades de Amperios/Voltios²) dado por:

$$\beta = \mu C_{ox} \left(\frac{W}{L} \right), \quad (2)$$

donde μ representa la movilidad de la portadora, C_{ox} es la capacitancia de óxido de puerta por unidad de área, y la relación W/L es la relación de ancho a largo del canal 63. Si el electrodo de referencia 76 proporciona una referencia eléctrica o tierra ($V_G = 0$ Voltios), y la corriente de drenaje I_D y la tensión de drenaje a fuente V_{DS} se mantienen constantes, las variaciones de la tensión de la fuente V_S del ISFET directamente siguen las variaciones de la tensión umbral V_{TH} , de acuerdo con la Ec. (1); esto puede observarse reorganizando la Ec. (1) como:

$$V_S = -V_{TH} - \left(\frac{I_D}{\beta V_{DS}} + \frac{V_{DS}}{2} \right). \quad (3)$$

Dado que la tensión umbral V_{TH} del ISFET es sensible a la concentración de iones como se analizó anteriormente, de acuerdo con la Ec. (3) la tensión de la fuente V_S proporciona una señal que está directamente relacionada con la concentración de iones en la solución de analito 74 en la proximidad del área sensible 78 del ISFET. En los ISFET convencionales ilustrativos que emplean una capa de pasivación 72 de nitruro de silicio u oxinitruro de silicio para la sensibilidad al pH, las sensibilidades de tensión umbral ΔV_{TH} (es decir, se ha observado un cambio en la tensión umbral con el cambio en el pH de la solución de analito) de aproximadamente 30 mV/pH a 50 mV/pH (con una sensibilidad máxima teórica de 59,2 mV/pH a 298 grados Kelvin).

Los esfuerzos de investigación anteriores para fabricar ISFET para mediciones de pH basados en técnicas de procesamiento CMOS convencionales generalmente tenían como objetivo lograr una alta linealidad de la señal en un rango de pH de 1-14. Usando un umbral de sensibilidad ilustrativa de aproximadamente 50 mV/pH, y considerando la ecuación (3) anterior, esto requiere un rango operativo lineal de aproximadamente 700 mV para la tensión de la fuente V_S . Como se analizó anteriormente en relación con la Figura 1, la tensión umbral V_{TH} de los ISFET (así como los MOSFET) se ve afectada por cualquier tensión V_{SB} entre la fuente y el cuerpo (pocillo de tipo n 54). Más específicamente, la tensión umbral V_{TH} es una función no lineal de una tensión V_{SB} de fuente a cuerpo distinta de cero. En consecuencia, para evitar comprometer la linealidad debido a una diferencia entre los potenciales de tensión de la fuente y del cuerpo (es decir, para mitigar el "efecto del cuerpo"), como se muestra en la Figura 1, la fuente 56 y la conexión del cuerpo 62 del ISFET 50 a menudo se acoplan a un potencial común a través

del contacto metálico 68. Este acoplamiento cuerpo-fuente también se muestra en la representación del circuito eléctrico del ISFET 50 que se muestra en la Figura 2.

Los esfuerzos anteriores para fabricar matrices bidimensionales de ISFET basados en el diseño ISFET de la figura 1 dieron como resultado un máximo de 256 elementos sensores ISFET, o "píxeles", en una matriz (es decir, una matriz de 16 píxeles por 16 píxeles). Investigaciones ilustrativas de la fabricación de matrices ISFET se informan en las publicaciones "A large transistor-based sensor array chip for direct extracellular imaging," de M.J. Milgrew, M.O. Riehle, y D.R.S. Cumming, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 111-112, (2005), pág. 347-353, y "The development of scalable sensor arrays using standard CMOS technology," MJ. Milgrew, P. A. Hammond, y D.R.S. Cumming, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 103, (2004), pág. 37-42, cuyas publicaciones se denominan colectivamente en lo sucesivo como "Milgrew y otros". Otros esfuerzos de investigación relacionados con la realización de matrices de ISFET se informan en las publicaciones "A very large integrated pH-ISFET sensor array chip compatible with standard CMOS processes," T. C. W. Yeow, M. R. Haskard, D. E.

Mulcahy, H. I. Seo y D. H. Kwon, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 44, (1997), pág. 434-440 y "Fabrication of a two-dimensional pH image sensor using a charge transfer technique," Hizawa, T., Sawada, K., Takao, H., Ishida, M., *Sensors and Actuators, B: Chemical* 117 (2), 2006, pág. 509-515.

La Figura 3 ilustra una columna 85_j de una matriz de ISFET bidimensional según el diseño de Milgrew y otros. La columna 85_j incluye dieciséis (16) píxeles 80_1 a 80_{16} y, como se analiza más adelante en relación con la Figura 7, una matriz bidimensional completa incluye dieciséis (16) de tales columnas 85_j ($j = 1, 2, 3, \dots, 16$) dispuestas una al lado de la otra. Como se muestra en la Figura 3, una columna dada 85_j incluye una fuente de corriente $I_{FUENTEj}$ que es compartida por todos los píxeles de la columna, y un circuito de polarización/lectura ISFET 82_j (incluido el sumidero de corriente $I_{SUMIDEROj}$) que también es compartido por todos los píxeles de la columna. Cada píxel 80_1 a 80_{16} de ISFET incluye un ISFET de canal p 50 que tiene una fuente y un cuerpo acoplados eléctricamente (como se muestra en las Figuras 1 y 2), más dos conmutadores S1 y S2 que responden a una de dieciséis señales de selección de fila ($RSEL_1$ a $RSEL_{16}$, y sus complementos). Como se analiza a continuación en relación con la Figura 7, una señal de selección de fila y su complemento se generan simultáneamente para "habilitar" o seleccionar un píxel dado de la columna 85_j , y dichos pares de señales se generan en alguna secuencia para habilitar sucesivamente diferentes píxeles de la columna de una en una.

Como se muestra en la Figura 3, el conmutador S2 de cada píxel 80 en el diseño de Milgrew y otros se implementa como un MOSFET de canal n convencional que acopla la fuente de corriente $I_{FUENTEj}$ a la fuente del ISFET 50 al recibir la señal de selección de fila correspondiente. El conmutador S1 de cada píxel 80 se implementa como una puerta de transmisión, es decir, un par CMOS que incluye un MOSFET de canal n y un MOSFET de canal p, que acopla la fuente del ISFET 50 al circuito de polarización/lectura 82_j al recibir la señal de selección de fila correspondiente y su complemento. En la Figura 4 se muestra un ejemplo del conmutador $S1_1$ del píxel 80_1 , en el que el MOSFET de canal p de la puerta de transmisión se indica como $S1_{1P}$ y el MOSFET de canal n se indica como $S1_{1N}$. En el diseño de Milgrew y otros, se emplea una puerta de transmisión para el conmutador S1 de cada píxel de modo que, para un píxel habilitado, cualquier tensión de fuente ISFET dentro del rango de suministro de potencia V_{DD} a V_{SS} puede aplicarse al circuito de polarización/lectura 82_j y ser emitida por la columna como la señal V_{Sj} . De lo anterior, debe apreciarse que cada píxel 80 en el diseño de matriz de sensores ISFET de Milgrew y otros incluye cuatro transistores, es decir, un ISFET de canal p, una puerta de transmisión de par CMOS que incluye un MOSFET de canal n y un MOSFET de canal p para el conmutador S1, y un MOSFET de canal n para el conmutador S2.

Como también se muestra en la Figura 3, el circuito de polarización/lectura 82_j emplea una configuración de seguidor de fuente-drenaje en forma de puente Kelvin para mantener una tensión de drenaje-fuente constante V_{DSj} y aislar la medición de la tensión de la fuente V_{Sj} de la corriente de drenaje constante $I_{FUENTEj}$ para el ISFET de un píxel habilitado en la columna 85_j . Con este fin, el circuito de polarización/lectura 82_j incluye dos amplificadores operacionales A1 y A2, un sumidero de corriente $I_{SUMIDEROj}$ y una resistencia R_{SDj} . La tensión desarrollada a través de la resistencia R_{SDj} debido a la corriente $I_{SUMIDEROj}$ que fluye a través de la resistencia es forzada por los amplificadores operacionales a aparecer a través del drenaje y la fuente del ISFET de un píxel habilitado como una tensión de drenaje-fuente constante V_{DSj} . Por lo tanto, con referencia nuevamente a la Ec. (3), debido a la constante V_{DSj} y la constante $I_{FUENTEj}$, la tensión de la fuente V_{Sj} del ISFET del píxel habilitado proporciona una señal correspondiente a la tensión umbral de los ISFET V_{Th} , y por lo tanto una medición de pH en la proximidad del área sensible de los ISFET (ver Figura 1). El amplio rango dinámico para la tensión de la fuente V_{Sj} proporcionada por la puerta de transmisión S1 asegura que se pueda medir un rango completo de valores de pH de 1 a 14, y la conexión fuente-cuerpo de cada ISFET asegura suficiente linealidad del umbral de tensión de los ISFET sobre el rango completo de medición de pH.

En el diseño de columna de Milgrew y otros como se muestra en la Figura 3, debe apreciarse que para que la configuración de puente Kelvin del circuito de polarización/lectura de columna 82_j funcione correctamente, se debe emplear un ISFET de canal p 50 como se muestra en la Figura 1 en cada píxel; más específicamente, una implementación alternativa basada en la configuración del puente de Kelvin no es posible utilizando un ISFET de canal n. Con referencia nuevamente a la Figura 1, para un ISFET de canal n basado en un proceso CMOS convencional, no se requeriría el pocillo de tipo n 54, y las regiones de tipo n altamente dopadas para el drenaje y la

fente se formarían directamente en el sustrato de silicio tipo p 52 (que constituiría el cuerpo del transistor). Para los dispositivos FET de canal n, el cuerpo del transistor típicamente está acoplado a tierra eléctrica. Dado el requisito de que la fuente y el cuerpo de un ISFET en el diseño de Milgrew y otros están acoplados eléctricamente para mitigar el rendimiento no lineal debido al efecto del cuerpo, esto daría como resultado que la fuente de un ISFET de canal n también esté conectada a tierra eléctrica (es decir, $V_S = V_B = 0$ Voltios), lo que impide cualquier salida útil señal de un píxel habilitado. En consecuencia, el diseño de columna de Milgrew y otros que se muestra en la Figura 3 requiere ISFET de canal p para un funcionamiento adecuado.

También debe apreciarse que en el diseño de la columna de Milgrew y otros que se muestra en la Figura 3, los dos MOSFET de canal n necesarios para implementar los conmutadores S1 y S2 en cada píxel no se pueden formar en el pocillo 54 de tipo n que se muestra en la Figura 1, en el que se forma el ISFET de canal p para el píxel; más bien, los MOSFET de canal n se forman directamente en el sustrato de silicio de tipo p 52, más allá de los límites del pocillo de tipo n 54 para el ISFET. La Figura 5 es un diagrama similar a la Figura 1, que ilustra una sección transversal más ancha de una porción del sustrato de silicio de tipo p 52 correspondiente a un píxel 80 de la columna 85, que se muestra en la Figura 3, en la que el pocillo tipo n 54 que contiene el drenaje 58, la fuente 56 y la conexión del cuerpo 62 del ISFET 50 se muestra junto con un primer MOSFET de canal n correspondiente al conmutador S2 y un segundo MOSFET de canal n S1_{1N} que constituye uno de los dos transistores de la puerta de transmisión S1₁ mostrado en la Figura 4.

Además, en el diseño de Milgrew y otros, el MOSFET de canal p requerido para implementar la puerta de transmisión S1 en cada píxel (por ejemplo, vea S1_{1P} en la Figura 4) no se puede formar en el mismo pocillo de tipo n en el que se forma el ISFET de canal p 50 para el píxel. En particular, debido a que el cuerpo y la fuente del ISFET de canal p están acoplados eléctricamente entre sí, implementar el MOSFET S1_{1P} de canal p en el mismo pocillo n que el ISFET de canal p 50 conduciría a un funcionamiento impredecible de la puerta de transmisión, o impide el funcionamiento por completo. En consecuencia, se requieren dos pocillos de tipo n separados para implementar cada píxel en el diseño de Milgrew y otros. La Figura 6 es un diagrama similar a la Figura 5, que muestra una sección transversal de otra porción del sustrato de silicio de tipo p 52 correspondiente a un píxel 80, en el que el pocillo de tipo n 54 correspondiente al ISFET 50 se muestra junto a un segundo pocillo de tipo n 55 en el que se forma el MOSFET S1_{1P} de canal p que constituye uno de los dos transistores de la puerta de transmisión S1₁ que se muestra en la Figura 4. Debe apreciarse que los dibujos de las Figuras 5 y 6 no están a escala y es posible que no representen exactamente la disposición real de un píxel en particular en el diseño de Milgrew y otros; más bien, estas figuras son de naturaleza conceptual y se proporcionan principalmente para ilustrar los requisitos de múltiples pocillos n y MOSFET de canal n separados fabricados fuera de los pocillos n, en el diseño de Milgrew y otros.

El diseño de matriz de Milgrew y otros se implementó utilizando un proceso de fabricación CMOS convencional de 0,35 micrómetros (μm). En este proceso, varias reglas de diseño dictan distancias mínimas de separación entre características. Por ejemplo, de acuerdo con las reglas de diseño de CMOS de 0,35 μm , con referencia a la Figura 6, una distancia "a" entre n pocillos vecinos debe ser de al menos tres (3) micrómetros. También se indica una distancia "a/2" en la Figura 6 a la izquierda del pocillo n 54 y a la derecha del pocillo n 55 para indicar la distancia mínima requerida para separar el píxel 80 que se muestra en la Figura 6 de píxeles vecinos en otras columnas a la izquierda y derecha, respectivamente. Además, de acuerdo con las reglas de diseño CMOS de 0,35 μm , una distancia "b" que se muestra en la Figura 6 que representa el ancho de sección transversal del pocillo tipo n 54 y una distancia "c" que representa el ancho de sección transversal del pocillo tipo n 55 son cada uno del orden de aproximadamente 3 μm a 4 μm (dentro del pocillo tipo n, se hace una asignación de 1,2 μm entre el borde del pocillo n y cada uno de la fuente y el drenaje, y la fuente y el drenaje tienen un ancho del orden de 0,7 μm). En consecuencia, la distancia total "d" mostrada en la Figura 6 que representa el ancho del píxel 80 en sección transversal es del orden de aproximadamente 12 μm a 14 μm . En una implementación, Milgrew y otros informa de una matriz basada en el diseño de columna/píxel que se muestra en la Figura 3 que comprende píxeles geoméricamente cuadrados, cada uno de los cuales tiene una dimensión de 12,8 μm por 12,8 μm .

En resumen, el diseño de píxeles ISFET de Milgrew y otros tiene como objetivo garantizar mediciones precisas de la concentración de iones de hidrógeno en un rango de pH de 1-14. Para garantizar la linealidad de la medición, la fuente y el cuerpo del ISFET de cada píxel están acoplados eléctricamente. Para garantizar una gama completa de mediciones de pH, se emplea una puerta de transmisión S1 en cada píxel para transmitir la tensión de la fuente de un píxel habilitado. Por lo tanto, cada píxel de la matriz de Milgrew requiere cuatro transistores (ISFET de canal p, MOSFET de canal p y dos MOSFET de canal n) y dos pocillos n separados (Figura 6). Basado en un proceso de fabricación de CMOS convencional de 0,35 micrómetros y las reglas de diseño correspondientes, los píxeles de dicha matriz tienen un tamaño mínimo apreciablemente superior a 10 μm , es decir, del orden de aproximadamente 12 μm a 14 μm .

La Figura 7 ilustra una matriz de píxeles bidimensional completa 95 según el diseño de Milgrew y otros, junto con el circuito decodificador de filas y columnas adjunto y el circuito de lectura de mediciones. La matriz 95 incluye dieciséis columnas 85₁ a 85₁₆ de píxeles, cada columna tiene dieciséis píxeles como se explicó anteriormente en relación con la Figura 3 (es decir, una matriz de 16 píxeles por 16 píxeles). Un decodificador de fila 92 proporciona dieciséis pares de señales de selección de fila complementarias, en donde cada par de señales de selección de fila habilita simultáneamente un píxel en cada columna 85₁ a 85₁₆ para proporcionar un conjunto de señales de salida de

columna de la matriz 95 en función de las tensiones de fuente respectivos V_{S1} a V_{S16} de la fila habilitada de los ISFET. El decodificador de filas 92 se implementa como un decodificador convencional de cuatro a dieciséis (es decir, una entrada binaria de cuatro bits FILA] - FILA4 para seleccionar una de 2^4 salidas). El conjunto de señales de salida de columna V_{S1} a V_{S16} para una fila habilitada de la matriz se aplica a la lógica de conmutación 96, que incluye dieciséis puertas de transmisión S_1 a S_{16} (una puerta de transmisión para cada señal de salida). Como antes, cada puerta de transmisión de la lógica de conmutación 96 se implementa utilizando un MOSFET de canal p y un MOSFET de canal n para garantizar un rango dinámico suficiente para cada una de las señales de salida V_{S1} a V_{S16} - El decodificador de columna 94, como el decodificador de filas 92, se implementa como un decodificador convencional de cuatro a dieciséis y se controla a través de la entrada binaria de cuatro bits COL_1 - COL_4 para habilitar una de las puertas de transmisión S_1 a S_{16} de la lógica de conmutación 96 en cualquier momento dado, para proporcionar una única señal de salida V_S desde la lógica de conmutación 96. Esta señal de salida V_S se aplica a un convertidor de analógico a digital (ADC) 98 de 10 bits para proporcionar una representación digital D_1 - D_{10} de la señal de salida V_S correspondiente a un píxel dado de la matriz.

Como se señaló anteriormente, los ISFET individuales y las matrices de ISFET similares a los analizados anteriormente se han empleado como dispositivos de detección en una variedad de aplicaciones relacionadas con la química y la biología. En particular, los ISFET se han empleado como sensores de pH en varios procesos que involucran ácidos nucleicos como el ADN. En las siguientes publicaciones se dan algunos ejemplos del empleo de ISFET en varias aplicaciones relacionadas con las ciencias de la vida:

Massimo Barbaro, Annalisa Bonfiglio, Luigi Raffo, Andrea Alessandrini, Paolo Facci e Imrich Barak, "Fully electronic DNA hybridization detection by a standard CMOS biochip," *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volumen 118, Issues 1-2, 2006, pág. 41-46; Toshinari Sakurai and Yuzuru Husimi, "Realtime monitoring of DNA polymerase reactions by a micro ISFET pH sensor," *Anal. Chem.*, 64(M), 1992, pág. 1996 - 1997; S. Purushothaman, C. Toumazou, J. Georgiou, "Towards fast solid state DNA sequencing," *Circuits and Systems*, vol.4, 2002, pág. IV-169 a IV-172; S. Purushothaman, C. Toumazou, CP. Ou, "Protons and single nucleotide polymorphism detection: A simple use for the Ion Sensitive Field Effect Transistor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 114, núm. 2, 2006, pág. 964-968; A.L. Simonian, A. W. Flounders, J.R. Wild, "FET-Based Biosensors for The Direct Detection of Organophosphate Neurotoxins," *Electroanalysis*, Vol. 16, Núm. 22, 2004, pág. 1896-1906; C. Toumazou, S. Purushothaman, "Sensing Apparatus and Method," United States Patent Application 2004-0134798, published July 15, 2004; y T. W. Koo, S. Chan, X. Su, Z. Jingwu, M. Yamakawa, V.M. Dubin, "Sensor Arrays and Nucleic Acid Sequencing Applications," United States Patent Application 2006-0199193, publicada el 7 de Septiembre de 2006.

En general, el desarrollo de métodos de secuenciación de ácidos nucleicos rápidos y sensibles que utilizan secuenciadores de ADN automatizados ha hecho avanzar significativamente la comprensión de la biología. El término "secuenciación" se refiere a la determinación de una estructura primaria (o secuencia primaria) de un biopolímero no ramificado, lo que da como resultado una representación lineal simbólica conocida como "secuencia" que resume de manera sucinta gran parte de la estructura a nivel atómico de la molécula secuenciada. "Secuenciación de ADN" se refiere particularmente al proceso de determinar el orden de nucleótidos de un fragmento de ADN dado. Ahora es posible el análisis de genomas completos de virus, bacterias, hongos, animales y plantas, pero dicho análisis generalmente está limitado debido al costo y el rendimiento de la secuenciación. Más específicamente, los métodos de secuenciación convencionales actuales están limitados en cuanto a la precisión de la secuencia, la longitud de los moldes individuales que pueden secuenciarse, el coste de la secuencia y la tasa de determinación de la secuencia.

A pesar de las mejoras en las tecnologías de secuenciación y preparación de muestras, ninguna de las estrategias de secuenciación convencionales actuales, incluidas las que hasta la fecha pueden involucrar ISFET, ha proporcionado las reducciones de costos necesarias para aumentar el rendimiento a los niveles requeridos para el análisis de grandes cantidades de genomas humanos individuales. Es necesario secuenciar una gran cantidad de genomas individuales para comprender la base genética de la enfermedad y el envejecimiento. Además, será necesario secuenciar una gran cantidad de cánceres para comprender los cambios somáticos subyacentes al cáncer. Algunos esfuerzos recientes han logrado avances significativos tanto en la capacidad de preparar genomas para la secuenciación como en la secuenciación de un gran número de moldes simultáneamente. Sin embargo, estos y otros esfuerzos todavía están limitados por el tamaño relativamente grande de los volúmenes de reacción necesarios para preparar moldes que sean detectables por estos sistemas, así como por la necesidad de análogos de nucleótidos especiales y métodos enzimáticos o fluorescentes complejos para leer las bases.

El documento US2005/230271 A1 describe interacciones iónicas con un material de detección que está acoplado eléctricamente con la puerta flotante de un transistor de efecto de campo sensible a iones basado en puerta flotante (FGISFET) que puede usarse para detectar un material objetivo. El documento XP055419294 describe una especificación de rendimiento de un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD) de silicio de alto rendimiento diseñado para una amplia gama de aplicaciones de detección de imágenes en la banda de longitud de onda de 0,4 mm a 1,1 mm.

Resumen de la descripción

Los solicitantes han reconocido y apreciado que grandes matrices de ISFET pueden configurarse y emplearse particularmente para facilitar las técnicas de secuenciación de ADN basadas en el control de cambios en los procesos químicos relacionados con la síntesis de ADN. De manera más general, los solicitantes han reconocido y apreciado que se pueden emplear grandes matrices de FET químicamente sensibles para detectar y medir concentraciones/niveles de una variedad de analitos (por ejemplo, iones de hidrógeno, otros iones, moléculas o compuestos no iónicos, eventos de unión, etc.) en una serie de procesos químicos y/o biológicos (reacciones químicas, cultivos celulares, actividad neuronal, secuenciación de ácidos nucleicos, etc.) en los que se puede obtener información valiosa basada en dichas mediciones de analitos.

En consecuencia, la presente divulgación se dirige en general a métodos y aparatos relacionados con matrices de FET a gran escala para medir uno o más analitos. Varias realizaciones de acuerdo con el alcance de las reivindicaciones adjuntas se muestran en las Figuras 9, 11A, 13, 28A y 28B, respaldadas por la descripción en los párrafos 126, 134-138, 145-147, 151, 189-191 y 239. Otras realizaciones y aspectos de la invención se proporcionan como ejemplos ilustrativos para mejorar la comprensión general de la invención, sin embargo, no entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En las diversas realizaciones descritas en el presente documento, las matrices de FET incluyen múltiples "chemFET" o transistores de efecto de campo químicamente sensibles, que actúan como sensores químicos. Un ISFET, como se analizó anteriormente, es un tipo particular de chemFET que está configurado para la detección de iones, y los ISFET pueden emplearse en varias realizaciones descritas en este documento. Otros tipos de chemFET contemplados por la presente divulgación incluyen ENFET, que están configurados para detectar enzimas específicas. Debe apreciarse, sin embargo, que la presente divulgación no se limita a los ISFET y ENFET, sino que se relaciona más generalmente con cualquier FET que esté configurado para algún tipo de sensibilidad química.

De acuerdo con otras realizaciones más, la presente descripción se refiere en general a métodos y aparatos novedosos relacionados con el suministro a las matrices de chemFET a gran escala descritas anteriormente de muestras químicas apropiadas para provocar respuestas correspondientes. Las muestras químicas pueden comprender muestras de analitos (líquidos) en pequeños volúmenes de reacción, para facilitar la determinación a alta densidad y alta velocidad de la concentración química (por ejemplo, iones u otros constituyentes) u otras mediciones en el analito.

Por ejemplo, algunas realizaciones están dirigidas a una matriz de sensores chemFET bidimensional de "escala muy grande" (por ejemplo, más de 256k sensores), en la que uno o más elementos que contienen chemFET o "píxeles" que constituyen los sensores de tal matriz son configurado para monitorear una o más reacciones químicas independientes o eventos que ocurren cerca de los píxeles de la matriz. En algunas implementaciones ilustrativas, la matriz se puede acoplar a una o más estructuras microfluídicas que forman una o más cámaras de reacción, o "pocillos" o "micropocillos", sobre sensores individuales o grupos de sensores de la matriz, y aparatos que suministran muestras de analitos a los pocillos y los retira de los pocillos entre mediciones. Incluso cuando no se emplean micropocillos, la matriz de sensores se puede acoplar a una o más estructuras microfluídicas para el suministro de uno o más analitos a los píxeles y para la eliminación de analitos entre mediciones. En consecuencia, los aspectos novedosos de esta divulgación, que se desea proteger, incluyen las diversas estructuras microfluídicas que pueden emplearse para hacer fluir reactivos/analitos hacia y desde los pocillos o píxeles, los métodos de fabricación de la matriz de pocillos, los métodos y estructuras para acoplar los pocillos con los píxeles de la matriz, y los métodos y aparatos para cargar los pocillos con perlas que contienen ADN cuando el aparato se utiliza para la secuenciación de ADN o análisis relacionados.

También se muestran un electrodo de referencia único y su acoplamiento a la celda de flujo.

En varias realizaciones, un analito de particular interés son los iones de hidrógeno, y las matrices de ISFET a gran escala de acuerdo con la presente divulgación están configuradas específicamente para medir el pH. En otras realizaciones, las reacciones químicas que se monitorean pueden relacionarse con procesos de síntesis de ADN u otros procesos químicos y/o biológicos, y las matrices de chemFET pueden configurarse específicamente para medir el pH o uno o más analitos que brindan información relevante relacionada con un proceso químico de interés particular. En varios aspectos, las matrices de chemFET se fabrican utilizando tecnologías de procesamiento CMOS convencionales y están particularmente configuradas para facilitar la adquisición rápida de datos de toda la matriz (escanear todos los píxeles para obtener las señales de salida de píxeles correspondientes).

Con respecto a la detección y medición de analitos, debe apreciarse que en varias realizaciones analizadas con mayor detalle a continuación, uno o más analitos medidos por una matriz de chemFET de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir cualquiera de una variedad de sustancias químicas que brindan información relevante con respecto a un proceso químico o procesos químicos de interés (por ejemplo, unión de múltiples cadenas de ácido nucleico, unión de un anticuerpo a un antígeno, etc.). En algunos aspectos, la capacidad de medir niveles o concentraciones de uno o más analitos, además de simplemente detectar la presencia de un analito, proporciona información valiosa en relación con el proceso o procesos químicos. En otros aspectos, la mera detección de la presencia de un analito o analitos de interés puede proporcionar información valiosa.

Una matriz de chemFET de acuerdo con varias realizaciones novedosas de la presente descripción puede configurarse para ser sensible a cualquiera de uno o más de una variedad de analitos/sustancias químicas. En una realización, uno o más chemFET de una matriz pueden configurarse particularmente para la sensibilidad a uno o más analitos que representan uno o más eventos de unión (por ejemplo, asociados con un proceso de secuenciación de ácidos nucleicos), y en otras realizaciones diferentes chemFET de una matriz dada puede configurarse para la sensibilidad a diferentes analitos. Por ejemplo, en una realización, uno o más sensores (píxeles) de la matriz pueden incluir un primer tipo de chemFET configurado para ser químicamente sensible a un primer analito, y uno o más sensores de la matriz pueden incluir un segundo tipo de chemFET configurado para ser químicamente sensible a un segundo analito diferente del primer analito. En una implementación ilustrativa, el primer analito puede representar un primer evento de unión asociado con un proceso de secuenciación de ácidos nucleicos, y el segundo analito puede representar un segundo evento de unión asociado con el proceso de secuenciación de ácidos nucleicos. Por supuesto, debe apreciarse que se pueden emplear más de dos tipos diferentes de chemFET en cualquier matriz dada para detectar y/o medir diferentes tipos de analitos/eventos de unión. En general, debe apreciarse en cualquiera de las realizaciones de matrices de sensores analizados aquí que una matriz de sensores dada puede ser "homogénea" e incluir chemFET de tipos sustancialmente similares o idénticos para detectar y/o medir un mismo tipo de analito (por ejemplo, pH u otra concentración de iones), o una matriz de sensores puede ser "heterogénea" e incluir chemFET de diferentes tipos para detectar y/o medir diferentes analitos.

En otros aspectos más, los solicitantes han mejorado específicamente el diseño de matriz de ISFET de Milgrew y otros analizado anteriormente en relación con las Figuras 1-7, así como otros diseños de matrices de ISFET convencionales, para reducir significativamente el tamaño de píxel y, por lo tanto, aumentar el número de píxeles de una matriz de chemFET para un tamaño de la pastilla de semiconductor dado (es decir, aumentar la densidad de píxeles). En varias realizaciones, este aumento en la densidad de píxeles se logra al mismo tiempo que aumenta la relación señal-ruido (SNR) de las señales de salida correspondientes a las mediciones respectivas relacionadas con los procesos químicos monitoreados, y la velocidad con la que dichas señales de salida pueden ser leídas de la matriz. En particular, los solicitantes han reconocido y apreciado que al relajar los requisitos para la linealidad de chemFET y enfocarse en un rango de señal de salida de medición más limitado (por ejemplo, señales de salida correspondientes a un rango de pH de aproximadamente 7 a 9 en lugar de 1 a 14), la complejidad del píxel individual y el tamaño pueden reducirse significativamente, lo que facilita la realización de matrices de chemFET densas a muy gran escala. Los solicitantes también han reconocido y apreciado que los enfoques alternativos menos complejos para la selección de píxeles en una matriz de chemFET (por ejemplo, alternativas al enfoque del decodificador de filas y columnas empleado en el diseño de Milgrew y otros como se muestra en la Figura 7, cuya complejidad escala con el tamaño de la matriz) facilitan la adquisición rápida de datos de matrices significativamente grandes y densas.

Con respecto a la fabricación de matrices de chemFET, los solicitantes también han reconocido y apreciado que varias técnicas empleadas en un proceso de fabricación de CMOS convencional, así como varios pasos de procesamiento posteriores a la fabricación (manipulación de obleas, limpieza, troceado, empaque, etc.), pueden en algunos casos afectar negativamente al rendimiento de la matriz de chemFET resultante. Por ejemplo, con referencia nuevamente a la Figura 1, un problema potencial se relaciona con la carga atrapada que puede inducirse en el óxido de puerta 65 durante el grabado de metales asociado con la estructura de la puerta flotante 70, y cómo dicha carga atrapada puede afectar la tensión umbral V_{TH} del chemFET. Otro problema potencial se relaciona con la densidad/porosidad de la capa de pasivación de chemFET (por ejemplo, consulte la capa de pasivación de ISFET 72 en la Figura 1) que resulta de los procesos de deposición de material a baja temperatura comúnmente empleados en la fabricación de CMOS a base de metal de aluminio. Si bien tales procesos de baja temperatura generalmente proporcionan una capa de pasivación adecuada para los dispositivos CMOS convencionales, estos pueden dar como resultado una capa de pasivación porosa y de baja densidad que puede ser potencialmente problemática para los chemFET en contacto con una solución de analito; en particular, una capa de pasivación porosa de baja densidad con el tiempo puede absorber y saturarse con analitos u otras sustancias en la solución, lo que a su vez puede causar una deriva variable en el tiempo indeseable en la tensión umbral V_{TH} de los chemFET. Este fenómeno, a su vez, impide mediciones precisas de uno o más analitos particulares de interés. En vista de lo anterior, otras realizaciones novedosas divulgadas en este documento se refieren a métodos y aparatos que mitigan los efectos potencialmente adversos sobre el rendimiento de los chemFET que pueden surgir de diversos aspectos de la fabricación y el procesamiento/manejo posterior a la fabricación de matrices de chemFET.

En consecuencia, una realización de la presente invención se dirige a un aparato que comprende una matriz de sensores fabricados con CMOS, cada sensor que comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET) y que ocupa un área en una superficie de la matriz de diez micrómetros por diez micrómetros o menos.

Otra realización está dirigida a una matriz de sensores, que comprende una matriz bidimensional de sensores electrónicos que incluye al menos 512 filas y al menos 512 columnas de sensores electrónicos, cada sensor que comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET) configurado para proporcionar al menos al menos una señal de salida que representa una presencia y/o concentración de un analito próximo a una superficie de la matriz bidimensional.

Otra realización está dirigida a un aparato, que comprende una matriz de sensores fabricados con CMOS, cada sensor que comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET). La matriz de sensores fabricados con CMOS incluye más de 256 sensores, y una colección de señales de salida de chemFET de todos los chemFET de la matriz constituye una trama de datos. El aparato comprende además circuitos de control acoplados a la matriz y configurados para generar al menos una señal de salida de la matriz para proporcionar múltiples tramas de datos de la matriz a una tasa de trama de al menos 1 trama por segundo. En un aspecto, la tasa de tramas puede ser de al menos 10 tramas por segundo. En otro aspecto, la tasa de tramas puede ser de al menos 20 tramas por segundo. En otros aspectos más, la tasa de tramas puede ser de al menos 30, 40, 50, 70 o hasta 100 tramas por segundo.

Otra realización se dirige a un aparato, que comprende una matriz de sensores fabricados con CMOS, cada sensor que comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET). El chemFET comprende una estructura de puerta flotante, y una fuente y un drenaje que tiene un primer tipo de semiconductor y se fabrica en una región que tiene un segundo tipo de semiconductor, en donde no hay un conductor eléctrico que conecte eléctricamente la región que tiene el segundo tipo de semiconductor a la fuente o el drenaje.

Otra realización está dirigida a un aparato, que comprende una serie de sensores electrónicos, cada sensor consiste en tres transistores de efecto de campo (FET) que incluyen un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET).

Otra realización está dirigida a un aparato, que comprende una matriz de sensores electrónicos, cada sensor comprende tres o menos transistores de efecto de campo (FET), en donde los tres o menos FET incluyen un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET).

Otra realización está dirigida a un aparato, que comprende una matriz de sensores electrónicos, cada sensor comprende una pluralidad de transistores de efecto de campo (FET) que incluyen un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET), y una pluralidad de conductores eléctricos conectados eléctricamente a la pluralidad de FET, en donde la pluralidad de FET se dispone de manera que la pluralidad de conductores eléctricos incluye no más de cuatro conductores que atraviesan un área ocupada por cada sensor e interconectan múltiples sensores de la matriz.

Otra realización está dirigida a un aparato, que comprende una matriz de sensores fabricados con CMOS, cada sensor comprende una pluralidad de transistores de efecto de campo (FET) que incluyen un transistor de efecto de campo sensible químicamente (chemFET), en donde todos los FET en cada sensor son del mismo tipo de canal y se implementan en una sola región semiconductor de un sustrato de matriz.

Otra realización está dirigida a una matriz de sensores, que comprende una pluralidad de sensores electrónicos dispuestos en una pluralidad de filas y una pluralidad de columnas. Cada sensor comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET) configurado para proporcionar al menos una señal de salida que representa una presencia y/o una concentración de un analito cerca de una superficie de la matriz. Para cada columna de la pluralidad de columnas, la matriz comprende además un circuito de columna configurado para proporcionar una corriente de drenaje constante y una tensión de drenaje a fuente constante a los respectivos chemFET en la columna, el circuito de columna incluye dos amplificadores operacionales y un FET conectado a diodo dispuesto en una configuración de puente Kelvin con los respectivos chemFET para proporcionar la tensión constante de drenaje a fuente.

Otra realización está dirigida a una matriz de sensores, que comprende una pluralidad de sensores electrónicos dispuestos en una pluralidad de filas y una pluralidad de columnas. Cada sensor comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET) configurado para proporcionar al menos una señal de salida que representa una concentración de iones en un analito próximo a una superficie de la matriz. La matriz comprende además al menos un registro de desplazamiento de selección de fila para habilitar filas respectivas de la pluralidad de filas, y al menos un registro de desplazamiento de selección de columna para adquirir señales de salida chemFET de columnas respectivas de la pluralidad de columnas.

Otra realización está dirigida a un aparato, que comprende una matriz de sensores fabricados con CMOS, cada sensor que comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET). El chemFET comprende una estructura de puerta flotante, y una fuente y un drenaje que tiene un primer tipo de semiconductor y está fabricado en una región que tiene un segundo tipo de semiconductor, en donde no hay un conductor eléctrico que conecte eléctricamente la región que tiene el segundo tipo de semiconductor a la fuente o el drenaje. La matriz incluye una matriz bidimensional de al menos 512 filas y al menos 512 columnas de sensores fabricados con CMOS. Cada sensor consta de tres transistores de efecto de campo (FET), incluido el chemFET, y cada sensor incluye una pluralidad de conductores eléctricos conectados eléctricamente a los tres FET. Los tres FET están dispuestos de manera que la pluralidad de conductores eléctricos no incluya más de cuatro conductores que atraviesan un área ocupada por cada sensor e interconecten múltiples sensores de la matriz. Todos los FET en cada sensor son del mismo tipo de canal y están implementados en una sola región de semiconductores de un sustrato de matriz. Una colección de señales de salida chemFET de todos los chemFET de la matriz constituye una trama de datos. El

aparato comprende además circuitos de control acoplados a la matriz y configurados para generar al menos una señal de salida de la matriz para proporcionar múltiples tramas de datos de la matriz a una tasa de tramas de al menos 20 tramas por segundo.

5 Otra realización está dirigida a un método para procesar una matriz de sensores fabricados con CMOS, cada sensor que comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET). El método comprende: A) trocear una oblea semiconductora que incluye la matriz para formar al menos una porción troceada que incluye la matriz; y B) realizar un recocido con gas de formación en la al menos una porción troceada.

10 Otra realización está dirigida a un método para procesar una matriz de sensores fabricados con CMOS. Cada sensor comprende un transistor de efecto de campo químicamente sensible (chemFET) que tiene una capa de pasivación químicamente sensible de nitruro de silicio y/u oxinitruro de silicio depositada mediante deposición química de vapor mejorada con plasma (PECVD). El método comprende: A) depositar al menos un material de pasivación adicional sobre la capa de pasivación químicamente sensible para reducir la porosidad y/o aumentar la densidad de la capa de pasivación.

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que comprende disponer una pluralidad de ácidos nucleicos de molde en una pluralidad de cámaras de reacción, en donde la pluralidad de cámaras de reacción está en contacto con una matriz de transistores de efecto de campo sensible a productos químicos (chemFET) que comprende al menos un chemFET para cada cámara de reacción, y en donde cada uno de los ácidos nucleicos molde se hibrida con un cebador de secuenciación y se une a una polimerasa, sintetizando una nueva cadena de ácido nucleico mediante la incorporación secuencial de uno o más nucleótidos trifosfato conocidos en el extremo 3' del cebador de secuenciación, detectando la incorporación de uno o más trifosfatos de nucleótidos conocidos mediante un cambio en la corriente en al menos un chemFET.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que comprende disponer una pluralidad de ácidos nucleicos molde en una pluralidad de cámaras de reacción, en donde la pluralidad de cámaras de reacción está en contacto con una matriz de transistores de efecto de campo sensible a productos químicos (chemFET) que comprende al menos un chemFET para cada cámara de reacción, y en donde cada uno de los ácidos nucleicos molde se hibrida con un cebador de secuenciación y se une a una polimerasa, sintetizando una nueva cadena de ácido nucleico mediante la incorporación secuencial de uno o más nucleótidos trifosfato conocidos en el extremo 3' del cebador de secuenciación, detectando la incorporación de uno o más trifosfatos de nucleótidos conocidos mediante un cambio en la corriente en al menos un chemFET, en donde la matriz de chemFET es cualquiera de las matrices anteriores.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que comprende disponer una pluralidad de ácidos nucleicos molde en una pluralidad de cámaras de reacción, en donde la pluralidad de cámaras de reacción está en contacto con una matriz de transistores de efecto de campo sensible a productos químicos (chemFET) que comprende al menos un chemFET para cada cámara de reacción, y en donde cada uno de los ácidos nucleicos molde se hibrida con un cebador de secuenciación y se une a una polimerasa, sintetizando una nueva cadena de ácido nucleico mediante la incorporación secuencial de uno o más nucleótidos trifosfato conocidos en el extremo 3' del cebador de secuenciación, detectando la incorporación de uno o más trifosfatos de nucleótidos conocidos mediante la generación de subproductos de reacción de secuenciación, en donde (a) la matriz de chemFET comprende más de 256 sensores, o (b) una distancia de centro a centro entre cámaras de reacción adyacentes (o "paso") es de 1-10 μm .

30 Diversas realizaciones se aplican igualmente a los métodos divulgados en este documento y se enumeran una vez por brevedad. En algunas realizaciones, la distancia de centro a centro entre las cámaras de reacción adyacentes es de aproximadamente 2-9 μm , aproximadamente 2 μm , aproximadamente 5 μm o aproximadamente 9 μm . En algunas realizaciones, la matriz de chemFET comprende más de 256 sensores (y opcionalmente más de 256 cámaras de reacción (o pocillos) correspondientes), más de 10^3 sensores (y opcionalmente más de 10^3 cámaras de reacción correspondientes), más de 10^4 sensores (y opcionalmente más de 10^4 cámaras de reacción correspondientes), más de 10^5 sensores (y opcionalmente más de 10^5 cámaras de reacción correspondientes), o más de 10^6 sensores (y opcionalmente más de 10^6 cámaras de reacción correspondientes). En algunas realizaciones, la matriz de chemFET comprende al menos 512 filas y al menos 512 columnas de sensores.

35 En algunas realizaciones, el subproducto de la reacción de secuenciación es pirofosfato inorgánico (PPi). En algunas realizaciones, el PPi se mide directamente. En algunas realizaciones, el PPi se mide en ausencia de un receptor de PPi. En algunas realizaciones, el subproducto de la reacción de secuenciación son iones de hidrógeno. En algunas realizaciones, el subproducto de la reacción de secuenciación es fosfato inorgánico (Pi). En aún otras realizaciones, el chemFET detecta cambios en cualquier combinación de los subproductos, opcionalmente en combinación con otros parámetros, como se describe en este documento.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un método para secuenciar un ácido nucleico que comprende disponer una pluralidad de ácidos nucleicos molde en una pluralidad de cámaras de reacción, en donde la pluralidad de cámaras de reacción está en contacto con una matriz de transistores de efecto de campo sensible a productos

químicos (chemFET) que comprende al menos un chemFET para cada cámara de reacción, y en donde cada uno de los ácidos nucleicos molde se hibrida con un cebador de secuenciación y se une a una polimerasa, sintetizando una nueva cadena de ácido nucleico mediante la incorporación secuencial de uno o más nucleótidos trifosfato conocidos en el extremo 3' del cebador de secuenciación, detectando directamente la liberación de pirofosfato inorgánico (PPI) como indicador de la incorporación de uno o más nucleótidos trifosfato conocidos.

En algunas realizaciones, el PPI se detecta directamente al unirse a un receptor de PPI inmovilizado en el chemFET. En algunas realizaciones, el chemFET detecta directamente el PPI en ausencia de un receptor de PPI.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para secuenciar ácidos nucleicos que comprende fragmentar un ácido nucleico molde para generar una pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados, uniendo una cadena de cada uno de la pluralidad de ácidos nucleicos fragmentados individualmente a perlas para generar una pluralidad de perlas cada una de las cuales tiene un ácido nucleico fragmentado de cadena sencilla unido al mismo, administrando la pluralidad de perlas que tienen un ácido nucleico fragmentado de cadena sencilla unido a las mismas a una matriz de chemFET que tiene una cámara de reacción separada para cada sensor en el área, y en donde solo se sitúa una perla en cada cámara de reacción, y realizando una reacción de secuenciación simultáneamente en la pluralidad de cámaras.

En otro aspecto, la invención proporciona un aparato que comprende un transistor de efecto de campo sensible a productos químicos (chemFET) que tiene dispuesto en su superficie un receptor de PPI.

En algunas realizaciones, el receptor selectivo de PPI es el Compuesto 1, Compuesto 2, Compuesto 3, Compuesto 4, Compuesto 5, Compuesto 6, Compuesto 7, Compuesto 8, Compuesto 9 o Compuesto 10 como se muestra en la Figura 11B. En algunas realizaciones, el chemFET está presente en una matriz de chemFET, cada uno de los cuales tiene dispuesto en su superficie un receptor selectivo de PPI. En algunas realizaciones, los receptores selectivos de PPI idénticos están dispuestos en cada chemFET de la matriz. En algunas realizaciones, la matriz comprende más de 256 sensores. En algunas realizaciones, la matriz comprende al menos 512 filas y al menos 512 columnas de sensores. En algunas realizaciones, el chemFET está ubicado en la parte inferior de una cámara de reacción.

En otro aspecto, la invención proporciona un aparato que comprende una matriz de transistores de efecto de campo sensible a productos químicos (chemFET) que tiene dispuesta sobre su superficie una matriz biológica.

La matriz biológica puede ser una matriz de ácidos nucleicos, una matriz de proteínas que incluye, entre otros, una matriz de enzimas, una matriz de anticuerpos y una matriz de fragmentos de anticuerpos, una matriz de células y similares. La matriz química puede ser una matriz de moléculas pequeñas orgánicas o una matriz de moléculas inorgánicas, pero no está tan limitada. La matriz de chemFET puede comprender al menos 5, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 o más sensores. La matriz biológica o química puede disponerse en una pluralidad de "células" o regiones espacialmente definidas y cada una de estas regiones está situada sobre un sensor diferente en la matriz de chemFET, en algunas realizaciones.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para detectar un ácido nucleico que comprende poner en contacto una matriz de ácidos nucleicos dispuesta en una matriz de chemFET con una muestra y detectar la unión de un ácido nucleico de la muestra a una o más regiones en la matriz de ácidos nucleicos.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar una proteína que comprende poner en contacto una matriz de proteínas dispuesta en una matriz de chemFET con una muestra y detectar la unión de una proteína de la muestra a una o más regiones de la matriz de proteínas.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método para detectar un ácido nucleico que comprende poner en contacto una matriz de proteínas dispuesta en una matriz de chemFET con una muestra y detectar la unión de un ácido nucleico de la muestra a una o más regiones de la matriz de proteínas.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar un antígeno que comprende poner en contacto una matriz de anticuerpos dispuesta en una matriz de chemFET con una muestra y detectar la unión de un antígeno de la muestra a una o más regiones de la matriz de anticuerpos.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar un sustrato o inhibidor enzimático que comprende poner en contacto una matriz enzimática dispuesta en una matriz de chemFET con una muestra y detectar la unión de una entidad de la muestra a una o más regiones en la matriz enzimática.

Debe apreciarse que todas las combinaciones de los conceptos anteriores y los conceptos adicionales analizados con mayor detalle a continuación (siempre que tales conceptos no sean incompatibles entre sí) se contemplan como parte de la materia novedosa divulgada en este documento. En particular, todas las combinaciones de la materia reivindicada que aparecen al final de esta divulgación se contemplan como parte de la materia novedosa divulgada en este documento.

Breve Descripción de las Figuras

En los dibujos, los caracteres de referencia similares generalmente se refieren a las mismas partes en las diferentes vistas. Además, los dibujos no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié en la ilustración general de los diversos conceptos analizados en este documento.

La Figura 1 ilustra una sección transversal de un transistor de efecto de campo sensible a iones (ISFET) de tipo p (canal p) fabricado utilizando un proceso CMOS convencional.

La Figura 2 ilustra una representación del circuito eléctrico del ISFET de canal p que se muestra en la Figura 1.

La Figura 3 ilustra una columna de una matriz de ISFET bidimensional basada en el ISFET que se muestra en la Figura 1.

La Figura 4 ilustra una puerta de transmisión que incluye un MOSFET de canal p y un MOSFET de canal n que se emplea en cada píxel de la columna de matriz que se muestra en la Figura 3.

La Figura 5 es un diagrama similar a la Figura 1, que ilustra una sección transversal más amplia de una porción de un sustrato que corresponde a un píxel de la columna de matriz que se muestra en la Figura 3, en la que se muestra el ISFET junto con dos MOSFET de canal n también incluido en el píxel.

La Figura 6 es un diagrama similar a la Figura 5, que ilustra una sección transversal de otra porción del sustrato correspondiente a un píxel de la columna de matriz que se muestra en la Figura 3, en la que se muestra el ISFET junto con el MOSFET de canal p de la puerta de transmisión que se muestra en la Figura 4.

La Figura 7 ilustra un ejemplo de una matriz de píxeles ISFET bidimensional completa basada en el diseño de columna de la Figura 3, junto con el circuito decodificador de fila y columna adjunto y el circuito de lectura de medición.

La Figura 8 ilustra en general un sistema de procesamiento de ácidos nucleicos que comprende una matriz de chemFET a gran escala, según una realización novedosa de la presente divulgación.

La Figura 9 ilustra una columna de una matriz de chemFET similar a la que se muestra en la Figura 8, según una realización novedosa de la presente divulgación.

La Figura 9A ilustra un diagrama de circuito para un amplificador ilustrativo empleado en la columna de matriz que se muestra en la Figura 9, y la Figura 9B es un gráfico de la polarización del amplificador frente al ancho de banda, según una realización novedosa de la presente divulgación.

La Figura 10 ilustra una vista superior de un diseño de disposición de chip para un píxel de la columna de una matriz de chemFET que se muestra en la Figura 9, según una realización novedosa de la presente descripción.

La Figura 11A muestra una vista de sección transversal compuesta a lo largo de la línea I—I del píxel que se muestra en la Figura 10, que incluye elementos adicionales en la mitad derecha de la Figura 10 entre las líneas II—II y III—III, que ilustra una vista capa por capa de la fabricación de píxeles según una realización novedosa de la presente divulgación.

La Figura 11B proporciona las estructuras químicas de diez receptores de PPI (compuestos 1 a 10).

La Figura 11C es un esquema de un protocolo de síntesis para el compuesto 4 de la Figura 11B.

La Figura 11D es un esquema que ilustra una variedad de productos químicos que se pueden aplicar a la capa de pasivación para unir compuestos de reconocimiento molecular (tales como, entre otros, receptores de PPI).

La Figura 11E es un esquema de la unión del compuesto 10 de la Figura 11B a una superficie de óxido metálico.

Las Figuras 12A a 12L proporcionan vistas superiores de cada una de las capas de fabricación que se muestran en la Figura 11A, según una realización novedosa de la presente descripción.

La Figura 13 ilustra un diagrama de bloques de una implementación de chip CMOS IC ilustrativa de una matriz de sensores chemFET similar a la que se muestra en la Figura 8, basada en los diseños de columnas y píxeles que se muestran en las Figuras 9-12, de acuerdo con una realización novedosa de la presente divulgación.

La Figura 14 ilustra un registro de desplazamiento de selección de fila de la matriz mostrada en la Figura 13, según una realización novedosa de la presente descripción.

La Figura 15 ilustra uno de los dos registros de desplazamiento de selección de columna de la matriz mostrada en la Figura 13, según una realización novedosa de la presente descripción.

La Figura 16 ilustra uno de los dos controladores de salida de la matriz que se muestra en la Figura 13, según una realización novedosa de la presente descripción.

La Figura 17 ilustra un diagrama de bloques de la matriz de sensores chemFET de la Figura 13 acoplada a un controlador de matriz, según una realización novedosa de la presente descripción.

La Figura 18 ilustra un diagrama de temporización ilustrativo para diversas señales proporcionadas por el controlador de matriz de la Figura 17, según una realización novedosa de la presente descripción.

Las Figuras 19-20 ilustran diagramas de bloques de implementaciones alternativas de chip CMOS IC de matrices de sensores chemFET, de acuerdo con otras realizaciones novedosas de la presente divulgación.

La Figura 20A ilustra una vista superior de un diseño de disposición de chip para un píxel de la matriz de chemFET que se muestra en la Figura 20, según otra realización novedosa de la presente descripción.

Las Figuras 21-23 ilustran diagramas de bloques de implementaciones de chips CMOS IC alternativas adicionales de matrices de sensores chemFET, de acuerdo con otras realizaciones novedosas de la presente descripción.

La Figura 24 ilustra el diseño de píxeles de la Figura 9 implementado con un chemFET de canal n y los MOSFET de canal n que lo acompañan, de acuerdo con otra realización novedosa de la presente divulgación.

Las Figuras 25-27 ilustran diseños de píxeles alternativos y circuitos de columna asociados para matrices de chemFET de acuerdo con otras realizaciones novedosas de la presente divulgación.

Las Figuras 28A y 28B son ilustraciones isométricas de porciones de matrices de micropocillos como se emplean aquí, que muestran pocillos redondos y pocillos rectangulares, para ayudar a la visualización tridimensional de las estructuras de la matriz.

La Figura 29 es una representación esquemática de una vista superior de una esquina (es decir, la esquina inferior izquierda) de la disposición de un chip que muestra una matriz de sensores ISFET individuales en una pastilla de CMOS.

La Figura 30 es una ilustración de un ejemplo de una disposición para una porción de una máscara (típicamente de cromo) para una realización de un sensor por pocillo de la matriz de sensores descrita anteriormente, correspondiente a la porción de la pastilla que se muestra en la Figura 29.

La Figura 31 es una disposición correspondiente para una máscara para una realización de 4 sensores por pocillo.

La Figura 32 es una ilustración de una segunda máscara utilizada para enmascarar un área que rodea la matriz, para construir un cuello o pared (o cuenca, usando ese término en el sentido geológico) de material protector que rodea la matriz activa de sensores en un sustrato, como se muestra en la Figura 33A.

La Figura 33 es una ilustración de la cuenca resultante.

La Figura 33A es una ilustración de un proceso PCM de tres capas para fabricar la matriz de micropocillos.

Las Figuras 34 - 37 ilustran esquemáticamente un primer ejemplo de un aparato experimental adecuado que incorpora una interfaz fluidica con la matriz de sensores, donde la Figura 35 proporciona una sección transversal a través del aparato de la Figura 34 a lo largo de la línea de sección 35-35' y la Figura 36 expandiendo la parte de la Figura 35, en perspectiva, y la Figura 37 ampliando aún más una porción de la estructura para hacer más visible el flujo del fluido.

La Figura 38 es una ilustración esquemática de un sustrato con una capa de material fotoprotector grabada que comienza la formación de una celda de flujo de ejemplo de una determinada configuración.

Las Figuras 39 - 41 son diagramas de máscaras adecuadas para producir una primera configuración de celda de flujo consistente con la Figura 38.

Las Figuras 42 - 54 y 57-58 son pares de vistas en sección parcialmente isométricas de aparatos de ejemplo y ampliaciones, que muestran formas de introducir un electrodo de referencia en, y formar, una celda de flujo y una cámara de flujo, utilizando materiales tales como plástico y PDMS.

Las Figuras 55 y 56 son vistas esquemáticas en sección transversal de disposiciones de vidrio (o plástico) de dos capas para fabricar aparatos fluidicos para montar en un chip para usar como se enseña aquí.

Las Figuras 59A-59C son ilustraciones de las piezas para dos ejemplos de partes moldeadas por inyección de dos piezas para formar una celda de flujo.

La Figura 60 es una ilustración esquemática, en sección transversal, para introducir un tubo capilar de acero inoxidable como electrodo, en un puerto aguas abajo de una celda de flujo tal como las celdas de flujo de las Figuras 59A - 59C, u otras celdas de flujo.

La Figura 61 es un esquema que ilustra la incorporación de un dNTP en una cadena de ácido nucleico sintetizada con la liberación concomitante de pirofosfato inorgánico (PPi).

Las Figuras 62-70 ilustran la carga de perlas en las matrices microfluidicas de la invención.

La Figura 71A es una captura de pantalla que muestra píxeles con una señal que se produce después de que se agregó dATP (primero) que da como resultado una extensión de 4 bases en el molde 4 (consulte las Tablas 1 y 2) (panel izquierdo) y un gráfico de tensión versus trama (o tiempo) para los píxeles con flechas (panel derecho).

La Figura 71B es una captura de pantalla que muestra píxeles con señal que se produce después de que se agregó dCTP, lo que da como resultado a continuación una extensión de 4 bases en el molde 1 (consulte las Tablas 1, 2) (panel izquierdo) y una gráfica de tensión versus trama (o tiempo) para los píxeles con flechas (panel derecho).

La Figura 71C es una captura de pantalla que muestra píxeles con una señal que se produce después de que se agregó dGTP, lo que da como resultado a continuación la extensión de los moldes 1, 2 y 4 (consulte las Tablas 1, 2) (panel izquierdo) y una gráfica de tensión versus trama (o tiempo) para los píxeles con flechas (panel derecho).

La Figura 71D es una captura de pantalla que muestra los píxeles con la señal que se produce después de que se agregó dTTP y que se produjo la escorrentía (debido a la presencia de los 4 dNTP) en los 4 moldes (consulte las Tablas 1, 2) (panel izquierdo) y una gráfica de tensión versus trama (o tiempo) para los píxeles señalados con flechas (panel derecho).

Descripción detallada

A continuación, se incluyen descripciones más detalladas de varios conceptos relacionados con, y realizaciones de, métodos y aparatos novedosos relacionados con matrices de chemFET a gran escala para mediciones de analitos. Debe apreciarse que varios conceptos presentados anteriormente y analizados con mayor detalle a continuación pueden implementarse de numerosas formas, ya que los conceptos divulgados no se limitan a ninguna forma particular de implementación. Los ejemplos de implementaciones y aplicaciones específicas se proporcionan principalmente con fines ilustrativos.

Diversas realizaciones novedosas de acuerdo con la presente divulgación están dirigidas, al menos en parte, a un sistema híbrido microfluidico/basado en semiconductores que combina el poder de la microelectrónica con la biocompatibilidad de un sistema microfluidico. En algunos ejemplos a continuación, la porción de microelectrónica del sistema híbrido se implementa en tecnología CMOS con fines ilustrativos. Debe apreciarse, sin embargo, que la divulgación no pretende ser limitativa a este respecto, ya que se pueden utilizar otras tecnologías basadas en semiconductores para implementar varios aspectos de la porción microelectrónica de los sistemas analizados en este documento.

Una realización descrita en el presente documento está dirigida a una gran matriz de sensores (por ejemplo, una matriz bidimensional) de transistores de efecto de campo químicamente sensibles (chemFET), en la que los elementos sensores individuales de chemFET o "píxeles" de la matriz están configurados para detectar cambios en la concentración de analitos en una gran cantidad de procesos químicos y/o biológicos (reacciones químicas, cultivos celulares, actividad neuronal, procesos de secuenciación de ácidos nucleicos, etc.) que se producen en las proximidades de la matriz. Los ejemplos de chemFET contemplados por varias realizaciones analizadas con mayor detalle a continuación incluyen, pero no se limitan a, transistores de efecto de campo sensibles a iones (ISFET) y transistores de efecto de campo sensibles a enzimas (ENFET). En una implementación ilustrativa, se fabrican una o más estructuras microfluidicas por encima de la matriz de sensores chemFET para proporcionar contención y/o confinamiento de una reacción química en la que se puede producir un analito de interés. Por ejemplo, en una implementación, la(s) estructura(s) microfluidica(s) puede(n) configurarse como uno o más "pocillos" (por ejemplo, pequeñas cámaras de reacción) dispuestos sobre uno o más sensores de la matriz, de modo que el uno o más sensores sobre los que se dispone un pocillo dado detecta y mide la concentración del analitos en el pocillo dado.

En algunas realizaciones, tal matriz de chemFET/estructura híbrida de microfluidos puede usarse para analizar soluciones/materiales de interés que contienen ácidos nucleicos. Por ejemplo, tales estructuras pueden emplearse para procesar ácidos nucleicos en una multitud de formas que utilizan la secuenciación de ácidos nucleicos. En varios aspectos, dicha secuenciación se puede realizar para determinar la identidad de una secuencia de ácidos nucleicos, para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido en fragmentos de ácidos nucleicos, para el perfil de expresión de ácidos nucleicos (comparando el perfil de expresión de ácidos nucleicos entre dos o más estados, por ejemplo, comparando entre tejido enfermo y tejido normal o comparando entre tejido no tratado y tejido tratado con fármacos, enzimas, radiación o tratamiento químico), para haplotipo (comparación de genes o variaciones en genes en cada uno de los dos alelos presentes en un sujeto humano), para cariotipo (comparación diagnóstica de uno o más genes en un tejido de prueba, generalmente de un embrión/feto antes de la concepción para detectar defectos de nacimiento, con los mismos genes de sujetos con cariotipo "normal"), y para genotipo (comparación de uno o más genes en un primer individuo de una especie con los mismos genes en otros individuos de la misma especie). Debe apreciarse, sin embargo, que aunque algunos ejemplos ilustrativos de los conceptos descritos en el presente documento se aplican en el contexto del procesamiento de ácidos nucleicos, la aplicación de los conceptos descritos en el presente documento en relación con las matrices de sensores chemFET no se limita a estos ejemplos.

La Figura 8 ilustra en general un sistema de procesamiento de ácido nucleico 1000 que comprende una matriz de chemFET a gran escala, según una realización novedosa de la presente descripción. En la discusión que sigue, los sensores chemFET de la matriz se describen con fines ilustrativos como ISFET configurados para la sensibilidad a la concentración de iones de hidrógeno. Sin embargo, debe apreciarse que la presente divulgación no está limitada a este respecto, y que en cualquiera de las realizaciones analizadas en este documento en las que se emplean ISFET como ejemplo ilustrativo, otros tipos de chemFET pueden emplearse de manera similar en realizaciones alternativas, como se describe con más detalle a continuación. En un aspecto, el sistema 1000 incluye una estructura híbrida de semiconductor/microfluidos 300 que comprende una matriz de sensores ISFET 100 y una celda de flujo de microfluidos 200. En otro aspecto, la celda de flujo 200 está configurada para facilitar la secuenciación de un molde de ácido nucleico dispuesto en la celda de flujo a través de la admisión controlada a la celda de flujo de varios reactivos de secuenciación 272 (por ejemplo, bases dATP, dCTP, dGTP, dTTP y otros reactivos). Como se ilustra en la Figura 8, la admisión de los reactivos de secuenciación a la celda de flujo 200 se puede lograr a través de una o más válvulas 270 y una o más bombas 274 que están controladas por un ordenador 260.

En el sistema 1000 de la Figura 8, según una realización, la matriz de sensores ISFET 100 monitorea los cambios de pH que ocurren en diferentes porciones de la celda de flujo 200 debido a reacciones químicas entre una o más de las bases que constituyen los reactivos de secuenciación 272 y el modelo de ácido nucleico. En otras realizaciones analizadas con mayor detalle a continuación, la matriz de sensores FET puede configurarse particularmente para la sensibilidad a otros analitos que pueden proporcionar información relevante sobre las reacciones químicas de interés. A través de un controlador de matriz 250 (también bajo el funcionamiento del ordenador 260), la matriz de ISFET puede controlarse para adquirir datos relacionados con las mediciones de analitos, y el ordenador 260 puede procesar los datos recopilados para producir información significativa asociada con el procesamiento del molde de ácido nucleico. Por ejemplo, en una implementación, el cambio de pH generalmente es proporcional al número de un tipo particular de base (por ejemplo, uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP) agregado a el molde de ácido nucleico. Dicho cambio de pH puede estar representado por un cambio en la tensión de salida de uno o más ISFET de la matriz 100 en la proximidad de las reacciones entre un tipo dado de base y el molde. Por lo tanto, la magnitud del cambio de tensión en una señal de salida de un píxel dado de la matriz se puede usar para determinar el número de bases de un tipo particular que se agregan a el molde dispuesta en la celda de flujo por encima del píxel dado.

En un aspecto, la celda de flujo 200 del sistema 1000 que se muestra en la Figura 8 puede comprender varios pocillos (no se muestran en la Figura 8) dispuestos encima de los sensores correspondientes de la matriz de ISFET 100. Se pueden utilizar varias técnicas para admitir los diversos materiales de procesamiento en los pocillos de una celda de flujo de este tipo. Por ejemplo, la celda de flujo primero puede cargarse con un molde de ácido nucleico para ser secuenciada mediante centrifugación en las "perlas" de los pocillos que contienen el molde de ácido nucleico; alternativamente, dichas perlas pueden entrar en los pocillos por gravedad. En otro ejemplo, en lugar de emplear perlas, los pocillos se pueden recubrir con un conjunto de pares de cebadores y el molde de ácido nucleico se proporciona a la celda de flujo con adaptadores que complementan los pares de cebadores (se pueden agregar materiales de inmovilización a la matriz de sensores 100, o a pastillas individuales como parte del empaque del chip, o inmediatamente antes del procesamiento del ácido nucleico). Se pueden usar otros métodos que involucran solgel para inmovilizar un molde de ácido nucleico cerca de la superficie de la matriz de ISFET 100.

Una vez que se carga un molde de ácido nucleico en los pocillos respectivos de la celda de flujo 200, se puede realizar la amplificación del puente en los pocillos, desnaturalizar el producto y realizar la secuenciación por síntesis o ligación. Se prevén otros métodos de amplificación en los pocillos (con los productos capturados en los pocillos), incluida la amplificación por círculo rodante, u otras estrategias que utilicen técnicas de amplificación isotérmicas o no isotérmicas como la PCR. Como se ilustra en la Figura 8, los reactivos que incluyen bases pueden admitirse en la celda de flujo (por ejemplo, a través de la válvula controlada por ordenador 270 y las bombas 274) y difundirse en los pocillos, o los reactivos pueden agregarse a la celda de flujo por otros medios, tal como un chorro de tinta. En otro

ejemplo más, la celda de flujo 200 puede no contener pocillos, y las propiedades de difusión de los reactivos pueden aprovecharse para limitar la diafonía entre los respectivos sensores de la matriz de ISFET 100.

En resumen, la celda de flujo 200 en el sistema de la Figura 8 puede configurarse de diversas maneras para proporcionar uno o más analitos en las proximidades de la matriz de ISFET 100; por ejemplo, un molde de ácido nucleico (ADN) puede unirse o aplicarse directamente en una proximidad adecuada a uno o más píxeles de la matriz de sensores 100, o en un material de soporte (por ejemplo, una o más "perlas") ubicada encima de la matriz de sensores. Los reactivos de procesamiento (por ejemplo, enzimas) también se pueden colocar en los sensores directamente, o en uno o más soportes sólidos cerca de la matriz, y el dispositivo se puede usar sin pocillos ni perlas para una serie de aplicaciones de biosensores en las que las enzimas dan como resultado un producto detectable por sensor (por ejemplo, cambio de concentración de iones).

Con respecto a la matriz de ISFET 100 del sistema 1000 que se muestra en la Figura 8, en una realización, la matriz 100 se implementa como un circuito integrado diseñado y fabricado utilizando procesos CMOS estándar (por ejemplo, proceso de 0,35 micrómetros, proceso de 0,18 micrómetros), que comprende todos los sensores y la electrónica necesarios para monitorear/medir uno o más analitos. Con referencia nuevamente a la Figura 1, uno o más electrodos de referencia 76 para ser empleados junto con la matriz de ISFET 100 pueden colocarse en la celda de flujo 200 (por ejemplo, disponerse en pocillos "no utilizados" de la celda de flujo) o exponerse de otro modo a una referencia (por ejemplo, uno o más de los reactivos de secuenciación 172) para establecer una línea de base contra la cual se comparan los cambios en la concentración de analitos próximos a los ISFET respectivos de la matriz 100. Los electrodos de referencia 76 pueden acoplarse eléctricamente a la matriz 100, el controlador de matriz 250 o directamente al ordenador 260 para facilitar las mediciones de analitos basadas en señales de tensión obtenidas de la matriz 100; en algunas implementaciones, los electrodos de referencia pueden estar acoplados a una tierra eléctrica u otro potencial predeterminado, o la tensión del electrodo de referencia puede medirse con respecto a tierra, para establecer una referencia eléctrica para las mediciones de la señal de salida del ISFET, como se analiza más adelante.

La matriz de ISFET 100 no está limitada a ningún tamaño en particular, como matrices unidimensionales o bidimensionales, que incluyen desde dos hasta 256 píxeles (por ejemplo, 16 por 16 píxeles en una implementación bidimensional) o hasta 54 megapíxeles (por ejemplo, 7400 por 7400 píxeles en una implementación bidimensional) o incluso se pueden fabricar e implementar matrices mayores para diversos fines de análisis químico/biológico de acuerdo con los conceptos divulgados en el presente documento. En una realización del sistema ilustrativo que se muestra en la Figura 8, los sensores ISFET individuales de la matriz pueden configurarse para ser sensibles a los iones de hidrógeno; sin embargo, también debe apreciarse que la presente divulgación no está limitada a este respecto, ya que los sensores individuales de una matriz de sensores ISFET pueden configurarse particularmente para ser sensibles a otros tipos de concentraciones de iones para una variedad de aplicaciones (se conocen materiales sensibles a otros iones como sodio, plata, hierro, bromo, yodo, calcio y nitrato, por ejemplo).

Más generalmente, una matriz de chemFET de acuerdo con varias realizaciones de la presente divulgación puede configurarse para ser sensible a uno o más de una variedad de analitos/sustancias químicas. En una realización, uno o más chemFET de una matriz pueden configurarse particularmente para la sensibilidad a uno o más analitos que representan uno o más eventos de unión (por ejemplo, asociados con un proceso de secuenciación de ácidos nucleicos), y en otras realizaciones diferentes chemFET de una matriz dada puede configurarse para la sensibilidad a diferentes analitos. Por ejemplo, en una realización, uno o más sensores (píxeles) de la matriz pueden incluir un primer tipo de chemFET configurado para ser químicamente sensible a un primer analito, y uno o más sensores de la matriz pueden incluir un segundo tipo de chemFET configurado para ser químicamente sensible a un segundo analito diferente del primer analito. En una implementación ilustrativa, el primer analito puede representar un primer evento de unión asociado con un proceso de secuenciación de ácidos nucleicos, y el segundo analito puede representar un segundo evento de unión asociado con el proceso de secuenciación de ácidos nucleicos. Por supuesto, debe apreciarse que se pueden emplear más de dos tipos diferentes de chemFET en cualquier matriz dada para detectar y/o medir diferentes tipos de analitos/eventos de unión. En general, debe apreciarse en cualquiera de las realizaciones de matrices de sensores analizados aquí que una matriz de sensores dada puede ser "homogénea" e incluir chemFET de tipos sustancialmente similares o idénticos para detectar y/o medir un mismo tipo de analito (por ejemplo, pH u otra concentración de iones), o una matriz de sensores puede ser "heterogénea" e incluir chemFET de diferentes tipos para detectar y/o medir diferentes analitos. Para simplificar la discusión, nuevamente el ejemplo de un ISFET se analiza a continuación en varias realizaciones de matrices de sensores, pero la presente descripción no está limitada a este respecto, y varias otras opciones para la sensibilidad del analito se analizan con más detalle a continuación (por ejemplo, en conexión con la Figura 11A).

En implementaciones ilustrativas basadas en técnicas de procesamiento CMOS de 0,35 micrómetros (o técnicas de procesamiento CMOS capaces de tamaños de características más pequeños), cada píxel de la matriz de ISFET 100 puede incluir un ISFET y los componentes de habilitación/selección que lo acompañan, y puede ocupar un área en una superficie de la matriz de aproximadamente diez micrómetros por diez micrómetros (es decir, 100 micrómetros²) o menos; dicho de otra manera, se pueden realizar matrices que tienen un paso (separación de píxel a píxel) del orden de 10 micrómetros o menos. Una separación de la matriz del orden de 10 micrómetros o menos utilizando una técnica de procesamiento CMOS de 0,35 micrómetros constituye una mejora significativa en términos de reducción

de tamaño con respecto a los intentos anteriores de fabricar matrices de ISFET, que dieron como resultado tamaños de píxeles del orden de al menos 12 micrómetros o mayor.

Más específicamente, en algunas realizaciones analizadas más adelante en base a los conceptos novedosos divulgados en este documento, una separación de la matriz de aproximadamente nueve (9) micrómetros permite una matriz de ISFET que incluye más de 256 000 píxeles (es decir, una matriz de 512 por 512), junto con la fila asociada y la selección de columna y la electrónica de polarización/lectura, que se fabricará en una pastilla de semiconductor de 7 milímetros por 7 milímetros, y una matriz de sensores similar que incluye más de cuatro millones de píxeles (es decir, una matriz de 2048 por 2048, más de 4 megapíxeles) que se fabricará en una pastilla de 21 milímetros por 21 milímetros. En otros ejemplos, una separación de la matriz de aproximadamente 5 micrómetros permite fabricar una matriz de ISFET que incluye aproximadamente 1,55 megapíxeles (es decir, una matriz de 1348 por 1152) y la electrónica asociada en una pastilla de 9 milímetros por 9 milímetros, y una matriz de sensores ISFET que incluye más de 14 megapíxeles y la electrónica asociada en una pastilla de 22 milímetros por 20 milímetros. En otras implementaciones más, utilizando un proceso de fabricación de CMOS en el que son posibles tamaños de características de menos de 0,35 micrómetros (por ejemplo, técnicas de procesamiento CMOS de 0,18 micrómetros), se pueden fabricar matrices de sensores ISFET con un paso significativamente inferior a 5 micrómetros (por ejemplo, una separación de la matriz de 2,6 micrómetros o un área de píxeles de menos de 8 o 9 micrómetros²), lo que proporciona matrices de ISFET significativamente densas. Por supuesto, debe apreciarse que pueden implementarse tamaños de píxel superiores a 10 micrómetros (por ejemplo, del orden de aproximadamente 20, 50, 100 micrómetros o más) en varias realizaciones de matrices de chemFET según la presente divulgación.

En otros aspectos del sistema que se muestra en la Figura 8, se pueden emplear uno o más controladores de matriz 250 para operar la matriz de ISFET 100 (por ejemplo, seleccionar/habilitar píxeles respectivos de la matriz para obtener señales de salida que representen mediciones de analitos). En varias implementaciones, uno o más componentes que constituyen uno o más controladores de matriz pueden implementarse junto con elementos de píxeles de las propias matrices, en el mismo chip de circuito integrado (IC) que la matriz pero en una porción diferente del chip de IC, o sin chip. En relación con el control de matriz, la conversión de analógico a digital de las señales de salida del ISFET se puede realizar mediante circuitos implementados en el mismo chip de circuito integrado que la matriz de ISFET, pero ubicada fuera de la región de la matriz de sensores (la ubicación de los circuitos de conversión de analógico a digital fuera de la región de la matriz de sensores permite un paso más pequeño y, por lo tanto, una mayor cantidad de sensores, así como un ruido reducido). En varias implementaciones ilustrativas analizadas más adelante, la conversión de analógico a digital puede ser de 4 bits, 8 bits, 12 bits, 16 bits u otras resoluciones de bits dependiendo del rango dinámico de señal requerido.

Habiendo proporcionado una visión general del papel de una matriz de chemFET 100 (por ejemplo, ISFET) en un sistema 1000 ilustrativo para medir uno o más analitos en relación con el procesamiento de ácidos nucleicos, a continuación se encuentran descripciones más detalladas de matrices de chemFET ilustrativas de acuerdo con varias realizaciones novedosas de la presente divulgación que pueden emplearse en una variedad de aplicaciones que incluyen, entre otras, el procesamiento de ácidos nucleicos. Nuevamente, con fines ilustrativos, las matrices de chemFET según la presente descripción se analizan a continuación usando el ejemplo particular de una matriz de ISFET, pero se pueden emplear otros tipos de chemFET en realizaciones alternativas.

Como se indicó anteriormente, varias realizaciones novedosas divulgadas en este documento mejoran específicamente el diseño de matriz de ISFET de Milgrew y otros analizado anteriormente en relación con las Figuras 1-7, así como otros diseños de matriz de ISFET anteriores, para reducir significativamente el tamaño de píxel y la separación de la matriz y, por lo tanto, aumentar la cantidad de píxeles de una matriz de ISFET para un tamaño de la pastilla de semiconductor dado (es decir, aumentar la densidad de píxeles). En algunas implementaciones, se logra un aumento en la densidad de píxeles y, al mismo tiempo, aumenta la relación señal-ruido (SNR) de las señales de salida correspondientes a las mediciones respectivas relacionadas con una o más propiedades químicas de uno o más analitos y la velocidad a la que tales señales de salida pueden leerse de la matriz. En particular, los solicitantes han reconocido y apreciado que al relajar los requisitos para la linealidad de ISFET y enfocarse en un rango de medición/salida de señal más limitado (por ejemplo, salidas de señal correspondientes a un rango de pH de aproximadamente 7 a 9 en lugar de 1 a 14), la complejidad y el tamaño de los píxeles individuales pueden reducirse significativamente, lo que facilita la realización de matrices de ISFET densas a muy gran escala.

Con este fin, la Figura 9 ilustra una columna 102_j de una matriz de ISFET 100, según la realización preferida de la presente divulgación, en la que el diseño de píxeles ISFET se simplifica considerablemente para facilitar un tamaño de píxel pequeño. La columna 102_j incluye n píxeles, el primero y el último de los cuales se muestran en la Figura 9 como los píxeles 105_i y 105_n . Como se analiza más adelante en relación con la Figura 13, una matriz 100 de ISFET bidimensional completa basada en el diseño de columna que se muestra en la Figura 9 incluye m columnas 102_j ($j = 1, 2, 3, \dots, m$) con columnas sucesivas de píxeles generalmente dispuestos uno al lado del otro.

De acuerdo con la realización preferida que se muestra en la Figura 9, cada píxel 105_i a 105_n de la columna 102_j incluye solo tres componentes, a saber, un ISFET 150 (también marcado como Q1) y dos conmutadores MOSFET Q2 y Q3. Los conmutadores MOSFET Q2 y Q3 responden ambos a una de n señales de selección de fila (SeldeFila_i

a SeldeFila_n, lógica baja activa) para habilitar o seleccionar un píxel dado de la columna 102_j. Utilizando el píxel 105_i como ejemplo que se aplica a todos los píxeles de la columna, el conmutador de transistor Q3 acopla una fuente de corriente controlable 106_j a través de la línea 112_i a la fuente del ISFET 150 al recibir la señal de selección de fila correspondiente a través de la línea 118_i. El conmutador de transistor Q2 acopla la fuente del ISFET 150 al circuito de polarización/lectura de columna 110_j a través de la línea 114_i al recibir la señal de selección de fila correspondiente. El drenaje del ISFET 150 está directamente acoplado a través de la línea 116_i al circuito de polarización/lectura 110_j. Por lo tanto, solo se requieren cuatro líneas de señal por píxel, a saber, las líneas 112_i, 114_i, 116_i and 118_i, para operar los tres componentes del píxel 105_i. En una matriz de m columnas, una señal de selección de fila dada se aplica simultáneamente a un píxel de cada columna (por ejemplo, en las mismas posiciones en las columnas respectivas).

Como se ilustra en la Figura 9, el diseño de la columna 102_j según una realización se basa en principios generales similares a los analizados anteriormente en relación con el diseño de la columna de Milgrew y otros mostrado en la Figura 3. En particular, el ISFET de cada píxel, cuando está habilitado, se configura con una corriente de drenaje constante I_{Dj} y una tensión de drenaje a fuente constante V_{DSj} para obtener una señal de salida V_{Sj} de un píxel habilitado de acuerdo con la ecuación. (3) anterior. Con este fin, la columna 102_j incluye una fuente de corriente controlable 106_j, acoplada a una tensión de suministro positivo de circuito analógico VDDA y que responde a una tensión de polarización VBI, que es compartida por todos los píxeles de la columna para proporcionar una corriente de drenaje constante I_{Dj} al ISFET de un píxel habilitado. En un aspecto, la fuente de corriente 106_j se implementa como un espejo de corriente que incluye dos MOSFET de longitud de canal largo y alta impedancia de salida. La columna también incluye un circuito de polarización/lectura 110_j que también es compartido por todos los píxeles de la columna para proporcionar una tensión de drenaje a fuente constante al ISFET de un píxel habilitado. El circuito de polarización/lectura 110_j se basa en una configuración de puente Kelvin e incluye dos amplificadores operacionales 107A (A1) y 107B (A2) configurados como amplificadores búfer y acoplados a la tensión de suministro positiva del circuito analógico VDDA y a la tensión de suministro a tierra analógica VSSA. El circuito de polarización/lectura también incluye un sumidero de corriente controlable 108_j (similar a la fuente de corriente 106_j) acoplado a la tierra analógica VSSA y que responde a una tensión de polarización VB2, y un MOSFET Q6 conectado a diodo. Las tensiones de polarización VB1 y VB2 se ajustan/controlan en tándem para proporcionar una fuente y una corriente de sumidero complementarias. La tensión desarrollada a través del MOSFET Q6 conectado a diodo como resultado de la corriente consumida por el sumidero de corriente 108_j es forzada por los amplificadores operacionales a aparecer a través del drenaje y la fuente del ISFET de un píxel habilitado como una tensión constante de drenaje-fuente V_{DSj} .

Empleando el MOSFET Q6 conectado a diodo en el circuito de polarización/lectura 110_j de la Figura 9, en lugar de la resistencia R_{SDj} como se muestra en el diseño de Milgrew y otros ilustrado en la Figura 3, se proporciona una ventaja significativa en un proceso de fabricación de CMOS; específicamente, las resistencias coincidentes se pueden fabricar con tolerancias de error generalmente del orden de $\pm 20\%$, mientras que la coincidencia de MOSFET en un proceso de fabricación de CMOS es del orden de $\pm 1\%$ o mejor. El grado en que el componente responsable de proporcionar una tensión constante de drenaje a fuente del ISFET V_{DSj} puede coincidir de columna a columna afecta significativamente la precisión de la medición (por ejemplo, compensación) de columna a columna. Por lo tanto, el empleo del MOSFET Q6 en lugar de una resistencia mitiga considerablemente las compensaciones de medición de columna a columna. Además, mientras que las características de deriva térmica de una resistencia y un ISFET pueden ser apreciablemente diferentes, las características de deriva térmica de un MOSFET y un ISFET son sustancialmente similares, si no virtualmente idénticas; por lo tanto, cualquier deriva térmica en MOSFET Q6 prácticamente cancela cualquier deriva térmica del ISFET Q1, lo que da como resultado una mayor estabilidad de medición con cambios en la temperatura de la matriz.

En la Figura 9, los circuitos de polarización/lectura de columna 110_j también incluyen circuitería adoptadora y de muestreo/ mantenimiento de nivel para proporcionar una señal de salida V_{COLj} desde la columna. En particular, después de habilitar o seleccionar uno de los píxeles 105_i a 105_n a través de los transistores Q2 y Q3 en cada píxel, la salida del amplificador 107A (A1), es decir, una V_{Sj} amortiguada, se almacena en una muestra de columna y en un condensador de almacenamiento C_{sh} a través del funcionamiento de un conmutador (por ejemplo, una puerta de transmisión) que responde a una muestra de columna y mantiene la señal COL SH. Los ejemplos de capacitancias adecuadas para el condensador de muestreo y almacenamiento incluyen, pero no se limitan a, un rango de aproximadamente 500fF a 2pF. La tensión muestreada se amortigua a través de un amplificador búfer de salida de columna 111_j (BUF) y se proporciona como la señal de salida de columna V_{COLj} . Como también se muestra en la Figura 9, se puede aplicar una tensión de referencia VREF al amplificador búfer 111_j, a través de un conmutador que responde a una señal de control CAL, para facilitar la caracterización de las faltas de uniformidad de columna a columna debido al amplificador búfer 111_j y así permitir corrección de datos posterior a la lectura.

La Figura 9A ilustra un diagrama de circuito ilustrativo para uno de los amplificadores 107A del circuito de polarización/lectura 110_j (el amplificador 107B se implementa de manera idéntica), y la Figura 9B es un gráfico de polarización del amplificador versus el ancho de banda para los amplificadores 107A y 107B. Como se muestra en la Figura 9A, el amplificador 107A emplea una disposición de múltiples espejos de corriente basada en nueve MOSFET (M1 a M9) y está configurado como un búfer de ganancia unitaria, en el que las entradas y salidas del amplificador están marcadas en general como IN+ y VOUT, respectivamente. La tensión de polarización VB4 (que

representa una corriente de polarización correspondiente) controla la transimpedancia del amplificador y sirve como control de ancho de banda (es decir, mayor ancho de banda con mayor corriente). Con referencia de nuevo a la Figura 9, debido al condensador de muestreo y almacenamiento C_{sh} , la salida del amplificador 107A activa esencialmente un filtro cuando el conmutador de muestreo y retención está cerrado. En consecuencia, para lograr tasas de datos apreciablemente altas, la tensión de polarización V_{B4} puede ajustarse para proporcionar corrientes de polarización más altas y un mayor ancho de banda del amplificador. A partir de la Figura 9B, se puede observar que en algunas implementaciones ilustrativas, se pueden realizar anchos de banda del amplificador de al menos 40 MHz y significativamente mayores. En algunas implementaciones, los anchos de banda del amplificador de hasta 100 MHz pueden ser apropiados para facilitar altas tasas de adquisición de datos y tiempos de "permanencia" o muestreo de píxeles relativamente más bajos (por ejemplo, del orden de 10 a 20 microsegundos).

En otro aspecto de la realización que se muestra en la Figura 9, a diferencia del diseño de píxeles de Milgrew y otros mostrado en la Figura 3, los píxeles 105_1 a 105_n no incluyen ninguna puerta de transmisión u otros dispositivos que requieran componentes FET de canal n y canal p; en particular, los píxeles 105_1 a 105_n de esta realización incluyen solo dispositivos FET del mismo tipo (es decir, solo canal n o solo canal p). Con fines ilustrativos, los píxeles 105_1 y 105_n ilustrados en la Figura 9 se muestran comprendiendo solo componentes de canal p, es decir, dos MOSFET de canal p Q2 y Q3 y un ISFET 150 de canal p. Al no emplear una puerta de transmisión para acoplar la fuente del ISFET al circuito de polarización/lectura 110j, se puede sacrificar parte de rango dinámico para la señal de salida del ISFET (es decir, la tensión V_S de la fuente del ISFET). Sin embargo, los solicitantes han reconocido y apreciado que al prescindir potencialmente de algún rango dinámico de la señal de salida (y, por lo tanto, limitar potencialmente el rango de medición para una propiedad química determinada, como el pH), el requisito de diferentes tipos de dispositivos FET (tanto de canal n como de canal p) en cada píxel puede eliminarse y el recuento de componentes de píxeles puede reducirse. Como se analiza más adelante en relación con las Figuras 10-12, esto facilita significativamente la reducción del tamaño de los píxeles. Por lo tanto, en un aspecto, existe una compensación beneficiosa entre un rango dinámico reducido y un tamaño de píxel más pequeño.

En otro aspecto más de la realización que se muestra en la Figura 9, a diferencia del diseño de píxeles de Milgrew y otros, el ISFET 150 de cada píxel 105_1 a 105_n no tiene su conexión de cuerpo vinculada a su fuente (es decir, no hay conductor eléctrico que acopla la conexión del cuerpo y la fuente del ISFET de manera que se ven obligados a tener el mismo potencial eléctrico durante el funcionamiento). Más bien, las conexiones del cuerpo de todos los ISFET de la matriz están unidas entre sí y a una tensión de polarización del cuerpo V_{CUERPO} . Si bien no se muestra explícitamente en la Figura 9, las conexiones del cuerpo para los MOSFET Q2 y Q3 tampoco están vinculadas a sus fuentes respectivas, sino a la tensión de polarización del cuerpo V_{CUERPO} . En una implementación ilustrativa basada en píxeles que tienen todos los componentes del canal p, la tensión de polarización del cuerpo V_{CUERPO} se acopla al potencial de tensión más alto disponible para la matriz (por ejemplo, VDDA), como se analiza más adelante en relación con la Figura 17.

Al no vincular la conexión del cuerpo de cada ISFET a su fuente, la posibilidad de que exista una tensión de la fuente a cuerpo distinto de cero V_{SB} puede dar lugar al "efecto del cuerpo", como se analizó anteriormente en relación con la Figura 1, que afecta la tensión umbral V_{TH} del ISFET de acuerdo con una relación no lineal (y por lo tanto, de acuerdo con la ecuación. (3), puede afectar las mediciones de propiedades químicas, como el pH). Sin embargo, los solicitantes han reconocido y apreciado que al enfocarse en un rango dinámico de señal de salida de ISFET reducido, cualquier efecto de cuerpo que pueda surgir en el ISFET a partir de una tensión de la fuente a cuerpo distinto de cero puede ser relativamente mínimo. Por lo tanto, cualquier no linealidad de medición que pueda resultar sobre el rango dinámico reducido puede ignorarse como insignificante o tomarse en consideración y compensarse (por ejemplo, a través de técnicas de procesamiento de datos y calibración de matriz, como se analiza más adelante en relación con la Figura 17). Los solicitantes también han reconocido y apreciado que al no vincular cada fuente ISFET a su conexión de cuerpo, todos los FET que constituyen el píxel pueden compartir una conexión de cuerpo común, lo que facilita aún más la reducción del tamaño del píxel, como se analiza más adelante en relación con las Figuras 10-12. En consecuencia, en otro aspecto, existe una compensación beneficiosa entre linealidad reducida y tamaño de píxel más pequeño.

La Figura 10 ilustra una vista desde arriba de un diseño de disposición de chip para el píxel 105_1 que se muestra en la Figura 9, según una realización novedosa de la presente divulgación. La Figura 11A muestra una vista transversal compuesta a lo largo de la línea I-I del píxel que se muestra en la Figura 10, que incluye elementos adicionales en la mitad derecha de la Figura 10 entre las líneas II-II y III-III, que ilustra una vista capa por capa de la fabricación de píxeles, y las Figuras 12A a 12L proporcionan vistas superiores de cada una de las capas de fabricación que se muestran en la Figura 11A (las imágenes respectivas de las Figuras 12A a 12L se superponen una encima de otra para crear el diseño de la disposición de los chips de píxeles que se muestra en la Figura 10). En una implementación ilustrativa, el diseño de píxeles ilustrado en las Figuras 10-12 puede realizarse utilizando un proceso CMOS estándar de 4 metales, 2 poli, 0,35 micrómetros para proporcionar un píxel geoméricamente cuadrado que tiene una dimensión "e" como se muestra en la Figura 10 de aproximadamente 9 micrómetros, y una dimensión "f" correspondiente al área sensible del ISFET de aproximadamente 7 micrómetros.

En la vista superior de la Figura 10, el ISFET 150 (marcado como Q1 en la Figura 10) generalmente ocupa la porción central derecha de la ilustración de píxeles, y las ubicaciones respectivas de la puerta, la fuente y el drenaje

del ISFET se indican como Q1_G, Q1_S y Q1_D. Los MOSFET Q2 y Q3 generalmente ocupan la porción central izquierda de la ilustración de píxeles; la puerta y la fuente del MOSFET Q2 se indican como Q2_G y Q2_S, y la puerta y la fuente del MOSFET Q3 se indican como Q3_G y Q3_S. En un aspecto de la disposición que se muestra en la Figura 10, los MOSFET Q2 y Q3 comparten un drenaje, indicado como Q2/3_D. En otro aspecto, se puede observar generalmente desde la vista superior de la Figura 10 que el ISFET está formado de manera que su canal se encuentra a lo largo de un primer eje del píxel (por ejemplo, paralelo a la línea I--I), mientras que los MOSFET Q2 y Q3 están formados de manera que sus canales se encuentran a lo largo de un segundo eje perpendicular al primer eje. La Figura 10 también muestra las cuatro líneas requeridas para operar el píxel, a saber, la línea 112_i acoplada a la fuente de Q3, la línea 114_i acoplada a la fuente de Q2, la línea 116_i acoplada al drenaje del ISFET, y la línea de selección de fila 118_i acoplada a las puertas de Q2 y Q3. Con referencia a la Figura 9, se puede apreciar que todos los píxeles de una columna determinada comparten las líneas 112, 114 y 116 (por ejemplo, que se extiende verticalmente el píxel de la Figura 10), y que todos los píxeles de una fila determinada comparten la línea 118 (por ejemplo, que se extiende horizontalmente a través del píxel en la Figura 10); por lo tanto, según el diseño de píxeles de la Figura 9 y la disposición que se muestra en la Figura 10, solo es necesario que cuatro líneas metálicas atraviesen cada píxel.

Con referencia ahora a la vista en sección transversal de la Figura 11A, las regiones de tipo p altamente dopadas 156 y 158 (que se encuentran a lo largo de la línea I--I en la Figura 10) en el pocillo n 154 constituyen la fuente (S) y el drenaje (D) del ISFET, entre los cuales se encuentra una región 160 del pocillo n en el que se forma el canal p de los ISFET debajo de la puerta de polisilicio de los ISFET 164 y un óxido de puerta 165. De acuerdo con un aspecto de la realización novedosa que se muestra en las Figuras 10 y 11, todos los componentes FET del píxel 105_i se fabrican como FET de canal p en el único pocillo de tipo n 154 formado en un sustrato semiconductor de tipo p 152. Esto es posible porque, a diferencia del diseño de Milgrew y otros, 1) no se requiere una puerta de transmisión en el píxel; y 2) la fuente de los ISFET no está vinculada a la conexión del cuerpo del pocillo n. Más específicamente, las regiones de tipo n altamente dopadas 162 proporcionan una conexión del cuerpo (B) al pocillo n 154 y, como se muestra en la Figura 10, la conexión del cuerpo B está acoplada a un conductor de metal 322 alrededor del perímetro del píxel 105_i. Sin embargo, la conexión del cuerpo no está directamente acoplada eléctricamente a la región de la fuente 156 del ISFET (es decir, no hay un conductor eléctrico que acople la conexión del cuerpo y la fuente de manera que se vean obligados a tener el mismo potencial eléctrico durante el funcionamiento), ni tampoco la conexión del cuerpo directamente acoplada eléctricamente a la puerta, fuente o drenaje de cualquier componente en el píxel. Por lo tanto, los otros componentes FET de canal p del píxel, a saber, Q2 y Q3, pueden fabricarse en el mismo pocillo n 154.

En la vista transversal compuesta de la Figura 11A, también se ve una región de tipo p 159 altamente dopada (que se encuentra a lo largo de la línea I--I en la Figura 10), correspondiente al drenaje compartido (D) de los MOSFET Q2 y Q3. A modo de ilustración, una puerta de polisilicio 166 del MOSFET Q3 también es visible en la Figura 11A, aunque esta puerta no se encuentra a lo largo de la línea I--I en la Figura 10, sino "detrás del plano" de la sección transversal a lo largo de la línea I--I. Sin embargo, para simplificar, las fuentes respectivas de los MOSFET Q2 y Q3 que se muestran en la Figura 10, así como la puerta de Q2, no son visibles en la Figura 11A, ya que se encuentran a lo largo del mismo eje (es decir, perpendiculares al plano de la figura) como el desagüe compartido (si se muestran en la Figura 11A, estos elementos complicarían indebidamente la vista de sección transversal compuesta de la Figura 11A).

Encima de las capas de sustrato, óxido de puerta y polisilicio que se muestran en la Figura 11A, se proporcionan varias capas adicionales para establecer conexiones eléctricas con los diversos componentes de píxeles, incluidas capas metálicas alternas y capas de óxido a través de las cuales se forman vías conductoras. De acuerdo con el proceso CMOS de 4 metales, estas capas están marcadas en la Figura 11A como "Contacto", "Metal1", "Vía1", "Metal2", "Vía2", "Metal3", "Vía3" y "Metal4". Para facilitar una comprensión particular de las conexiones eléctricas del ISFET, la vista de sección transversal compuesta de la Figura 11A muestra elementos adicionales de la fabricación de píxeles en el lado derecho de la vista superior de la Figura 10 entre las líneas II--II y III--III. Con respecto a las conexiones eléctricas de los ISFET, la capa metálica superior 304 corresponde al área sensible de los ISFET 178, encima de la cual se dispone una capa de pasivación sensible al analito 172. La capa metálica superior 304, junto con la puerta de polisilicio del ISFET 164 y los conductores intermedios 306, 308, 312, 316, 320, 326 y 338, forman la estructura de "puerta flotante" del ISFET 170, de manera similar a la analizada anteriormente en conexión con un diseño de ISFET convencional que se muestra en la Figura 1. Los conductores 340, 328, 318, 314 y 310 acoplados a la línea 116_i proporcionan una conexión eléctrica al drenaje de los ISFET. La fuente de ISFET está acoplada al drenaje compartido de los MOSFET Q2 y Q3 a través de los conductores 334 y 336 y el conductor 324 (que se encuentra a lo largo de la línea II en la Figura 10). Las conexiones del cuerpo 162 al pocillo n 154 están eléctricamente acopladas a un conductor de metal 322 alrededor del perímetro del píxel en la capa "Metal1" a través de los conductores 330 y 332.

Como se indicó anteriormente, las Figuras 12A a 12L proporcionan vistas superiores de cada una de las capas de fabricación que se muestran en la Figura 11A (las imágenes respectivas de las Figuras 12A a 12L se superponen una encima de otra para crear el diseño de la disposición de chips de píxeles que se muestra en la Figura 10). En la Figura 12, la correspondencia entre las vistas superiores marcadas con letras de las capas respectivas y la vista en sección transversal de la Figura 11A es la siguiente: A) pocillo de tipo n 154; B) Implante; C) Difusión; D) puertas de

polisilicio 164 (ISFET) y 166 (MOSFET Q2 y Q3); E) contactos; F) Metal1; G) Vía1; H) Metal2; I) Vía2; J) Metal3; K) Vía3; L) Metal4 (electrodo superior en contacto con la puerta del ISFET). Los diversos números de referencia indicados en las Figuras 12A a 12L corresponden a las características idénticas que están presentes en la vista en sección transversal compuesta de la Figura 11A.

Por lo tanto, el diseño de la disposición de chips de píxeles que se muestra en las Figuras 10, 11 y 12A a 12L ilustran que, según una realización, se pueden emplear dispositivos FET del mismo tipo para todos los componentes del píxel, y que todos los componentes se pueden implementar en un solo pocillo. Esto reduce drásticamente el área requerida para el píxel, lo que facilita una mayor densidad de píxeles en un área determinada.

En una implementación ilustrativas, el óxido de puerta 165 para el ISFET puede fabricarse para que tenga un espesor del orden de aproximadamente 75 Angstroms, dando lugar a una capacitancia de óxido de puerta por unidad de área C_{ox} de $4,5 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$. Además, la puerta de polisilicio 164 puede fabricarse con dimensiones correspondientes a un ancho de canal W de $1,2 \mu\text{m}$ y una longitud de canal L de $0,35$ a $0,6 \mu\text{m}$ (es decir, W/L que varía de aproximadamente 2 a 3,5), y el dopaje de la región 160 puede seleccionarse de modo que la movilidad de la portadora para el canal p sea de $190 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ (es decir, $1,9\text{E}10 \mu\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$). De la Ec. (2) anterior, esto da como resultado un parámetro de transconductancia de ISFET β del orden de aproximadamente 170 a $300 \mu\text{A}/\text{V}^2$. En otros aspectos de esta implementación ilustrativa, la tensión de suministro analógico V_{DDA} es de $3,3$ voltios, y $VB1$ y $VB2$ están polarizados para proporcionar una corriente de drenaje de ISFET constante I_{Dj} del orden de $5 \mu\text{A}$ (en algunas implementaciones, $VB1$ y $VB2$ pueden ser ajustados para proporcionar corrientes de drenaje de aproximadamente $1 \mu\text{A}$ a $20 \mu\text{A}$). Además, el MOSFET Q6 (consulte el circuito de polarización/lectura 110j en la Figura 9) está dimensionado para tener una relación de ancho a largo del canal (por ejemplo, W/L de aproximadamente 50) tal que la tensión a través de Q6, dado I_{Dj} de $5 \mu\text{A}$, es de 800 mV (es decir, $V_{DSj} = 800 \text{ mV}$). De la Ec. (3), en base a estos parámetros ilustrativos, esto proporciona tensiones de salida de píxeles V_{Sj} en un rango de aproximadamente $0,5$ a $2,5$ voltios para cambios de tensión de umbral del ISFET en un rango de aproximadamente 0 a 2 voltios.

Con respecto a la capa de pasivación sensible al analito 172 que se muestra en la Figura 11A, en implementaciones ilustrativas de CMOS, la capa de pasivación puede ser significativamente sensible a la concentración de iones de hidrógeno y puede incluir nitruro de silicio (Si_3N_4) y/u oxinitruro de silicio ($\text{Si}_2\text{N}_2\text{O}$). En los procesos CMOS convencionales, una capa de pasivación puede estar formada por una o más deposiciones sucesivas de estos materiales, y se emplea generalmente para tratar o recubrir dispositivos para protegerlos contra la contaminación y aumentar la estabilidad eléctrica. Las propiedades del material del nitruro de silicio y el oxinitruro de silicio son tales que una capa de pasivación que comprende estos materiales brinda protección contra rayones y sirve como una barrera importante para la difusión de agua y sodio, lo que puede causar que la metalización del dispositivo se corroa y/o que el funcionamiento del dispositivo se vuelva inestable. Una capa de pasivación que incluye nitruro de silicio y/o oxinitruro de silicio también proporciona sensibilidad a los iones en los dispositivos ISFET, ya que la capa de pasivación contiene grupos superficiales que pueden donar o aceptar protones de una solución de analito con la que están en contacto, alterando así el potencial de la superficie y la tensión umbral del dispositivo V_{TH} , como se analizó anteriormente en relación con la Figura 1.

Para los procesos CMOS que involucran aluminio como metal (que tiene un punto de fusión de aproximadamente 650 grados Celsius), generalmente se forma una capa de pasivación de nitruro de silicio y/u oxinitruro de silicio a través de la deposición de vapor químico mejorada con plasma (PECVD), en la cual una descarga luminiscente a 250 - 350 grados Celsius ioniza los gases constituyentes que forman nitruro de silicio u oxinitruro de silicio, creando especies activas que reaccionan en la superficie de la oblea para formar un laminado de los materiales respectivos. En un proceso ilustrativo, se puede formar una capa de pasivación que tiene un espesor del orden de aproximadamente $1,0$ a $1,5 \mu\text{m}$ mediante una deposición inicial de una capa delgada de oxinitruro de silicio (del orden de $0,2$ a $0,4 \mu\text{m}$) seguida de una deposición levemente más gruesa de oxinitruro de silicio (del orden de $0,5 \mu\text{m}$) y una deposición final de nitruro de silicio (del orden de $0,5 \mu\text{m}$). Debido a la baja temperatura de deposición involucrada en el proceso PECVD, la metalización del aluminio no se ve afectada negativamente.

Sin embargo, los solicitantes han reconocido y apreciado que, si bien un proceso PECVD de baja temperatura proporciona una pasivación adecuada para los dispositivos CMOS convencionales, el proceso de baja temperatura da como resultado una capa de pasivación generalmente de baja densidad y algo porosa, que en algunos casos puede afectar negativamente la estabilidad de la tensión umbral del ISFET. En particular, durante el funcionamiento del dispositivo ISFET, una capa de pasivación porosa de baja densidad con el tiempo puede absorber y saturarse con iones de la solución, lo que a su vez puede causar una deriva variable en el tiempo indeseable en la tensión umbral V_{TH} de los ISFET, haciendo desafiante lograr mediciones precisas.

En vista de lo anterior, en una realización se puede emplear un proceso CMOS que usa metal de tungsteno en lugar de aluminio para fabricar matrices de ISFET según la presente divulgación. La alta temperatura de fusión del tungsteno (superior a 3400 grados Celsius) permite el uso de un proceso de deposición química de vapor a baja presión (LPCVD) a mayor temperatura (por ejemplo, aproximadamente 700 a 800 grados Celsius) para una capa de pasivación de nitruro de silicio u oxinitruro de silicio. El proceso LPCVD suele dar como resultado películas significativamente más densas y menos porosas para la capa de pasivación, lo que mitiga los efectos

potencialmente adversos de la absorción de iones de la solución de analito que conduce a la deriva de la tensión umbral de ISFET.

En otra realización más en la que se emplea un proceso CMOS basado en aluminio para fabricar matrices de ISFET de acuerdo con la presente divulgación, la capa de pasivación 172 que se muestra en la Figura 11A puede comprender deposiciones y/o materiales adicionales más allá de los empleados típicamente en un proceso CMOS convencional. Por ejemplo, la capa de pasivación 172 puede incluir deposiciones iniciales asistidas por plasma a baja temperatura (PECVD) de nitruro de silicio y/u oxinitruro de silicio como se analizó anteriormente; para fines del presente análisis, estas deposiciones convencionales se ilustran en la Figura 11A como una primera porción 172A de la capa de pasivación 172. En una realización, después de la primera porción 172A, se disponen uno o más materiales de pasivación adicionales para formar al menos una segunda porción 172B para aumentar la densidad y reducir la porosidad (y la absorción) de la capa de pasivación general 172. Si bien una porción adicional 172B se muestra principalmente con fines ilustrativos en la Figura 11A, debe apreciarse que la descripción no está limitada a este respecto, ya que la capa de pasivación general 172 puede comprender dos o más porciones constituyentes, en las que cada porción puede comprender una o más capas/deposiciones de materiales iguales o diferentes, y las porciones respectivas pueden configurarse de manera similar o diferente.

[109] Los ejemplos de materiales adecuados para la segunda porción 172B (u otras porciones adicionales) de la capa de pasivación 172 para una sensibilidad particular a los iones de hidrógeno incluyen, entre otros, nitruro de silicio, oxinitruro de silicio, óxido de aluminio (Al_2O_3), óxido de tantalio (Ta_2O_5), óxido de estaño (SnO_2) y dióxido de silicio (SiO_2). En un aspecto, la segunda porción 172B (u otras porciones adicionales) se puede depositar a través de una variedad de procesos de temperatura relativamente baja que incluyen, entre otros, pulverización iónica de RF, pulverización iónica de magnetrón de CC, evaporación térmica o por haz de electrones y deposiciones asistidas por iones. En otro aspecto, se puede emplear un proceso de grabado previo a la pulverización iónica, antes de la deposición de la segunda porción 172B, para eliminar cualquier óxido nativo que resida en la primera porción 172A (alternativamente, se puede utilizar un entorno reductor, tal como un entorno de hidrógeno a temperatura elevada para eliminar el óxido nativo que reside en la primera porción 172A). En otro aspecto más, el grosor de la segunda porción 172B puede ser del orden de aproximadamente 0,04 μm a 0,06 μm (400 a 600 Angstroms) y el grosor de la primera porción puede ser del orden de 1,0 a 1,5 μm , como se ha analizado anteriormente. En algunas implementaciones ilustrativas, la primera porción 172A puede incluir múltiples capas de oxinitruro de silicio y nitruro de silicio con un espesor combinado de 1,0 a 1,5 μm , y la segunda porción 172B puede incluir una sola capa de óxido de aluminio u óxido de tantalio con un espesor de aproximadamente 400 a 600 Angstroms. Nuevamente, debe apreciarse que los espesores ilustrativos anteriores se proporcionan principalmente con fines ilustrativos, y que la divulgación no se limita a estos aspectos.

Por lo tanto, debe entenderse que las matrices de chemFET descritas en el presente documento pueden usarse para detectar varios analitos y, al hacerlo, pueden monitorear una variedad de reacciones y/o interacciones. También debe entenderse que el énfasis en la detección de iones de hidrógeno (en forma de un cambio de pH) es por comodidad y brevedad y que otros analitos (incluidos otros iones) pueden sustituir al hidrógeno en estas descripciones.

Los chemFET, incluidos los ISFET, descritos en este documento son capaces de detectar cualquier analito que sea capaz de inducir un cambio en el campo eléctrico. No es necesario cargar el analito para que el sensor lo detecte. Por ejemplo, dependiendo de la realización, el analito puede ser cargado positivamente (es decir, un catión), cargado negativamente (es decir, un anión), zwitteriónico (es decir, capaz de tener dos cargas iguales y opuestas pero neutral en general) y polar pero neutral. Esta lista no pretende ser exhaustiva, ya que los expertos en el arte contemplarán fácilmente otras clases de analitos, así como especies dentro de cada clase, basándose en la descripción proporcionada en este documento.

En el sentido más amplio de la invención, la capa de pasivación puede o no estar recubierta y el analito puede interactuar o no con la capa de pasivación. Como ejemplo, la capa de pasivación puede estar compuesta por nitruro de silicio y el analito puede ser algo distinto de los iones de hidrógeno. Como ejemplo específico, la capa de pasivación puede estar compuesta por nitruro de silicio y el analito puede ser pirofosfato inorgánico (PPI). En estos casos, PPI se detecta directamente (es decir, en ausencia de receptores de PPI unidos a la capa de pasivación directa o indirectamente).

Si el analito que se detecta es hidrógeno (o, alternativamente, hidróxido), entonces es preferible utilizar tampones débiles para que los cambios en cualquiera de las especies iónicas puedan detectarse en la capa de pasivación. Si el analito que se está detectando no es hidrógeno (o hidróxido) pero existe alguna posibilidad de un cambio de pH en la solución durante el paso de reacción o detección, entonces es preferible usar un tampón fuerte para que los cambios en el pH no interfieran con la detección del analito. Un tampón es una molécula iónica que resiste los cambios de pH. Los tampones pueden neutralizar los ácidos o bases agregados o generados en una solución, lo que no produce un cambio de pH efectivo en la solución. Debe entenderse que cualquier tampón es adecuado siempre que tenga un pKa en el rango deseado. Un tampón adecuado es uno que funciona en un rango de pH de 6 a 9, y con mayor preferencia de 6,5 a 8,5. La fuerza de un tampón es un término relativo, ya que depende de la naturaleza, la fuerza y la concentración del ácido o la base agregados o generados en la solución de interés. Un

tampón débil es un tampón que permite la detección (y por lo tanto no puede controlar) de cambios de pH de al menos +/- 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,45, 0,50 o más. En algunas realizaciones, el cambio de pH es del orden de aproximadamente 0,005 (por ejemplo, por incorporación de nucleótido) y es preferiblemente un aumento en el pH. Un tampón fuerte es un tampón que controla los cambios de pH de al menos +/- 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,45, 0,50 o más. La fuerza del tampón se puede variar variando la concentración de la propia especie tampón. Por lo tanto, los tampones de baja concentración pueden ser tampones de baja fuerza. Los ejemplos incluyen aquellos que tienen menos de 1 mM (por ejemplo, 50-100 μ M) de especies tampón. Un ejemplo no limitativo de un tampón débil adecuado para las reacciones de secuenciación descritas en el presente documento en el que el cambio de pH es la lectura es Tris o Tricina de 0,1 mM. En los ejemplos se proporcionan ejemplos de tampones débiles adecuados y también se conocen en el arte. Los tampones de mayor concentración pueden ser tampones más fuertes. Los ejemplos incluyen aquellos que tienen especies tampón de 1-25 mM. Un ejemplo no limitativo de un tampón fuerte adecuado para las reacciones de secuenciación descritas en el presente documento en donde se lee PPI es directamente Tris o Tricina de 1,5 o 25 mM (o más). Un experto en el arte será capaz de determinar el tampón óptimo para su uso en las reacciones y métodos de detección abarcados por la invención.

En algunas realizaciones, la capa de pasivación y/o las moléculas recubiertas en la misma dictan la especificidad del analito de la lectura de la matriz.

La detección de iones de hidrógeno (en forma de pH) se puede realizar utilizando una capa de pasivación de nitrato de silicio (Si_3N_4), oxinitrato de silicio ($\text{Si}_2\text{N}_2\text{O}$), óxido de silicio (SiO_2), óxido de aluminio (Al_2O_3), pentóxido de tantalio (Ta_2O_5), óxido de estaño u óxido estannico (SnO_2), y similares.

La capa de pasivación también puede detectar otras especies de iones directamente, incluidos, entre otros, calcio, potasio, sodio, yoduro, magnesio, cloruro, litio, plomo, plata, cadmio, nitrato, fosfato, dihidrógeno fosfato y similares.

En algunas realizaciones, la capa de pasivación está recubierta con un receptor para el analito de interés. El receptor se une selectivamente al analito de interés. Como se usa aquí, un receptor que se une selectivamente a un analito es una molécula que se une preferentemente a ese analito (es decir, su afinidad de unión por ese analito es mayor que su afinidad de unión por cualquier otro analito). Su afinidad de unión por el analito de interés puede ser de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 100 veces o más que su afinidad de unión por cualquier otro analito. Además de su afinidad de unión relativa, el receptor también debe tener una afinidad de unión absoluta que sea suficientemente alta para unirse de manera eficiente al analito de interés (es decir, debe tener una sensibilidad suficiente). Son adecuados los receptores que tienen afinidades de unión en el rango picomolar a micromolar. Preferiblemente tales interacciones son reversibles.

El receptor puede ser de cualquier naturaleza (por ejemplo, químico, ácido nucleico, péptido, lípido, combinaciones de los mismos y similares). El analito también puede ser de cualquier naturaleza siempre que exista un receptor que se una a él de forma selectiva y, en algunos casos, específicamente. Sin embargo, debe entenderse que la invención contempla además la detección de analitos en ausencia de un receptor. Un ejemplo de esto es la detección de PPI y Pi por la capa de pasivación en ausencia de receptores PPI o Pi.

En un aspecto, la invención contempla receptores que son ionóforos. Como se usa en este documento, un ionóforo es una molécula que se une selectivamente a una especie iónica, ya sea un anión o un catión. En el contexto de la invención, el ionóforo es el receptor y el ion al que se une es el analito. Los ionóforos de la invención incluyen ionóforos portadores reconocidos en la técnica (es decir, moléculas pequeñas solubles en lípidos que se unen a un ion particular) derivados de microorganismos. Varios ionóforos están disponibles comercialmente de fuentes tales como Calbiochem.

La detección de algunos iones se puede lograr mediante el uso de la propia capa de pasivación o mediante el uso de receptores que recubren la capa de pasivación. Por ejemplo, el potasio puede detectarse selectivamente utilizando polisiloxano, valinomicina o salinomicina; el sodio se puede detectar selectivamente utilizando monensina, nistatina o SQI-Pr; el calcio se puede detectar selectivamente usando ionomicina, calcimicina (A23187) o CA 1001 (ETH 1001).

En algunos casos, también se pueden usar receptores capaces de unirse a más de un ion. Por ejemplo, la beauvericina se puede usar para detectar iones de calcio y/o bario, la nigericina se puede usar para detectar iones de potasio, hidrógeno y/o plomo, y la gramicidina se puede usar para detectar iones de hidrógeno, sodio y/o potasio. Un experto en el arte reconocerá que estos compuestos pueden usarse en aplicaciones en las que no se requiere especificidad de ion único o en las que es poco probable (o imposible) que estén presentes o que se generen otros iones a los que se unen los compuestos.

En otras realizaciones, que incluyen pero no se limitan a aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos, se pueden usar receptores que se unen selectivamente a pirofosfato inorgánico (PPI). Los ejemplos de receptores de PPI incluyen los compuestos que se muestran en la Figura 11B (compuestos 1-10). El compuesto 1 se describe en Angew Chem Int Ed 2004 43: 4777-4780 y US 2005/0119497 A1 y se denomina p-naftil-bis[(bis(2-

piridilmetil)amino)metil]fenol. El compuesto 2 se describe en J Am Chem Soc 2003 125: 7752-7753 y US 2005/0119497 A1 y se denomina p-(p-nitrofenilazo)-bis[bis(2-piridilmetil-1)amino)metil]fenol (o su complejo dinuclear Zn). El compuesto 3 se describe en Sensors and Actuators B 1995 29:324-327. El compuesto 4 se describe en Angew Chem Int Ed 2002 41 (20): 3811-3814. El compuesto 5 se describe en WO 2007/002204 y se denomina allí bis-Zn²⁺-dipicolilamina (Zn²⁺-DPA). Los esquemas de síntesis para los compuestos 1 y 2 se muestran en US 2005/0119497 A1. En la Figura 11C se muestra una síntesis ilustrativa para el compuesto 4. La unión del compuesto 10 a una superficie de óxido metálico se muestra en la Figura 11E.

Como otro ejemplo, los receptores para neurotoxinas se describen en Simonian Electroanalysis 2004, 16: 1896-1906.

Los receptores se pueden unir a la capa de pasivación de forma covalente o no covalente. La unión covalente de un receptor a la capa de pasivación puede ser directa o indirecta (por ejemplo, a través de un conector). La Figura 11D ilustra el uso de la química del silanol para unir covalentemente los receptores a la capa de pasivación. Los receptores pueden inmovilizarse en la capa de pasivación utilizando, por ejemplo, aminas primarias alifáticas (panel inferior izquierdo) o isotiocianatos de arilo (panel inferior derecho). En estas y otras realizaciones, la capa de pasivación que puede estar compuesta por sí misma de nitruro de silicio, óxido de aluminio, óxido de silicio, pentóxido de tántalo o similares, se une a una capa de silanización a través de sus grupos superficiales reactivos. Para obtener más detalles sobre la química del silanol para la unión covalente a la superficie del FET, se puede hacer referencia al menos a las siguientes publicaciones: para nitruro de silicio, consulte Sensors and Actuators B 1995 29:324-327, Jpn J Appl Phys 1999 38:3912-3917 y Langmuir 2005 21:395-402; para óxido de silicio, véase Protein Sci 1995 4:2532-2544 y Am Biotechnol Lab 2002 20(7):16-18; y para el óxido de aluminio, véase Colloids and Surfaces 1992 63:1-9, Sensors and Actuators B 2003 89:40-47, y Bioconjugate Chem 1997 8:424-433. A continuación, el receptor se conjuga con los grupos reactivos de la capa de silanización. Esta última unión puede ocurrir directa o indirectamente mediante el uso de un enlazador bifuncional, como se ilustra en la Figura 11D. Un enlazador bifuncional es un compuesto que tiene al menos dos grupos reactivos a los que se pueden unir dos entidades. En algunos casos, los grupos reactivos están ubicados en extremos opuestos del enlazador. En algunas realizaciones, el enlazador bifuncional es un enlazador bifuncional universal como el que se muestra en la Figura 11D. Un enlazador universal es un enlazador que se puede utilizar para enlazar una variedad de entidades. Debe entenderse que las químicas mostradas en la Figura 11D pretenden ser ilustrativas y no limitativas.

El enlazador bifuncional puede ser un enlazador homobifuncional o un enlazador heterobifuncional, dependiendo de la naturaleza de las moléculas a conjugar. Los enlazadores homobifuncionales tienen dos grupos reactivos idénticos. Los enlazadores heterobifuncionales tienen dos grupos reactivos diferentes. Varios tipos de enlazadores disponibles comercialmente son reactivos con uno o más de los siguientes grupos: aminas primarias, aminas secundarias, sulfhidrilos, carboxilos, carbonilos y carbohidratos. Ejemplos de enlaces específicos de amina son bis(sulfosuccinimidil) suberato, bis[2-(succinimidooxicarboniloxi)etil] sulfona, disuccinimidil suberato, disuccinimidil tartarato, dimetil adipimato·2 HCl, dimetil pimelimidato·2 HCl, dimetil suberimidato·2 HCl, y etileno glicolbis-[succinimidil-[succinato]]. Los enlaces que reaccionan con grupos sulfhidrilos incluyen bismaleimidohexano, 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)-propionamido] butano, 1-[p-azidosalicilamido]-4-[yodoacetamido] butano, y N-[4-(p-azidosalicilamido) butil]-3'-[2'-piridilditio] propionamida. Los enlaces que reaccionan preferentemente con carbohidratos incluyen azidobenzoi hidrazina. Los enlaces que reaccionan preferentemente con grupos carboxilo 4-[p-azidosalicilamido] butilamina.

Los enlaces heterobifuncionales que reaccionan con aminas y sulfhidrilos incluyen N-succinimidil-3-[2-piridilditio] propionato, succinimidil [4-yodoacetil]aminobenzoato, succinimidil 4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1- carboxilato, m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida éster, sulfosuccinimidil 6-[3-[2-piridilditio]propionamido]hexanoato, y sulfosuccinimidil 4-[N-maleimidometil] ciclohexano-1-carboxilato. Los enlaces heterobifuncionales que reaccionan con grupos carboxilo y amina incluyen 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida hidrocloreuro. Los enlaces heterobifuncionales que reaccionan con carbohidratos y sulfhidrilos incluyen 4-[N-maleimidometil]-ciclohexano-1-carboxilhidrazida·2 HCl, 4-(4-N-maleimidofenil)- hidrazida de ácido butírico·2 HCl, y 3-[2-piridilditio] propionil hidrazida.

Alternativamente, los receptores se pueden recubrir de forma no covalente sobre la capa de pasivación. La deposición no covalente del receptor en la capa de pasivación puede implicar el uso de una matriz polimérica. El polímero puede ser de origen natural o no natural y puede ser de cualquier tipo, incluidos, entre otros, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, APN, ALN y similares, o imitaciones, derivados o combinaciones de los mismos), amino ácido (por ejemplo, péptidos, proteínas (nativas o desnaturalizadas) y similares, o imitaciones, derivados o combinaciones de los mismos, lípidos, polisacáridos y copolímeros de bloques funcionalizados. El receptor puede ser adsorbido y/o atrapado dentro de la matriz polimérica.

Alternativamente, el receptor puede conjugarse covalentemente o entrecruzarse con el polímero (por ejemplo, puede "inertarse" en un polímero funcionalizado).

Un ejemplo de un polímero peptídico adecuado es la polilisina (por ejemplo, poli-L-lisina). Los ejemplos de otros polímeros incluyen copolímeros de bloque que comprenden polietilen-glicol (PEG), poliamidas, policarbonatos,

polialquilenos, polialquilen-glicol, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicolidos, polisiloxanos, poliuretanos, alquil celulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros of ésteres de acrílico y metacrílico, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, sal de sulfato de sodio de celulosa, poli(metil metacrilato), poli(etil metacrilato), poli(butylmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), poli(octadecil acrilato), polietileno, polipropileno, poli(etileno glicol), poli(óxido de etileno), poli(etileno tereftalato), poli(alcoholes de vinilo), acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, polistireno, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhidruos, ácido poliacrílico, alginato, chitosan, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butylmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato), y poli(octadecil acrilato), poli(lactida-glicolida), copolioxalates, policaprolactones, poliésteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico, polianhidruos, poli (estireno-b-isobutileno-b-estireno) (SIBS) copolímero de bloque, etileno vinil acetato, ácido poli(met)acrílico, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhidruos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), y poli(lactida-cocaprolactona), y polímeros naturales tal como alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, albúmina y otras proteínas hidrofílicas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas, copolímeros y sus mezclas, y sus derivados químicos incluyendo sustituciones y/o adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquilen, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones realizadas rutinariamente por los expertos en el arte.

Otro problema que se relaciona con la estabilidad y/o la previsibilidad de la tensión umbral de ISFET involucra la carga atrapada que puede acumularse en las capas metálicas de los dispositivos fabricados con CMOS como resultado de varias actividades de procesamiento durante o después de la fabricación de la matriz (por ejemplo, procesamiento al final de la línea como el grabado de metales con plasma, la limpieza de obleas, el troceado, el envasado, la manipulación, etc.). En particular, con referencia a la Figura 11A, la carga atrapada puede acumularse en algunos casos en uno o más de los diversos conductores 304, 306, 308, 312, 316, 320, 326, 338 y 164 que constituyen la estructura de puerta flotante 170 de los ISFET. Este fenómeno también se denomina en la literatura relevante como el "efecto antena".

Una oportunidad para que se acumule la carga atrapada incluye el grabado con plasma de la capa metálica superior 304. Los solicitantes han reconocido y apreciado que otras oportunidades para que se acumule carga en uno o más conductores de la estructura de puerta flotante incluyen el corte de obleas, durante el cual el proceso abrasivo de una sierra de troceado que corta una oblea genera electricidad estática, y/o varios pasos de manipulación/embalaje de obleas de procesamiento posterior, donde la maquinaria automatizada que manipula/transporta obleas puede ser fuente de descargas electrostáticas (ESD) a los conductores de la estructura de compuerta flotante. Si no hay conexión con el sustrato de silicio (u otro sustrato semiconductor) para proporcionar un trayecto eléctrico para purgar dicha acumulación de carga, la carga puede acumularse hasta el punto de causar cambios no deseados o daños en el óxido de puerta 165 (por ejemplo, inyección de carga en el óxido, o descomposición del óxido de bajo nivel en el sustrato subyacente). La carga atrapada en el óxido de puerta o en la interfaz del semiconductor de óxido de puerta, a su vez, puede causar variaciones no deseadas y/o impredecibles en el funcionamiento y el rendimiento del ISFET.

En vista de lo anterior, otras realizaciones novedosas de la presente divulgación están dirigidas a métodos y aparatos para mejorar el rendimiento del ISFET reduciendo la carga atrapada o mitigando el efecto de antena. En una realización, la carga atrapada puede reducirse después de que se haya fabricado una matriz de sensores, mientras que en otras realizaciones el proceso de fabricación en sí puede modificarse para reducir la carga atrapada que podría inducirse mediante algunos pasos de proceso convencionales. En aún otras realizaciones, las técnicas "durante la fabricación" y "posteriores a la fabricación" pueden emplearse en combinación para reducir la carga atrapada y mejorar así el rendimiento del ISFET.

Con respecto a las alteraciones del propio proceso de fabricación para reducir la carga atrapada, en una realización, el grosor del óxido de puerta 165 que se muestra en la Figura 11A puede seleccionarse particularmente para facilitar el sangrado de la carga acumulada al sustrato; en particular, un óxido de puerta más delgado puede permitir que una cantidad suficiente de carga acumulada pase a través del óxido de puerta al sustrato de abajo sin quedar atrapada. En otra realización basada en este concepto, se puede diseñar un píxel para que incluya un dispositivo de "sacrificio" adicional, es decir, otro transistor que tenga un óxido de puerta más delgado que el óxido de puerta 165 del ISFET. La estructura de puerta flotante del ISFET puede entonces acoplarse a la puerta del dispositivo de sacrificio de modo que sirva como un "transistor de purga de carga". Por supuesto, se debe tener en cuenta que algunas ventajas y desventajas de incluir un dispositivo de sacrificio de este tipo incluyen un aumento en el tamaño y la complejidad de los píxeles.

En otra realización, la capa metálica superior 304 de la estructura de puerta flotante de los ISFET 170 que se muestra en la Figura 11A puede cubrirse con un dieléctrico antes del grabado con plasma para mitigar la carga atrapada. Como se analizó anteriormente, la carga acumulada en la estructura de la compuerta flotante puede, en algunos casos, acoplarse desde el plasma que se usa para el grabado de metales. Por lo general, se aplica un

material fotoprotector sobre el metal que se va a grabar y luego se estampa según la geometría deseada para el metal subyacente. En una implementación ilustrativa, se puede depositar una capa dieléctrica de protección (por ejemplo, un óxido) sobre el metal que se va a grabar, antes de la aplicación del material fotoprotector, para proporcionar una barrera adicional en la superficie del metal contra la carga del proceso de grabado con plasma. En un aspecto, la capa dieléctrica de protección puede permanecer detrás y formar una porción de la capa de pasivación 172.

En otra realización más, el proceso de grabado de metales para la capa metálica superior 304 puede modificarse para incluir química húmeda o molienda con haz de iones en lugar de grabado con plasma. Por ejemplo, la capa metálica 304 podría grabarse utilizando una química acuosa selectiva para el dieléctrico subyacente (por ejemplo, véase <http://www.transene.com/aluminum.html>). Otro enfoque alternativo emplea molienda de iones en lugar de grabado con plasma para la capa metálica 304. La molienda de iones se usa comúnmente para grabar materiales que no se pueden eliminar fácilmente con plasma convencional o productos químicos húmedos. El proceso de molienda de iones no emplea un campo eléctrico oscilante como lo hace un plasma, por lo que no se acumula carga en la(s) capa(s) metálica(s). Aún otra alternativa de grabado de metales implica optimizar las condiciones del plasma para reducir la tasa de grabado (es decir, menos densidad de potencia).

En otra realización más, se pueden realizar cambios en la arquitectura de la capa metálica para facilitar el aislamiento eléctrico completo durante la definición de la puerta flotante. En un aspecto, diseñar el apilamiento de metales para que la puerta flotante del ISFET de área grande no esté conectada a nada durante su definición final puede requerir una capa metálica posterior que sirva como "puente" para realizar la conexión eléctrica a la puerta flotante del transistor. Este esquema de conexión de "puente" evita el flujo de carga desde la puerta flotante grande al transistor. Este método puede implementarse de la siguiente manera (M = capa metálica): i) M1 en contacto con el electrodo de puerta de polietileno; ii) M2 en contacto con M1; iii) M3 define la puerta flotante y se conecta por separado a M2 con isla aislada; iv) El puente M4, que tiene un área muy pequeña grabada sobre las islas aisladas y las conexiones a la puerta flotante M3, conecta la puerta flotante M3 a la pila M1/M2/M3 conectada a la puerta Poli inmediatamente sobre el área activa del transistor; y v) el dieléctrico de la capa intermedia M3 a M4 se retira solo sobre la puerta flotante para exponer la puerta flotante M3 desnuda. En el método descrito inmediatamente antes, no es necesario realizar el paso v), ya que la arquitectura del ISFET de acuerdo con algunas realizaciones analizadas anteriormente deja la pasivación M4 en su lugar sobre la puerta flotante M4. En un aspecto, la eliminación puede, no obstante, mejorar el rendimiento del ISFET de otras maneras (es decir, la sensibilidad). En cualquier caso, la capa de pasivación químicamente sensible final puede ser una fina capa de óxido de metal sensible a iones depositada por pulverización catódica. Debe apreciarse que la arquitectura puenteada de superposición analizada anteriormente puede implementarse en el flujo de fabricación de CMOS estándar para permitir que cualquiera de las primeras tres capas metálicas se use como puertas flotantes (es decir, M1, M2 o M3).

Con respecto a los procesos posteriores a la fabricación para reducir la carga atrapada, en una realización se puede emplear un "recocido con gas de formación" como proceso posterior a la fabricación para mitigar los efectos potencialmente adversos de la carga atrapada. En un recocido de gas de formación, los dispositivos ISFET fabricados con CMOS se calientan en una mezcla de gas hidrógeno y nitrógeno. El gas de hidrógeno en la mezcla se difunde en el óxido de puerta 165 y neutraliza ciertas formas de cargas atrapadas. En un aspecto, el recocido con gas de formación no necesita eliminar necesariamente todos los daños por óxido de puerta que pueden resultar de las cargas atrapadas; más bien, en algunos casos, una neutralización parcial de alguna carga atrapada es suficiente para mejorar significativamente el rendimiento del ISFET. En procesos de recocido ilustrativos de acuerdo con la presente descripción, los ISFET pueden calentarse durante aproximadamente 30 a 60 minutos a aproximadamente 400 a 425 grados Celsius en una mezcla de hidrógeno/nitrógeno que incluye del 10 % al 15 % de hidrógeno. En una implementación particular, se observa que el recocido a 425 grados Celsius durante 30 minutos en una mezcla de hidrógeno/nitrógeno que incluye un 10 % de hidrógeno es particularmente eficaz para mejorar el rendimiento del ISFET. Para los procesos CMOS de aluminio, la temperatura de recocido debe mantenerse a 450 grados centígrados o menos para evitar dañar la metalurgia del aluminio. En otro aspecto de un proceso de recocido de acuerdo con la presente divulgación, el recocido del gas de formación se realiza después de que se cortan las obleas de las matrices de ISFET fabricadas, para garantizar que el daño debido a la carga atrapada inducida por el propio proceso de corte y/u otros pasos de procesamiento previo al corte (por ejemplo, grabado con plasma de metales) puedan mejorarse eficazmente.

En otros procesos más para mitigar los efectos potencialmente adversos de la carga atrapada de acuerdo con las realizaciones de la presente descripción, se puede adoptar una variedad de "protocolos sensibles a descargas electrostáticas (ESD)" durante cualquiera de una variedad de pasos de empaque/manipulación posteriores a la fabricación de obleas. Por ejemplo, en un proceso ilustrativo, se puede emplear cinta antiestática para el corte para mantener los sustratos de la oblea en su lugar (por ejemplo, durante el proceso de corte). Además, aunque convencionalmente se emplea agua desionizada de alta resistividad (por ejemplo, 10 M Ω) en relación con el enfriamiento de las sierras de corte, de acuerdo con una realización de la presente divulgación, se puede emplear agua menos resistiva/más conductora para este propósito para facilitar la conducción de carga a través del agua; por ejemplo, el agua desionizada se puede tratar con dióxido de carbono para reducir la resistividad y mejorar la conducción de la carga que surge del proceso de corte. Además, las herramientas de eyección de matriz conductoras y conectadas a tierra se pueden usar durante varios pasos de corte/manipulación/empaquetado de

obleas, nuevamente para proporcionar trayectos de conducción efectivos para la carga generada durante cualquiera de estos pasos y, por lo tanto, reducir las oportunidades de que la carga se acumule en uno o más conductores de la estructura de puerta flotante de los respectivos ISFET de una matriz.

- 5 En otra realización más que implica un proceso posterior a la fabricación para reducir la carga atrapada, la región de óxido de puerta de un ISFET puede irradiarse con radiación UV. Con referencia nuevamente a la Figura 11A, en una implementación ilustrativa basada en esta realización, se incluye un agujero o ventana opcional 302 durante la fabricación de una matriz de ISFET en la capa metálica superior 304 de cada píxel de la matriz, próxima a la estructura de puerta flotante del ISFET. Esta ventana está destinada a permitir que la radiación UV, cuando se genere, entre a la región de puerta de los ISFET; en particular, las diversas capas del píxel 105₁, como se muestra en las Figuras 11 y 12 A-L, están configurados de tal manera que la radiación UV que entra por la ventana 302 puede incidir esencialmente sin obstrucciones en el área próxima a la puerta de polisilicio 164 y al óxido de puerta 165.
- 10
- 15 Para facilitar un proceso de irradiación UV para reducir la carga atrapada, los solicitantes han reconocido y apreciado que en la capa de pasivación 172 que se muestra en la Figura 11A generalmente es necesario emplear materiales distintos del nitruro de silicio y el oxinitruro de silicio, ya que el nitruro de silicio y el oxinitruro de silicio absorben significativamente los rayos UV. En vista de lo anterior, es necesario sustituir estos materiales por otros visiblemente transparentes a la radiación UV, entre los que se incluyen, entre otros, el vidrio de fososilicato (PSG) y el vidrio de fososilicato dopado con boro (BPSG). PSG y BPSG, sin embargo, no son impermeables a los iones de hidrógeno e hidroxilo; en consecuencia, para ser empleados en una capa de pasivación de un ISFET diseñado para la sensibilidad al pH, PSG y BPSG pueden usarse junto con un material impermeable a los iones que también es significativamente transparente a la radiación UV, como el óxido de aluminio (Al₂O₃), para formar la capa de pasivación. Por ejemplo, con referencia nuevamente a la Figura 11A, se puede emplear PSG o BPSG como sustituto del nitruro de silicio o del oxinitruro de silicio en la primera porción 172A de la capa de pasivación 172, y se puede emplear una capa delgada (por ejemplo, de 400 a 600 Angstroms) de óxido de aluminio en la segunda porción 172B de la capa de pasivación 172 (por ejemplo, el óxido de aluminio se puede depositar usando un proceso de litografía de despegue posterior a CMOS).
- 20
- 25
- 30 En otro aspecto de una realización que implica la irradiación UV, cada ISFET de una matriz de sensores debe polarizarse adecuadamente durante un proceso de irradiación UV para facilitar la reducción de la carga atrapada. En particular, los fotones de alta energía de la radiación UV, que inciden sobre la mayor parte de la región de silicio 160 en la que se forma el canal conductor de los ISFET, crean pares de agujeros de electrones que facilitan la neutralización de la carga atrapada en el óxido de puerta a medida que la corriente fluye a través del canal conductor de los ISFET. Con este fin, un controlador de matriz, que se analiza más adelante en relación con la Figura 17, genera señales apropiadas para polarizar los ISFET de la matriz durante un proceso de irradiación UV. En particular, con referencia nuevamente a la Figura 9, cada una de las señales SeldeFila₁ a la SeldeFila_n se genera para habilitar/seleccionar (es decir, encender) todas las filas de la matriz de sensores al mismo tiempo y acoplar así todos los ISFET de la matriz a las respectivas fuentes de corriente controlables 106_j en cada columna. Con todos los píxeles de cada columna seleccionados simultáneamente, la corriente de la fuente de corriente 106_j de una columna dada es compartida por todos los píxeles de la columna. Los amplificadores de columna 107A y 107B se desactivan eliminando la tensión de polarización VB₄ y, al mismo tiempo, la salida del amplificador 107B, conectada al drenaje de cada ISFET en una columna dada, se conecta a tierra a través de un conmutador que responde a una señal de control "UV". Además, la tensión de cuerpo común V_{CUERPO} para todos los ISFET de la matriz está acoplada a tierra eléctrica (es decir, V_{CUERPO} = 0 voltios) (como se analizó anteriormente, durante el funcionamiento normal de la matriz, la tensión de polarización del cuerpo V_{CUERPO} está acoplada al potencial de tensión más alto disponible para la matriz, por ejemplo, VDDA). En un procedimiento ilustrativo, la tensión de polarización VB₁ para todas las fuentes de corriente controlables 106_j se establece de manera que el ISFET de cada píxel conduzca aproximadamente 1 µA de corriente. Con la matriz de ISFET así polarizada, la matriz se irradia con una dosis suficiente de radiación UV (por ejemplo, desde un borrador de EPROM que genera aproximadamente 20 milivatos/cm² de radiación a una distancia de aproximadamente una pulgada de la matriz durante aproximadamente 1 hora). Después de la irradiación, se puede dejar que la matriz descanse y se estabilice durante varias horas antes de usarla para medir propiedades químicas, como la concentración de iones.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 La Figura 13 ilustra un diagrama de bloques de una implementación ilustrativa de chip CMOS IC de una matriz de sensores ISFET 100 basada en los diseños de columna y píxel analizados anteriormente en relación con las Figuras 9-12, según la realización preferida de la presente divulgación. En esta realización, la matriz 100 incluye 512 columnas 102₁ a 102₅₁₂ con el correspondiente circuito de polarización/lectura de columna 110₁ a 110₅₁₂ (uno para cada columna, como se muestra en la Figura 9), donde cada columna incluye 512 píxeles geoméricamente cuadrados 105₁ a 105₅₁₂, cada uno con un tamaño de aproximadamente 9 micrómetros por 9 micrómetros (es decir, la matriz es de 512 columnas por 512 filas). En otro aspecto, la matriz completa (incluidos los píxeles junto con el circuito de selección de fila y columna asociado y el circuito de polarización/lectura de columna) puede fabricarse en una pastilla de semiconductor como un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC) que tiene dimensiones de aproximadamente 7 milímetros por 7 milímetros. Si bien se muestra una matriz de 512 por 512 píxeles en la realización de la Figura 13, debe apreciarse que las matrices pueden implementarse con diferentes números de filas
- 60
- 65

y columnas y diferentes tamaños de píxeles según otras realizaciones, como se analiza más adelante en relación con Figuras 19-23.

Además, como se analizó anteriormente, debe apreciarse que las matrices de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención pueden fabricarse de acuerdo con técnicas de fabricación de CMOS convencionales, así como técnicas de fabricación de CMOS modificadas (por ejemplo, para facilitar la realización de varios aspectos funcionales de las matrices de chemFET analizadas en este documento, como la deposición adicional de materiales de pasivación, pasos de proceso para mitigar la carga atrapada, etc.) y otras técnicas de fabricación de semiconductores más allá de las empleadas convencionalmente en la fabricación de CMOS. Además, se pueden emplear varias técnicas de litografía como parte de un proceso de fabricación de matrices. Por ejemplo, en una implementación ilustrativa, se puede emplear una técnica de litografía en la que se "cosen" bloques diseñados apropiadamente superponiendo los bordes de un escalón y repitiendo exposiciones de litografía en un sustrato de oblea en aproximadamente 0,2 micrómetros. En una sola exposición, el tamaño máximo de la pastilla típicamente es de aproximadamente 21 milímetros por 21 milímetros. Mediante la exposición selectiva de diferentes bloques (lados, parte superior e inferior, núcleo, etc.) se pueden definir chips muy grandes en una oblea (hasta un máximo, en extremo, de un chip por oblea, comúnmente denominado "integración a escala de oblea").

De acuerdo con la realización preferida de la invención, la matriz 100 que se muestra en la Figura 13, las dos primeras y las dos últimas columnas 102₁, 102₂, 102₅₁₁ y 102₅₁₂, así como los dos primeros píxeles 105₁ y 105₂ y los últimos dos píxeles 105₅₁₁ y 105₅₁₂ de cada una de las columnas 102₃ a 102₅₁₀ (por ejemplo, dos filas y columnas de píxeles alrededor de un perímetro de la matriz) se configuran como píxeles de "referencia" o "ficticios" 103. Con referencia a la Figura 11A, para los píxeles ficticios de una matriz, la capa metálica superior 304 del ISFET de cada píxel ficticio (acoplado en última instancia a la puerta de polisilicio 164 de los ISFET) está unida a la misma capa metálica de otros píxeles ficticios y se hace accesible como terminal del chip, que a su vez está acoplado a una tensión de referencia VREF. Como se analizó anteriormente en relación con la Figura 9, la tensión de referencia VREF también se puede aplicar al circuito de polarización/lectura de las columnas respectivas de la matriz. En algunas implementaciones ilustrativas analizadas más adelante, los datos preliminares de prueba/evaluación pueden adquirirse de la matriz en función de aplicar la tensión de referencia VREF y seleccionar y leer píxeles ficticios, y/o leer columnas en función de la aplicación directa de VREF a los tampones de columna respectiva (por ejemplo, a través de la señal CAL), para facilitar la determinación de la compensación (por ejemplo, varianzas de píxel a píxel y de columna a columna) y la calibración de matrices.

En la Figura 13, diversas tensiones de suministro de potencia y de polarización necesarios para el funcionamiento de la matriz (como se explicó anteriormente en relación con la Figura 9) se proporcionan a la matriz a través de conexiones eléctricas (por ejemplo, clavijas, almohadillas metálicas) y se marcan por simplicidad en el bloque 195 como "conexiones de alimentación y polarización". La matriz 100 de la Figura 13 también incluye un registro de desplazamiento de selección de fila 192, dos conjuntos de registros de desplazamiento de selección de columna 194_{1,2} y dos controladores de salida 198₁ y 198₂ para proporcionar dos señales de salida paralelas de la matriz, Vsalida1 y Vsalida2, que representan las mediciones del sensor. Las diversas tensiones de suministro de potencia y de polarización, las señales de control para los registros de desplazamiento de fila y columna y las señales de control para el circuito de polarización/lectura de columna que se muestran en la Figura 13 son proporcionados por un controlador de matriz, como se analiza más adelante en relación con la Figura 17, que también lee las señales de salida Vsalida1 y Vsalida2 (y otras señales opcionales de estado/diagnóstico) de la matriz 100. En otro aspecto de la realización de la matriz que se muestra en la Figura 13, la configuración de la matriz de modo que varias regiones (por ejemplo, varias columnas) de la matriz se puedan leer al mismo tiempo a través de múltiples salidas de matriz paralelas (por ejemplo, Vsalida1 y Vsalida2) facilita mayores tasas de adquisición de datos, como se analiza más adelante en relación con las Figuras 17 y 18. Mientras que la Figura 13 ilustra una matriz que tiene dos registros de selección de columna y señales de salida paralelas Vsalida1 y Vsalida2 para adquirir datos simultáneamente de dos columnas a la vez, debe apreciarse que, en otras realizaciones, las matrices según la presente divulgación pueden configurarse para tener solo una salida de señal de medición, o más de dos salidas de señal de medición; en particular, como se analiza más adelante en relación con las Figuras 19-23, se pueden configurar matrices más densas según otras realizaciones novedosas para tener cuatro o más salidas de señal de medición paralelas y permitir simultáneamente que diferentes regiones de la matriz proporcionen datos a través de las cuatro o más salidas.

La Figura 14 ilustra el registro de desplazamiento de selección de fila 192, la Figura 15 ilustra uno de los registros de desplazamiento de selección de columna 194₂ y la Figura 16 ilustra uno de los controladores de salida 198₂ de la matriz 100 que se muestra en la Figura 13, según un ejemplo. implementación. Como se muestra en las Figuras 14 y 15, los registros de desplazamiento de selección de fila y columna se implementan como una serie de biestables de tipo D acoplados a una tensión de suministro positivo de circuitos digitales VDDD y una tierra de suministro digital VSSD. En los registros de desplazamiento de fila y columna, se aplica una señal de datos a una entrada D del primer biestable de cada serie y una señal de reloj se aplica simultáneamente a una entrada de reloj de todos los biestables de la serie. Para cada biestable, una salida "Q" reproduce el estado de la entrada D en una transición (por ejemplo, borde descendente) de la señal del reloj. Con referencia a la Figura 14, el registro de desplazamiento de selección de fila 192 incluye 512 biestables de tipo D, en los que un primer biestable 193 recibe una señal de datos vertical DV y todos los biestables reciben una señal de reloj vertical CV. Una salida "Q" del primer biestable 193

proporciona la señal de selección de primera fila SeldeFila₁ y está acoplada a la entrada D del siguiente biestable de la serie. Las salidas Q de biestables sucesivos se acoplan a las entradas D del siguiente biestable en la serie y proporcionan las señales de selección de fila SeldeFila₂ a SeldeFila₅₁₂ con transiciones sucesivas de borde descendente de la señal de reloj vertical CV, como se analiza más adelante en relación con la Figura 18. La señal de selección de la última fila SeldeFila₅₁₂ también se puede tomar como una salida opcional de la matriz 100 como la señal LSTV (Last STage Vertical), que proporciona una indicación (por ejemplo, con fines de diagnóstico) de que se ha seleccionado la última fila de la matriz. Si bien no se muestra explícitamente en la Figura 14, cada una de las señales de selección de fila SeldeFila₁ a SeldeFila₅₁₂ se aplica a un inversor correspondiente, cuya salida se usa para habilitar un píxel dado en cada columna (como se ilustra en la Figura 9 por las señales SeldeFila₁ a la SeldeFila_n).

Con respecto a los registros de desplazamiento de selección de columna 194₁ y 194₂, estos se implementan de manera similar a los registros de desplazamiento de selección de fila, cada registro de desplazamiento de selección de columna que comprende 256 biestables conectados en serie y responsable de permitir la lectura desde el columnas impares de la matriz o las columnas pares de la matriz. Por ejemplo, la Figura 15 ilustra el registro de desplazamiento de selección de columna 194₂, que está configurado para permitir la lectura de todas las columnas pares de la matriz en sucesión a través de las señales de selección de columna ColSel₂, ColSel₄, ..., ColSel₅₁₂, mientras que otro registro de desplazamiento de selección de columna 194₁ está configurado para permitir la lectura de todas las columnas impares de la matriz en sucesión (a través de las señales de selección de columna ColSel₁, ColSel₃, ..., ColSel₅₁₁). Ambos registros de desplazamiento de selección de columna están controlados simultáneamente por la señal de datos horizontal DH y la señal de reloj horizontal CH para proporcionar las respectivas señales de selección de columna, como se analiza más adelante en relación con la Figura 18. Como se muestra en la Figura 15, la última señal de selección de columna ColSel₅₁₂ también se puede tomar como una salida opcional de la matriz 100 como la señal LSTH (Last STage Horizontal), que proporciona una indicación (por ejemplo, con fines de diagnóstico) de que se ha seleccionado la última columna de la matriz.

Con referencia de nuevo por el momento a la Figura 7, los solicitantes han reconocido y apreciado que una implementación para la selección de filas y columnas de matriz basada en registros de desplazamiento, como se analizó anteriormente en relación con las Figuras 13-15, es una mejora significativa del enfoque del decodificador de filas y columnas empleado en varios diseños de matrices de ISFET de la técnica anterior, incluido el diseño de Milgrew y otros que se muestra en la Figura 7. En particular, con respecto al decodificador de fila 92 y el decodificador de columna 94 que se muestran en la Figura 7, la complejidad de implementar estos componentes en un diseño de matriz de circuito integrado aumenta drásticamente a medida que aumenta el tamaño de la matriz, ya que se requieren entradas adicionales para ambos decodificadores. Por ejemplo, una matriz que tiene 512 filas y columnas como se analizó anteriormente en relación con la Figura 13 requeriría nueve entradas ($2^9 = 512$) por decodificador de fila y columna si se empleara tal esquema para la selección de fila y columna; de manera similar, las matrices que tienen 7400 filas y 7400 columnas, como se analiza a continuación en relación con otras realizaciones, requerirían 13 entradas ($2^{13} = 8192$) por decodificador de fila y columna. Por el contrario, los registros de desplazamiento de selección de fila y columna que se muestran en las Figuras 14 y 15 no requieren señales de entrada adicionales a medida que aumenta el tamaño de la matriz, sino biestables de tipo D adicionales (que se implementan de forma rutinaria en un proceso CMOS). Así, las implementaciones del registro de desplazamiento mostradas en las Figuras 14 y 15 proporcionan una solución fácilmente escalable para la selección de filas y columnas de matrices.

En la realización de la Figura 13, el registro de desplazamiento de selección de columna "impar" 194₁ proporciona señales de selección de columna impar a un controlador de salida "impar" 198₁ y el registro de desplazamiento de selección de columna par 194₂ proporciona señales de selección de columna par a un controlador de salida "par" 198₂. Ambos controladores de salida están configurados de manera similar, y en la Figura 16 se muestra un ejemplo del controlador de salida para 198₂. En particular, la Figura 16 muestra que las respectivas señales de salida de columna pares V_{COL2}, V_{COL4}, ..., V_{COL512} (consulte la Figura 9 para la salida de señal de columna genérica V_{COLj}) se aplican a los conmutadores correspondientes 191₂, 191₄, ..., 191₅₁₂, en respuesta a las señales de selección de columna par ColSel₂, ColSel₄, ..., ColSel₅₁₂ proporcionadas por el registro de selección de columna 194₂, para acoplar sucesivamente las señales de salida de columna par a la entrada de un amplificador búfer 199 (BUF) a través de un bus 175. En la Figura 16, el amplificador búfer 199 recibe potencia de una tensión de suministro positiva VDDO del búfer de salida y de una tierra de suministro VSSO del búfer de salida, y responde a una tensión de polarización VBOO del búfer de salida para establecer una corriente de polarización correspondiente para la salida del búfer. Dada la entrada de alta impedancia del amplificador búfer 199, un sumidero de corriente 197 que responde a una tensión de polarización VB3 se acopla al bus 175 para proporcionar una corriente de excitación adecuada (por ejemplo, del orden de aproximadamente 100 μ A) para la salida del búfer de salida de la columna (véase el amplificador búfer 111j de la Figura 9) de una columna seleccionada. El amplificador búfer 199 proporciona la señal de salida V_{salida2} en función de la columna par seleccionada de la matriz; al mismo tiempo, con referencia a la Figura 13, un amplificador búfer correspondiente del controlador de salida "impar" 198₁ proporciona la señal de salida V_{salida1} basada en una columna impar seleccionada de la matriz.

En una implementación ilustrativa, los conmutadores de los controladores de salida par e impar 198₁ y 198₂ (por ejemplo, los conmutadores 191₂, 191₄, ..., 191₅₁₂ que se muestran en la Figura 16) pueden implementarse como

puertas de transmisión de pares CMOS (que incluyen un MOSFET de canal n y un MOSFET de canal p; véase la Figura 4) e inversores para que cada señal de selección de columna y su complemento puedan aplicarse a un conmutador de puerta de transmisión 191 dado para permitir la conmutación. Cada conmutador 191 tiene una resistencia en serie cuando está habilitado o "encendido" para acoplar una señal de salida de columna correspondiente al bus 175; igualmente, cada conmutador añade una capacitancia al bus 175 cuando el conmutador está apagado. Un conmutador más grande reduce la resistencia en serie y permite una corriente de accionamiento más alta para el bus 175, lo que generalmente permite que el bus 175 se estabilice más rápidamente; por otro lado, un conmutador más grande aumenta la capacitancia del bus 175 cuando el conmutador está apagado, lo que a su vez aumenta el tiempo de estabilización del bus 175. Por lo tanto, existe una compensación entre la resistencia y la capacitancia en serie del conmutador en relación con el tamaño del conmutador.

La capacidad del bus 175 para estabilizarse rápidamente después de la habilitación de conmutadores sucesivos facilita a su vez la adquisición rápida de datos de la matriz. Con este fin, en algunas realizaciones, los conmutadores 191 de los controladores de salida 198₁ y 198₂ están particularmente configurados para reducir significativamente el tiempo de estabilización del bus 175. Tanto los MOSFET de canal n como de canal p de un conmutador dado se suman a la capacitancia del bus 175; sin embargo, los MOSFET de canal n generalmente tienen una mejor respuesta de frecuencia y capacidades de control de corriente que sus contrapartes de canal p. En vista de lo anterior, los solicitantes han reconocido y apreciado que algunas de las características superiores de los MOSFET de canal n pueden explotarse para mejorar el tiempo de estabilización del bus 175 implementando conmutadores "asimétricos" en los que los tamaños respectivos para el MOSFET de canal n y MOSFET de canal p de un conmutador dado son diferentes.

Por ejemplo, en una realización, con referencia a la Figura 16, el sumidero de corriente 197 puede configurarse de manera que el bus 175 típicamente se "baja" cuando todos los conmutadores 191₂, 191₄, ..., 191₅₁₂ están abiertos o apagados (sin conducir). Dado un rango dinámico de señal esperado algo limitado para las señales de salida de columna basadas en mediciones ISFET, cuando un conmutador determinado está habilitado o encendido (conduciendo), en muchos casos, la mayor parte de la conducción la realiza el MOSFET de canal n del par CMOS que constituyen el conmutador. En consecuencia, en un aspecto de esta realización, el MOSFET de canal n y el MOSFET de canal p de cada conmutador 191 tienen un tamaño diferente; concretamente, en una implementación ilustrativa, el MOSFET de canal n tiene un tamaño significativamente mayor que el MOSFET de canal p. Más específicamente, considerando los MOSFET de canal n y canal p de igual tamaño como punto de referencia, en una implementación, el MOSFET de canal n se puede aumentar para que sea de 2 a 2,5 veces más grande, y el MOSFET de canal p se puede reducir en tamaño para que sea de 8 a 10 veces más pequeño, de modo que el MOSFET de canal n es aproximadamente 20 veces más grande que el MOSFET de canal p. Debido a la disminución significativa del tamaño del MOSFET de canal p y el aumento relativamente modesto del tamaño del MOSFET de canal n, la capacitancia general del conmutador en el estado apagado se reduce notablemente y hay una reducción notable correspondiente en la capacitancia para el bus 175; al mismo tiempo, debido al MOSFET de canal n más grande, hay un aumento significativo en la capacidad de excitación actual, la respuesta de frecuencia y la transconductancia del conmutador, lo que a su vez da como resultado una reducción significativa en el tiempo de estabilización del bus 175.

Si bien el ejemplo anterior describe conmutadores asimétricos 191 para los controladores de salida 198₁ y 198₂ en los que el MOSFET de canal n es más grande que el MOSFET de canal p, debe apreciarse que en otra realización, se puede implementar lo contrario, a saber, conmutadores asimétricos en los que el MOSFET de canal p es más grande que el MOSFET de canal n. En un aspecto de esta realización, con referencia nuevamente a la Figura 16, el sumidero de corriente 197 puede servir alternativamente como una fuente de corriente para impulsar adecuadamente la salida del búfer de salida de columna (ver el amplificador búfer 111j de la Figura 9) de una columna seleccionada, y configurarse de manera que el bus 175 típicamente se "suba" cuando todos los conmutadores 191₂, 191₄, ..., 191₅₁₂ están abiertos o apagados (sin conducir). En esta situación, la mayor parte de la conducción del conmutador puede ser realizada por el MOSFET de canal p del par CMOS que constituye el conmutador. Los beneficios de la capacitancia del conmutador reducida (y, por lo tanto, la capacitancia del bus reducida) pueden obtenerse en esta realización, aunque el efecto beneficioso general del tiempo de establecimiento reducido para el bus 175 puede ser algo menor que el descrito anteriormente, debido a la respuesta de frecuencia más baja del MOSFET de canal p en comparación con los MOSFET de canal n. Sin embargo, los conmutadores asimétricos basados en MOSFET de canal p más grandes aún pueden facilitar una reducción notable en el tiempo de estabilización del bus y también pueden proporcionar implementaciones de circuitos en las que el amplificador búfer de salida de columna (111j de la Figura 9) puede ser un seguidor fuente atado al cuerpo con una ganancia notablemente mayor.

En otra realización más dirigida a facilitar la rápida estabilización del bus 175 que se muestra en la Figura 16, se puede apreciar que menos conmutadores 191 acoplados al bus 175 dan como resultado una capacitancia del bus más pequeña. Con esto en mente, y con referencia nuevamente a la Figura 13, en otra realización más, se pueden emplear más de dos controladores de salida 198₁ y 198₂ en la matriz de ISFET 100 de modo que cada controlador de salida maneje un número menor de columnas de la formación. Por ejemplo, en lugar de tener todas las columnas pares manejadas por un controlador y todas las columnas impares manejadas por otro controlador, la matriz puede incluir cuatro registros de selección de columna 194_{1,2,3,4} y cuatro controladores de salida correspondientes 198_{1,2,3,4}.

de modo que cada controlador de salida maneje una cuarta parte del total de columnas de la matriz, en lugar de la mitad de las columnas. En tal implementación, cada controlador de salida tendría la mitad del número de conmutadores 191 en comparación con la realización analizada anteriormente en relación con la Figura 16, y el bus 175 de cada controlador de salida tendría una capacitancia más baja correspondiente, mejorando así el tiempo de estabilización del bus. Si bien se analizan cuatro controladores de salida con fines ilustrativos en este ejemplo, debe apreciarse que la presente divulgación no está limitada a este respecto, y prácticamente cualquier número de controladores de salida mayor que dos puede emplearse para mejorar el tiempo de estabilización del bus en el escenario descrito arriba. Otras realizaciones de matriz en las que se emplean más de dos controladores de salida para facilitar la adquisición rápida de datos de la matriz se analizan con mayor detalle a continuación (por ejemplo, en relación con las Figuras 19-23).

En un aspecto del diseño de matriz analizado anteriormente en relación con las Figuras 13-16, se proporcionan en la matriz conexiones de tensión de suministro analógico independientes (para VDDA, VSSA), conexiones de tensión de suministro digital (para VDDD, VSSD) y conexiones de tensión de suministro de búfer de salida (para VDDO, VSSO) para facilitar el aislamiento del ruido y reducir la diafonía de la señal entre varios componentes de la matriz, lo que aumenta la relación señal-ruido (SNR) de las señales de salida Vsalida1 y Vsalida2. En una implementación ilustrativa, cada una de las tensiones de suministro positivas VDDA, VDDD y VDDO puede ser de aproximadamente 3,3 voltios. En otro aspecto, estas tensiones respectivamente pueden ser proporcionados "fuera del chip" por una o más fuentes de tensión programables, como se analiza más adelante en relación con la Figura 17.

La Figura 17 ilustra un diagrama de bloques de la matriz de sensores 100 de la Figura 13 acoplada a un controlador de matriz 250, según una realización novedosa de la presente divulgación. En varias implementaciones ilustrativas, el controlador de matriz 250 puede fabricarse como un controlador "autónomo", o como una "tarjeta" compatible con ordenador que forma parte de un ordenador 260, como se analizó anteriormente en relación con la Figura 8. En un aspecto, las funciones del controlador de matriz 250 pueden ser controladas por el ordenador 260 a través de un bloque de interfaz 252 (por ejemplo, interfaz en serie, mediante puerto USB o bus PCI, conexión Ethernet, etc.), como se muestra en la Figura 17. En una realización, el controlador de matriz 250 se fabrica como una placa de circuito impreso en la que se conecta la matriz 100, similar a un chip IC convencional (por ejemplo, la matriz 100 está configurada como un ASIC que se conecta al controlador de matriz). En un aspecto de dicha realización, la totalidad o porciones del controlador de matriz 250 pueden implementarse como una matriz de puertas programables en campo (FPGA) configurada para realizar varias funciones de controlador de matriz descritas con más detalle a continuación.

En general, el controlador de matriz 250 proporciona varias tensiones de suministro y tensiones de polarización a la matriz 100, así como varias señales relacionadas con la selección de filas y columnas, muestreo de salidas de píxeles y adquisición de datos. En particular, el controlador de matriz 250 lee las dos señales de salida analógicas Vsalida1 (columnas impares) y Vsalida2 (columnas pares), incluidas las señales de tensión de píxeles respectivas multiplexadas de la matriz 100 y luego digitaliza estas señales de píxeles respectivas para proporcionar datos de medición al ordenador 260, que a su vez podrá almacenar y/o tratar los datos. En algunas implementaciones, el controlador de matriz 250 también puede configurarse para realizar o facilitar varias funciones de diagnóstico y calibración de matriz, y un tratamiento de radiación UV de matriz opcional como se analizó anteriormente en relación con la Figura 11A.

Como se ilustra en la Figura 17, el controlador de matriz 250 generalmente proporciona a la matriz 100 la tensión de suministro analógico y tierra (VDDA, VSSA), la tensión de suministro digital y tierra (VDDD, VSSD) y la tensión de suministro de salida de búfer y tierra (VDDO, VSSO). En una implementación ilustrativa, cada una de las tensiones de suministro VDDA, VDDD y VDDO es de aproximadamente 3,3 voltios. Como se analizó anteriormente, en un aspecto, cada una de estas tensiones de suministro de potencia se proporciona a la matriz 100 a través de trayectos de conducción separados para facilitar el aislamiento del ruido. En otro aspecto, estas tensiones de suministro pueden originarse en los respectivos reguladores/suministros de potencia, o uno o más de estas tensiones de suministro pueden originarse en una fuente común en un suministro de potencia 258 del controlador de matriz 250. El suministro de potencia 258 también puede proporcionar las diversas tensiones de polarización necesarias para el funcionamiento de la matriz (por ejemplo, VB1, VB2, VB3, VB4, VBO0, V_{CUERPO}) y la tensión de referencia VREF utilizada para el diagnóstico y la calibración de la matriz. En otro aspecto, el suministro de potencia 258 incluye uno o más convertidores de digital a analógico (DAC) que pueden ser controlados por el ordenador 260 para permitir que cualquiera o todas las tensiones de polarización, la tensión de referencia y las tensiones de suministro se cambien por software (es decir, ajustes de polarización programables). Por ejemplo, un suministro de potencia 258 que responda al control del ordenador puede facilitar el ajuste de las tensiones de polarización VB1 y VB2 para la corriente de drenaje de píxeles, VB3 para la unidad de bus de columna, VB4 para el ancho de banda del amplificador de columna y VBO0 para la unidad de corriente de búfer de salida de columna. En algunos aspectos, se pueden ajustar una o más tensiones de polarización para optimizar los tiempos de estabilización de las señales de los píxeles habilitados. Además, la tensión de cuerpo común V_{CUERPO} para todos los ISFET de la matriz se puede conectar a tierra durante un tratamiento opcional de irradiación UV posterior a la fabricación para reducir la carga atrapada y luego acoplarse a una tensión más alta (por ejemplo, VDDA) durante el análisis de diagnóstico, la calibración y funcionamiento normal del matriz para la medición/adquisición de datos. Asimismo, la tensión de referencia VREF puede variarse para facilitar una variedad de funciones de diagnóstico y calibración.

Como también se muestra en la Figura 17, el electrodo de referencia 76 que típicamente se emplea en relación con una solución de analito que va a medir la matriz 100 (como se explicó anteriormente en relación con la Figura 1), puede acoplarse al suministro de potencia 258 para proporcionar un potencial de referencia para las tensiones de salida de píxel. Por ejemplo, en una implementación, el electrodo de referencia 76 se puede acoplar a una tierra de suministro (por ejemplo, la tierra analógica VSSA) para proporcionar una referencia para las tensiones de salida de los píxeles basada en la Ec. (3) anterior. En otras implementaciones ilustrativas, la tensión del electrodo de referencia puede establecerse colocando una solución/muestra de interés que tenga un nivel de pH conocido cerca de la matriz de sensores 100 y ajustando la tensión del electrodo de referencia hasta que las señales de salida de la matriz Vsalida1 y Vsalida2 proporcionen tensiones de píxel en un nivel de referencia deseado, a partir del cual los cambios posteriores en las tensiones de píxel reflejan cambios locales en el pH con respecto al nivel de pH de referencia conocido. En general, debe apreciarse que una tensión asociada con el electrodo de referencia 76 no tiene que ser necesariamente idéntica a la tensión de referencia VREF analizada anteriormente (que puede emplearse para una variedad de funciones de calibración y diagnóstico de matriz), aunque en algunas implementaciones la tensión de referencia VREF proporcionada por el suministro de potencia 258 puede usarse para establecer la tensión del electrodo de referencia 76.

Con respecto a la adquisición de datos de la matriz 100, en una realización, el controlador de matriz 250 de la Figura 17 puede incluir uno o más preamplificadores 253 para amortiguar aún más las señales de salida Vsalida1 y Vsalida2 de la matriz de sensores y proporcionar una ganancia seleccionable. En un aspecto, el controlador de matriz 250 puede incluir un preamplificador para cada señal de salida (por ejemplo, dos preamplificadores para dos señales de salida analógicas). En otros aspectos, los preamplificadores pueden configurarse para aceptar tensiones de entrada de 0,0 a 3,3 voltios, pueden tener ganancias programables/seleccionables por ordenador (por ejemplo, 1, 2, 5, 10 y 20) y salidas de bajo ruido (por ejemplo, $<10 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$), y pueden proporcionar filtrado de paso bajo (por ejemplo, anchos de banda de 5 MHz y 25 MHz). En otro aspecto más, los preamplificadores pueden tener una compensación programable/seleccionable por ordenador para señales de tensión de entrada y/o salida para establecer un nivel nominal para cualquiera en un rango deseado.

El controlador de matriz 250 de la Figura 17 también comprende uno o más convertidores de analógico a digital 254 (ADC) para convertir las señales de salida de la matriz de sensores Vsalida1 y Vsalida2 en salidas digitales (por ejemplo, 10 bits o 12 bits) para proporcionar datos al ordenador 260. En un aspecto, se puede emplear un ADC para cada salida analógica de la matriz de sensores, y cada ADC se puede acoplar a la salida de un preamplificador correspondiente (si se emplean preamplificadores en una implementación dada). En otro aspecto, los ADC pueden tener un rango de entrada seleccionable por ordenador (por ejemplo, 50 mV, 200 mV, 500 mV, 1V) para facilitar la compatibilidad con diferentes rangos de señales de salida de matriz y/o parámetros de preamplificador. En otros aspectos más, el ancho de banda de los ADC puede ser superior a 60 MHz, y la tasa de adquisición/conversión de datos superior a 25 MHz (por ejemplo, tan alta como 100 MHz o superior).

En la realización de la Figura 17, la temporización de adquisición del ADC y la selección de filas y columnas de la matriz pueden controlarse mediante un generador de temporización 256. En particular, el generador de temporización proporciona los datos verticales digitales y las señales de reloj (DV, CV) para controlar la selección de filas, los datos horizontales digitales y las señales de reloj (DH, CH) para controlar la selección de columnas, y la muestra de columna y la señal de mantenimiento COL SH para muestrear las respectivas tensiones de píxeles para una fila habilitada, como se analizó anteriormente en relación con la Figura 9. En algunas implementaciones, el generador de temporización 256 puede implementarse mediante un código de ejecución de microprocesador y configurarse como un generador de patrones digitales multicanal para proporcionar señales de control sincronizadas apropiadamente. En una implementación ilustrativa, el generador de sincronización 256 puede implementarse como una matriz de puertas programables en campo (FPGA).

La Figura 18 ilustra un diagrama de temporización ilustrativo para tales señales, proporcionadas por el generador de temporización 256, para adquirir datos de píxeles de la matriz de sensores 100. Para los propósitos del siguiente análisis, una "trama" se define como un conjunto de datos que incluye un valor (por ejemplo, señal de salida de píxel o tensión V_s) para cada píxel en la matriz, y una "tasa de tramas" se define como la tasa a la que se pueden adquirir tramas sucesivas de la matriz. En el ejemplo de la Figura 18, se elige una tasa de tramas ilustrativa de 20 tramas/segundo para ilustrar el funcionamiento de la matriz (es decir, selección de filas y columnas y adquisición de señales); sin embargo, debe apreciarse que las matrices y los controladores de matriz según la presente divulgación no están limitados a este respecto, ya que las diferentes tasas de tramas, incluidas las tasas de tramas más bajas (por ejemplo, de 1 a 10 tramas/segundo) o las tasas de tramas más altas (por ejemplo, 25, 30, 40, 50, 60, 70 a 100 tramas/seg., etc.), con matrices que tienen el mismo o mayor número de píxeles. En algunas aplicaciones ilustrativas, se puede adquirir un conjunto de datos que incluye muchas tramas durante varios segundos para realizar un experimento en un analito o analitos dados. Se pueden realizar varios de estos experimentos en sucesión, en algunos casos con pausas entre ellos para permitir la transferencia/procesamiento de datos y/o el lavado del ASIC de la matriz de sensores y la preparación de reactivos para un experimento posterior.

En una implementación, el controlador de matriz 250 controla la matriz 100 para habilitar filas sucesivamente, una a la vez. Por ejemplo, con referencia nuevamente por el momento a la Figura 9, se habilita una primera fila de píxeles a través de la señal de selección de fila SeldeFila₁. Se permite que los píxeles habilitados se estabilicen durante un

período de tiempo, después del cual la señal COL SH se activa brevemente para cerrar el conmutador de muestra/mantenimiento en cada columna y almacenar en el condensador de muestreo/almacenamiento de la columna C_{sh} el valor de tensión emitido por el primer píxel en la columna. Esta tensión está entonces disponible como la tensión de salida de columna V_{COLj} aplicada a uno de los dos controladores de salida de matriz (columna par e impar) 198₁ y 198₂ (por ejemplo, véase la Figura 16). A continuación, se desactiva la señal COL SH, abriendo así los conmutadores de muestra/mantenimiento en cada columna y desacoplando el búfer de salida de columna 111j de los amplificadores de columna 107A y 107B. Poco después, la segunda fila de píxeles se habilita a través de la señal de selección de fila SeldeFila₂. Durante el período de tiempo en el que se permite que se establezca la segunda fila de píxeles, las señales de selección de columna se generan de dos en dos (una impar y una par; las señales de selección de columna impar se aplican en sucesión al controlador de salida impar, las señales de selección de columna par se aplican en sucesión al controlador de salida par) para leer las tensiones de salida de la columna asociadas con la primera fila. Por lo tanto, mientras una fila dada en la matriz está habilitada y estabilizándose, la fila anterior se lee, dos columnas a la vez. Al escalonar la selección de filas y el muestreo/lectura, y al leer múltiples columnas a la vez para una fila dada, se puede adquirir una trama de datos de la matriz de una manera significativamente simplificada.

La Figura 18 ilustra los detalles de temporización del proceso anterior para una tasa de tramas ilustrativa de 20 tramas/seg. Dada esta tasa de tramas y 512 filas en la matriz, cada fila debe leerse en aproximadamente 98 microsegundos, como lo indican las delineaciones verticales en la Figura 18. En consecuencia, la señal de reloj vertical CV tiene un período de 98 microsegundos (es decir, una frecuencia de reloj de más de 10 kHz), habilitando una nueva fila en un borde posterior (transición negativa) de la señal CV. El lado izquierdo de la Figura 18 refleja el comienzo de un nuevo ciclo de trama, momento en el que la señal de datos vertical DV se activa antes del primer borde posterior de la señal CV y se desactiva antes del siguiente borde posterior de la señal CV (por adquisición de datos de tramas sucesivas, la señal de datos verticales se activa nuevamente solo después de que se habilita la fila 512). Además, inmediatamente antes de cada borde posterior de la señal CV (es decir, nueva fila habilitada), la señal COL SH se activa durante 2 microsegundos, dejando aproximadamente 50 nanosegundos antes del borde posterior de la señal CV.

En la Figura 18, la primera aparición de la señal COL SH en realidad está muestreando los valores de píxel de la fila 512 de la matriz. Así, en el primer borde de salida de la señal CV, la primera fila se habilita y se deja estabilizar (durante aproximadamente 96 microsegundos) hasta la segunda aparición de la señal COL SH. Durante este tiempo de estabilización para la primera fila, los valores de píxel de la fila 512 se leen a través de las señales de selección de columna. Debido a que se generan dos señales de selección de columna simultáneamente para leer 512 columnas, la señal de reloj horizontal CH debe generar 256 ciclos dentro de este período, cada borde posterior de la señal CH genera una señal de selección de columna impar y una par. Como se muestra en la Figura 18, el primer borde posterior de la señal CH en una fila determinada está programado para que ocurra dos microsegundos después de la selección de la fila para permitir la estabilización de los valores de tensión almacenados en los condensadores de muestreo/almacenamiento C_{sh} y proporcionados por los búferes de salida de columna. También para cada fila, la señal de datos horizontal DH se activa antes del primer borde posterior de la señal CH y se desactiva antes del siguiente borde posterior de la señal CH. Las dos últimas columnas (por ejemplo, 511 y 512) se seleccionan antes de que se produzca la señal COL SH que, como se explicó anteriormente, se produce aproximadamente dos microsegundos antes de que se habilite la siguiente fila. Así, se leen 512 columnas, dos a la vez, dentro de un período de tiempo de aproximadamente 94 microsegundos (es decir, 98 microsegundos por fila, menos dos microsegundos al principio y al final de cada fila). Esto da como resultado una tasa de datos para cada una de las señales de salida de la matriz $V_{salida1}$ y $V_{salida2}$ de aproximadamente 2,7 MHz. En otro aspecto, los ADC 254 pueden ser controlados por el generador de temporización 256 para muestrear las señales de salida $V_{salida1}$ y $V_{salida2}$ a una tasa significativamente más alta para proporcionar múltiples muestras digitalizadas para cada medición de píxel, que luego pueden promediarse (por ejemplo, la tasa de adquisición de datos del ADC puede ser de aproximadamente 100 MHz para muestrear las señales de salida de la matriz de 2,7 MHz, lo que proporciona hasta aproximadamente 35-40 muestras por medición de píxel).

Además de controlar la matriz de sensores y los ADC, el generador de temporización 256 puede configurarse para facilitar varias funciones de calibración y diagnóstico de la matriz, así como un tratamiento de radiación UV opcional. Con este fin, el generador de temporización puede utilizar la señal LSTV que indica la selección de la última fila de la matriz y la señal LSTH para indicar la selección de la última columna de la matriz. El generador de temporización 256 también puede ser responsable de generar la señal CAL que aplica la tensión de referencia VREF a los amplificadores búfer de columna y generar la señal UV que conecta a tierra los drenajes de todos los ISFET en la matriz durante un proceso de irradiación UV (consulte la Figura 9). El generador de temporización también puede proporcionar alguna función de control sobre el suministro de potencia 258 durante diversas funciones de calibración y diagnóstico, o irradiación UV, para controlar apropiadamente las tensiones de alimentación o polarización; por ejemplo, durante la irradiación UV, el generador de temporización puede controlar el suministro de potencia para acoplar la tensión del cuerpo V_{CUERPO} a tierra mientras la señal UV se activa para poner a tierra los drenajes del ISFET. Con respecto a la calibración y el diagnóstico de la matriz, así como la irradiación UV, en algunas implementaciones el generador de tiempo puede recibir programas especializados del ordenador 260 para proporcionar señales de control apropiadas. En un aspecto, el ordenador 260 puede usar varios datos obtenidos de píxeles ficticios de la matriz, así como información de columna basada en la aplicación de la señal CAL y la tensión

de referencia VREF, para determinar varios parámetros de calibración asociados con una matriz dada y/o generar programas especializados para funciones de calibración y diagnóstico.

Con respecto a la interfaz de ordenador 252 del controlador de matriz 250, en una implementación ilustrativa, la interfaz está configurada para facilitar una tasa de datos de aproximadamente 200 MB/seg al ordenador 260 y puede incluir almacenamiento local de hasta 400 MB o más. El ordenador 260 está configurado para aceptar datos a una tasa de 200 MB/seg, y procesar los datos para reconstruir una imagen de los píxeles (por ejemplo, que puede mostrarse en color falso en un monitor). Por ejemplo, el ordenador puede configurarse para ejecutar un programa de propósito general con rutinas escritas en C++ o Visual Basic para manipular los datos y mostrarlos como se desee.

Habiendo analizado varios aspectos de una matriz de ISFET ilustrativa y un controlador de matriz de acuerdo con la presente divulgación, las Figuras 19-23 ilustran diagramas de bloques de implementaciones alternativas de chip CMOS IC de matrices de sensores ISFET que tienen un mayor número de píxeles, de acuerdo con otras realizaciones novedosas. En un aspecto, cada una de las matrices de ISFET analizadas más adelante en relación con las Figuras 19-23 puede ser controlada por un controlador de matriz similar al que se muestra en la Figura 17, en algunos casos con modificaciones menores para acomodar un mayor número de píxeles (por ejemplo, preamplificadores adicionales 253 y convertidores de analógico a digital 254).

La Figura 19 ilustra un diagrama de bloques de una matriz de sensores ISFET 100A basada en los diseños de columnas y píxeles analizados anteriormente en relación con las Figuras 9-12 y un proceso de fabricación de CMOS de 0,35 micrómetros, según una realización novedosa. La matriz 100A incluye 2048 columnas 102_1 a 102_{2048} , donde cada columna incluye 2048 píxeles geoméricamente cuadrados 105_1 a 105_{2048} , cada uno con un tamaño de aproximadamente 9 micrómetros por 9 micrómetros. Por lo tanto, la matriz incluye más de cuatro millones de píxeles (> 4 megapíxeles) y, en una implementación ilustrativa, la matriz completa (píxeles ISFET y circuitos asociados) puede fabricarse como un chip de circuito integrado que tiene dimensiones de aproximadamente 20,5 milímetros por 20,5 milímetros.

En un aspecto de la realización que se muestra en la Figura 19, la matriz 100A puede configurarse, al menos en parte, como múltiples grupos de píxeles que pueden controlarse respectivamente. Por ejemplo, cada columna de píxeles se puede dividir en mitades superior e inferior, y la colección de píxeles en las respectivas mitades superiores de las columnas forman un primer grupo 400_1 de filas (por ejemplo, un grupo superior, filas 1-1024) y la colección de píxeles en las respectivas mitades inferiores de las columnas forman un segundo grupo 400_2 de filas (por ejemplo, un grupo inferior, filas 1025-2048). A su vez, cada uno del primer y segundo los grupos de filas (por ejemplo, superior e inferior) está asociado con registros de selección de fila correspondientes, circuitos de polarización/lectura de columna, registros de selección de columna y controladores de salida. De esta manera, la selección de píxeles y la adquisición de datos de cada uno del primer y segundo grupos de filas 400_1 y 400_2 es sustancialmente similar a la selección de píxeles y la adquisición de datos de toda la matriz 100 que se muestra en la Figura 13; dicho de otra manera, en un aspecto, la matriz 100A de la Figura 19 comprende sustancialmente dos "submatrices" controladas simultáneamente de diferentes grupos de píxeles para proporcionar una adquisición de datos significativamente optimizada a partir de un mayor número de píxeles.

En particular, la Figura 19 muestra que la selección de filas del primer grupo 400_1 de filas puede controlarse mediante un registro de selección de primera fila 192_1 , y la selección de filas del segundo grupo 400_2 de filas puede controlarse mediante un registro de selección de segunda fila 192_2 . En un aspecto, cada uno de los registros de selección de fila 192_1 y 192_2 puede configurarse como se explicó anteriormente en relación con la Figura 14 para recibir señales de reloj vertical (CV) y datos verticales (DV) y generar señales de selección de fila en respuesta; por ejemplo, el registro de selección de primera fila 192_1 puede generar las señales SeldeFila $_1$ a SeldeFila $_{1024}$ y el registro de selección de segunda fila 192_2 puede generar las señales SeldeFila $_{1025}$ a SeldeFila $_{2048}$. En otro aspecto, ambos registros de selección de filas 192_1 y 192_2 pueden recibir simultáneamente señales de datos y de reloj verticales comunes, de modo que se habilitan dos filas de la matriz en un momento dado, una del grupo superior y otra del grupo inferior.

Para cada uno del primer y segundo grupos de filas, la matriz 100A de la Figura 19 comprende además un circuito de lectura/polarización de columna 110_{1T} - 110_{2048T} (para el grupo de la primera fila 400_1) y 110_{1B} - 110_{2048B} (para el segundo grupo de filas 400_2), de modo que cada columna incluye dos instancias del circuito de polarización/lectura 110_j que se muestra en la Figura 9. La matriz 100A también comprende dos registros de selección de columna $192_{1,2}$ (par e impar) y dos controladores de salida $198_{1,2}$ (par e impar) para el segundo grupo de filas 400_2 , y dos registros de selección de columna $192_{3,4}$ (par e impar) y dos controladores de salida $198_{3,4}$ (par e impar) para el grupo de la primera fila 400_1 (es decir, un total de cuatro registros de selección de columna y cuatro controladores de salida). Los registros de selección de columna reciben señales de reloj horizontales (CHT y CHB para el grupo de la primera fila y el grupo de la segunda fila, respectivamente) y las señales de datos horizontales (DHT y DHB para el grupo de la primera fila y el grupo de la segunda fila, respectivamente) para controlar la selección de las columnas pares e impares. En una implementación, las señales CHT y CHB pueden proporcionarse como señales comunes, y DHT y DHB pueden proporcionarse como señales comunes, para leer simultáneamente cuatro columnas a la vez de la matriz (es decir, una columna impar y una par de cada grupo de filas); en particular, como se analizó anteriormente en relación con las Figuras 13-18, se pueden leer simultáneamente dos columnas para cada fila

habilitada y las tensiones de píxel correspondientes se proporcionan como dos señales de salida. Por lo tanto, mediante la habilitación de dos filas en cualquier momento dado y la lectura de dos columnas por fila en cualquier momento dado, la matriz 100A puede proporcionar cuatro señales de salida simultáneas Vsalida1, Vsalida2, Vsalida3 y Vsalida4.

En una implementación ilustrativa de la matriz 100A de la Figura 19, en la que las tramas de datos completos (todos los píxeles de los grupos 4001 y 4002 de la primera y la segunda fila) se adquieren a una tasa de tramas de 20 tramas/seg, 1024 pares de las filas se habilitan sucesivamente por períodos de aproximadamente 49 microsegundos cada una. Para cada fila habilitada, cada controlador de registro/salida de selección de columna lee 1024 píxeles durante aproximadamente 45 microsegundos (permitiendo 2 microsegundos al principio y al final de cada fila, como se analizó anteriormente en relación con la Figura 18). Por lo tanto, en este ejemplo, cada una de las señales de salida de la matriz Vsalida1, Vsalida2, Vsalida3 y Vsalida4 tiene una tasa de datos de aproximadamente 23 MHz. Nuevamente, debe apreciarse que en otras implementaciones, los datos pueden adquirirse desde la matriz 100A de la Figura 19 a tasas de tramas distintas de 20 tramas/seg (por ejemplo, 50-100 tramas/seg).

Al igual que la matriz 100 de la Figura 13, en otros aspectos, la matriz 100A de la Figura 19 puede incluir varias filas y columnas de píxeles ficticios o de referencia 103 alrededor de un perímetro de la matriz para facilitar datos preliminares de prueba/evaluación, determinación de compensación y/o calibración de matrices. Además, diversas tensiones de suministro de potencia y de polarización requeridos para el funcionamiento de la matriz (como se analizó anteriormente en relación con la Figura 9) se proporcionan a la matriz 100A en el bloque 195, de manera similar a la analizada anteriormente en relación con la Figura 13.

La Figura 20 ilustra un diagrama de bloques de una matriz de sensores ISFET 100B basada en un proceso de fabricación de CMOS de 0,35 micrómetros y que tiene una configuración sustancialmente similar a la matriz 100A analizada anteriormente en la Figura 19, según otra realización novedosa. Mientras que la matriz 100B también se basa generalmente en los diseños de columnas y píxeles analizados anteriormente en relación con las Figuras 9-12, el tamaño/paso de píxel en la matriz 100B es menor que el del píxel que se muestra en la Figura 10. En particular, con referencia de nuevo a las Figuras 10 y 11, la dimensión "e" que se muestra en la Figura 10 se reduce sustancialmente en la realización de la Figura 20, sin afectar la integridad de los componentes de píxel activos dispuestos en la región central del píxel, de aproximadamente 9 micrómetros a aproximadamente 5 micrómetros; de manera similar, la dimensión "f" que se muestra en la Figura 10 se reduce de aproximadamente 7 micrómetros a aproximadamente 4 micrómetros. Dicho de otra manera, parte del área periférica del píxel que rodea los componentes activos se reduce sustancialmente con respecto a las dimensiones dadas en relación con la Figura 10, sin alterar la vista superior y la disposición y el diseño de la sección transversal de los componentes activos del píxel como se muestra en las Figuras 10 y 11. En la Figura 20A se muestra una vista superior de dicho píxel 105A, en la que la dimensión "e" es de 5,1 micrómetros y la dimensión "f" es de 4,1 micrómetros. En un aspecto de este diseño de píxel, para facilitar la reducción de tamaño, se incluyen menos conexiones de cuerpo B en el píxel 105A (por ejemplo, una en cada esquina del píxel) en comparación con el píxel que se muestra en la Figura 10, que incluye varias conexiones de cuerpo B alrededor de todo el perímetro del píxel.

Como se observa en la Figura 20, la matriz 100B incluye 1348 columnas 102₁ a 102₁₃₄₈, donde cada columna incluye 1152 píxeles geoméricamente cuadrados 105A₁ a 105A₁₁₅₂, cada uno con un tamaño de aproximadamente 5 micrómetros por 5 micrómetros. Por lo tanto, la matriz incluye más de 1,5 millones de píxeles (> 1,5 megapíxeles) y, en una implementación ilustrativa, la matriz completa (píxeles ISFET y circuitos asociados) puede fabricarse como un chip de circuito integrado que tiene dimensiones de aproximadamente 9 milímetros por 9 milímetros. Al igual que la matriz 100A de la Figura 19, en un aspecto la matriz 100B de la Figura 20 se divide en dos grupos de filas 400₁ y 400₂, como se explicó anteriormente en relación con la Figura 19. En una implementación ilustrativa, las tramas de datos completos (todos los píxeles de los grupos 4001 y 4002 de la primera y la segunda fila) se adquieren a una tasa de tramas de 50 tramas/segundo, lo que requiere que se habiliten sucesivamente 576 pares de filas durante períodos de aproximadamente 35 microsegundos cada uno. Para cada fila habilitada, cada controlador de registro/salida de selección de columna lee 674 píxeles durante aproximadamente 31 microsegundos (permitiendo 2 microsegundos al principio y al final de cada fila, como se analizó anteriormente en relación con la Figura 18). Por lo tanto, en este ejemplo, cada una de las señales de salida de la matriz Vsalida1, Vsalida2, Vsalida3 y Vsalida4 tiene una tasa de datos de aproximadamente 22 MHz. Nuevamente, debe apreciarse que en otras implementaciones, los datos pueden adquirirse desde la matriz 100B de la Figura 20 a tasas de tramas distintas de 50 tramas/seg.

La Figura 21 ilustra un diagrama de bloques de una matriz de sensores ISFET 100C basada en un proceso de fabricación de CMOS de 0,35 micrómetros e incorporando el tamaño de píxel más pequeño analizado anteriormente en relación con las Figuras 20 y 20A (píxeles cuadrados de 5,1 micrómetros), según otra realización más. Como se observa en la Figura 21, la matriz 100C incluye 4000 columnas 102₁ a 102₄₀₀₀, en donde cada columna incluye 3600 píxeles geoméricamente cuadrados 105A₁ a 105A₃₆₀₀, cada uno con un tamaño de aproximadamente 5 micrómetros por 5 micrómetros. Por lo tanto, la matriz incluye más de 14 millones de píxeles (> 14 megapíxeles) y, en una implementación ilustrativa, la matriz completa (píxeles ISFET y circuitos asociados) puede fabricarse como un chip de circuito integrado que tiene dimensiones de aproximadamente 22 milímetros por 22 milímetros. Al igual que las matrices 100A y 100B de las Figuras 19 y 20, en un aspecto la matriz 100C de la Figura 21 está dividida en dos grupos de filas 400₁ y 400₂. Sin embargo, a diferencia de las matrices 100A y 100B, para cada grupo de filas, la

matriz 100C incluye dieciséis registros de selección de columna y dieciséis controladores de salida para leer simultáneamente dieciséis píxeles a la vez en una fila habilitada, de modo que treinta y dos señales de salida Vsalida1-Vsalida32 pueden ser proporcionadas desde la matriz 100C. En una implementación ilustrativa, las tramas de datos completos (todos los píxeles de los grupos 400₁ y 400₂ de la primera y la segunda fila) se pueden adquirir a una tasa de tramas de 50 tramas/seg, lo que requiere que se habiliten sucesivamente 1800 pares de filas durante períodos de aproximadamente 11 microsegundos cada uno. Para cada fila habilitada, 250 píxeles (4000/16) son leídos por cada controlador de salida/registro de selección de columna durante aproximadamente 7 microsegundos (permitiendo 2 microsegundos al principio y al final de cada fila). Por lo tanto, en este ejemplo, cada una de las señales de salida del matriz Vsalida1 - Vsalida32 tiene una tasa de datos de aproximadamente 35 MHz. Al igual que con las realizaciones anteriores, debe apreciarse que en otras implementaciones, los datos pueden adquirirse desde la matriz 100C a tasas de tramas distintas de 50 tramas/seg.

Mientras que las matrices ilustrativas analizadas anteriormente en relación con las Figuras 13-21 se basan en un proceso de fabricación de CMOS convencional de 0,35 micrómetros, debe apreciarse que las matrices según la presente descripción no están limitadas a este respecto, ya que se pueden emplear procesos de fabricación de CMOS que tienen tamaños de características de menos de 0,35 micrómetros (por ejemplo, técnicas de procesamiento de CMOS de 0,18 micrómetros) para fabricar dichas matrices. En consecuencia, pueden fabricarse matrices de sensores ISFET con un tamaño/paso de píxel significativamente inferior a 5 micrómetros, proporcionando matrices de ISFET significativamente más densas. Por ejemplo, las Figuras 22 y 23 ilustran diagramas de bloques respectivos de matrices de sensores ISFET 100D y 100E según otras realizaciones basadas en un proceso de fabricación de CMOS de 0,18 micrómetros, en el que se logra un tamaño de píxel de 2,6 micrómetros. El diseño de píxel en sí se basa sustancialmente en el píxel 105A que se muestra en la Figura 20A, aunque a menor escala debido al proceso CMOS de 0,18 micrómetros.

La matriz 100D de la Figura 22 incluye 2800 columnas 102₁ a 102₂₈₀₀, donde cada columna incluye 2400 píxeles geoméricamente cuadrados, cada uno con un tamaño de aproximadamente 2,6 micrómetros por 2,6 micrómetros. Por lo tanto, la matriz incluye más de 6,5 millones de píxeles (> 6,5 megapíxeles) y, en una implementación ilustrativa, la matriz completa (píxeles ISFET y circuitos asociados) puede fabricarse como un chip de circuito integrado que tiene dimensiones de aproximadamente 9 milímetros por 9 milímetros. Al igual que las matrices 100A, 100B y 100C de las Figuras 19-21, en un aspecto, la matriz 100D de la Figura 22 está dividida en dos grupos de filas 400₁ y 400₂. Sin embargo, a diferencia de las matrices 100A, 100B y 100C, para cada grupo de filas, la matriz 100D incluye ocho registros de selección de columna y ocho controladores de salida para leer simultáneamente ocho píxeles a la vez en una fila habilitada, de modo que dieciséis señales de salida Vsalida1- Vsalida16 pueden ser proporcionada desde la matriz 100D. En una implementación ilustrativa, las tramas de datos completos (todos los píxeles de los grupos 400₁ y 400₂ de la primera y la segunda fila) se pueden adquirir a una tasa de tramas de 50 tramas/seg, lo que requiere que se habiliten sucesivamente 1200 pares de filas durante períodos de aproximadamente 16-17 microsegundos cada uno. Para cada fila habilitada, 350 píxeles (2800/8) son leídos por cada controlador de salida/registro de selección de columna durante aproximadamente 14 microsegundos (permitiendo 1 a 2 microsegundos al principio y al final de cada fila). Por lo tanto, en este ejemplo, cada una de las señales de salida del matriz Vsalida1 - Vsalida16 tiene una tasa de datos de aproximadamente 25 MHz. Al igual que con las realizaciones anteriores, debe apreciarse que en otras implementaciones, los datos pueden adquirirse desde la matriz 100D a tasas de tramas distintas de 50 tramas/seg.

La matriz 100E de la Figura 23 incluye 7400 columnas 102₁ a 102₇₄₀₀, en donde cada columna incluye 7400 píxeles geoméricamente cuadrados, cada uno con un tamaño de aproximadamente 2,6 micrómetros por 2,6 micrómetros. Por lo tanto, la matriz incluye más de 54 millones de píxeles (> 54 megapíxeles) y, en una implementación ilustrativa, la matriz completa (píxeles ISFET y circuitos asociados) puede fabricarse como un chip de circuito integrado que tiene dimensiones de aproximadamente 21 milímetros por 21 milímetros. Al igual que las matrices 100A-100D de las Figuras 19-22, en un aspecto, la matriz 100E de la Figura 23 está dividida en dos grupos de filas 400₁ y 400₂. Sin embargo, a diferencia de las matrices 100A-100D, para cada grupo de filas, la matriz 100E incluye treinta y dos registros de selección de columna y treinta y dos controladores de salida para leer simultáneamente treinta y dos píxeles a la vez en una fila habilitada, de modo que sesenta y cuatro las señales Vsalida1- Vsalida64 pueden proporcionarse desde la matriz 100E. En una implementación ilustrativa, las tramas de datos completos (todos los píxeles de los grupos 400₁ y 400₂ de la primera y la segunda fila) se pueden adquirir a una tasa de tramas de 100 tramas/seg, lo que requiere que se habiliten sucesivamente 3700 pares de filas durante períodos de aproximadamente 3 microsegundos cada uno. Para cada fila habilitada, 230 píxeles (7400/32) son leídos por cada controlador de salida/registro de selección de columna durante aproximadamente 700 nanosegundos. Por lo tanto, en este ejemplo, cada una de las señales de salida de la matriz Vsalida1 - Vsalida64 tiene una tasa de datos de aproximadamente 328 MHz. Al igual que con las realizaciones anteriores, debe apreciarse que en otras implementaciones, los datos pueden adquirirse desde la matriz 100D a tasas de tramas distintas de 100 tramas/seg.

Por lo tanto, en varios ejemplos de matrices de ISFET basados en los conceptos novedosos divulgados en el presente documento, una separación de la matriz de aproximadamente nueve (9) micrómetros (por ejemplo, un área superficial del sensor de menos de diez micrómetros por diez micrómetros) permite que una matriz de ISFET incluya más de 256 000 píxeles (es decir, una matriz de 512 por 512), junto con la selección de filas y columnas asociada y la electrónica de polarización/lectura, que se fabricará en una pastilla de semiconductor de 7 milímetros por 7

milímetros, y una matriz de sensores similar que incluye más de cuatro millones de píxeles (es decir, una matriz de 2048 por 2048, más de 4 megapíxeles) que se fabricará en una pastilla de 21 milímetros por 21 milímetros. En otros ejemplos, una separación de la matriz de aproximadamente 5 micrómetros permite fabricar una matriz de ISFET que incluye aproximadamente 1,55 megapíxeles (es decir, una matriz de 1348 por 1152) y la electrónica asociada en una pastilla de 9 milímetros por 9 milímetros, y una matriz de sensores ISFET que incluye más de 14 megapíxeles y la electrónica asociada en una pastilla de 22 milímetros por 20 milímetros. En otras implementaciones más, utilizando un proceso de fabricación de CMOS en el que son posibles tamaños de características de menos de 0,35 micrómetros (por ejemplo, técnicas de procesamiento CMOS de 0,18 micrómetros), se pueden fabricar matrices de sensores ISFET con un tamaño/paso de píxel significativamente inferior a 5 micrómetros (por ejemplo, separación de la matriz de 2,6 micrómetros o área de píxel/sensor de menos de 8 o 9 micrómetros²), proporcionando matrices de ISFET significativamente densas.

En las realizaciones de matrices de ISFET analizadas anteriormente, los píxeles de la matriz emplean un ISFET de canal p, como se analizó anteriormente en relación con la Figura 9. Debe apreciarse, sin embargo, que las matrices de ISFET según la presente divulgación no están limitadas a este respecto, y que en otras realizaciones los diseños de píxeles para las matrices de ISFET pueden basarse en un ISFET de canal n. En particular, cualquiera de las matrices analizadas anteriormente en relación con las Figuras 13 y 19-23 pueden implementarse con píxeles basados en ISFET de canal n.

Por ejemplo, la Figura 24 ilustra el diseño de píxeles de la Figura 9 implementado con un ISFET de canal n y los MOSFET de canal n que lo acompañan, según otra realización novedosa de la presente descripción. Más específicamente, la Figura 24 ilustra un píxel ilustrativo 105i de una columna de matriz (es decir, el primer píxel de la columna), junto con un circuito de polarización/lectura de columna 110j, en el que el ISFET 150 (Q1) es un ISFET de canal n. Al igual que el diseño de píxeles de la Figura 9, el diseño de píxeles de la Figura 24 incluye solo tres componentes, a saber, el ISFET 150 y dos conmutadores MOSFET de canal n Q2 y Q3, que responden a una de las *n* señales de selección de fila (SeldeFila₁ a SeldeFila_n, lógica alta activa). No se requieren puertas de transmisión en el píxel de la Figura 24, y todos los dispositivos del píxel son del "mismo tipo", es decir, dispositivos de *n* canales. También como el diseño de píxel de la Figura 9, solo se requieren cuatro líneas de señal por píxel, a saber, las líneas 112₁, 114₁, 116₁ y 118₁, para operar los tres componentes del píxel 105i que se muestra en la Figura 24. En otros aspectos, los diseños de píxeles de la Figura 9 y la Figura 24 son similares, ya que ambos están configurados con una corriente de drenaje constante *I*_{Dj} y una tensión de drenaje a fuente constante *V*_{DSj} para obtener una señal de salida *V*_{Sj} de un píxel habilitado.

Una de las principales diferencias entre el diseño de píxel ISFET de canal n de la Figura 24 y el diseño de ISFET de canal p de la Figura 9 es la dirección opuesta del flujo de corriente a través del píxel. Con este fin, en la Figura 24, el elemento 106j es un sumidero de corriente controlable acoplado a la tierra VSSA de la tensión de suministro del circuito analógico, y el elemento 108j del circuito de polarización/lectura 110j es una fuente de corriente controlable acoplada a la tensión de suministro positiva analógica VDDA. Además, la conexión del cuerpo del ISFET 150 no está ligada a su fuente, sino a las conexiones del cuerpo de otros ISFET de la matriz, que a su vez está acoplada a la VSSA de tierra analógica, como se indica en la Figura 24.

Además de los diseños de píxeles mostrados en las Figuras 9 y 24 (basado en una corriente de drenaje ISFET constante y una tensión de la fuente de drenaje ISFET constante), se contemplan diseños de píxeles alternativos para matrices de ISFET, basados tanto en ISFET de canal p como en ISFET de canal n, de acuerdo con otras realizaciones novedosas del presente descripción, como se ilustra en las Figuras 25-27. Como se analiza a continuación, algunos diseños de píxeles alternativos pueden requerir señales adicionales y/o modificadas del controlador de matriz 250 para facilitar la adquisición de datos. En particular, una característica común de los diseños de píxeles mostrados en las Figuras 25-27 incluye un condensador de muestreo y almacenamiento dentro de cada píxel, además de un condensador de muestreo y mantenimiento para cada columna de la matriz. Mientras que los diseños de píxeles alternativos de las Figuras 25-27 generalmente incluyen un mayor número de componentes que los diseños de píxeles de las Figuras 9 y 24, la característica de un condensador de muestreo y almacenamiento de píxeles permite tipos de matrices de "instantáneas", en los que todos los píxeles de una matriz pueden habilitarse simultáneamente para muestrear una trama completa y adquirir señales que representan mediciones de uno o más analitos en la proximidad de respectivos ISFET de la matriz. En algunas aplicaciones, esto puede proporcionar mayores velocidades de adquisición de datos y/o sensibilidad de señal mejorada (por ejemplo, mayor relación señal/ruido).

La Figura 25 ilustra uno de tales diseños alternativos para un solo píxel 105C y un circuito de columna asociado 110j. El píxel 105C emplea un ISFET de canal n y generalmente se basa en la premisa de proporcionar una tensión constante a través del ISFET Q1 basado en un amplificador de retroalimentación (Q4, Q5 y Q6). En particular, el transistor Q4 constituye la carga del amplificador de retroalimentación, y la corriente del amplificador se establece mediante la tensión de polarización VB1 (proporcionada por el controlador de matriz). El transistor Q5 es un amplificador de puerta común y el transistor Q6 es un amplificador de fuente común. Nuevamente, el propósito del amplificador de retroalimentación es mantener constante la tensión a través del ISFET Q1 ajustando la corriente suministrada por el transistor Q3. El transistor Q2 limita la corriente máxima que puede consumir el ISFET Q1 (por ejemplo, para evitar daños por sobrecalentamiento de una gran variedad de píxeles). Esta corriente máxima se

establece mediante la tensión de polarización VB2 (también proporcionada por el controlador de matriz). En un aspecto del diseño de píxel que se muestra en la Figura 25, la potencia al píxel 105C se puede desconectar ajustando la tensión de polarización VB2 a 0 voltios y la tensión de polarización VB1 a 3,3 voltios. De esta manera, la potencia suministrada a grandes matrices de tales píxeles puede modularse (encenderse durante un período de tiempo corto y luego apagarse mediante el controlador de la matriz) para obtener mediciones de concentración de iones y, al mismo tiempo, reducir el consumo total de energía de la matriz. La potencia de modulación de los píxeles también reduce la disipación de calor de la matriz y el calentamiento potencial de la solución de analito, lo que también reduce los efectos potencialmente nocivos del calentamiento de la muestra.

En la Figura 25, la salida del amplificador de retroalimentación (la puerta del transistor Q3) es muestreada por el conmutador MOS Q7 y almacenada en un condensador de muestreo y almacenamiento de píxeles C_{sh} dentro del propio píxel. El conmutador Q7 está controlado por una muestra de píxeles y una señal de retención pSH (proporcionada al chip de matriz por el controlador de matriz), que se aplica simultáneamente a todos los píxeles de la matriz para almacenar simultáneamente las lecturas de todos los píxeles en su muestra respectiva y los condensadores de almacenamiento. De esta manera, las matrices basadas en el diseño de píxeles de la Figura 25 pueden considerarse como matrices "instantáneas", ya que se muestrea una trama completa de datos en un momento dado, en lugar de muestrear filas sucesivas de la matriz. Después de almacenar cada valor de píxel en la muestra de píxel correspondiente y el condensador de almacenamiento C_{sh} , cada píxel 105C (ISFET y amplificador de retroalimentación) es libre de adquirir otra lectura de pH o puede apagarse para conservar potencia.

En la Figura 25, los valores de píxeles almacenados en todos los condensadores de muestreo y almacenamiento de píxeles C_{sh} se aplican al circuito de columna 110j una fila a la vez a través del seguidor de fuente Q8, que se habilita a través del transistor Q9 en respuesta a una señal de selección de fila (por ejemplo, SeldeFila1). En particular, después de seleccionar y estabilizar una fila, los valores almacenados en los condensadores de muestreo y almacenamiento de píxeles se almacenan a su vez en los condensadores de muestra y retención de columna C_{sh2} , según lo permita la señal de muestra y retención de columna COL SH, y se proporciona como la señal de salida de la columna V_{COLj} .

La Figura 26 ilustra otro diseño alternativo para un único píxel 105D y un circuito de columna asociado 110j, según una realización de la presente divulgación. En esta realización, el ISFET se muestra como un dispositivo de canal p. Al comienzo de un ciclo de adquisición de datos, los conmutadores CMOS controlados por las señales pSH (muestreo/retención de píxeles) y pRST (restablecimiento de píxeles) se cierran (estas señales son suministradas por el controlador de matriz). Esto lleva la fuente de ISFET (Q1) a la tensión VRST. Posteriormente, se abre el conmutador controlado por la señal pRST y la fuente de ISFET Q1 saca el condensador de muestreo y almacenamiento de píxeles C_{sh} a un umbral por debajo del nivel establecido por el pH. Entonces se abre el conmutador controlado por la señal pSH, y el valor de salida de píxel se acopla, mediante el funcionamiento de un conmutador que responde a la señal de selección de fila SeldeFila1, al circuito de columna 110j para proporcionar la señal de salida de columna V_{COLj} . Al igual que el diseño de píxeles en la realización ilustrada en la Figura 25, las matrices basadas en el píxel 105D son matrices de tipo "instantánea" en el sentido de que todos los píxeles de la matriz pueden funcionar simultáneamente. En un aspecto, este diseño permite un largo tiempo de integración simultánea en todos los píxeles, seguido de una lectura de alta velocidad de una trama completa de datos.

La Figura 27 ilustra otro diseño alternativo más para un solo píxel 105E y un circuito de columna asociado 110j, según una realización de la presente divulgación. En esta realización, nuevamente el ISFET se muestra como un dispositivo de canal p. Al comienzo de un ciclo de adquisición de datos, los conmutadores operados por las señales de control p1 y pRST se cierran brevemente. Esto borra el valor almacenado en el condensador de muestreo C_{sh} y permite almacenar una carga en el ISFET (Q1). Posteriormente, el conmutador controlado por la señal pSH se cierra, lo que permite que la carga almacenada en el ISFET Q1 se almacene en el condensador de muestreo y almacenamiento de píxeles C_{sh} . Entonces se abre el conmutador controlado por la señal pSH, y el valor de salida de píxel se acopla, mediante el funcionamiento de un conmutador que responde a la señal de selección de fila SeldeFila1, al circuito de columna 110j para proporcionar la señal de salida de columna V_{COLj} . La ganancia puede proporcionarse en el píxel 105E a través de la relación entre la capacitancia ISFET y el límite C_{sh} , es decir, ganancia = C_{Q1}/C_{sh} , o habilitando el píxel varias veces (es decir, tomando múltiples muestras de la medición del analito) y acumulando la salida ISFET en el condensador de muestreo y almacenamiento de píxeles C_{sh} sin reiniciar el condensador (es decir, la ganancia es una función del número de acumulaciones). Al igual que las realizaciones de las Figuras 25 y 26, las matrices basadas en el píxel 105D son matrices de tipo "instantánea" en el sentido de que todos los píxeles de la matriz pueden funcionar simultáneamente.

Pasando del análisis del sensor, ahora abordaremos la combinación de la matriz de ISFET con una matriz de micropocillos y los fluidos correspondientes. Como la mayoría de los dibujos de la estructura de la matriz de micropocillos se presentan solo en sección transversal o muestran esa matriz solo como un bloque en un diagrama simplificado, las Figuras 28A y 28B se proporcionan para ayudar al lector a comenzar a visualizar el aparato resultante en tres dimensiones. La Figura 28A muestra un grupo de pocillos cilíndricos redondos 2810 dispuestos en una matriz, mientras que la Figura 28B muestra un grupo de pocillos cilíndricos rectangulares 2830 dispuestos en una matriz. Se verá que los pocillos están separados (aislados) entre sí por el material 2840 que forma las paredes del pocillo. Si bien es cierto que es posible fabricar pocillos de otras secciones transversales, no se cree que sea

ventajoso hacerlo. Tal matriz de micropocillos se asienta sobre la matriz de ISFET mencionada anteriormente, con uno o más ISFET por pocillo. En los dibujos subsiguientes, cuando se identifica la matriz de micropocillos, se puede representar una de estas matrices.

5 Sistema fluido: Aparato y método para uso con matrices de sensores electrónicos de alta densidad

Para muchos usos, para completar un sistema para detectar reacciones químicas o agentes químicos utilizando las matrices electrónicas de alta densidad explicadas anteriormente, se requieren técnicas y aparatos para entregar a los elementos de la matriz (llamados "píxeles") fluidos que contienen componentes químicos o bioquímicos para la
10 detección. En esta sección se ilustrarán ejemplos de técnicas y métodos, que son útiles para tales fines, con características deseables.

Dado que puede desearse un funcionamiento a alta velocidad del sistema, se prefiere que el sistema de suministro de fluido, en la medida de lo posible, no limite la velocidad de funcionamiento del sistema global.

En consecuencia, existen necesidades no solo de matrices de ISFET de alta densidad y alta velocidad u otros elementos sensibles a las concentraciones de iones u otros atributos químicos, o cambios en los atributos químicos, sino también de mecanismos y técnicas relacionados para suministrar a los elementos de la matriz las muestras a evaluar, en volúmenes de reacción suficientemente pequeños como para avanzar sustancialmente en la velocidad y
20 calidad de detección de la variable a detectar.

Hay dos y, a veces, tres componentes o subsistemas, y métodos relacionados, involucrados en el suministro de las muestras químicas en cuestión a los elementos de la matriz: (1) sistema macrofluido de suministros de reactivos y fluidos de lavado y válvulas apropiadas y aparatos auxiliares, (2) una celda de flujo y (3) en muchas aplicaciones, una matriz de micropocillos. Se analizará cada uno de estos subsistemas, aunque en orden inverso.

Matriz de micropocillos

Como se analizó en otra parte, para muchos usos, tal como en la secuenciación de ADN, es deseable proporcionar sobre la matriz de sensores semiconductores una matriz correspondiente de micropocillos, cada micropocillo es lo suficientemente pequeño preferiblemente para recibir solo una perla cargada de ADN, en conexión con la cual un píxel subyacente en la matriz proporcionará una señal de salida correspondiente.

El uso de una matriz de micropocillos de este tipo implica tres etapas de fabricación y preparación, cada una de las cuales se analiza por separado: (1) crear la matriz de micropocillos para dar como resultado un chip que tiene un revestimiento que comprende una capa de matriz de micropocillos; (2) montar el chip revestido en una interfaz fluidica; y en el caso de la secuenciación de ADN, (3) cargar una o varias perlas cargadas con ADN en los pocillos. Se entenderá, por supuesto, que en otras aplicaciones, las perlas pueden ser innecesarias o pueden emplearse perlas que tengan diferentes características.

Fabricación de matrices de micropocillos

La fabricación de micropocillos se puede lograr de varias maneras. Los detalles reales de fabricación pueden requerir algo de experimentación y varían según las capacidades de procesamiento disponibles.

En general, la fabricación de una matriz de micropocillos de alta densidad implica estampar fotolitográficamente la configuración de la matriz de pocillos en una capa o capas de material como fotoprotector (orgánico o inorgánico), un dieléctrico, mediante un proceso de grabado. El estampado puede realizarse con el material de la matriz de sensores o puede realizarse por separado y luego transferirse al chip de la matriz de sensores, o alguna combinación de los dos. Sin embargo, las técnicas distintas de la fotolitografía no deben excluirse si proporcionan resultados aceptables.

Ahora se analiza un ejemplo de un método para formar una matriz de micropocillos, comenzando con referencia a la Figura 29. Esa figura representa esquemáticamente una vista superior de una esquina (es decir, la esquina inferior izquierda) de la disposición de un chip que muestra una matriz 2910 de los sensores ISFET individuales 2912 en la pastilla CMOS 2914. Las líneas de señal 2916 y 2918 se utilizan para direccionar la matriz y leer su salida. El bloque 2920 representa algunos de los componentes electrónicos de la matriz, como se analizó anteriormente, y la capa 2922 representa una porción de una pared que se convierte en parte de una estructura de microfluidos, la celda de flujo, como se explica con más detalle a continuación; la celda de flujo es la estructura que proporciona un flujo de fluido sobre la matriz de micropocillos o sobre la superficie del sensor directamente, si no hay una estructura de micropocillos. En la superficie de la pastilla, se puede formar un patrón como el patrón 2922 en la parte inferior izquierda de la Figura 29 durante el procesamiento de semiconductores para formar los ISFET y los circuitos asociados, para usar como marcas de alineación para ubicar los pocillos sobre los píxeles del sensor cuando el dieléctrico ha cubierto la superficie de la matriz.

Después de que se forman las estructuras semiconductoras, como se muestra, la estructura de micropocillos se aplica a la pastilla. Es decir, la estructura de micropocillos puede formarse directamente en la pastilla o puede formarse por separado y luego montarse en la pastilla, siendo aceptable cualquier enfoque. Para formar la estructura de micropocillos en la pastilla, pueden usarse varios procesos. Por ejemplo, toda la pastilla se puede recubrir por rotación con, por ejemplo, un material fotoprotector negativo como SU-8 2015 de Microchem o una poliimida/resistencia positiva como HD Microsystems HD8820, hasta la altura deseada de los micropocillos. La altura deseada de los pocillos (por ejemplo, alrededor de 4 - 12 μm en el ejemplo de un píxel por pocillo, aunque no tan limitada como cuestión general) en la(s) capa(s) del material fotoprotector se puede lograr haciendo girar el material protector adecuado a tasas predeterminadas (que se puede encontrar por referencia a la literatura y las especificaciones del fabricante, o empíricamente), en una o más capas. (Típicamente, la altura del pocillo se puede seleccionar en correspondencia con la dimensión lateral del píxel del sensor, preferiblemente para una relación de aspecto nominal de 1:1 - 1,5:1, altura: ancho o diámetro. Según las consideraciones de señal a ruido, existe una relación entre las dimensiones y las tasas de muestreo de datos requeridas para lograr el nivel de rendimiento deseado. Por lo tanto, hay una serie de factores que entrarán en la selección de parámetros óptimos para una aplicación dada). Alternativamente, se pueden aplicar múltiples capas de diferentes materiales fotoprotectores o se puede depositar otra forma de material dieléctrico. También se pueden usar varios tipos de deposición de vapor químico para construir una capa de materiales adecuados para la formación de micropocillos en ella.

Una vez que la capa de material fotoprotector (la forma singular "capa" se usa para abarcar múltiples capas en el agregado también) está en su lugar, los pocillos individuales (típicamente mapeados para tener uno o cuatro sensores ISFET por pocillo) pueden generarse colocando una máscara (por ejemplo, de cromo) sobre la pastilla revestida con material protector y exponiendo el material protector a la radiación de reticulación (típicamente UV). Todo el material protector expuesto a la radiación (es decir, donde la máscara no bloquea la radiación) se reticula y como resultado formará una capa de plástico permanente unida a la superficie del chip (matriz). El material protector que no ha reaccionado (es decir, el material protector en áreas que no están expuestas, debido a que la máscara impide que la luz llegue al material protector y evita la reticulación) se elimina lavando el chip en un solvente adecuado (es decir, revelador) tal como propilenglicolmetilacetato (PGMEA) u otro solvente apropiado. La estructura resultante define las paredes de la matriz de micropocillos.

La Figura 30 muestra un ejemplo de una disposición para una porción de una máscara de cromo 3010 para una realización de un sensor por pocillo, correspondiente a la pastilla que se muestra en la Figura 29. Las áreas sombreadas 3012, 3014 son las que bloquean la radiación UV. Las marcas de alineación en las porciones blancas 3016 en el cuadrante inferior izquierdo de la Figura 30, dentro del área gris 3012, se utilizan para alinear la disposición de los pocillos con los sensores ISFET en la superficie del chip. La serie de círculos 3014 en el cuadrante superior derecho de la máscara impide que la radiación llegue a las áreas de los pocillos, para dejar un material protector sin reaccionar que puede disolverse al formar los pocillos.

La Figura 31 muestra una disposición correspondiente para la máscara 3020 para una realización de 4 sensores por pocillo. Tenga en cuenta que el patrón de alineación 3016 todavía se usa y que los círculos de enmascaramiento de pocillos individuales 3014A en la matriz 2910 ahora tienen el doble del diámetro que los pocillos 3014 en la Figura 30, para acomodar cuatro sensores por pocillo en lugar de un sensor por pocillo.

Después de la exposición de la pastilla/material protector a la radiación UV, se puede recubrir una segunda capa de material protector sobre la superficie del chip. Esta capa de material protector puede ser relativamente gruesa, de aproximadamente 400 - 450 μm de espesor, típicamente. Una segunda máscara 3210 (Figura 32), que también puede ser de cromo, se usa para enmascarar un área 3220 que rodea la matriz, para construir un cuello o pared (o cuenca, usando ese término en el sentido geológico) 3310 de material protector que rodea la matriz activa de sensores en el sustrato 3312, como se muestra en la Figura 33. En el ejemplo particular que se describe, el cuello es 150 μm más ancho que la matriz de sensores, en cada lado de la matriz, en la dirección x, y 9 μm más ancho en cada lado que la matriz de sensores, en la dirección y. Las marcas de alineación en la máscara 3210 (la mayoría no se muestran) coinciden con las marcas de alineación en la primera capa y el propio chip CMOS.

Se pueden usar otros enfoques fotolitográficos para la formación de la matriz de micropocillos, por supuesto, siendo lo anterior solo un ejemplo.

Por ejemplo, puede emplearse litografía de contacto de varias resoluciones y con varios grabadores y reveladores. Pueden usarse tanto materiales orgánicos como inorgánicos para la(s) capa(s) en las que se forman los micropocillos. La(s) capa(s) puede(n) grabarse en un chip que tiene una capa dieléctrica sobre las estructuras de píxeles en la matriz de sensores, tal como una capa de pasivación, o la(s) capa(s) puede(n) formarse por separado y luego aplicarse sobre la matriz de sensores. La elección o los procesos específicos dependerán de factores tales como el tamaño del matriz, el tamaño del pocillo, la instalación de fabricación disponible, los costos aceptables y similares.

Entre los diversos materiales orgánicos que pueden usarse en algunas realizaciones para formar la(s) capa(s) de micropocillos están el tipo SU-8 de material fotoprotector de acción negativa mencionado anteriormente, un material

fotoprotector de acción positiva convencional y una poliimida fotodefinible de acción positiva. Cada uno tiene sus virtudes y sus inconvenientes, bien conocidos por los familiarizados con el arte fotolitográfico.

Naturalmente, en un entorno de producción, las modificaciones serán apropiadas.

La litografía de contacto tiene sus limitaciones y puede que no sea el método de producción de elección para producir las densidades más altas de pocillos, es decir, puede imponer un límite de paso mínimo más alto que el deseado en las direcciones laterales. Otras técnicas, tal como un proceso de paso y repetición UV profundo, son capaces de proporcionar una litografía de mayor resolución y se pueden utilizar para producir pasos pequeños y posiblemente diámetros de pocillo más pequeños. Por supuesto, para diferentes especificaciones deseadas (por ejemplo, números de sensores y pocillos por chip), diferentes técnicas pueden resultar óptimas. Y los factores pragmáticos, como los procesos de fabricación disponibles para un fabricante, pueden motivar el uso de un método de fabricación específico. Aunque se analizan métodos novedosos, diversos aspectos de la invención se limitan al uso de estos métodos novedosos.

Preferiblemente, la oblea CMOS con la matriz de ISFET se planarizará después del proceso de metalización final. Es adecuada una planarización dieléctrica mecánica química antes de la pasivación con nitruro de silicio. Esto permitirá que los pasos litográficos posteriores se realicen en superficies muy planas que están libres de topografía CMOS de fondo.

Mediante la utilización de sistemas de litografía de paso y repetición UV profundo, es posible resolver pequeñas características con una resolución, registro y repetibilidad superiores. Sin embargo, la alta resolución y la gran apertura numérica (NA) de estos sistemas impide que tengan una gran profundidad de enfoque. Como tal, puede ser necesario, cuando se usa un sistema de fabricación de este tipo, usar capas más delgadas fotodefinibles giradas (es decir, materiales protectores del orden de 1-2 μm en lugar de las capas más gruesas que se usan en la litografía de contacto) para transferir patrones y luego grabar las características de los micropocillos en la capa o capas subyacentes. Por ejemplo, se pueden realizar secuencialmente cuatro deposiciones de película delgada de vapor químico mejorado con plasma de 1 μm (proceso de fabricación estándar) para generar un espesor de micropocillo objetivo de 4 μm . Luego se puede usar litografía de alta resolución para estampar las características de los micropocillos y se pueden usar químicas de grabado de SiO₂ convencionales, una para las áreas de la almohadilla adhesiva y luego las áreas de los micropocillos, con paradas de grabado selectivas; las paradas de grabado pueden ser sobre almohadillas de unión de aluminio y pasivación de nitruro de silicio (o similar), respectivamente. Alternativamente, se pueden emplear otros procesos de grabado y transferencia de patrones sustitutos adecuados para producir micropocillos de materiales inorgánicos.

Otro enfoque es formar la estructura de micropocillos en un material orgánico. Por ejemplo, se puede emplear un proceso de "máscara blanda" de material protector dual, mediante el cual se utiliza un material protector UV profunda delgada de alta resolución sobre un material orgánico más grueso (por ejemplo, poliimida curada o material protector de acción opuesta). La capa superior del material protector está estampada. El patrón se puede transferir utilizando un proceso de grabado de iones reactivos con plasma de oxígeno. Esta secuencia de proceso a veces se denomina técnica de "máscara adaptable portátil" (PCM). Ver BJ Lin y otros, "Practicing the Novolac deep-UV portable conformable masking technique", Journal of Vacuum Science and Technology 19, Núm. 4, 1313-1319 (1981); y A. Cooper et al, "Optimization of a photosensitive spin-on dielectric process for copper inductor coil and interconnect protection in RF SoC devices."

Alternativamente, se puede emplear una técnica de "enfoque de perforación", mediante la cual se realizan varias exposiciones secuenciales de paso y repetición a diferentes profundidades focales para compensar la profundidad de enfoque limitada (DOF) de los fotorrepetidores de alta resolución cuando se estampan capas gruesas de material protector. Esta técnica depende de la NA y DOF del fotorrepetidor, así como de las propiedades de contraste del material protector.

Se puede adaptar otra técnica de PCM para estos fines, como la que se muestra en U.S. patent application publication no. 2006/0073422 by Edwards y otros. Este es un proceso PCM de tres capas y se ilustra en la Figura 33A. Como se muestra allí, básicamente se requieren seis pasos principales para producir la matriz de micropocillos y el resultado es bastante similar al que produciría la litografía de contacto.

En un primer paso, 3320, una capa de material fotoprotector de acción negativa de alto contraste como el tipo Shipley InterVia Photodielectric Material 8021 (IV8021) 3322 se hila sobre la superficie de una oblea, que supondremos que es la oblea que proporciona el sustrato 3312 de la Figura 33 (en la que se fabrica la matriz de sensores), y se realiza una operación de horneado suave. A continuación, en el paso 3324, se aplica una capa 3326 de recubrimiento antirreflectante de bloqueo (BARC) y se hornea suavemente. Encima de esta estructura, se hila una fina capa de material protector 3328 y se hornea suavemente, paso 3330, la fina capa de material protector es adecuada para una definición fina de las características. La capa de material protector 3328 luego se estampa, expone y revela, y el BARC en las regiones expuestas 3329, que ya no están protegidas por la capa protectora 3328, se elimina, Paso 3332. Esto abre las regiones 3329 hasta la capa IV8021 sin curar. La capa BARC ahora puede actuar como una máscara de contacto conforme. Una exposición general con una herramienta de exposición

de inundación, paso 3334, entrecruza el IV8021 expuesto, que ahora se muestra distinto del IV8021 sin curar en 3322. Luego se realizan uno o más pasos de revelador 3338, eliminando todo menos el IV8021 entrecruzado en las regiones 3336. Las regiones 3336 ahora constituyen las paredes de los micropocillos.

Aunque, como se muestra arriba, los pocillos tocan fondo (es decir, terminan) en la capa superior de pasivación de los ISFET, se cree que se puede obtener una mejora en el rendimiento del sensor ISFET (es decir, como la relación señal-ruido) si la perla activa se mantiene ligeramente elevada de la capa de pasivación del ISFET. Una forma de hacerlo es colocar una "protuberancia" espaciadora dentro del límite del micropocillo de píxeles. Un ejemplo de cómo se podría representar esto sería no grabar una porción de la capa o capas utilizadas para formar la estructura de micropocillos (es decir, dos pasos litográficos para formar los micropocillos: uno para grabar parcialmente, el otro para estampar la protuberancia y terminar el grabado hasta el fondo), depositando y definiendo litográficamente y grabando una capa separada para formar la "protuberancia", o usando un material fotodefinible permanente para la protuberancia una vez que los micropocillos estén completos. La característica de protuberancia se muestra como 3350 en la Figura 33B. Un enfoque no integrado alternativo (o adicional) consiste en cargar los pocillos con una o dos capas de perlas de relleno muy pequeñas antes de cargar las perlas que contienen ADN.

Montaje del chip revestido en una celda de flujo (interfaz de fluidos)

El proceso de utilizar el conjunto de una matriz de sensores en un chip combinado con una matriz de micropocillos para secuenciar el ADN en una muestra se denomina "experimento". Ejecutar un experimento requiere cargar los pocillos con perlas unidas al ADN y el flujo de varias soluciones diferentes (es decir, reactivos y lavados) a través de los pocillos. Se necesita un sistema de suministro de fluidos acoplado con una interfaz fluidica que haga fluir las diversas soluciones a través de los pocillos en un flujo laminar controlado con volúmenes muertos aceptablemente pequeños y una pequeña contaminación cruzada entre soluciones secuenciales. La interfaz fluidica a veces se denomina "celda de flujo".

Son posibles diseños de celdas de flujo de muchas configuraciones; el sistema y los métodos presentados en este documento no dependen del uso de una configuración de celda de flujo específica. Sin embargo, es deseable que una celda de flujo adecuada se ajuste sustancialmente al siguiente conjunto de objetivos:

- interconexiones adecuadas con un sistema de suministro de fluidos, por ejemplo, a través de un tubo de tamaño apropiado;
- espacio de cabeza apropiado (para secuenciación de ADN, aproximadamente 300 μm) por encima de los pocillos;
- minimización de los volúmenes muertos que encuentran los fluidos antes de su entrada a la cámara de flujo (es decir, el espacio cerrado por encima de la matriz de micropocillos).
- eliminación de pequeños espacios en contacto con líquido pero no barridos a través de la celda de flujo (para minimizar la contaminación cruzada).
- expansión uniforme del flujo desde el tubo de entrada hasta un frente ancho/plano en la entrada a la cámara de flujo.
- características de flujo laminar tales que el perfil frontal ancho/plano se mantiene a medida que atraviesa el chip desde el lado de entrada al lado de salida.
- adaptable a la colocación de un electrodo de referencia extraíble dentro o lo más cerca posible de la cámara de flujo.
- fácil carga de perlas.
- fabricable a un costo aceptable
- fácil montaje de la celda de flujo y fijación al paquete de chips.

Cada uno de varios diseños de ejemplo será analizado, cumpliendo con estos criterios. En cada caso, típicamente se puede optar por implementar el diseño de una de dos maneras: ya sea adjuntando la celda de flujo a una trama y pegando la trama (o uniéndola de otro modo) al chip o integrando la trama en la estructura de la celda de flujo y uniendo este conjunto al chip. Además, los diseños pueden categorizarse por la forma en que el electrodo de referencia está integrado en la disposición. Según el diseño, el electrodo de referencia puede estar integrado en la celda de flujo (por ejemplo, formar parte del techo de la cámara de flujo) o estar en el trayecto de flujo (típicamente en la salida o en el lado aguas abajo del trayecto de flujo, después de la matriz de sensores).

En las Figuras 34 - 37, se muestra un primer ejemplo de un aparato de experimento 3410 adecuado que incorpora una interfaz fluidica de este tipo, cuya fabricación y construcción se analizarán con mayor detalle a continuación.

El aparato comprende un chip semiconductor 3412 (indicado generalmente, aunque oculto) sobre o en el que se forman las matrices de pocillos y sensores, y un conjunto de fluidos 3414 encima del chip y que suministra la muestra al chip para su lectura. El conjunto de fluidos incluye una porción 3416 para introducir el fluido que contiene la muestra, una porción 3418 para permitir que el fluido se canalice y una porción de la cámara de flujo 3420 para permitir que el fluido fluya desde la entrada hasta la salida y en el camino interactúe con el material en los pocillos. Esas tres porciones están unificadas por una interfaz que comprende un portaobjetos de vidrio 3422 (por ejemplo, Erie Microarray Cat #C22-5128-M20 de Erie Scientific Company, Portsmouth, NH, cortado en tercios de tamaño de aproximadamente 25 mm x 25 mm).

Montados en la cara superior del portaobjetos de vidrio hay dos accesorios, 3424 y 3426, como los accesorios de nanopuerto Parte # N-333 de Upchurch Scientific of Oak Harbor, WA. Un puerto (por ejemplo, 3424) sirve como una entrada que suministra líquidos desde el sistema de bombeo/válvula que se describe a continuación pero que no se muestra aquí. El segundo puerto (por ejemplo, 3426) es la salida que canaliza los líquidos hacia el desecho. Cada puerto se conecta a un conducto 3428, 3432 tal como un tubo flexible de diámetro interior apropiado. Los nanopuertos se montan de manera que el tubo pueda penetrar los agujeros correspondientes en el portaobjetos de vidrio. Las aberturas de los tubos deben quedar al ras con la superficie inferior del portaobjetos.

En la parte inferior del portaobjetos de vidrio, la cámara de flujo 3420 puede comprender varias estructuras para promover un flujo sustancialmente laminar a través de la matriz de micropocillos. Por ejemplo, una serie de canales de microfluidos que se abren en abanico desde el tubo de entrada hasta el borde de la cámara de flujo pueden estamparse mediante litografía de contacto utilizando materiales fotoprotectores positivos como el material fotoprotector SU-8 de MicroChem Corp. of Newton, MA. Otras estructuras se analizarán a continuación.

El chip 3412, a su vez, se montará en un portador 3430, para empaquetarlo y conectarlo a los pasadores del conector 3432.

Para facilitar la descripción, para analizar la fabricación a partir de la Figura 38, ahora consideraremos que el portaobjetos de vidrio 3422 está invertido en relación con la orientación que tiene en las Figuras 34-37.

Se aplica una capa de material fotoprotector 3810 a la "parte superior" del portaobjetos (que se convertirá en el lado "inferior" cuando el portaobjetos y sus capas adicionales se den la vuelta y se monten en el conjunto de sensores de la matriz de ISFET con la matriz de micropocillos). La capa 3810 puede tener un grosor de aproximadamente 150 µm en este ejemplo, y formará la capa principal de transporte de fluidos desde el extremo del tubo en los nanopuertos hasta el borde del chip de la matriz de sensores. La capa 3810 se estampa usando una máscara como la máscara 3910 de la Figura 39 ("estampada" significa que se usa una fuente de radiación para exponer el material protector a través de la máscara y luego se retira el material protector no plastificado). La máscara 3910 tiene regiones transparentes a la radiación que se muestran en blanco y regiones de bloqueo de la radiación 3920, que se muestran sombreadas. Las regiones de bloqueo de la radiación están en 3922-3928. La región 3926 formará un canal alrededor del conjunto de sensores; se forma alrededor de 0,5 mm dentro del límite exterior de la máscara 3920, para evitar la perla de borde que es típica. Las regiones 3922 y 3924 bloquearán la radiación de modo que las porciones correspondientes del material protector se eliminen para formar vacíos con la forma que se muestra. Cada una de las regiones 3922, 3924 tiene un extremo redondeado dimensionado para recibir un extremo de uno correspondiente de los tubos 3428, 3432 que pasa a través de un nanopuerto 3424, 3426 correspondiente. Desde el extremo redondeado, las regiones 3922, 3924 se abren en abanico en la dirección de la matriz de sensores para permitir que el líquido se extienda de modo que el flujo a través de la matriz sea sustancialmente laminar. La región 3928 es simplemente un patrón de alineación y puede ser cualquier patrón de alineación adecuado o ser reemplazado por un mecanismo de alineación sustituto adecuado. Se proporcionaron líneas discontinuas en la Figura 38 para ilustrar la formación de los vacíos 3822 y 3824 debajo de las regiones de máscara 3922 y 3924.

Una segunda capa de material fotoprotector se forma de manera bastante separada, no en el material protector 3810 ni en el portaobjetos 3422. Preferiblemente, esta se forma sobre una superficie plana y flexible (no mostrada), para crear una capa de plástico estampada que se despegue. Esta segunda capa de material fotoprotector puede formarse usando una máscara como la máscara 4010, que dejará sobre el sustrato flexible, después del estampado, el borde debajo de la región 4012, dos ranuras debajo de las regiones 4014, 4016, cuyo uso se analizará más adelante, y las marcas de alineación producidas por las regiones estampadas 4018 y 4022. La segunda capa de material fotoprotector se aplica luego a la primera capa de material fotoprotector utilizando una marca de alineación o un conjunto de marcas de alineación, digamos producidas por el patrón 4018, para la alineación de estas capas. A continuación, se despegue la segunda capa de su sustrato flexible y se retira este último.

La otra marca de alineación o conjunto de marcas producido por el patrón 4022 se usa para la alineación con una capa posterior que se analizará.

La segunda capa tiene preferiblemente una profundidad de aproximadamente 150 μm y cubrirá el canal de transporte de fluidos con la excepción de una hendidura de aproximadamente 150 μm de largo en cada borde respectivo del chip de matriz de sensores, debajo de las regiones de formación de hendiduras 4014 y 4016.

Una vez que la segunda capa de material fotoprotector se coloca sobre la primera capa, se forma una tercera capa estampada de material fotoprotector sobre la segunda capa, usando una máscara como la máscara 4110, que se muestra en la Figura 41. La tercera capa proporciona un miembro deflector debajo de la región 4112 que es tan ancho como el cuello 3310 en la matriz de chips sensores (ver Figura 33) pero alrededor de 300 μm más estrecho para permitir la superposición con el canal de transporte de fluidos de la primera capa. La tercera capa puede tener un grosor de aproximadamente 150 μm y penetrará en el cuello del chip 3310, hacia el suelo de la cuenca así formada, 150 μm . Esta configuración dejará un espacio de aproximadamente 300 μm por encima de los pocillos en el chip de la matriz de sensores. Los líquidos fluyen a través de los pocillos a lo largo de todo el ancho de la matriz de sensores a través de las ranuras de 150 μm debajo de 4014, 4016.

La Figura 36 muestra una vista en sección parcial, en perspectiva, de la realización de ejemplo descrita anteriormente de un conjunto de sensores y microfluidos, también representado en las Figuras 34 y 35, ampliadas para hacer más visible el recorrido del flujo de fluido. (En la Figura 37 se muestra un esquema más ampliado de la mitad de la trayectoria del flujo). Aquí, se verá que el fluido entra a través del tubo de entrada 3428 en el puerto de entrada 3424. En la parte inferior del tubo 3428, el fluido fluye a través de la cámara de expansión de flujo 3610 formada por el área de la máscara 3922, el fluido fluye por el cuello 3310 y luego hacia el fondo 3320 de la cuenca, y a través de la pastilla 3412 con su matriz de micropocillos. Después de pasar por la matriz, el fluido toma un giro vertical en la pared opuesta del cuello 3310 y fluye sobre la parte superior del cuello hacia y a través de la cámara de concentración de flujo 3612 formada por el área de la máscara 3924, saliendo a través del tubo de salida 3432 en el puerto de salida 3426. Parte de este flujo, desde el centro de la matriz hasta la salida, también puede verse en la ilustración esquemática ampliada de la Figura 37, en donde las flechas indican el flujo del fluido.

El conjunto de fluidos se puede asegurar al conjunto de chips de la matriz de sensores aplicando un adhesivo a las partes de las superficies de acoplamiento de esos dos conjuntos, y presionándolos juntos, en alineación.

Aunque no se ilustra en las Figuras 34-36, se puede entender que el electrodo de referencia es una metalización 3710, como se muestra en la Figura 37, en el techo de la cámara de flujo.

En la Figura 42 se muestra otra forma de introducir el electrodo de referencia. Allí, se proporciona un agujero 4210 en el techo de la cámara de flujo y se ajusta una arandela 4212 (por ejemplo, de silicona) en ese agujero, proporcionando un pasaje central u orificio a través del cual se puede insertar un electrodo de referencia 4220. Se pueden estampar deflectores u otras microcaracterísticas (no mostrados) en el canal de flujo para promover el flujo laminar sobre la matriz de micropocillos.

Las Figuras 43 - 44 muestran otro diseño alternativo de celda de flujo, 4310. Este diseño se basa en el moldeo de una sola pieza de plástico o miembro 4320 que se unirá al chip para completar la celda de flujo. La conexión al sistema fluido se realiza a través de conexiones roscadas en los agujeros correspondientes de la pieza de plástico en 4330 y 4340. O, si el miembro 4320 está fabricado de un material como polidimetilsiloxano (PDMS), las conexiones se pueden realizar simplemente insertando el tubo en un agujero de tamaño adecuado en el miembro 4320. Una sección transversal vertical de este diseño se muestra en las Figuras 43-44. Este diseño puede usar un cuello de plástico sobresaliente 4350 (que puede ser una pared sólida como se muestra o una serie de patas dependientes separadas que forman una pared similar a una cerca que se extiende hacia abajo) para encerrar el paquete de chips y alinear la pieza de plástico con el paquete de chips, u otra estructura adecuada, y por lo tanto para alinear la trama de chip con el miembro que forma la celda de flujo 4320. El líquido se dirige hacia la celda de flujo a través de una de las aberturas 4330, 4340, y desde allí desciende hacia la cámara de flujo.

En la realización ilustrada, el electrodo de referencia se introduce en la parte superior de la cámara de flujo a través de un orificio 4325 en el miembro 4320. La colocación del electrodo de referencia extraíble se ve facilitada por un manguito de silicona 4360 y un anillo de tope de epoxi 4370 (consulte la ampliación de la Figura 44). El manguito de silicona proporciona un sello hermético y el anillo de tope de epoxi evita que el electrodo se inserte demasiado en la celda de flujo. Por supuesto, se pueden emplear otros mecanismos para los mismos fines y puede que no sea necesario emplear una estructura para detener el electrodo. Y si se usa un material como PDMS para el miembro 4320, el propio material puede formar un sello hermético cuando se inserta el electrodo, obviando la necesidad del manguito de silicona.

Las Figuras 45 y 46 muestran una disposición similar excepto que el miembro 4510 carece de un orificio para recibir un electrodo de referencia. En su lugar, el electrodo de referencia 4515 está formado o fijado a la parte inferior de la porción central 4520 y forma al menos parte del techo de la cámara de flujo. Por ejemplo, se puede aplicar una capa metalización sobre la parte inferior de la porción central 4520 antes de montar el miembro 4510 sobre el paquete de chips.

Las Figuras 47-48 muestran otro ejemplo, que es una variante de la realización mostrada en las Figuras 43-44, pero en donde la trama se fabrica como parte de la celda de flujo más bien uniendo una estructura de puerto de flujo a una trama previamente unida a la superficie del chip. En diseños de este tipo, el montaje es algo más delicado ya que las uniones por hilos al chip no están protegidas por el epoxi que encapsula el chip. El éxito de este diseño depende de la colocación precisa y el pegado seguro de la "estructura" integrada a la superficie del chip. Una realización equivalente a la de las Figuras 45-46, con el electrodo de referencia 4910 en el techo de la cámara de flujo y con la estructura fabricada como parte de la celda de flujo, se muestra en las Figuras 49-50.

Otra alternativa más para un conjunto de fluidos, como se muestra en las Figuras 51-52, tiene un miembro de fluidos 5110 elevado aproximadamente 5,5 mm en los empates 5120 desde la parte superior del paquete de chips 5130. Esto permite que un operador inspeccione visualmente la calidad de la unión entre la pieza de plástico 5140 y la superficie del chip y refuerce la unión externamente si es necesario.

Algunas de las realizaciones alternativas anteriores también pueden implementarse en una configuración híbrida de plástico/PDMS. Por ejemplo, como se muestra en las Figuras 53-54, una parte de plástico 5310 puede formar la estructura y la cámara de flujo, descansando sobre una porción "base" 5320 de PDMS. La parte de plástico 5310 también puede proporcionar una región 5330 a la matriz, para la expansión del flujo de fluido desde el puerto de entrada; y la parte de PDMS puede incluir ranuras de comunicación 5410, 5412 a través de las cuales pasan líquidos desde la parte de PDMS hacia y desde la cámara de flujo de abajo.

La estructura fluidica también puede estar fabricada de vidrio como se ha analizado anteriormente, tal como vidrio fotodefinible (PD). Tal vidrio puede tener una tasa de grabado mejorada en ácido fluorhídrico una vez expuesto selectivamente a la luz ultravioleta y, por lo tanto, las características pueden micromaquinarse en el lado superior y el lado posterior, que cuando se pegan juntas pueden formar una celda fluidica tridimensional de baja relación de aspecto.

En la Figura 55 se muestra un ejemplo. Una primera capa o lámina de vidrio 5510 se estampó y grabó para crear agujeros fluidicos de nanopuertos 5522 y 5524 en el lado superior y canales de expansión de fluidos 5526 y 5528 en el lado posterior. Una segunda capa o lámina de vidrio 5530 ha sido estampada y grabada para proporcionar canales de entrada/salida de fluido hacia abajo 5532 y 5534, de aproximadamente 300 µm de altura (el espesor de la capa). La superficie inferior de la capa 5530 se adelgaza hacia el exterior de los canales 5532 y 5534, para permitir que la capa 5530 descansa sobre la estructura de chip y el área sobresaliente 5542 para estar a una altura adecuada para formar la parte superior del canal de flujo. Se requieren dos capas de vidrio u obleas y cuatro pasos de litografía. Ambas obleas deben estar alineadas y unidas (por ejemplo, con un pegamento apropiado, que no se muestra) de modo que los puertos de entrada/salida de fluido hacia abajo estén alineados correctamente con los canales de expansión de fluido. Los objetivos de alineación se pueden grabar en el vidrio para facilitar el proceso de alineación.

Los nanopuertos se pueden asegurar sobre los agujeros fluidicos de los nanopuertos para facilitar la conexión de los tubos de entrada y salida.

Se puede grabar un orificio central 5550 a través de las capas de vidrio para recibir un electrodo de referencia, 5560. El electrodo se puede asegurar y sellar en su lugar con un cuello de silicona 5570 o una estructura similar; o el electrodo puede estar equipado integralmente con una arandela adecuada para realizar el mismo propósito.

Al usar materiales de vidrio para la celda fluidica de dos capas, el electrodo de referencia también puede ser una capa conductora o patrón depositado en la superficie inferior de la segunda capa de vidrio (no mostrada). O, como se muestra en la Figura 56, la región sobresaliente se puede grabar para formar una membrana de vidrio permeable 5610 sobre la cual se recubre una película delgada de plata (u otro material) 5620 para formar un electrodo de referencia integrado. Se puede grabar un agujero 5630 en la capa superior para acceder al electrodo y, si ese agujero es lo suficientemente grande, también puede servir como depósito para una solución de cloruro de plata. La conexión eléctrica al electrodo de plata de película delgada se puede realizar de cualquier forma adecuada, como mediante un conector de pasador con clip o, alternativamente, mediante uniones por hilos al paquete de ISFET de cerámica.

En las Figuras 57-58. Este diseño se limita a una pieza de plástico 5710 que incorpora la estructura y se une directamente a la superficie del chip, y a una segunda pieza 5720 que se usa para conectar los tubos del sistema fluidico y, de manera similar a la pieza de PDMS analizada anteriormente, distribuye los líquidos desde el tubo de pequeño orificio hasta una hendidura ancha y plana. Las dos piezas se pegan entre sí y se pueden usar múltiples (por ejemplo, tres) marcadores de alineación (no mostrados) para alinear con precisión las dos piezas durante el proceso de pegado. Se puede proporcionar un agujero en la placa inferior y se puede usar el agujero para llenar la cavidad con epoxi (por ejemplo) para proteger las uniones por hilos al chip y para llenar cualquier espacio potencial en el contacto de estructura/chip. En el ejemplo ilustrado, el electrodo de referencia es externo a la celda de flujo (aguas abajo en la corriente de escape, a través del puerto de salida; ver a continuación), aunque, por supuesto, se pueden usar otras configuraciones de electrodo de referencia.

Aún otros ejemplos de estructuras de celdas de flujo se muestran en las Figuras 59-60. La Figura 59A comprende ocho vistas (A-H) de una capa o placa inferior moldeada por inyección, 5910, para una interfaz fluidica de celda de flujo, mientras que la Figura 59B comprende siete vistas (A-G) de una placa o capa superior moldeada por inyección coincidente, 5950. La parte inferior de la placa 5910 tiene un borde que cuelga hacia abajo 5912 configurado y dispuesto para encerrar el chip sensor y un borde que se extiende hacia arriba 5914 para acoplarse con la placa superior 5610 a lo largo de su borde exterior. Para formar dos cámaras de fluido (una cámara de entrada y una cámara de salida) entre ellas. Una porción escalonada que cuelga hacia abajo 5960 de la placa superior 5950 separa la cámara de entrada de la cámara de salida. Un tubo de entrada 5970 y un tubo de salida 5980 están moldeados integralmente con el resto de la placa superior 5950. Desde el tubo de entrada 5970, que desemboca en el extremo pequeño de la cámara de entrada formada por una depresión 5920 en la parte superior de la placa 5910, hasta el borde de salida de la cámara de entrada, se abre para dirigir el fluido por toda la matriz.

Ya sea que se use vidrio, plástico u otro material para formar la celda de flujo, puede ser deseable, especialmente con matrices más grandes, incluir en la cámara de entrada de la celda de flujo, entre el conducto de entrada y el borde frontal de la matriz, no solo un espacio que se expande gradualmente (abanico), sino también alguna estructura para facilitar el flujo a través de la matriz que es adecuadamente laminar. Usando la capa inferior 5990 de una celda de flujo moldeada por inyección como ejemplo, un tipo de estructura de ejemplo para este propósito, que se muestra en la Figura 59C, es una estructura de árbol 5992 de canales desde la ubicación de entrada de la celda de flujo hasta el borde frontal de la matriz de micropocillos o matriz de sensores, que debe entenderse que está debajo del lado de salida de la estructura, en 5994.

Hay varias otras formas de proporcionar un conjunto de fluidos para suministrar un flujo de fluido apropiado a través del conjunto de matriz de micropocillos y sensores y, por lo tanto, los ejemplos anteriores no pretenden ser exhaustivos.

Electrodo de referencia

Los electrodos fluidicos de tipo de flujo comerciales, como los electrodos permeables a los protones de cloruro de plata, se pueden insertar en serie en una línea fluidica y generalmente están diseñados para proporcionar un potencial eléctrico estable a lo largo de la línea fluidica para diversos fines electroquímicos. Sin embargo, en el sistema analizado anteriormente, dicho potencial debe mantenerse en el volumen fluidico en contacto con el chip de ISFET de micropocillos. Con los electrodos de cloruro de plata convencionales, se ha encontrado que es difícil lograr un potencial estable debido a una trayectoria fluidica eléctricamente larga entre la superficie del chip y el electrodo (a través de pequeños canales en la celda de flujo). Esto condujo a la recepción de ruido en la electrónica del chip. Además, el gran volumen dentro de la cavidad de flujo del electrodo tendía a atrapar y acumular burbujas de gas que degradaban la conexión eléctrica con el fluido. Con referencia a la Figura 60, se ha encontrado una solución a este problema en el uso de un electrodo de tubo capilar de acero inoxidable 6010, conectado directamente al puerto de salida de la celda de flujo del chip 6020 y conectado a una fuente de tensión (no se muestra) a través de un cable blindado 6030. El tubo capilar de metal 6010 tiene un diámetro interior pequeño (por ejemplo, del orden de 0,01") que no atrapa gas en un grado apreciable y transporta fluido y gas de forma eficaz como otros tubos microfluidicos. Además, debido a que el tubo capilar se puede insertar directamente en el puerto de la celda de flujo 6020, se acerca a la superficie del chip, lo que reduce las posibles pérdidas eléctricas a través del fluido. La gran superficie interna del tubo capilar (típicamente de aproximadamente 2" de largo) también puede contribuir a su alto rendimiento. La construcción de acero inoxidable es muy resistente a los productos químicos y no debe estar sujeta a efectos electroquímicos debido al uso muy bajo de corriente eléctrica en el sistema ($< 1 \mu\text{A}$). Un accesorio fluidico 6040 está unido al extremo del capilar que no está en el puerto de la celda de flujo, para la conexión a la tubería al subsistema de suministro y extracción de fluidos.

Sistema fluidico

Un sistema completo para usar la matriz de sensores incluirá fuentes de fluidos adecuadas, válvulas y un controlador para operar las válvulas para reactivos bajos y soluciones de lavado sobre la micromatriz o la matriz de sensores, dependiendo de la aplicación. Estos elementos se ensamblan fácilmente a partir de componentes listos para usar, y el controlador se puede programar fácilmente para realizar un experimento deseado.

Como ya se analizó, el aparato y los sistemas de la invención pueden usarse para detectar y/o monitorear interacciones entre varias entidades. Estas interacciones incluyen reacciones químicas o enzimáticas en las que se consumen sustratos y/o reactivos y/o se generan subproductos de reacción. Un ejemplo de una reacción enzimática que se puede monitorear de acuerdo con la invención es la secuenciación de ácidos nucleicos, que se analizará con mayor detalle en este documento. En el contexto de una reacción de secuenciación, el aparato y el sistema proporcionados en el presente documento pueden detectar la incorporación de nucleótidos en función de los cambios en la corriente chemFET. Los cambios actuales pueden ser el resultado de uno o más de los siguientes eventos, ya sea individualmente o alguna combinación de los mismos: generación de PPI, generación de Pi (por ejemplo, en presencia de pirofosfatasa), generación de hidrógeno (y cambios concomitantes en el pH, por ejemplo, en la presencia de tampón de baja fuerza), concentración reducida de dNTP no incorporado en la superficie del chemFET, llegada retrasada de dNTP a la superficie del chemFET, y similares. Debe entenderse que los métodos

proporcionados en este documento no dependen del mecanismo mediante el cual se efectúa el cambio de corriente. Y en consecuencia, la invención contempla la secuenciación de ácidos nucleicos basada en cambios en la corriente chemFET. Los métodos proporcionados en este documento con respecto a la secuenciación pueden contrastarse con los de la literatura, que incluye Pourmand y otros PNAS 2006 103(17):6466-6470.

La Figura 61 ilustra la producción de PPi resultante de la incorporación de un nucleótido en una cadena de ácido nucleico recién sintetizada. El PPi generado como subproducto de la reacción de la incorporación de nucleótidos en una cadena de ácido nucleico puede detectarse directamente incluso en ausencia de un receptor de PPi (como los proporcionados en la Figura 11B) y en ausencia de un cambio de pH detectable (por ejemplo, como puede ocurrir en presencia de un tampón fuerte, como se define en este documento). La simple presencia de PPi es suficiente, en algunos casos, para provocar un cambio eléctrico en la superficie del chemFET, lo que da como resultado un cambio de corriente. El cambio de corriente puede resultar de la generación de PPi solo o en combinación con otros eventos como los descritos anteriormente.

Por tanto, en un aspecto, la invención contempla la secuenciación de ácidos nucleicos usando una matriz de chemFET tal como una matriz de ISFET. El método de la invención es un método de "secuenciación por síntesis" ya que requiere la síntesis de una nueva cadena de ácido nucleico que sea complementaria a la cadena que se está secuenciando.

La liberación de PPi luego de la incorporación de un nucleótido en una cadena de ácido nucleico recién sintetizada se muestra en la Figura 61. La incorporación de un dNTP en la cadena de ácido nucleico libera PPi que luego puede hidrolizarse a dos ortofosfatos (Pi) y un ion de hidrógeno. Por lo tanto, la generación del ion hidrógeno puede facilitar la detección de la incorporación de nucleótidos sobre la base del cambio de pH. Alternativamente, como se analiza en el presente documento, la generación de PPi (detectada en ausencia o presencia de receptores de PPi) puede facilitar la detección de la incorporación de nucleótidos sobre la base del cambio de pH. Y en aún otra realización, PPi puede convertirse en Pi usando pirofosfatasa y Pi puede detectarse directa o indirectamente. Cualquiera y todos estos eventos (y más como se describe aquí) pueden estar involucrados en causar un cambio actual en el chemFET que se correlaciona con la incorporación de nucleótidos.

Las reacciones de secuenciación tienen como objetivo maximizar la incorporación completa en todos los pocillos para cualquier dNTP determinado, reducir o disminuir la cantidad de dNTP no incorporados que permanecen en los pocillos y lograr una relación señal/ruido lo más alta posible.

El ácido nucleico que se está secuenciando se denomina en el presente documento ácido nucleico diana. Los ácidos nucleicos diana incluyen, entre otros, ADN como, entre otros, ADN genómico, ADN mitocondrial, ADNc y similares, y ARN, como, entre otros, ARNm, miARN y similares. El ácido nucleico puede ser de cualquier fuente, incluidas fuentes naturales o fuentes sintéticas. Los ácidos nucleicos pueden ser productos de PCR, cósmidos, plásmidos, bibliotecas naturales o sintéticas y similares. La invención no pretende limitarse a este respecto. Los métodos proporcionados en este documento se pueden usar para secuenciar ácidos nucleicos de cualquier longitud. Para que quede claro, los Ejemplos proporcionan una prueba de demostración de principio de la secuenciación de cuatro moldes de secuencia conocida. Este modelo artificial pretende mostrar que el aparato y el sistema pueden leer la incorporación de nucleótidos que se correlaciona con la secuencia conocida de los moldes. Esto no pretende representar el uso típico del método o sistema en el campo. La siguiente es una breve descripción de estos métodos.

Los ácidos nucleicos diana se preparan de cualquier manera conocida en el arte. Como ejemplo, el ADN genómico se puede recolectar de una muestra de acuerdo con técnicas conocidas en el arte (ver, por ejemplo, Sambrook y otros. "Maniatis"). Después de la cosecha, el ADN puede fragmentarse para producir ácidos nucleicos de menor longitud. Los fragmentos resultantes pueden tener una longitud del orden de cientos, miles o decenas de miles de nucleótidos. En algunas realizaciones, los fragmentos tienen un tamaño de 200-1000 pares de bases, o un tamaño de 300-800 pares de bases, aunque no están tan limitados. Los ácidos nucleicos pueden fragmentarse por cualquier medio, incluidos, entre otros, medios mecánicos, enzimáticos o químicos. Los ejemplos incluyen cizallamiento, sonicación, nebulización y digestión con endonucleasas (por ejemplo, ADNasa I), o cualquier otra técnica conocida en el arte para producir fragmentos de ácido nucleico, preferiblemente de una longitud deseada. La fragmentación puede estar seguida por técnicas de selección de tamaño que pueden usarse para enriquecer o aislar fragmentos de una longitud o tamaño particular. Dichas técnicas también se conocen en el arte e incluyen, pero no se limitan a, electroforesis en gel o SPRI.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana de tamaño seleccionado se ligan a secuencias adaptadoras en los extremos 5' y 3'. Estas secuencias adaptadoras comprenden secuencias de cebadores de amplificación para usar en la amplificación de los ácidos nucleicos diana. Una secuencia adaptadora también puede comprender una secuencia complementaria al cebador de secuenciación. La secuencia adaptadora opuesta puede comprender un resto que facilita la unión del ácido nucleico a un soporte sólido tal como, entre otros, una perla. Un ejemplo de un resto de este tipo es una molécula de biotina (o un resto de biotina doble, como se describe por Diehl y otros Nature Methods, 2006, 3(7):551-559) y, por lo tanto, dicho ácido nucleico marcado puede unirse a un soporte sólido que tiene grupos avidina o estreptavidina. El ácido nucleico resultante se denomina aquí ácido nucleico molde. El ácido

nucleico molde comprende al menos el ácido nucleico diana y típicamente comprende secuencias de nucleótidos además de la diana.

- 5 En algunos casos, se usa un espaciador para distanciar el ácido nucleico molde (y en particular la secuencia de ácido nucleico diana comprendida en el mismo) de la perla. Esto facilita la secuenciación del extremo del objetivo más cercano a la perla. En el arte se conocen ejemplos de enlazadores adecuados (ver Diehl y otros *Nature Methods*, 2006, 3(7):551-559) e incluyen pero no se limitan a enlazadores carbono-carbono tales como pero no se limitan a iSp18.
- 10 El soporte sólido al que se unen los ácidos nucleicos molde se denomina en el presente documento "soporte sólido de captura". Si el soporte sólido es una perla, dicha perla se denomina en el presente documento "perla de captura". Las perlas pueden estar fabricadas de cualquier material, incluidos, entre otros, celulosa, derivados de celulosa, gelatina, resinas acrílicas, vidrio, gel de sílice, polivinilpirrolidina (PVP), copolímeros de vinilo y acrilamida, poliestireno, poliestireno reticulado con divinilbenceno o similar (ver, Merrifield *Biochemistry* 1964, 3, 1385-1390),
- 15 poliacrilamidas, geles de látex, dextrano, dextranos reticulados (por ejemplo, Sephadex™), caucho, silicona, plásticos, nitrocelulosa, esponjas naturales, metal y gel de agarosa (Sephacrose™). En una realización, las perlas son perlas recubiertas de estreptavidina. El diámetro de la perla dependerá de la densidad del ISFET y de la matriz de pocillos utilizada con matrices más grandes (y, por lo tanto, pocillos de menor tamaño) que requieren perlas más pequeñas. En general, el tamaño de las perlas puede ser de aproximadamente 1 a 10 µm, y con mayor preferencia de 2 a 6 µm. En algunas realizaciones, las perlas tienen un tamaño de aproximadamente 5,91 µm, mientras que en otras realizaciones, las perlas tienen un tamaño de aproximadamente 2,8 µm. Debe entenderse que las perlas pueden tener o no una forma perfectamente esférica. Debe entenderse que se pueden usar otras perlas y se pueden utilizar otros mecanismos para unir el ácido nucleico a las perlas.
- 20 Como se analiza en el presente documento, las reacciones de secuenciación se llevan a cabo en pocillos situados por encima de los chemFET. Los pocillos (denominados aquí de forma intercambiable como cámaras de reacción o micropocillos) pueden variar en tamaño entre matrices. Preferiblemente, la relación entre el ancho y la altura del pocillo es de 1:1 a 1:1,5. El tamaño de la perla al pocillo está preferentemente en el intervalo de 0,6-0,8.
- 25 Una población homogénea de ácidos nucleicos amplificados se conjuga con una o más perlas con la condición de que cada perla finalmente se una a una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos idénticas. El grado de carga de los moldes de ácido nucleico en las perlas dependerá de una serie de factores que incluyen el tamaño de la perla y la longitud del ácido nucleico. En la mayoría de los aspectos, se desea una carga máxima de las perlas. La amplificación y conjugación de ácidos nucleicos con un soporte sólido, como las perlas, se puede lograr de varias maneras, que incluyen, entre otras, la PCR en emulsión, como se describe en Margulies y otros *Nature* 2005 437(15):376-380 y los materiales complementarios que lo acompañan. En algunas realizaciones, la amplificación es una amplificación representativa. Una amplificación representativa es una amplificación que no altera la representación relativa de ninguna especie de ácido nucleico.
- 30 Antes y/o mientras están en los pocillos de la cámara de flujo, las perlas se incuban con un cebador de secuenciación que se une a su secuencia complementaria ubicada en el extremo 3' del ácido nucleico molde (es decir, en la secuencia del cebador de amplificación o en otra secuencia adaptadora ligada al extremo 3' del ácido nucleico diana) y con una polimerasa durante un tiempo y en condiciones que promuevan la hibridación del cebador con su secuencia complementaria y que promuevan la unión de la polimerasa al ácido nucleico molde. El cebador
- 35 puede ser de prácticamente cualquier secuencia siempre que sea lo suficientemente largo para ser único. Las condiciones de hibridación son tales que el cebador se hibridará solo con su verdadero complemento en el extremo 3' del molde. Las condiciones adecuadas se describen en Margulies y otros *Nature* 2005 437(15):376-380 y los materiales complementarios que lo acompañan.
- 40 Las polimerasas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasa, ARN polimerasa o una subunidad de las mismas, siempre que sea capaz de sintetizar una nueva cadena de ácido nucleico basada en el molde y comenzando a partir del cebador hibridado. Un ejemplo de una subunidad de polimerasa adecuada es la versión exo del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* que carece de actividad de exonucleasa de 3' a 5'. Por lo tanto, la enzima se une a la perla (o al soporte sólido correspondiente), pero no a la superficie del ISFET en sí. El
- 45 ácido nucleico molde también se pone en contacto con otros reactivos y/o cofactores que incluyen, entre otros, tampón, detergente, agentes reductores como ditionitrito (DTT, reactivo de Cleland), proteínas de unión monocatenarias y similares antes y/o mientras están en el pocillo. En una realización, el ácido nucleico molde se pone en contacto con el cebador y la polimerasa antes de su introducción en la cámara de flujo y sus pocillos.
- 50 Las perlas cargadas con ácido nucleico se introducen en la cámara de flujo y, en última instancia, en los pocillos situados encima de la matriz de ISFET. El método requiere que cada pocillo en la cámara de flujo contenga solo una perla cargada con ácido nucleico ya que la presencia de dos perlas por pocillo producirá una información de secuenciación inutilizable derivada de dos ácidos nucleicos diferentes. Los Ejemplos proporcionan una breve descripción de un protocolo de carga de perlas ilustrativo en el contexto de perlas magnéticas. Debe entenderse que
- 55 podría usarse un enfoque similar para cargar otros tipos de perlas. Se ha demostrado que el protocolo reduce la probabilidad y la incidencia de aire atrapado en los pocillos de la cámara de flujo, distribuye uniformemente perlas
- 60
- 65

cargadas con ácido nucleico en la totalidad de los pocillos de la cámara de flujo y evita la presencia y/o acumulación de exceso de perlas en la cámara de flujo.

El porcentaje de pocillos ocupados en el chip puede variar según los métodos que se realicen. Si el método tiene como objetivo extraer el máximo de datos de secuencia en el menor tiempo posible, entonces es deseable una mayor ocupación. Si la velocidad y el recorrido no son tan críticos, entonces se puede tolerar una ocupación más baja. Por lo tanto, dependiendo de la realización, los porcentajes de ocupación adecuados pueden ser de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o el 100 % de los pocillos. Como se usa aquí, la ocupación se refiere a la presencia de una perla cargada con ácido nucleico en un pocillo y el porcentaje de ocupación se refiere a la proporción del total de pocillos en un chip que están ocupados por una sola perla. Los pocillos que están ocupados por más de una perla no pueden ser utilizados en los análisis contemplados por la invención.

En última instancia, se coloca una población homogénea de ácidos nucleicos molde en uno o más de una pluralidad de pocillos, cada uno de los pocillos situado sobre y por lo tanto correspondiente a al menos un ISFET. Como se analizó anteriormente, preferiblemente el pocillo contiene al menos 10, al menos 100, al menos 1000, al menos 10^4 , al menos 10^5 , al menos 10^6 o más copias de un ácido nucleico molde idéntico. Ácidos nucleicos molde idénticos significa como mínimo que los moldes son idénticos en secuencia. La mayoría y preferiblemente todos los ácidos nucleicos molde dentro de un pocillo se hibridan uniformemente con un cebador. La hibridación uniforme de los ácidos nucleicos molde con los cebadores significa que el cebador se hibrida con el molde en la misma ubicación (es decir, la secuencia a lo largo del molde que es complementaria al cebador) que cualquier otro híbrido cebador-molde en el pocillo. El posicionamiento uniforme del cebador en cada molde permite la síntesis coordinada de todas las nuevas cadenas de ácido nucleico dentro de un pocillo, lo que da como resultado una mayor relación señal-ruido.

A continuación, se añaden nucleótidos en flujo, o por cualquier otro método adecuado, en orden secuencial a la cámara de flujo y, por tanto, a los pocillos. Los nucleótidos se pueden añadir en cualquier orden, siempre que se conozca y, en aras de la simplicidad, se mantengan constantes a lo largo de una serie. Si la incorporación de nucleótidos se basa en la detección de PPI en lugar de la detección del cambio de pH como resultado de la liberación de PPI, entonces es preferible mantener un nivel y una concentración de nucleótidos relativamente constantes a lo largo de las reacciones y lavados. Una forma de lograr esto es agregar ATP al tampón de lavado de modo que los dNTP que fluyen hacia un pocillo desplacen el ATP del pocillo. El ATP coincide con la fuerza iónica de los dNTP que entran a los pocillos y también tiene un perfil de difusión similar al de esos dNTP. De esta forma, la entrada y salida de dNTP durante la reacción de secuenciación no interfieren con las mediciones en el chemFET. La concentración de ATP utilizada es del orden de la concentración de dNTP utilizada.

Un ciclo de secuenciación típico procede de la siguiente manera: lavado de la cámara de flujo (y los pocillos) con tampón de lavado que contiene ATP, introducción de una primera especie de dNTP (por ejemplo, dATP) en la cámara de flujo (y los pocillos), liberación y detección de PPI (mediante cualquiera de los mecanismos descritos en este documento), lavado de la cámara de flujo (y los pocillos) con tampón de lavado que contiene ATP, lavado de la cámara de flujo (y los pocillos) con tampón de lavado que contiene apirasa, lavado de la cámara de flujo (y los pocillos) con tampón de lavado que contiene ATP, y la introducción de una segunda especie de dNTP. Este proceso continúa hasta que los 4 dNTP (es decir, dATP, dCTP, dGTP y dTTP) hayan fluido a través de la cámara y se les haya permitido incorporarse a las hebras recién sintetizadas. Este ciclo de 4 nucleótidos puede repetirse cualquier número de veces, incluidas, entre otras, 10, 25, 50, 100, 200 o más veces. El número de ciclos se registrará por la longitud del molde que se está secuenciando y la necesidad de reponer los reactivos de reacción, en particular, las reservas de dNTP y los tampones de lavado.

Como parte de la reacción de secuenciación, se ligará un dNTP (o "se incorporará" como se usa en el presente documento) al extremo 3' de la cadena recién sintetizada (o al extremo 3' del cebador de secuenciación en el caso del primer dNTP incorporado) si su nucleótido complementario está presente en esa misma ubicación en el ácido nucleico molde. Por lo tanto, la incorporación del dNTP introducido (y la liberación concomitante de PPI) indica la identidad del nucleótido correspondiente en el ácido nucleico molde. Si el ISFET no detecta ningún cambio en el campo eléctrico, entonces el dNTP no se ha incorporado y se puede concluir que el nucleótido complementario no estaba presente en el molde en esa ubicación. Si se detecta un cambio en el campo eléctrico, entonces el dNTP introducido se ha incorporado a la hebra recién sintetizada. Existe una correlación positiva entre la incorporación de dNTP y la liberación de PPI y la respuesta del ISFET y, como resultado, es posible cuantificar el número de dNTP incorporados. En otras palabras, el cambio de tensión registrado en el ISFET está relacionado con la cantidad de dNTP incorporados. El resultado es que no se pierde información de la secuencia a través de la secuenciación de un tramo de homopolímero (por ejemplo, poli A, poli T, poli C o poli G) en el molde. Como ejemplo, si el ácido nucleico molde incluye una secuencia de 5' CAAAAG 3', el ISFET registrará una señal (por ejemplo, en términos de cambio de milivoltios) al introducir dCTP, y luego registrará una señal de mayor magnitud con la introducción de dTTP, seguida de otra señal tras la introducción de dGTP. La magnitud de las señales que surgen tras la introducción de dCTP y dTTP serán esencialmente equivalentes y se correlacionarán con el cambio de millitensión resultante de la incorporación de un solo nucleótido. La magnitud de la señal que surge tras la introducción de dTTP será mayor que las señales que surgen de la incorporación de un solo dNTP. La magnitud de estas señales puede ser aditiva y, dependiendo de la longitud del estiramiento del homopolímero, puede no ser fácilmente evidente en un gráfico de

tensión versus tiempo (o trama) (como los que se muestran en las Figuras 71A-D, paneles de la derecha). Las señales se pueden medir utilizando la intensidad máxima o el área bajo la curva de un gráfico de tensión versus tiempo (o trama).

La apirasa es una enzima que degrada los nucleótidos no incorporados residuales convirtiéndolos en monofosfato y liberando fosfato inorgánico en el proceso. Esta es útil para degradar los dNTP que no están incorporados y/o que están en exceso en todos y cada uno de los pocillos. Es importante que el exceso y/o el dNTP que no haya reaccionado se lave en todos y cada uno de los pocillos antes de la introducción del dNTP posterior. En consecuencia, la adición de apirasa durante la reacción de síntesis y entre la introducción de diferentes dNTP es útil para eliminar el exceso de dNTP que, de otro modo, oscurecería los datos de secuenciación.

A lo largo de la reacción se pueden introducir reactivos de reacción de secuenciación adicionales, como los descritos anteriormente, aunque en algunos casos esto puede no ser necesario. Por ejemplo, se puede añadir polimerasa adicional, DTT, SBB y similares si es necesario.

Por lo tanto, la invención contempla realizar una pluralidad de diferentes reacciones de secuenciación simultáneamente. Se está produciendo una pluralidad de reacciones de secuenciación idénticas en cada pocillo ocupado simultáneamente. Es esta incorporación simultánea e idéntica de dNTP dentro de cada pocillo lo que aumenta la relación señal/ruido, lo que hace posible la detección del subproducto de la reacción de secuenciación. Realizando reacciones de secuenciación en una pluralidad de pocillos simultáneamente, también se realizan simultáneamente una pluralidad de reacciones de secuenciación diferentes.

La reacción de secuenciación se puede llevar a cabo en un intervalo de temperaturas. Típicamente, la reacción se lleva a cabo en el intervalo de 30 a 60 °C, de 35 a 55 °C o de 40 a 45 °C. Es preferible realizar la reacción a temperaturas que impidan la formación de una estructura secundaria en el ácido nucleico. Sin embargo, esto debe equilibrarse con la unión del cebador (y la hebra recién sintetizada) al ácido nucleico molde y la vida media reducida de la apirasa a temperaturas más altas. Una temperatura adecuada es de aproximadamente 41 °C. Las soluciones que incluyen los tampones de lavado y las soluciones de dNTP generalmente se calientan a estas temperaturas para no alterar la temperatura en los pocillos. Sin embargo, el tampón de lavado que contiene apirasa se mantiene preferiblemente a una temperatura más baja para prolongar la vida media de la enzima. Típicamente, esta solución se mantiene a aproximadamente 4-15 °C, y con mayor preferencia de 4-10 °C.

La reacción de incorporación de nucleótidos puede ocurrir muy rápidamente. Como resultado, puede ser deseable en algunos casos ralentizar la reacción para asegurar la máxima captura de datos durante la reacción. La difusión de reactivos y/o subproductos se puede ralentizar de varias maneras, incluida, entre otras, la adición de perlas de relleno en los pocillos. Las perlas de relleno también tienden a aumentar la concentración de reactivos y/o subproductos en la superficie del chemFET, lo que aumenta el potencial de señal. La presencia de perlas de relleno generalmente permite un mayor tiempo para muestrear (por ejemplo, 2 o 4 veces).

Las tasas de captura de datos pueden variar y ser, por ejemplo, de 10 a 100 tramas por segundo y la elección de la tasa a utilizar estará establecida, al menos en parte, por el tamaño del pocillo y la presencia de perlas de relleno. Los tamaños de pocillo más pequeños generalmente requieren tasas de captura de datos más rápidas.

En algunos aspectos de la invención que se basan en el flujo y donde la cara superior del pocillo está abierta y en comunicación con fluido sobre la totalidad del chip, es importante detectar el PPi liberado u otro subproducto (por ejemplo, H⁺) antes de la difusión fuera del pocillo. La difusión de cualquiera de los subproductos de la reacción fuera del pocillo dará lugar a falsos negativos (porque el subproducto no se detecta en ese pocillo) y posibles falsos positivos en pocillos adyacentes o aguas abajo, por lo que debe evitarse. Las perlas de relleno también pueden ayudar a reducir el grado de difusión y/o diafonía entre pocillos.

Por lo tanto, en algunas realizaciones se utilizan perlas de relleno además de las perlas cargadas con ácido nucleico. Las perlas de relleno pueden ser magnéticas (incluyendo superparamagnéticas) pero no están tan limitadas. En algunas realizaciones, las perlas de relleno y las perlas de captura están hechas del mismo material (por ejemplo, ambas son magnéticas, ambas son de poliestireno, etc.), mientras que en otras realizaciones están hechas de diferentes materiales (por ejemplo, las perlas de empaque son de poliestireno y las perlas de captura son magnéticas). Las perlas de relleno son generalmente más pequeñas que las perlas de captura. La diferencia de tamaño puede variar y puede ser de 5, 10, 15, 20 o más veces. Como ejemplo, se han utilizado perlas de relleno de 0,35 µm de diámetro con perlas de captura de 5,91 µm. Dichas perlas de relleno están disponibles comercialmente de fuentes tales como Bang Labs. La ubicación de las perlas de relleno en relación con la perla de captura puede variar. Por ejemplo, las perlas de relleno pueden rodear la perla de captura y, por lo tanto, evitar que la perla de captura entre en contacto con la superficie del ISFET. Como otro ejemplo, las perlas de relleno se pueden cargar en los pocillos siguiendo a las perlas de captura, en cuyo caso la perla de captura está en contacto con la superficie del ISFET. La presencia de perlas de relleno entre la perla de captura y la superficie del ISFET ralentiza la difusión de los subproductos de la secuenciación, como el PPi, lo que facilita la captura de datos.

La invención contempla además el uso de perlas de relleno o modificaciones a la superficie del chemFET (como se describe en este documento) para evitar el contacto y, por lo tanto, la interferencia de la superficie del chemFET con los ácidos nucleicos molde unidos a las perlas de captura. Una capa de perlas de relleno de 0,1-0,5 μm de profundidad o altura impediría esta interacción.

La reacción de secuenciación puede estar precedida por un análisis de las matrices para determinar la ubicación de las perlas. Se ha encontrado que en ausencia de flujo, la señal de fondo (es decir, el ruido) es menor o igual a aproximadamente 0,25 mV, pero que en presencia de perlas de captura cargadas con ADN, esa señal aumenta a aproximadamente 1,0 mV $\pm$ 0,5 mV. Este aumento es suficiente para permitir determinar pocillos con perlas.

La invención contempla además kits que comprenden los diversos reactivos necesarios para realizar una reacción de secuenciación e instrucciones de uso de acuerdo con los métodos establecidos en el presente documento.

Un kit preferido comprende uno o más recipientes que contienen tampón de lavado, uno o más recipientes que contienen cada uno de los siguientes reactivos: tampón dATP, tampón dCTP, tampón dGTP o tampón dTTP, dATP, dCTP, dGTP y reservas de dTTP, apirasa, SSB, polimerasa, perlas de relleno y opcionalmente pirofosfatasa. Es importante destacar que los kits comprenden solo dNTP de origen natural.

Debe entenderse que las interacciones entre receptores y ligandos o entre dos miembros de un par de unión o entre componentes de un complejo molecular también pueden detectarse usando las matrices de chemFET. Los ejemplos de tales interacciones incluyen la hibridación de ácidos nucleicos entre sí, unión proteína-ácido nucleico, unión proteína-proteína, unión enzima-sustrato, unión enzima-inhibidor, unión antígeno-anticuerpo y similares. Cualquier evento de unión o hibridación que provoque un cambio de la densidad de carga del semiconductor en la interfaz FET y, por lo tanto, cambie la corriente que fluye desde la fuente hasta el drenaje de los sensores descritos en este documento puede detectarse según la invención.

En estas realizaciones, la capa de pasivación (o posiblemente una capa intermedia que recubre la capa de pasivación) se funcionaliza con ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, miARN, ADNc y similares), antígenos (que pueden ser de cualquier naturaleza), proteínas (por ejemplo, enzimas, cofactores, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y similares), y similares. La conjugación de estas entidades con la capa de pasivación puede ser directa o indirecta (por ejemplo, usando enlazadores bifuncionales que se unen tanto al grupo reactivo de la capa de pasivación como a la entidad a unir).

Como ejemplo, se pueden agregar grupos de reacción tales como grupos amina o tiol a un ácido nucleico en cualquier nucleótido durante la síntesis para proporcionar un punto de unión para un enlazador bifuncional. Como otro ejemplo, el ácido nucleico se puede sintetizar mediante la incorporación de reactivos competentes en la conjugación tal como Uni-Link AminoModifier, 3'-DMT-C6-Amina-ON CPG, AminoModifier II, N-TFA-C6-AminoModifier, C6-TiolModifier, C6-Disulfide Phosphoramidite and C6-Disulfide CPG (Clontech, Palo Alto, CA). A continuación se analizan otros métodos para unir ácidos nucleicos.

En un aspecto de la invención, las matrices de chemFET se proporcionan en combinación con matrices de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos en forma de ácidos nucleicos cortos (por ejemplo, oligonucleótidos) o ácidos nucleicos más largos (por ejemplo, ADNc de longitud completa) se pueden proporcionar en las superficies chemFET de las matrices descritas en el presente documento. Las matrices de ácidos nucleicos generalmente comprenden una pluralidad de regiones definidas físicamente en una superficie plana (por ejemplo, "manchas"), cada una de las cuales tiene conjugado uno y con mayor preferencia más ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos suelen ser monocatenarios. Los ácidos nucleicos conjugados a un punto dado suelen ser idénticos. En el contexto de una matriz de oligonucleótidos, estos ácidos nucleicos pueden tener una longitud del orden de menos de 100 nucleótidos (incluidos aproximadamente 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos). Si las matrices se utilizan para detectar determinados genes (incluidas mutaciones en tales genes o niveles de expresión de tales genes), entonces la matriz puede incluir varios puntos, cada uno de los cuales contiene oligonucleótidos que abarcan una secuencia definida y potencialmente diferente del gen. Estos puntos se ubican luego a lo largo de la superficie plana para excluir los efectos relacionados con la posición en los medios de hibridación y lectura de la matriz.

Las matrices se ponen en contacto con una muestra que se está probando. La muestra puede ser una muestra de ADN genómico, una muestra de ADNc de una célula, un tejido o una masa (por ejemplo, un tumor), una población de células que crecen en la matriz, potencialmente en una matriz bidimensional que corresponde a la matriz de sensores subyacente, y similares. Por lo tanto, dichas matrices son útiles para determinar la presencia y/o el nivel de un gen particular o de su expresión, detectar mutaciones dentro de genes particulares (tales como, entre otras, delecciones, adiciones, sustituciones, incluidos polimorfismos de un solo nucleótido) y similares.

La unión o hibridación de los ácidos nucleicos de muestra y los ácidos nucleicos inmovilizados se realiza generalmente en condiciones de hibridación estrictas tal como se entiende ese término en el arte. (Véase, por ejemplo, Sambrook y otros. "Maniatis".) Ejemplos de condiciones relevantes incluyen (en orden creciente de rigurosidad): temperaturas de incubación de 25 °C, 37 °C, 50 °C y 68 °C; concentraciones tampón de SSC 10X, SSC 6X, SSC 4X, SSC 1X, SSC 0,1X (donde SSC es 0,15 M de NaCl y 15 mM de tampón citrato) y sus equivalentes

utilizando otros sistemas tampón; concentraciones de formamida de 0 %, 25 %, 50 % y 75 %; tiempos de incubación de 5 minutos a 24 horas; 1, 2 o más pasos de lavado; tiempos de incubación de lavado de 1, 2 o 15 minutos; y soluciones de lavado de 6X SSC, 1X SSC, 0,1 X SSC o agua desionizada. A modo de ejemplo, la hibridación se puede realizar con formamida al 50 % y SSC 4X seguido de lavados de SSC 2X/formamida a 50 °C y con SSC 1X.

Las matrices de ácidos nucleicos incluyen aquellas en las que los ácidos nucleicos ya formados, como los ADNc, se depositan (o "manchan") en la matriz en una ubicación específica. Los ácidos nucleicos se pueden colocar sobre una superficie mediante deposición piezoeléctrica, reticulación UV de ácidos nucleicos a capas de polímero como, entre otros, poli-L-lisina o polipirrol, conjugación directa con SiO₂ recubierto de silicio como se describe en la Solicitud de patente de Estados Unidos 2003/0186262 publicada, conjugación directa a una superficie chemFET silanizada (por ejemplo, una superficie tratada con 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) como se describe por Uslu y otros, Biosensors and Bioelectronics 2004, 19:1723-1731, por ejemplo.

Las matrices de ácidos nucleicos también incluyen aquellas en las que los ácidos nucleicos (tales como oligonucleótidos de secuencia conocida) se sintetizan directamente en la matriz. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar en matrices utilizando técnicas reconocidas en el arte, como, entre otras, la impresión con agujas de punta fina en portaobjetos de vidrio, fotolitografía con máscaras prefabricadas, fotolitografía con dispositivos de microespejos dinámicos (como espejos DLP), impresión por chorro de tinta o electroquímica en matrices de microelectrodos. También se puede hacer referencia a Nuwaysir y otros, 2002 "Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography.". Genoma Res 12: 1749-1755. Las fuentes comerciales de este último tipo de matriz incluyen Agilent, Affymetrix y NimbleGen.

Por lo tanto, la capa de pasivación de chemFET puede estar recubierta con una capa intermedia de moléculas reactivas (y, por lo tanto, grupos reactivos) a las que se unen los ácidos nucleicos y/o a partir de los cuales se sintetizan.

La invención contempla la combinación de dichas matrices de ácidos nucleicos con las matrices de chemFET y, en particular, las matrices de chemFET a "gran escala" descritas en el presente documento. La matriz de chemFET/ácido nucleico se puede utilizar en una variedad de aplicaciones, algunas de las cuales no requerirán los pocillos (o micropocillos o cámaras de reacción, como se denominan indistintamente en este documento). Dado que los análisis pueden seguir realizándose en flujo, incluso en un sistema "cerrado" (es decir, donde el flujo de reactivos y soluciones de lavado y similares está automatizado), habrá una o más cámaras de flujo situadas encima y en contacto con la matriz. El uso de múltiples cámaras de flujo permite analizar simultáneamente múltiples muestras (o bibliotecas de ácidos nucleicos). Puede haber 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más cámaras de flujo. Esta configuración se aplica igualmente a otras matrices biológicas, incluidas las analizadas en este documento, como matrices de proteínas, matrices de anticuerpos, matrices de enzimas, matrices químicas y similares.

Dado que el evento de unión entre ligandos o entre componentes de un complejo se detecta electrónicamente a través del FET subyacente, tales ensayos pueden llevarse a cabo sin necesidad de manipular (por ejemplo, marcar extrínsecamente) la muestra que se está analizando. Esto es ventajoso ya que tal manipulación da como resultado invariablemente la pérdida de muestra y generalmente requiere más tiempo y trabajo. Además, el presente método permite estudiar las interacciones de unión en tiempo real.

También se contemplan las matrices de proteínas utilizadas en combinación con las matrices de chemFET de la invención. Las matrices de proteínas comprenden proteínas o péptidos u otros aminoácidos que comprenden un resto biológico unido a una superficie plana de una manera organizada y predeterminada. Dichas proteínas incluyen, pero no se limitan a, enzimas, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos o miméticos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios).

En una realización, una matriz de proteínas puede comprender una pluralidad de proteínas diferentes (u otros restos biológicos que contienen aminoácidos). Cada proteína, y preferiblemente una pluralidad de proteínas, está presente en una región predeterminada o "celda" de la matriz. Las regiones (o celdas) están alineadas con los sensores en la matriz de sensores de manera que hay un sensor para cada región (o celda). La pluralidad de proteínas en una única región (o celda) puede variar según el tamaño de la proteína y el tamaño de la región (o celda) y puede ser, entre otros, al menos 10, 50, 100, 500, 10³, 10⁴ o más. La propia matriz puede tener cualquier número de celdas, incluidas, entre otras, al menos 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ o más. En una aplicación, la matriz se expone a una muestra que se sabe que contiene o se sospecha que contiene un analito que se une a la proteína. El analito puede ser un sustrato o un inhibidor si la proteína es una enzima. El analito puede ser cualquier molécula que se une a la proteína, incluida otra proteína, un ácido nucleico, una especie química (ya sea sintética o natural) y similares.

Debe entenderse que, al igual que las matrices de ácidos nucleicos contempladas en este documento, la lectura de las matrices de proteínas será un cambio en la corriente a través del chemFET y, por lo tanto, no se requiere ningún paso adicional de marcaje y/o detección de marcas en estos métodos de matriz.

En otra realización, la matriz de proteínas puede comprender una pluralidad de proteínas idénticas (u otros restos biológicos que contienen aminoácidos). Las proteínas idénticas pueden distribuirse uniformemente sobre una

superficie plana o pueden organizarse en regiones discretas (o celdas) en esa superficie. En estas últimas realizaciones, las regiones (o celdas) están alineadas con los sensores en la matriz de sensores de manera que hay un sensor para cada región (o celda).

Las proteínas pueden sintetizarse fuera del chip, luego purificarse y unirse a la matriz. Alternativamente, se pueden sintetizar en un chip, de manera similar a los ácidos nucleicos analizados anteriormente. La síntesis de proteínas utilizando la expresión de ADN libre de células o la síntesis química es susceptible de síntesis en el chip. Utilizando la expresión de ADN libre de células, las proteínas se unen al soporte sólido una vez sintetizadas. Alternativamente, las proteínas se pueden sintetizar químicamente sobre el soporte sólido utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida. La desprotección selectiva se lleva a cabo mediante métodos litográficos o por síntesis SPOT. Se puede hacer referencia a por lo menos MacBeath and Schreiber, Science, 2000, 289:1760-1763, o Jones y otros, Nature, 2006, 439:168-174. También se puede hacer referencia a la Patente de Estados Unidos 6919211 de Fodor y otros.

También se prevén micromatrices de compuestos químicos en combinación con matrices de chemFET. Las micromatrices de compuestos químicos pueden fabricarse mediante la inmovilización covalente de los compuestos (por ejemplo, compuestos orgánicos) en la superficie sólida con diversas técnicas de enlace (puede denominarse en la literatura como "micromatriz de moléculas pequeñas"), mediante el marcaje y secado de compuestos (por ejemplo, compuestos orgánicos) en la superficie sólida sin inmovilización (puede denominarse en la literatura como "detección de compuestos en micromatrices (μ ARCS)"), o mediante el marcaje de compuestos orgánicos en una solución homogénea sin efecto de inmovilización y secado (comercializado como tecnología DiscoveryDot™ de Reaction Biology Corporation).

La invención también contempla micromatrices de tejido en combinación con matrices de chemFET. Las micromatrices de tejido se analizan con mayor detalle en Battifora Lab Invest 1986, 55:244-248; Battifora and Mehta Lab Invest 1990, 63:722-724; y Kononen y otros. Nat Med 1998, 4:844-847.

Las configuraciones de las matrices de chemFET y las matrices biológicas o químicas son similares en cada caso y el análisis de una combinación de matrices se aplicará a otras descritas en este documento o conocidas en el arte.

En otro aspecto más, la invención contempla el análisis de cultivos celulares (por ejemplo, cultivos celulares bidimensionales) (véase, por ejemplo, Baumann y otros. Sensors and Actuators B 55 1999 77:89), y secciones de tejido colocadas en contacto con la matriz de chemFET. Como ejemplo, una sección del cerebro puede ponerse en contacto con la matriz de chemFET de la invención y los cambios en la sección pueden detectarse en presencia o ausencia de estimulación tal como, entre otras, neurotoxinas y similares. De este modo puede analizarse la transducción de procesos neuronales y/o estimulación. En estas realizaciones, los chemFET pueden operar mediante la detección de flujos de calcio y/o potasio a través de la propia capa de pasivación o mediante receptores para estos iones que recubren la capa de pasivación.

En otro aspecto más, la invención contempla el uso de conjuntos de chemFET, funcionalizados como se describe en el presente documento o de otra manera, para uso in vivo. Una matriz de este tipo puede introducirse en un sujeto (por ejemplo, en el cerebro u otra región que esté sujeta al flujo de iones) y luego analizarse en busca de cambios en función del estado del sujeto.

Si bien en el presente documento se han descrito e ilustrado varias realizaciones novedosas, los expertos en el arte visualizarán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar la función y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en el presente documento, y cada una de dichas variaciones y/o modificaciones se considera que está dentro del alcance de las realizaciones novedosas descritas en el presente documento. De manera más general, los expertos en el arte apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en este documento tienen el propósito de ser ilustrativos y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las que se utilizan las enseñanzas novedosas. Los expertos en el arte reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones novedosas específicas descritas en el presente documento. Por lo tanto, debe entenderse que las realizaciones anteriores se presentan únicamente a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes, las realizaciones novedosas pueden llevarse a la práctica de forma diferente a como se describe y reivindica específicamente. Las realizaciones novedosas de la presente divulgación están dirigidas a cada característica, sistema, artículo, material, kit y/o método individual descrito en el presente documento. Además, se incluye dentro de la alcance novedoso de la presente divulgación cualquier combinación de dos o más de tales características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos, si tales características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos no son mutuamente inconsistentes.

Todas las definiciones, tal como se definen y utilizan en este documento, deben entenderse como un control sobre las definiciones y/o los significados ordinarios de los términos definidos del diccionario.

Los artículos indefinidos "un" y "una", como se usan en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse como "al menos uno/una".

La frase "y/o", como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse como "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes en forma conjunta en algunos casos y presentes disyuntivamente en otros casos. Los elementos múltiples enumerados con "y/o" deben interpretarse de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos.

Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos además de los elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", ya sea que estén relacionados o no con esos elementos específicamente identificados. Así, como ejemplo no limitativo, una referencia a "A y/o

B", cuando se usa junto con un lenguaje abierto como "que comprende" puede referirse, en una realización, solo a A (incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, solo a B (incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización más, tanto a A como a B (incluye opcionalmente otros elementos); etc.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "o" debe entenderse que tiene el mismo significado que "y/o" como se definió anteriormente. Por ejemplo, al separar elementos en una lista, "o" o "y/o" se interpretará como inclusivo, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluye más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos adicionales no listados. Solo los términos que indiquen claramente lo contrario, como "solo uno de" o "exactamente uno de" o, cuando se utilicen en las reivindicaciones, "que consiste en", se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" tal como se usa en el presente documento solo se interpretará como una indicación de alternativas exclusivas (es decir, "uno o el otro, pero no ambos") cuando esté precedido por términos de exclusividad, como "cualquiera", "uno de", "solo uno de" o "exactamente uno de". "que consiste esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario tal como se usa en el campo de la ley de patentes.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse que significa al menos un elemento seleccionado de cualquiera o más de los elementos en la lista de elementos, pero sin incluir necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos enumerados específicamente en la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que opcionalmente puedan estar presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase "al menos uno", ya sea relacionado o no con esos elementos específicamente identificados. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B" o, de manera equivalente, "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, sin presencia de B (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en aún otra realización, a al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, A, y al menos uno, que incluye opcionalmente más de uno, B (y que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

También debe entenderse que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquier método aquí reivindicado que incluya más de un paso o acto, el orden de los pasos o actos del método no se limita necesariamente al orden en que se enumeran los pasos o actos del método.

Ejemplos

El siguiente es un ejemplo de una prueba de principio para la secuenciación rápida de oligonucleótidos monocatenarios utilizando una matriz de ISFET.

1.1 Unión de oligonucleótidos monocatenarios a perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina.

Se solicitaron a IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IN) moldes de oligonucleótidos de ADN monocatenario con una etiqueta de doble biotina en 5' (purificada por HPLC) y un cebador universal de 20 bases. Los moldes tenían una longitud de 60 bases y se diseñaron para incluir 20 bases en el extremo 3' que eran complementarias al cebador de 20 bases (Tabla 1, *cursiva*). Los moldes y el cebador liofilizados y biotinilados se resuspendieron en tampón TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8) como soluciones madre 40 μ M y como solución madre 400 μ M, respectivamente, y se almacenaron a -20 °C. hasta su uso.

Para cada molde, se prepararon 60 μ l de perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina de 5,91 μ m (Bangs Laboratories, Inc. Fishers, IN), almacenadas como una suspensión tamponada acuosa ($8,57 \times 10^4$ perlas/ μ L), a 4 °C, lavándolas tres veces con 120 μ l de tampón de lavado de perlas y luego incubándolas con los moldes 1, 2, 3 y 4 (T1, T2, T3, T4: Tabla 1) con biotina en el extremo 5', respectivamente.

Debido a la fuerte afinidad de unión covalente de la estreptavidina por la biotina ($K_d \sim 10^{-15}$), estas perlas magnéticas se utilizan para inmovilizar los moldes en un soporte sólido, como se describe a continuación. La capacidad de unión notificada de estas perlas para la biotina libre es de 0,650 pmol/ μ l de solución madre de perlas. Para un molde de ssADN biotinilado pequeño (<100 bases), se calculó de manera conservadora que $9,1 \times 10^5$ moldes podrían unirse por perla. Las perlas se concentran fácilmente utilizando imanes simples, como con el

concentrador de partículas magnéticas Dynal o MPC-s (Invitrogen, Carlsbad, CA). El MPC-s se utilizó en los experimentos descritos.

Se usó un MPC-s para concentrar las perlas durante 1 minuto entre cada lavado, luego se añadió tampón y las perlas se resuspendieron. Después del tercer lavado, las perlas se resuspendieron en 120 µl de tampón de lavado de perlas más 1 µl de cada molde (40 µM). Las perlas se incubaron durante 30 minutos con rotación (Labquake Tube Rotator, Barnstead, Dubuque, IA). Después de la incubación, las perlas se lavaron tres veces en 120 µl de tampón de hibridación (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de acetato de magnesio, pH 7,5) y se resuspendieron en 60 µl del mismo tampón.

Tabla 1. Secuencias para los moldes 1, 2, 3 y 4

T1: 5'/ 52Bio/GCA AGT GCC CTT AGG CTT GAG TTC AAA AGT CCT AAC TGG GCA AGG CAC ACA GGG GAT AGG-3' (SEQ ID NO:1)
T2: 5'/ 52Bio/CCA TGT CGC CTT AAG CGC CGC CCA TTC CGC CCT GAA CCC CCA AGG CAC ACA GGG GAT AGG-3' (SEQ ID NO:2)
T3: 5'/ 52Bio/AAG CTC AAA AAC GGT AAA. AAA AAG CCA AAA AAC TGG AAA ACA AGG CAC ACA GGG GATAGG-3' (SEQ ID NO:3)
T4: 5'/ 52Bio/TTC GAG TTT TTG CCA TTT TTT TTC GGT TTT TTG ACC TTT T CA AGG CAC ACA GGG GAT AGG-3' (SEQ ID NO:4)

1.2. Recocido del cebador de secuenciación.

Los moldes inmovilizados, unidos en el extremo 5' a perlas magnéticas de 5,91 µm, se hibridan luego con un cebador de 20 bases complementario al extremo 3' de los moldes (Tabla 1). Luego se agrega una alícuota de 1,0 µL de la solución madre de cebador 400 µM, que representa un exceso de cebador de 20 veces respecto al molde inmovilizado, y luego se incuban las perlas más el molde con el cebador durante 15 minutos a 95 °C y luego se baja lentamente la temperatura a la temperatura ambiente. A continuación, las perlas se lavaron 3 veces en 120 µl de tampón Tricina 25 mM (Tricina 25 mM, PVP 0,4 mg/ml, Tween 20 al 0,1 %, Acetato de magnesio 8,8 mM; pH 7,8) como se describió anteriormente usando el MPC-s. Las perlas se resuspendieron en tampón Tricina 25 mM.

1.3. Incubación de moldes hibridados/cebador con ADN polimerasa.

Los híbridos del molde y cebador se incuban con polimerasa esencialmente como se describe en Margulies y otros. Nature 2005 437(15):376-380 y los materiales complementarios que lo acompañan.

2. Carga de muestras de prueba preparadas en la matriz de sensores ISFET.

Las dimensiones y la densidad de la matriz de ISFET y los microfluidos colocados en ella pueden variar según la aplicación. Un ejemplo no limitante es una matriz de 512 × 512. Cada cuadrícula de dicha matriz (de la cual habría 262144) tiene un solo ISFET. Cada cuadrícula también tiene un pocillo (o como pueden denominarse indistintamente en el presente documento como un "micropocillo") colocado encima de esta. El pocillo (o micropocillo) puede tener cualquier forma, incluyendo de columna, cónica, cuadrada, rectangular y similares. En una conformación ilustrativa, los pocillos son pocillos cuadrados que tienen unas dimensiones de 7 × 7 × 10 µm. La distancia de centro a centro entre los pocillos se denomina aquí "paso". El paso puede ser de cualquier distancia, aunque es preferible tener pasos más cortos para acomodar una matriz lo más grande posible. El paso puede ser inferior a 50 µm, inferior a 40 µm, inferior a 30 µm, inferior a 20 µm o inferior a 10 µm. En una realización, el paso es de aproximadamente 9 µm. Toda la cámara por encima de la matriz (dentro de la cual se sitúan los pocillos) puede tener un volumen igual o inferior a aproximadamente 30 µL, igual o inferior a aproximadamente 20 µL, igual o inferior a aproximadamente 15 µL, o igual o inferior a aproximadamente 10 µL. Por lo tanto, estos volúmenes corresponden también al volumen de solución dentro de la cámara.

2.1 Carga de perlas en un sistema 'abierto'.

Se cargaron perlas con los moldes 1-4 en el chip (10 µL de cada molde). Brevemente, se añadió una alícuota de cada molde al chip usando una pipeta Eppendorf. A continuación, se usó un imán para tirar de las perlas hacia los pocillos.

2.2 Carga de perlas en un sistema 'cerrado'.

Tanto las perlas de captura como las perlas de relleno se cargan mediante flujo. La precisión de microlitros del volumen de la solución de perlas, así como la colocación de la solución de perlas a través de las conexiones fluidicas, se logra como se muestra en la Figura 62 utilizando el accesorio de carga de perlas, que incluye un depósito principal (aproximadamente un volumen de 1 ml), un depósito secundario (aproximadamente un volumen de 10 μ l) y un canal de microfluidos para manejar pequeños volúmenes de solución de perlas. Este método también aprovecha la precisión en microlitros de la aplicación de fluidos que permiten las pipetas de precisión.

El chip que comprende la matriz de ISFET y la celda de flujo se asienta en el zócalo ZIF (fuerza de inserción cero) del dispositivo de carga y luego se conecta un capilar de acero inoxidable a un puerto de la celda de flujo y un tubo de nailon flexible en el otro puerto. Ambos materiales son trayectos de fluidos de tipo microfluidico (por ejemplo, del orden de <0,01" de diámetro interno). El accesorio de carga de perlas, que consiste en los depósitos mayor y menor, se une al extremo del capilar. Una jeringa de plástico común se llena con solución tampón y luego se conecta al extremo libre del tubo de nailon. Los cables eléctricos que sobresalen de la parte inferior del chip se insertan en un zócalo en la parte superior de una unidad de elemento fijo (no se muestra).

Se presiona la jeringa para inyectar la solución tampón a través del tubo, a través de la celda de flujo (y la superficie del chip) y hacia arriba a través del capilar, como se muestra en la Figura 63. Este proceso se denomina cebado y garantiza que el circuito fluidico esté libre de aire. El tampón se inyecta hasta que se puede ver el nivel del líquido en la parte superior del depósito menor, a través del depósito mayor transparente.

A continuación, se aplica una solución que contiene las perlas recubiertas de ácido nucleico con una pipeta de precisión al depósito menor, como se muestra en la Figura 64. Esta aplicación produce una gran gota en la parte superior del depósito. El volumen de solución añadido es igual al volumen de la cámara de flujo (por ejemplo, del orden de 10 μ l), y tiene una concentración de perlas tal que cuando se añade al volumen de solución tampón inicialmente en el depósito menor, produce la concentración de perlas deseada que se entregarán a la celda de flujo. La pipeta se retrae y se tira de la jeringa con cuidado y lentamente hasta que la gota retrocede hasta la parte superior del depósito menor, nuevamente visto a través del depósito principal transparente como se muestra en la Figura 65. Debido a que el canal de microfluidos que se extiende hacia abajo desde el depósito menor es muy pequeño (por ejemplo, del orden de 0,01" de diámetro), se produce muy poca mezcla entre la solución de perlas y la solución tampón en la vía fluidica durante este proceso.

En este punto, la solución de perlas se carga en el trayecto fluidico, pero aún no se encuentra en la ubicación de la celda de flujo. Antes de transferir el tapón de solución de perlas, o el volumen de solución de perlas en el trayecto fluidico, se limpia la solución en el depósito menor. En primer lugar, se inyecta aproximadamente 1 ml de solución tampón en el depósito principal, lo que diluye eficazmente la solución de perlas que queda en el depósito secundario, como se muestra en la Figura 66. Luego, la solución se pipetea colocando una punta de pipeta a lo largo del borde inferior del depósito principal. El nivel de solución en el depósito menor se deja en su parte superior como se muestra en la Figura 67.

Luego se agrega un volumen de solución tampón como gota sobre el depósito menor, como en la aplicación anterior de solución de perlas, como se muestra en la Figura 68. El volumen de esta solución es igual al volumen del trayecto fluidico entre el depósito menor y la cámara de flujo de la celda de flujo (es decir, el volumen del canal de microfluidos más el volumen capilar más el volumen de la celda de flujo antes de la cámara de flujo). Una vez más, se tira de la jeringa hasta que la gota se retrae hasta la parte superior del depósito menor, como se muestra en la Figura 69. Ahora, el tapón de solución de perlas se carga en la cámara de flujo de la celda de flujo.

El accesorio de carga ahora se levanta y se coloca sobre una base piramidal, que contiene un imán en su vértice, como se muestra en la Figura 70. El imán atrae las perlas de la solución de perlas hacia los micropocillos del chip. El accesorio se retira de la base después de unos segundos. Todo el proceso, excepto el cebado inicial de los fluidos con solución tampón, puede repetirse para la carga de pequeñas perlas de relleno en los micropocillos, si es necesario.

Se apreciará que habrá otras formas de introducir las perlas en los pocillos de la cámara de flujo, incluidas la centrifugación o la gravedad. La invención no está limitada a este respecto.

3. Secuenciación de ADN utilizando la matriz de sensores ISFET.

3.1 Secuenciación de ADN en un sistema 'abierto'.

Los resultados que se muestran son representativos de un experimento llevado a cabo en un sistema 'abierto' (es decir, el chip ISFET se coloca en la plataforma del aparato ISFET y luego cada nucleótido (5 μ L que dan como resultado 6,5 μ M cada uno) se agrega manualmente el siguiente orden: dATP, dCTP, dGTP y dTT (soluciones madre 100 mM, Pierce, Milwaukee, WI), pipeteando el nucleótido dado en el líquido que ya está en la superficie del chip y recopilando datos del chip a una tasa de 2,5 mHz. Esto dio como resultado una recopilación de datos de más de 7,5 segundos a aproximadamente 18 tramas por segundo. Luego, los datos se analizaron usando LabView.

Dadas las secuencias de los moldes, la adición de dATP resultó en una extensión de 4 bases en el molde 4. La adición de dCTP dio como resultado una extensión de 4 bases en el molde 1. La adición de dGTP hizo que los moldes 1, 2 y 4 se extendieran como se indica en la Tabla 2 y la adición de dTTP dio como resultado una escorrentía (extensión de todos los moldes como se indica).

La Figura 71 (AD) ilustra las reacciones de extensión. En el panel de la izquierda, se muestran todos los píxeles de una instantánea en el tiempo y, a la derecha, se muestran los gráficos de mV versus tiempo para cuatro píxeles seleccionados del conjunto de la izquierda. Las flechas blancas indican los píxeles activos donde se realizan las extensiones. En la escorrentía (Figura 71D), además de los pocillos marcados en la Figura 71C, una flecha adicional indica un pocillo donde no se produjo una extensión después de la adición de dGTP, sino dATP y luego se vuelve a ver durante el escorrentía.

Preferiblemente, cuando el método se realiza de forma no automatizada (es decir, en ausencia de flujo automatizado e introducción de reactivos), cada pocillo contiene apirasa para degradar los dNTP no incorporados. Debe entenderse que la apirasa se puede sustituir, en esta realización o en cualquier otra realización analizada en el presente documento, con otro compuesto (o enzima) capaz de degradar los dNTP.

Tabla 2. Configuración del experimento y orden de adición de nucleótidos.

	dATP	dCTP	dGTP	dTTP
T1	0	(3:C; 1:A)4	1	Escorrentía (25)
T2	0	0	4	Escorrentía (26)
T3	0	0	0	Escorrentía (30)
T4	4	0	2	Escorrentía (24)

3.2 Secuenciación de ADN mediante microfluidos en un chip sensor

La secuenciación en régimen de flujo es una extensión de la aplicación abierta de reactivos de nucleótidos para su incorporación en el ADN. En lugar de agregar los reactivos a un volumen de solución en el chip ISFET, los reactivos fluyen de manera secuencial a través de la superficie del chip, extendiendo una sola base de ADN a la vez. Los dNTP fluyen secuencialmente, comenzando con dTTP, luego dATP, dCTP y dGTP. Debido a la naturaleza de flujo laminar del movimiento del fluido sobre el chip, la difusión del nucleótido en los micropocillos y finalmente alrededor de la perla cargada con ácido nucleico es el principal mecanismo de suministro. El régimen de flujo también garantiza que la gran mayoría de la solución de nucleótidos se lave entre aplicaciones. Esto implica enjuagar el chip con una solución tampón y una solución de apirasa después de cada flujo de nucleótidos. Los nucleótidos y las soluciones de lavado se almacenan en botellas químicas en el sistema y se hacen fluir sobre el chip mediante un sistema de tubos fluidicos y válvulas automáticas. El chip ISFET se activa para detectar productos químicos de la extensión del ADN durante el flujo de nucleótidos.

LISTA DE SECUENCIAS

```

<110> Corporación de Tecnologías de la Vida
<120> APARATO Y MÉTODO PARA MEDIR ANALITOS UTILIZANDO ARRAYS FET
<130> LT00325 EP DIV 5
<140>
<141>
<150> 60/948.748
<151> 2007-07-10
<150> 60/956.324
<151> 2007-08-16
<150> 60/870.073
<151> 2006-12-14
<160> 7
<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
<210> 1
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Oligonucleótido sintético
400> 1
gcaagtgcc ttaggcttca gttcaaaagt cctaactggg caaggcacac aggggatagg 60
<210> 2
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

```

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 2
 ccatgtcccc ttaagcccc cccattcccc cctgaacccc caaggcacac aggggatagg 60
 5 <210> 3
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 3
 aagctcaaaa acggtaaaaa aaagccaaaa aactggaaaa caaggcacac aggggatagg 60
 <210> 4
 <211> 60
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 4
 20 ttcgagtttt tgccattttt ttctcggtttt ttgacctttt caaggcacac aggggatagg 60
 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 5
 actggtccag cattagccgt acgac 25
 <210> 6
 30 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 35 <400> 6
 gtcgtacggc taa 13
 <210> 7
 <211> 14
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 7
 gtcgtacggc taat 14
 45

REIVINDICACIONES

1. Un aparato, que comprende:
 - 5 una matriz (102) de sensores fabricados con CMOS que tienen los correspondientes micropocillos (2810), cada sensor de la pluralidad incluye un transistor de efecto de campo químicamente sensible, abreviado como chemFET, que tiene una estructura de puerta flotante (170) acoplada a un micropocillo de muestra química correspondiente;
 - 10 múltiples filas y columnas de celdas de referencia alrededor de un perímetro de la matriz (103), cada celda de referencia incluye un FET que tiene una estructura de puerta flotante (170) acoplada a una línea de tensión de referencia (VREF); y
 - 15 un circuito de polarización/lectura de columna (110), en donde el circuito de polarización/lectura de columna está configurado para conectarse selectivamente a los sensores en la matriz y las celdas de referencia alrededor del perímetro de la matriz.
2. El aparato de la reivindicación 1, en donde los sensores de la matriz se disponen en filas y columnas, una columna que incluye una pluralidad de sensores, y el circuito de polarización/lectura de columna se puede conectar selectivamente a través de un conmutador a las salidas de la pluralidad de sensores en la columna y a las celdas de referencia.
3. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el circuito de polarización/lectura de columna incluye un condensador de muestreo y almacenamiento (C_{sh}) y un conmutador de selección de columna (COL SH) entre un nodo acoplado a las salidas de la pluralidad de sensores en una columna de la matriz y el condensador de muestreo y almacenamiento de la columna.
4. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que incluye un electrodo de referencia (76) acoplado a dichos pocillos de muestras químicas correspondientes.
- 30 5. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los chemFET son transistores de efecto de campo sensibles a iones, abreviados como ISFET, y en donde los ISFET en cada uno de los sensores incluyen una capa de pasivación (172) en la estructura de puerta flotante (170), y tienen una tensión umbral que indica una concentración de iones en una solución de analito en el pocillo de muestra química acoplado a la puerta flotante a través de la capa de pasivación.
- 35 6. El aparato de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la matriz se dispone en filas y columnas, una columna que incluye una pluralidad de sensores, y en donde al menos una celda de referencia (103) se dispone en la matriz en una fila adicional en la columna.
- 40 7. El aparato de la reivindicación 1, en donde la matriz se dispone en filas y columnas, una fila que incluye una pluralidad de sensores, y en donde las celdas de referencia (103) se disponen en la matriz en una columna adicional en la fila.
- 45 8. El aparato de la reivindicación 1, en donde la matriz se dispone en filas y columnas, una fila que incluye una pluralidad de sensores, el circuito de polarización/lectura de la columna se puede conectar selectivamente a través de un conmutador a las salidas de la pluralidad de sensores en la fila, y al celdas de referencia y que incluye circuitos acoplados a la matriz, los circuitos de polarización/lectura de columna y el conmutador, que produce señales que conectan la pluralidad de sensores en la fila y las celdas de referencia al circuito de polarización/lectura de columna.
- 50

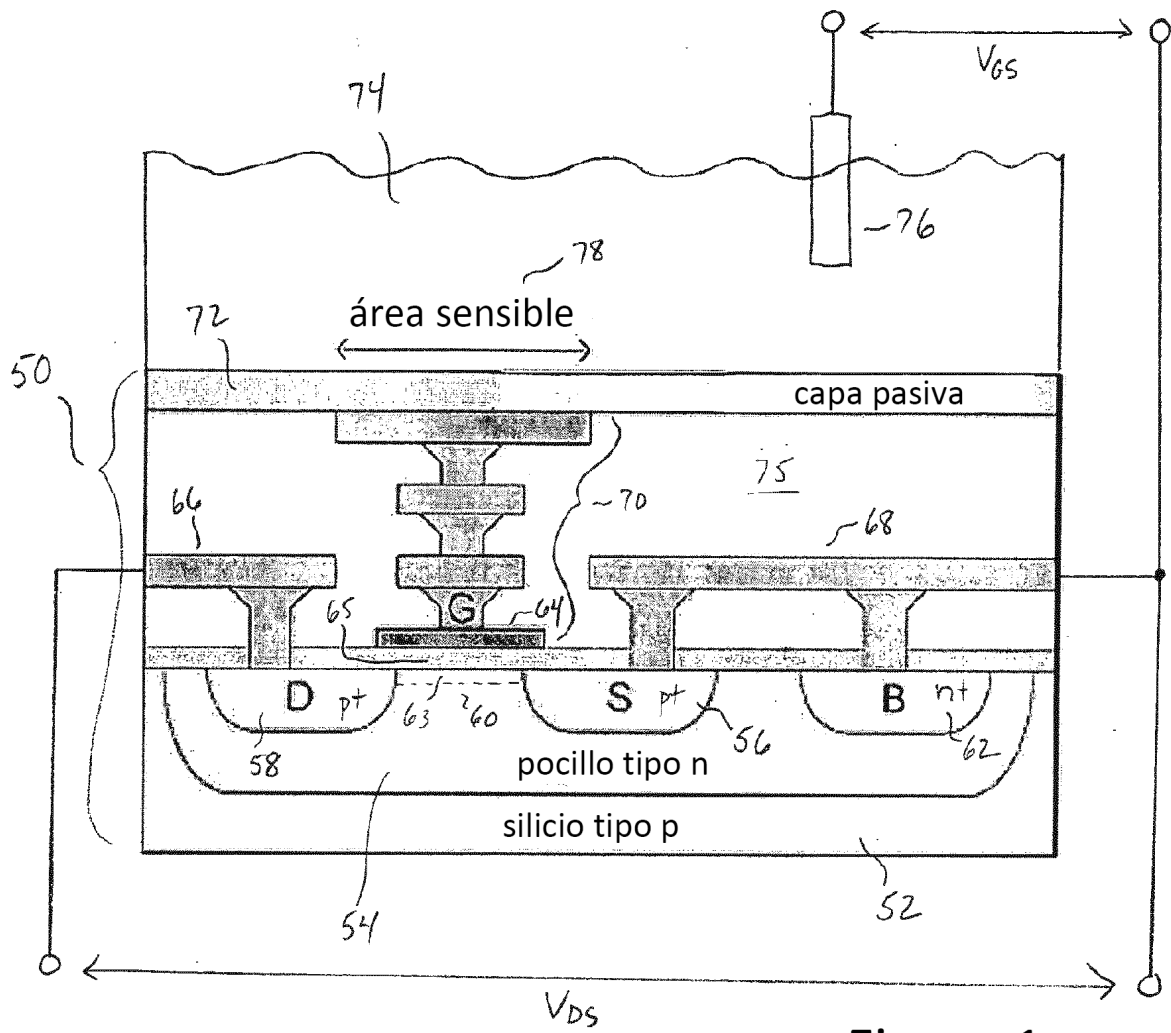


Figura 1

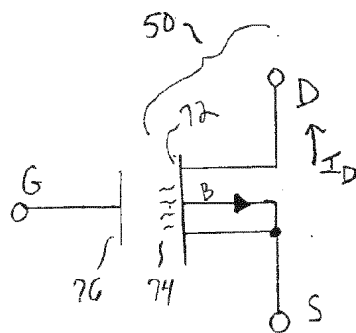


Figura 2

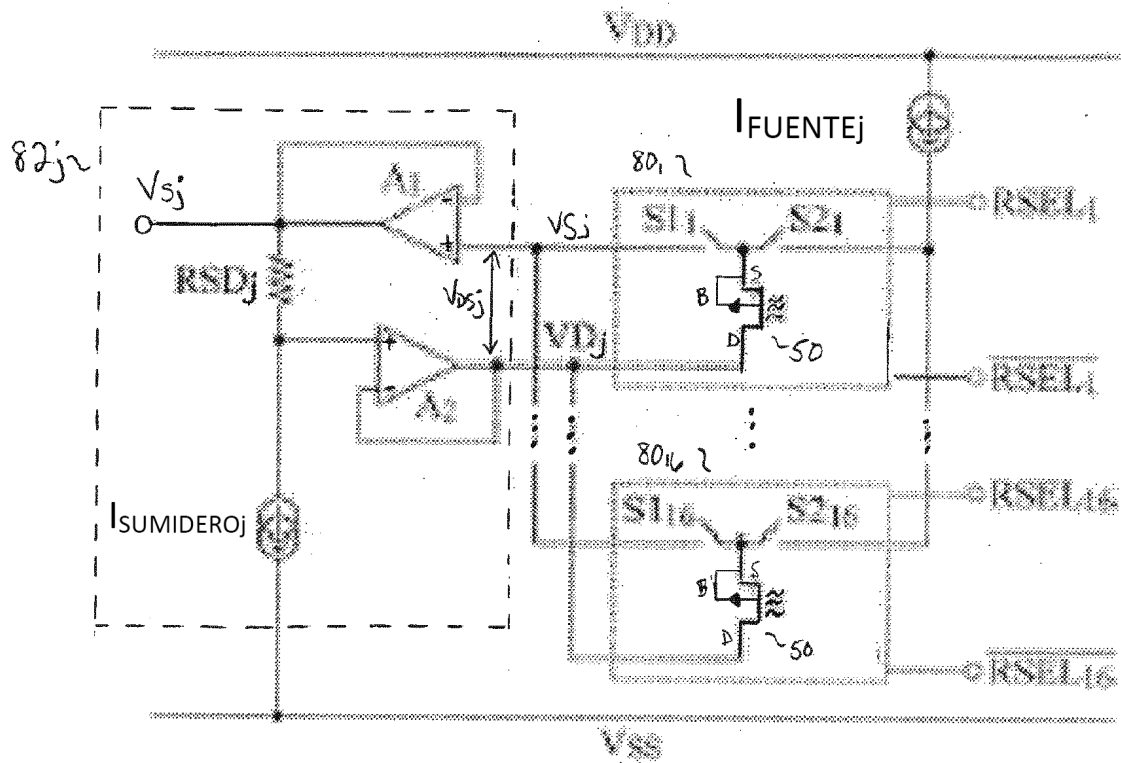


Figura 3

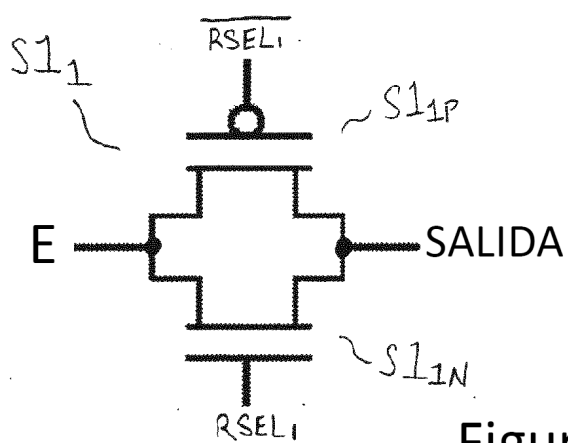
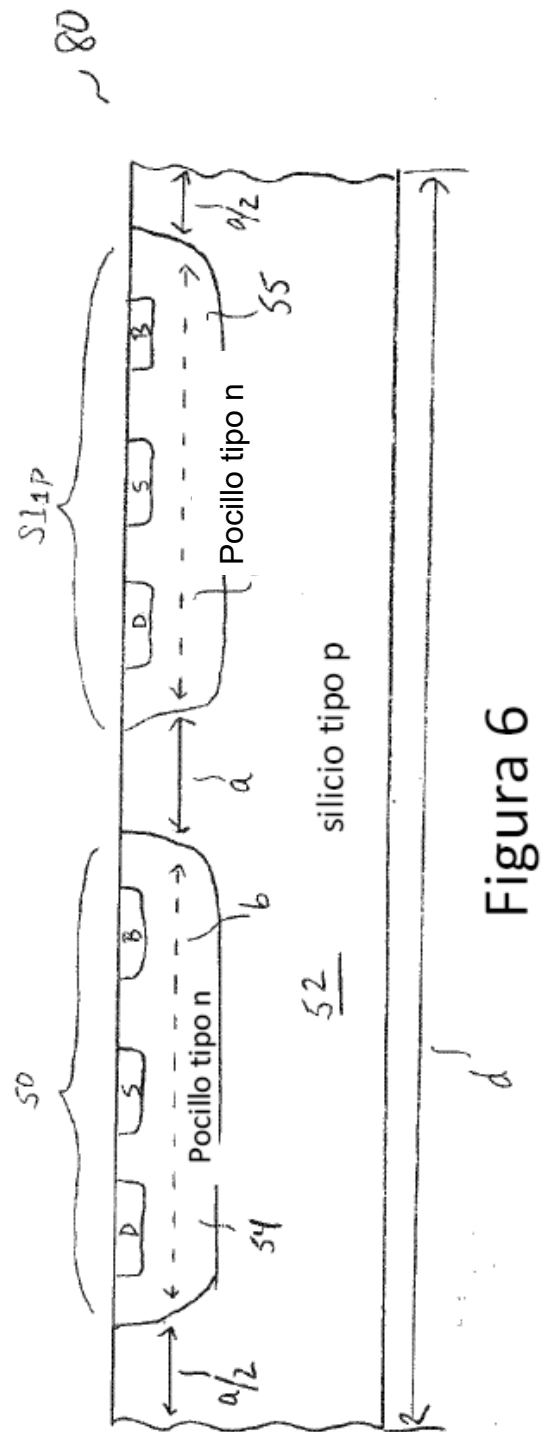
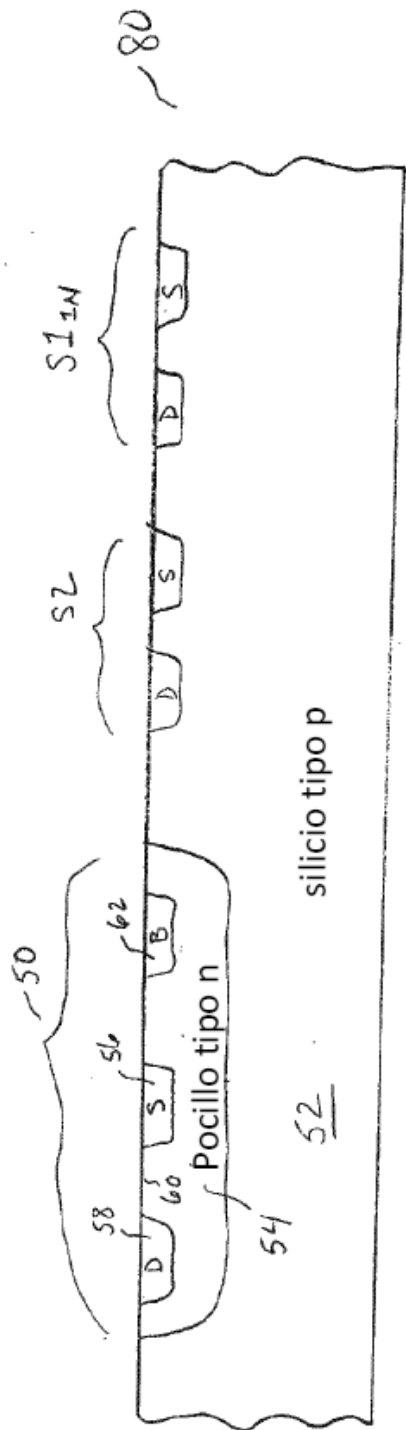


Figura 4



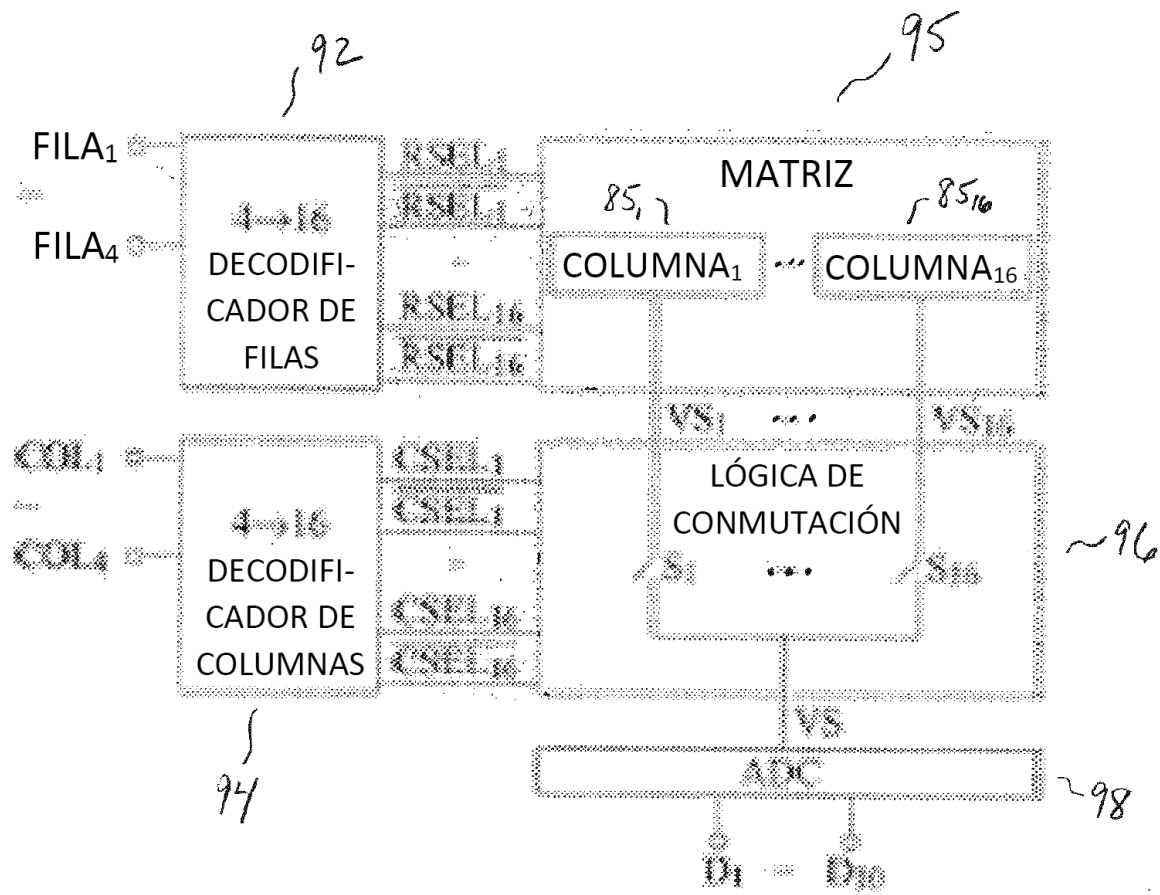


Figura 7

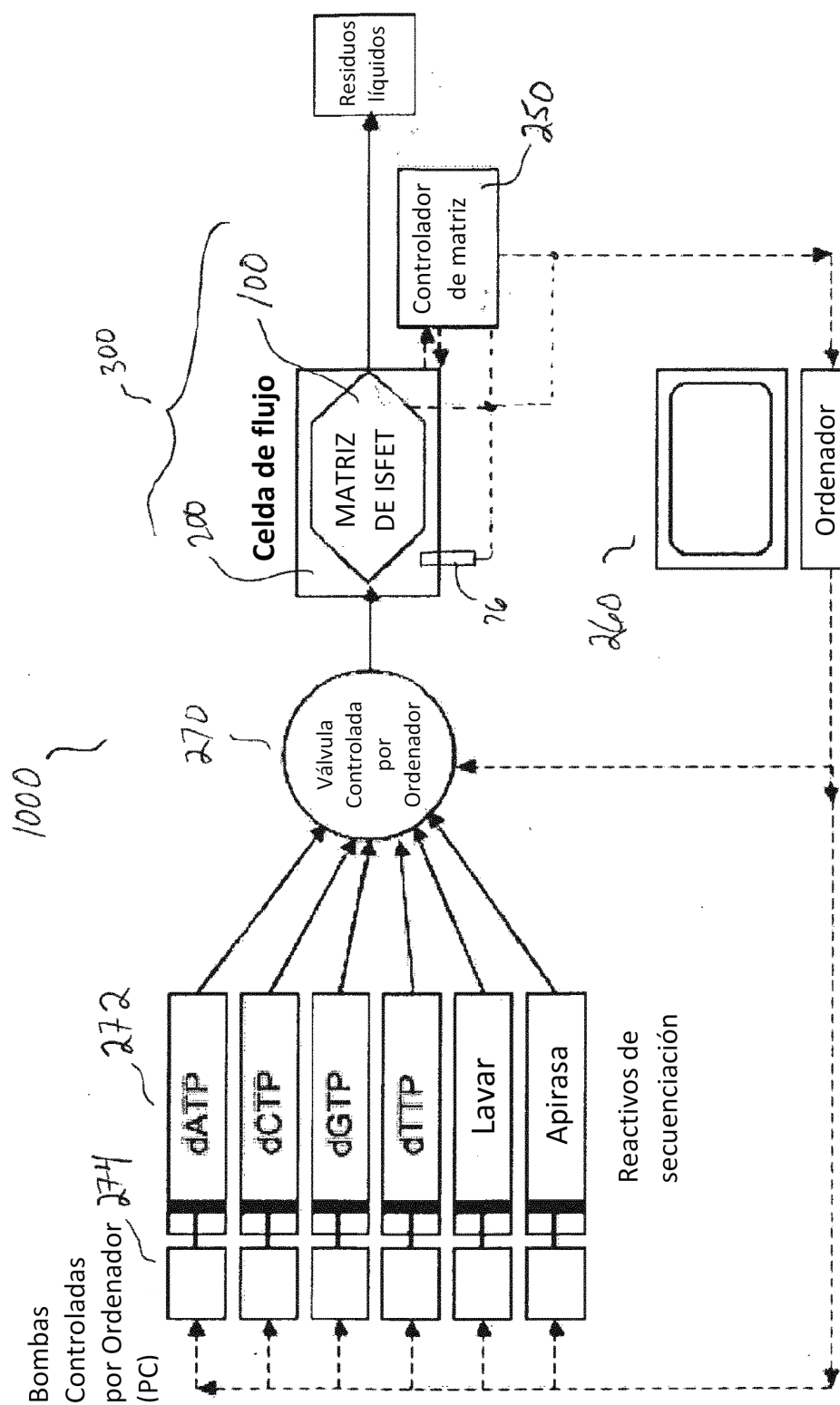


Figura 8

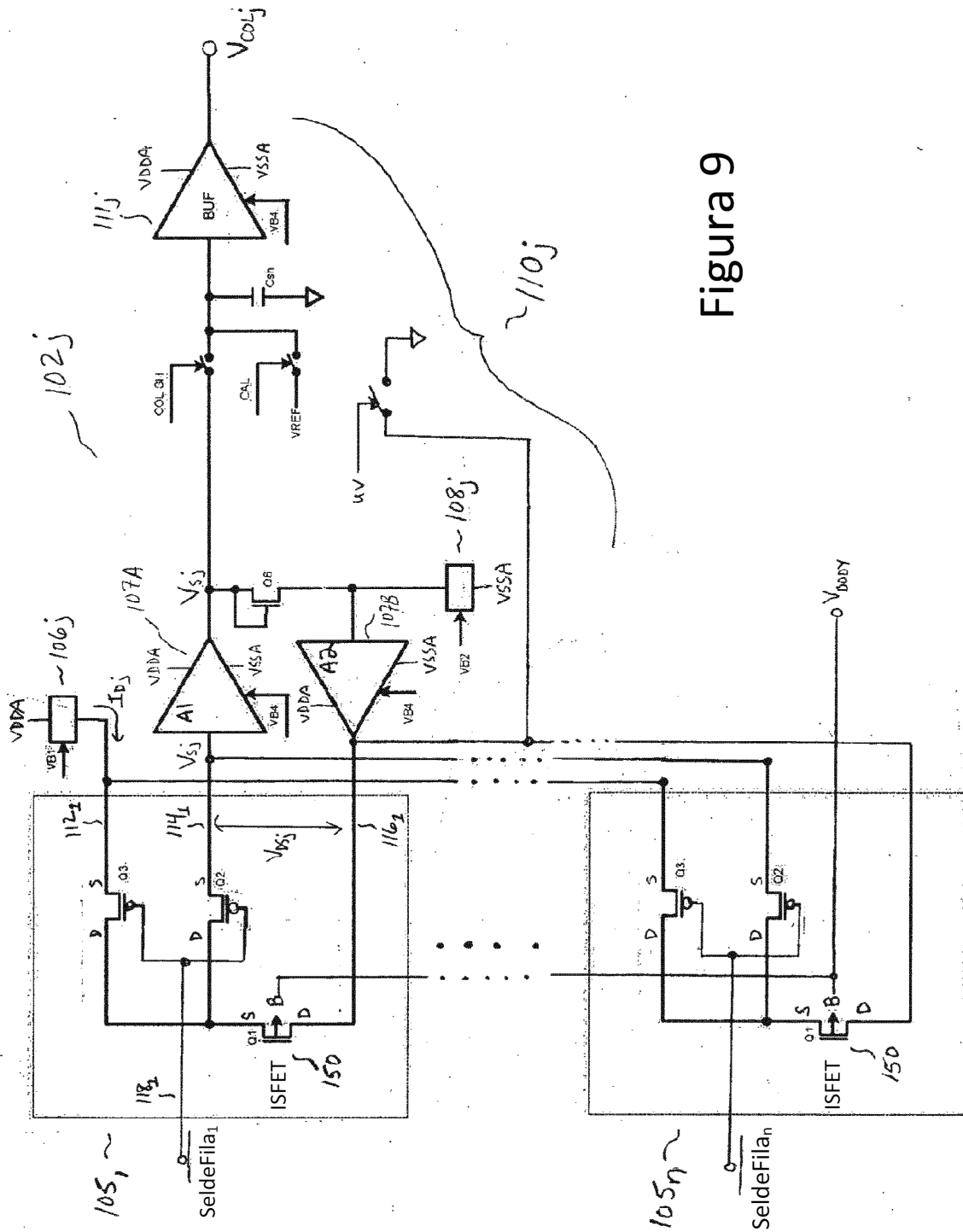


Figura 9

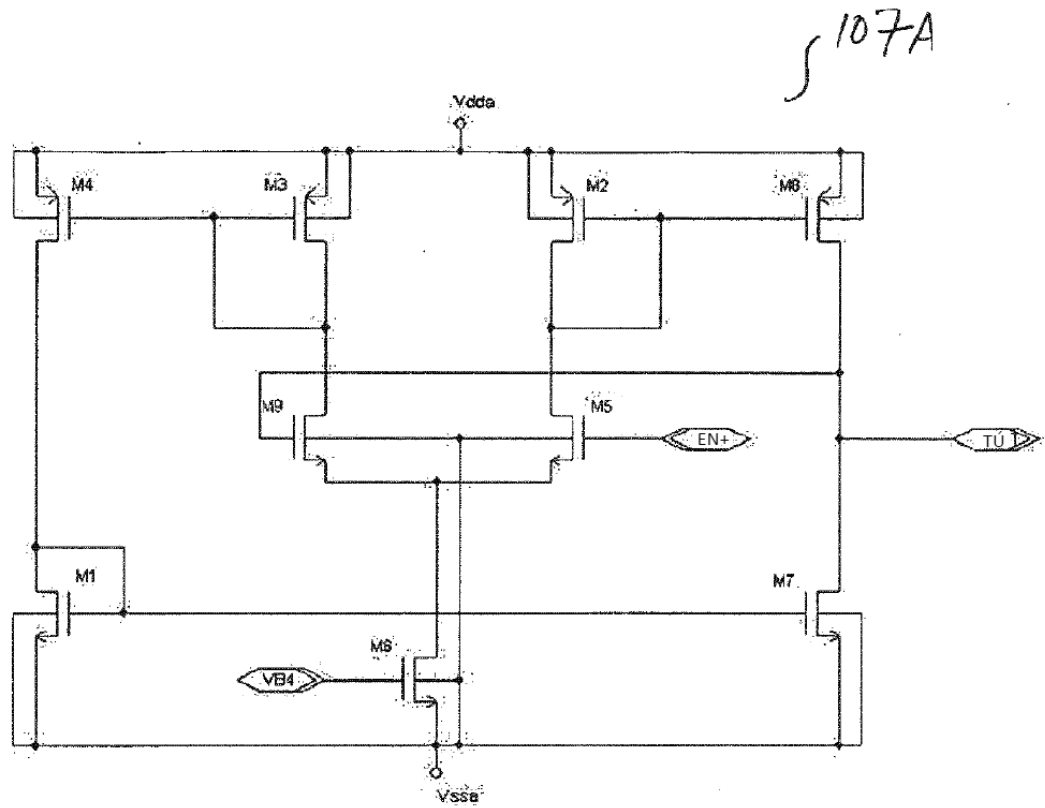


Figura 9A

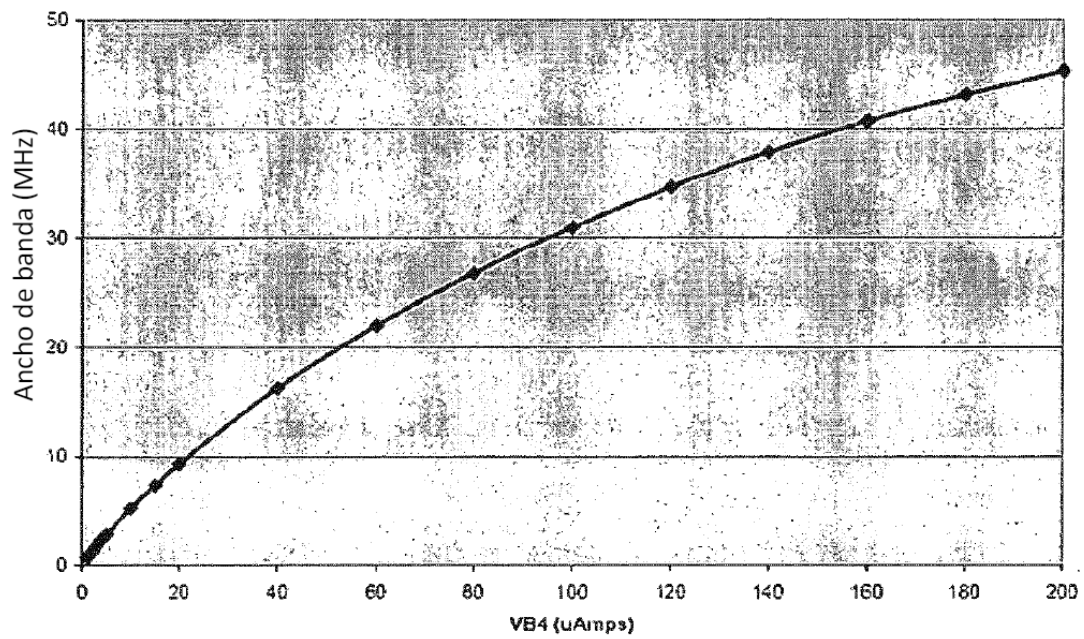


Figura 9B

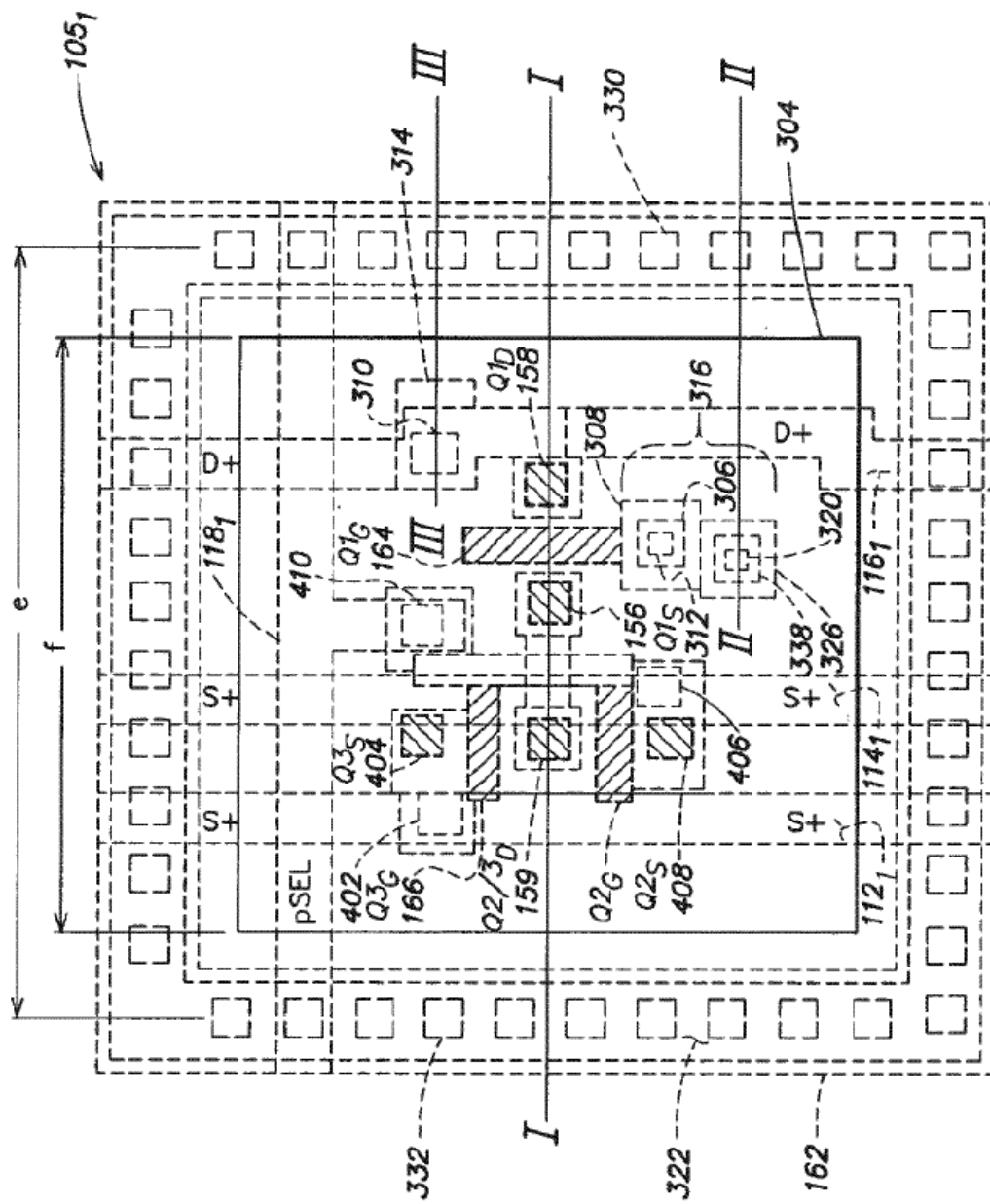


Figura 10

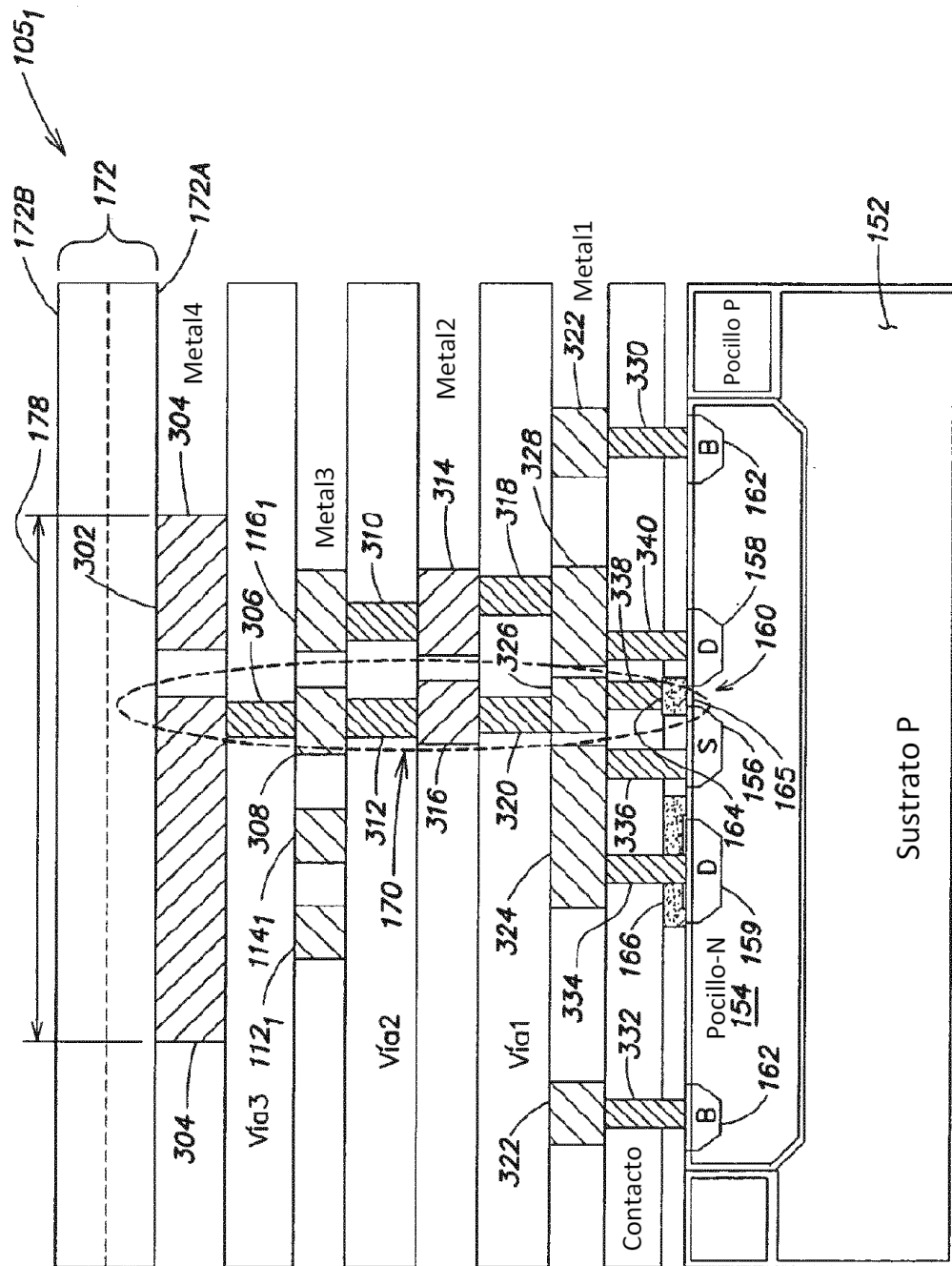
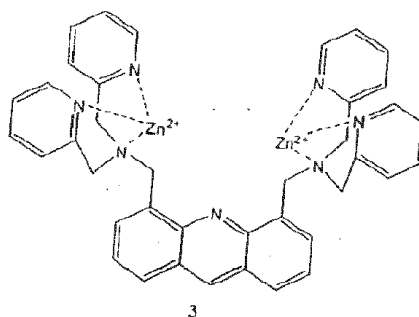
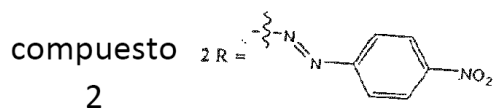
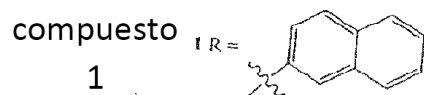
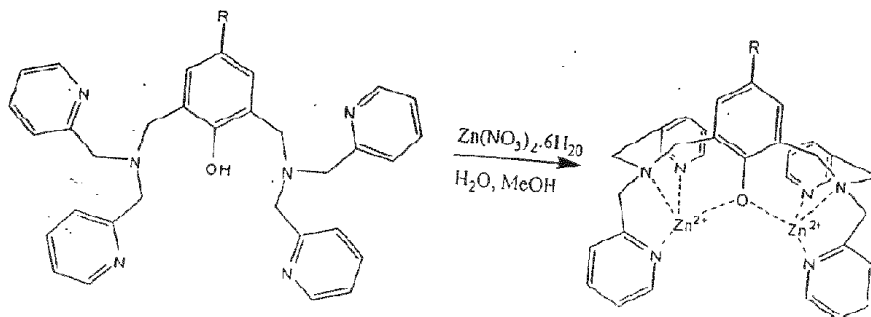
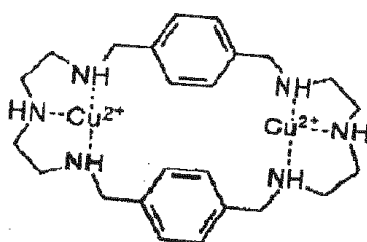


Figura 11A

Figura 11B

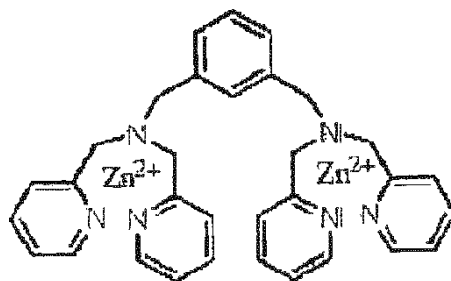


compuesto 3



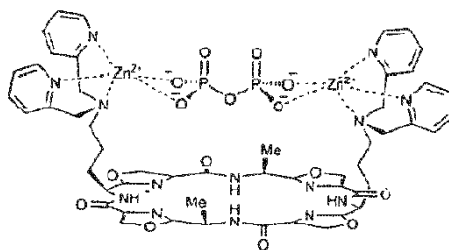
compuesto 4

Figura 11B

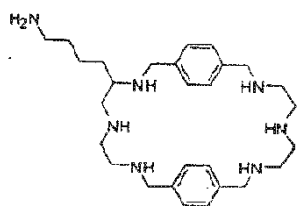


Zn^{2+} -dipicolilamina

compuesto 5

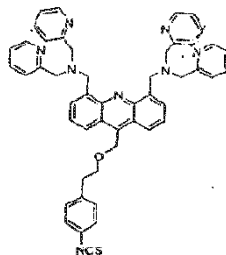


compuesto 6



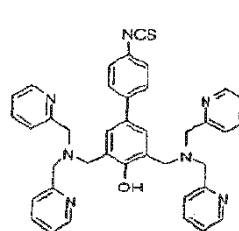
compuesto

7



compuesto

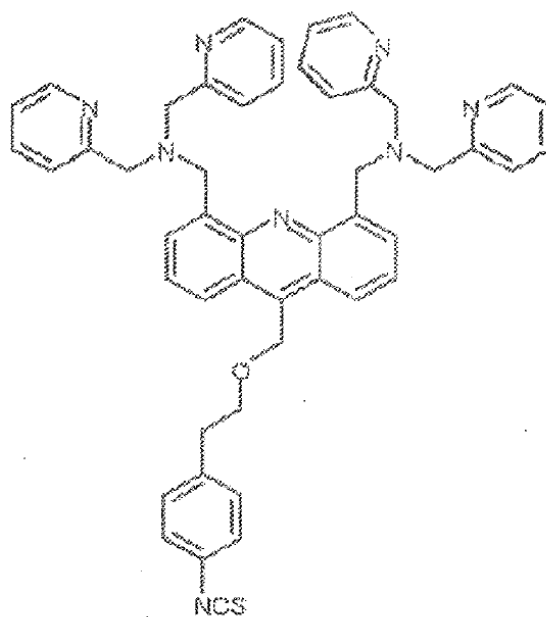
8



compuesto

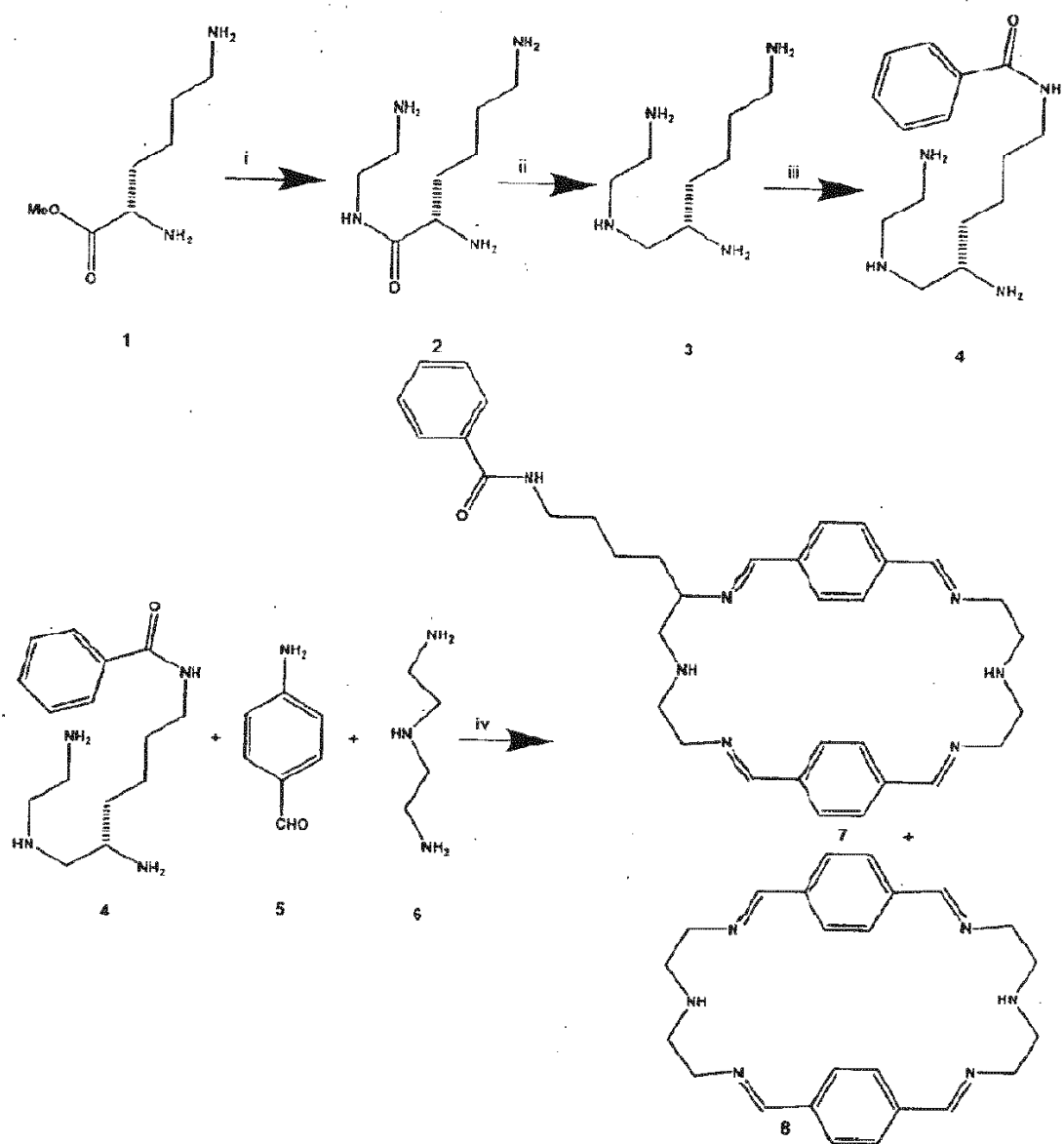
9

Figura 11B



compuesto 10

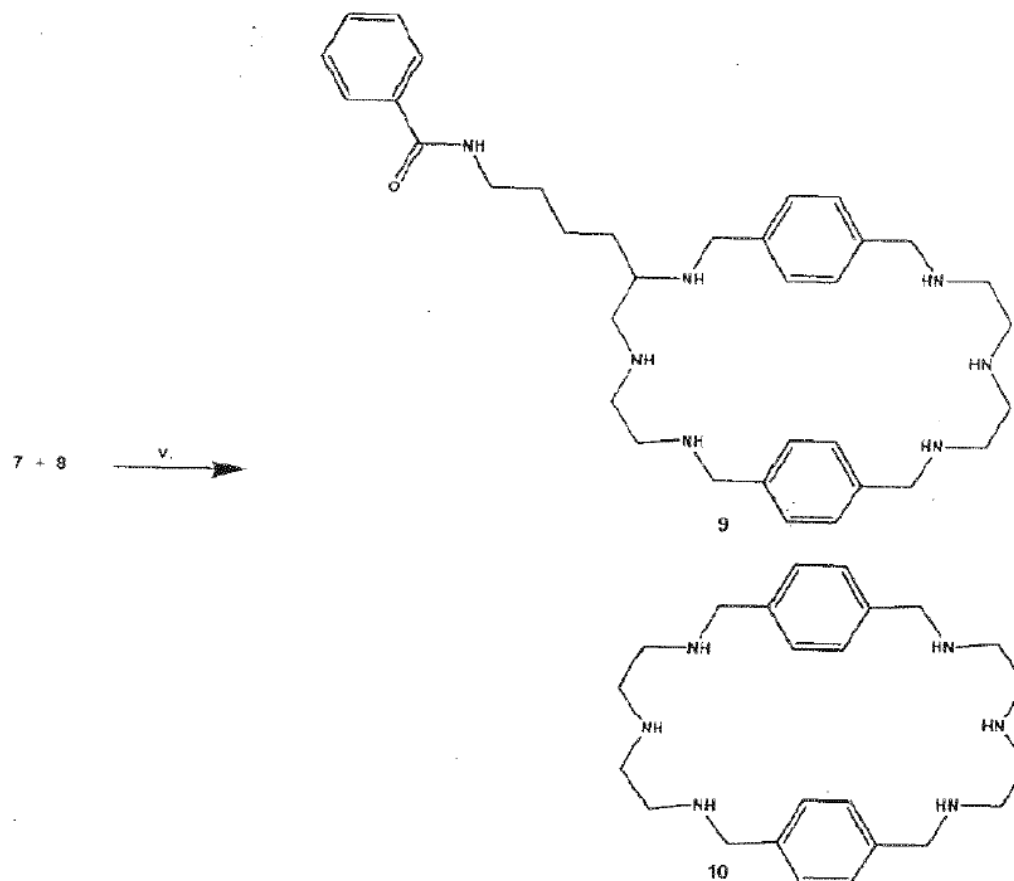
Figura 11C



- i) Etilendiamina, 120 °C
- ii) BH_3 , THF
- iii) KOH, CuCo_3 , cloruro de benzoílo

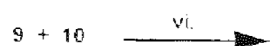
Figura 11C

iv) 1:3 ratio de 4:6, MeOH, r.t.



V. NaBH_3 , MeOH

Figura 11C



vi. 6N HCl; 10 N NaOH

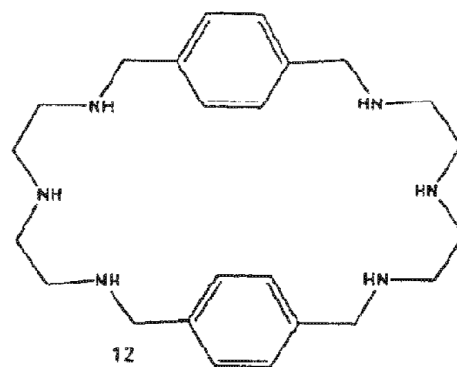
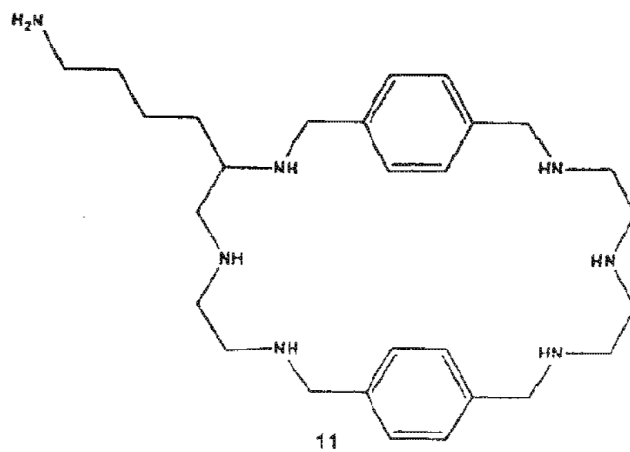


Figura 11D

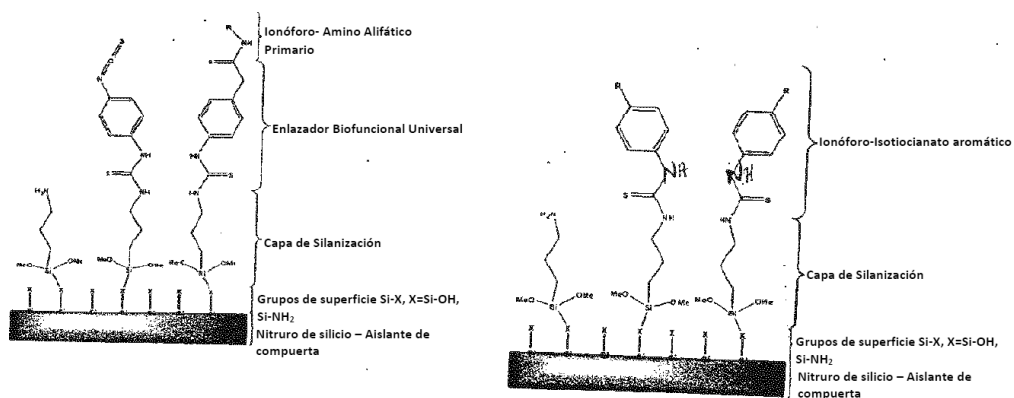
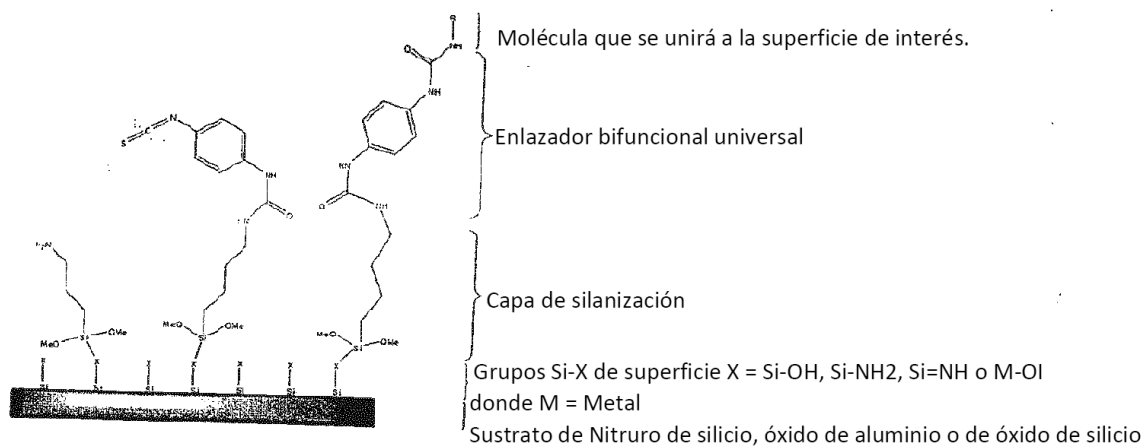
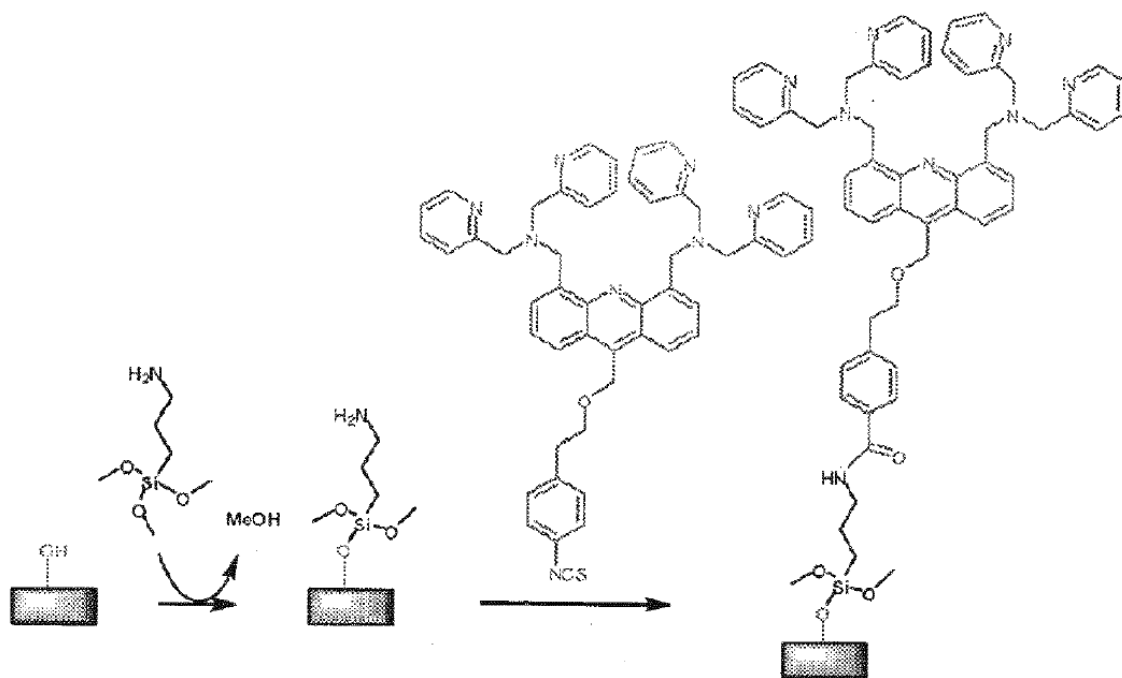


Figura 11E



Fijación del receptor PPI (compuesto 10) a la superficie
de óxido metálico

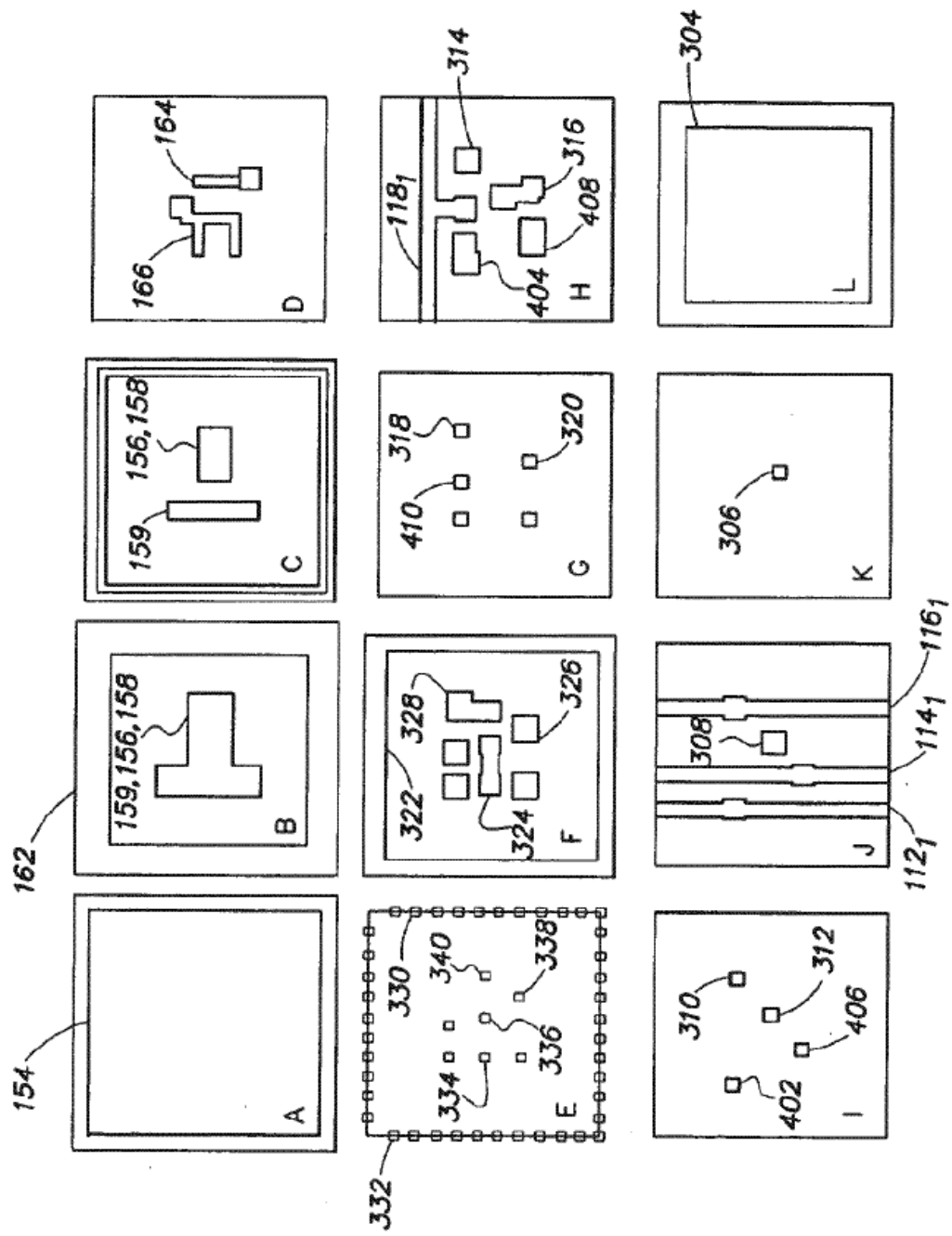


Figura 12

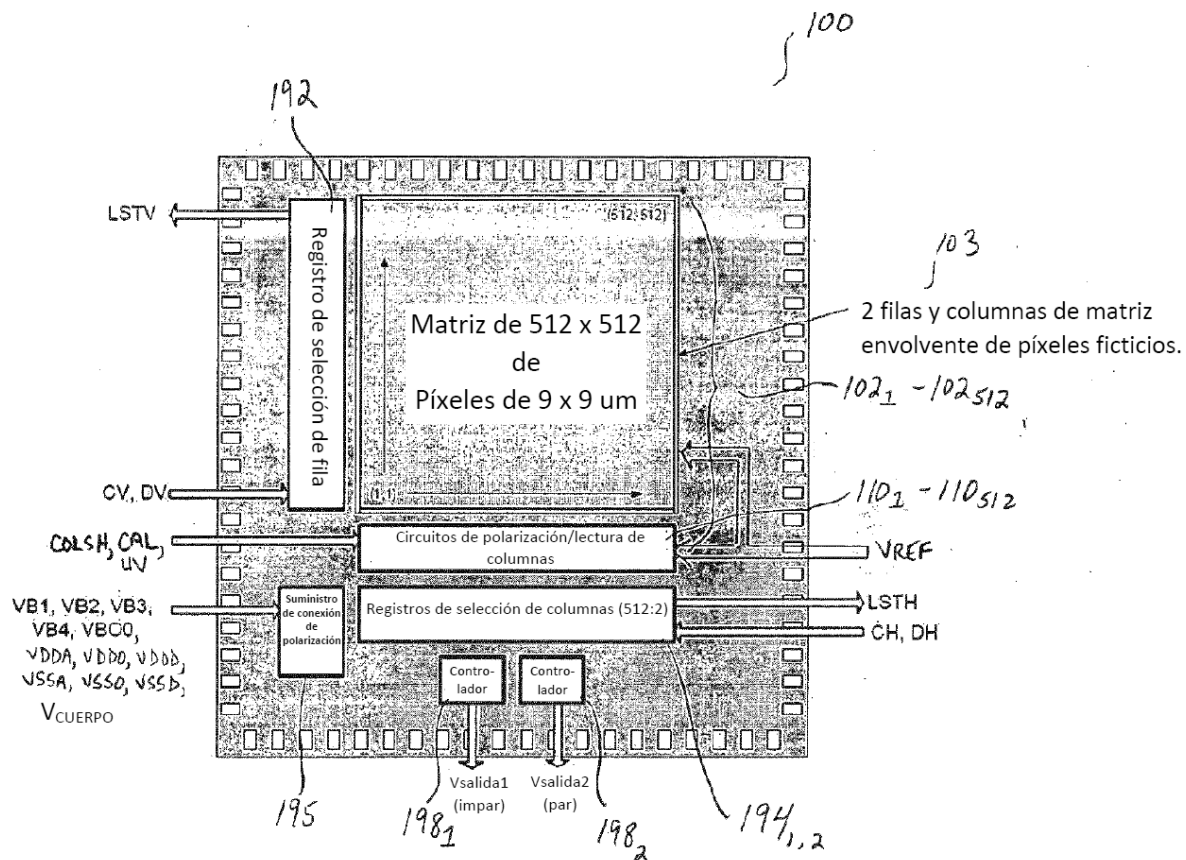
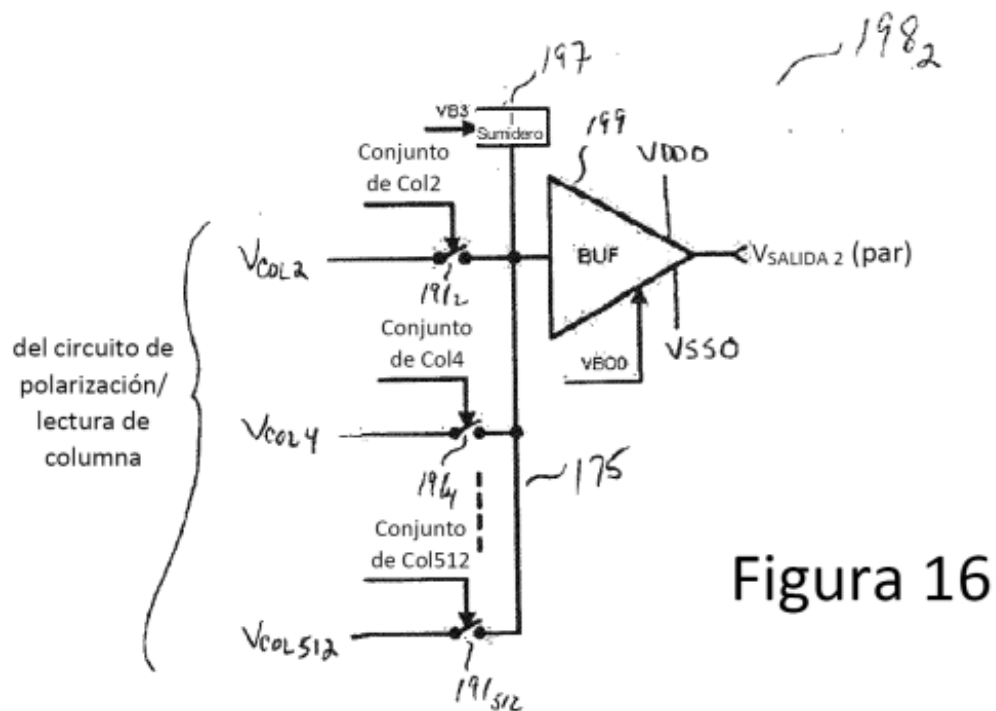
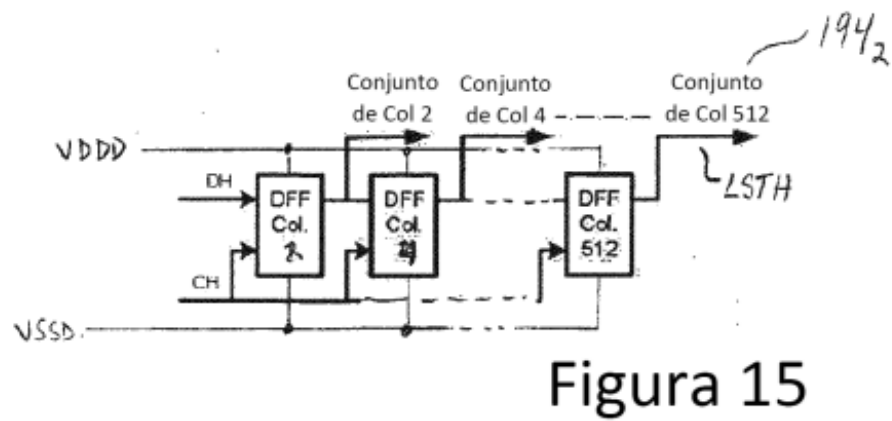
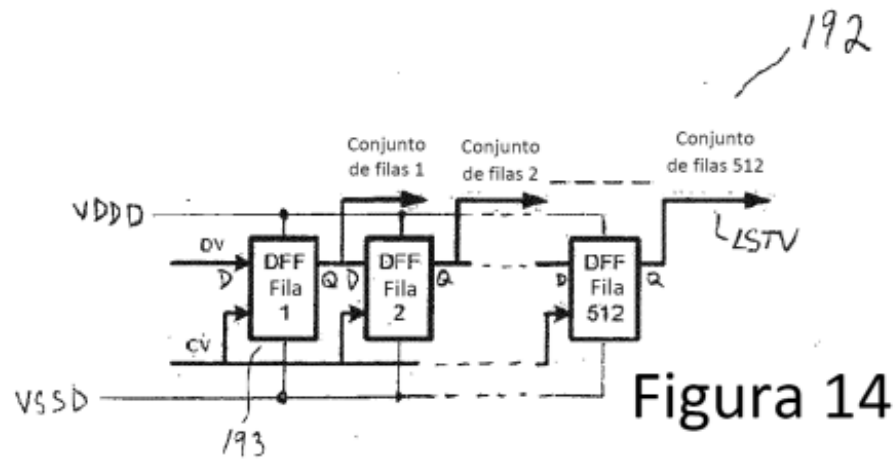


Figura 13



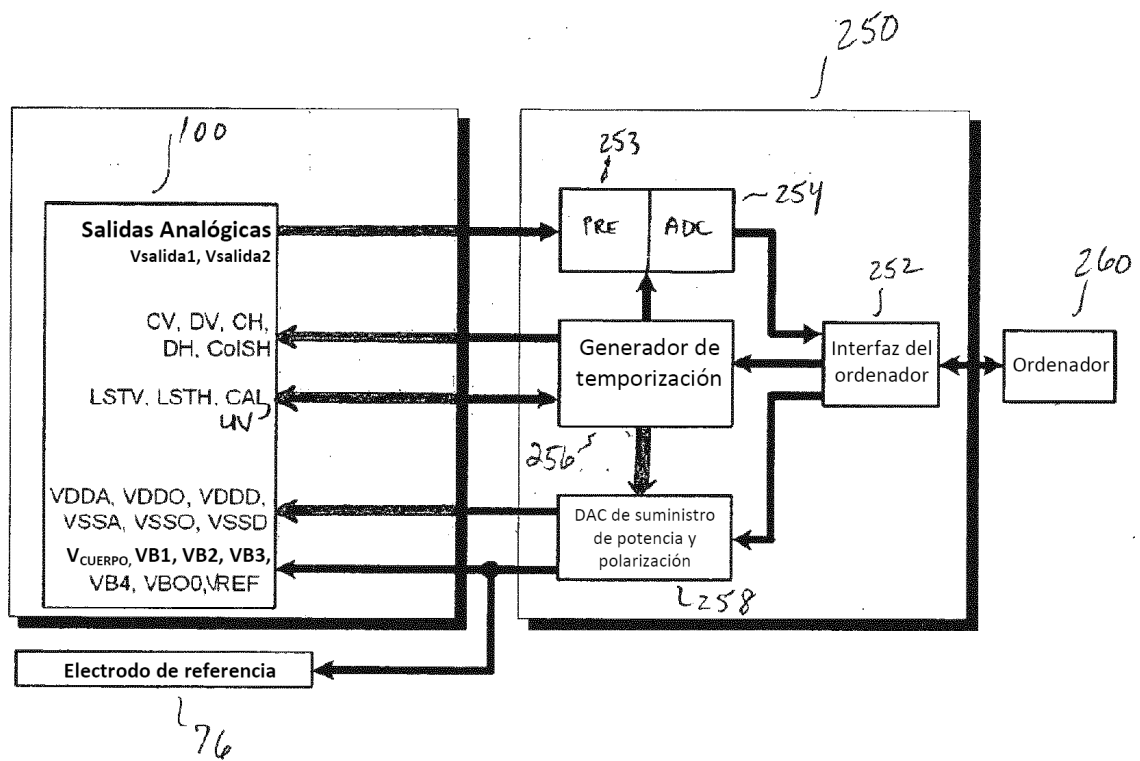


Figura 17

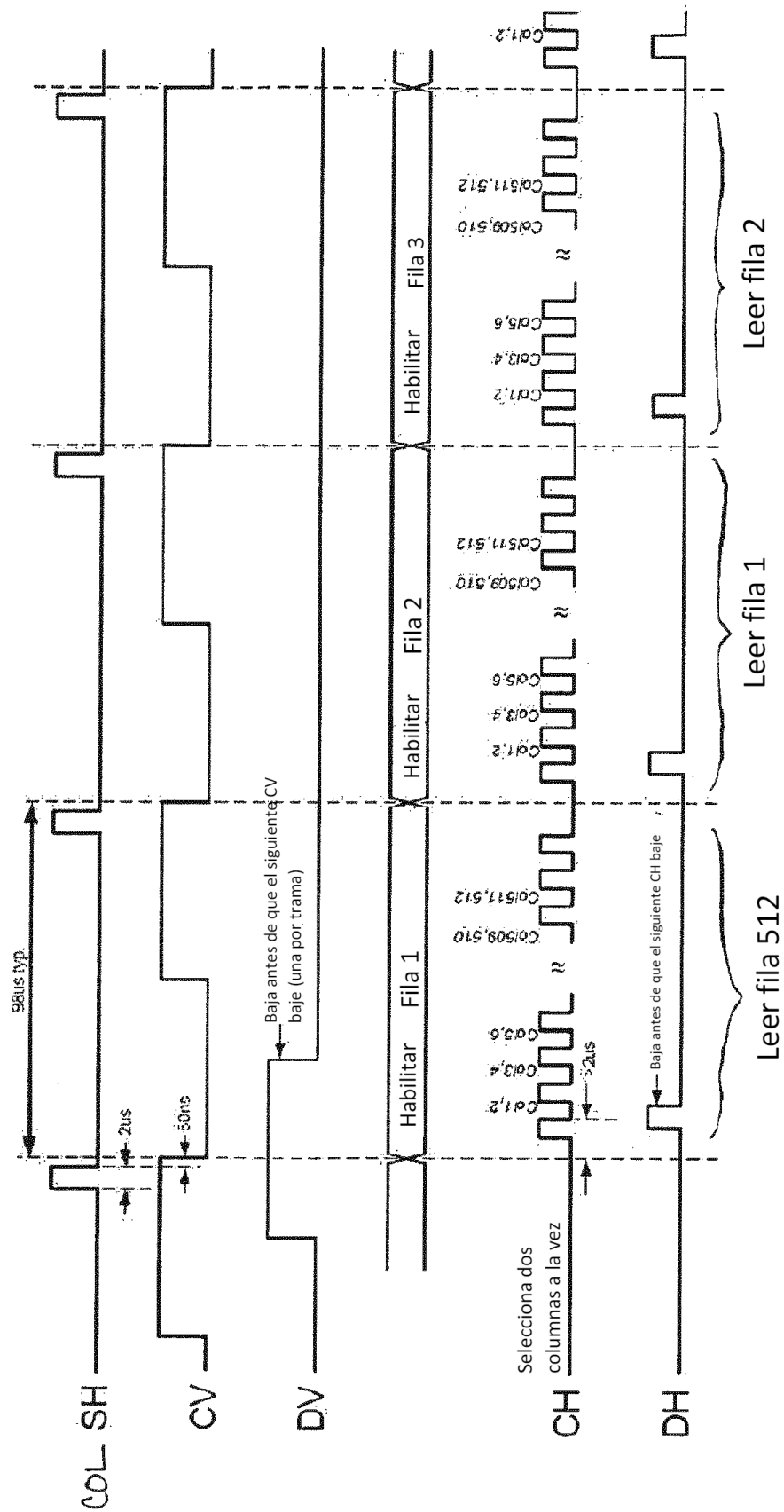


Figura 18

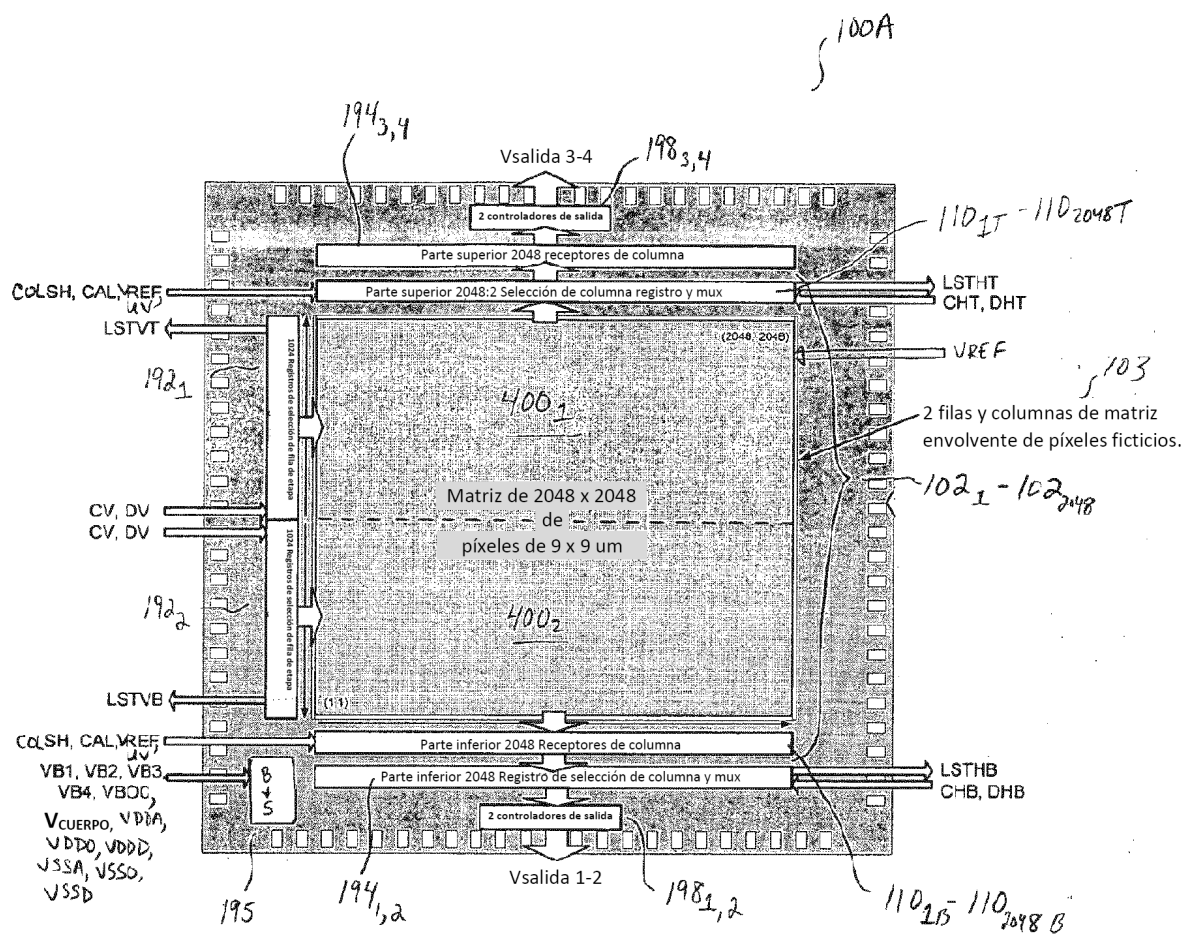


Figura 19

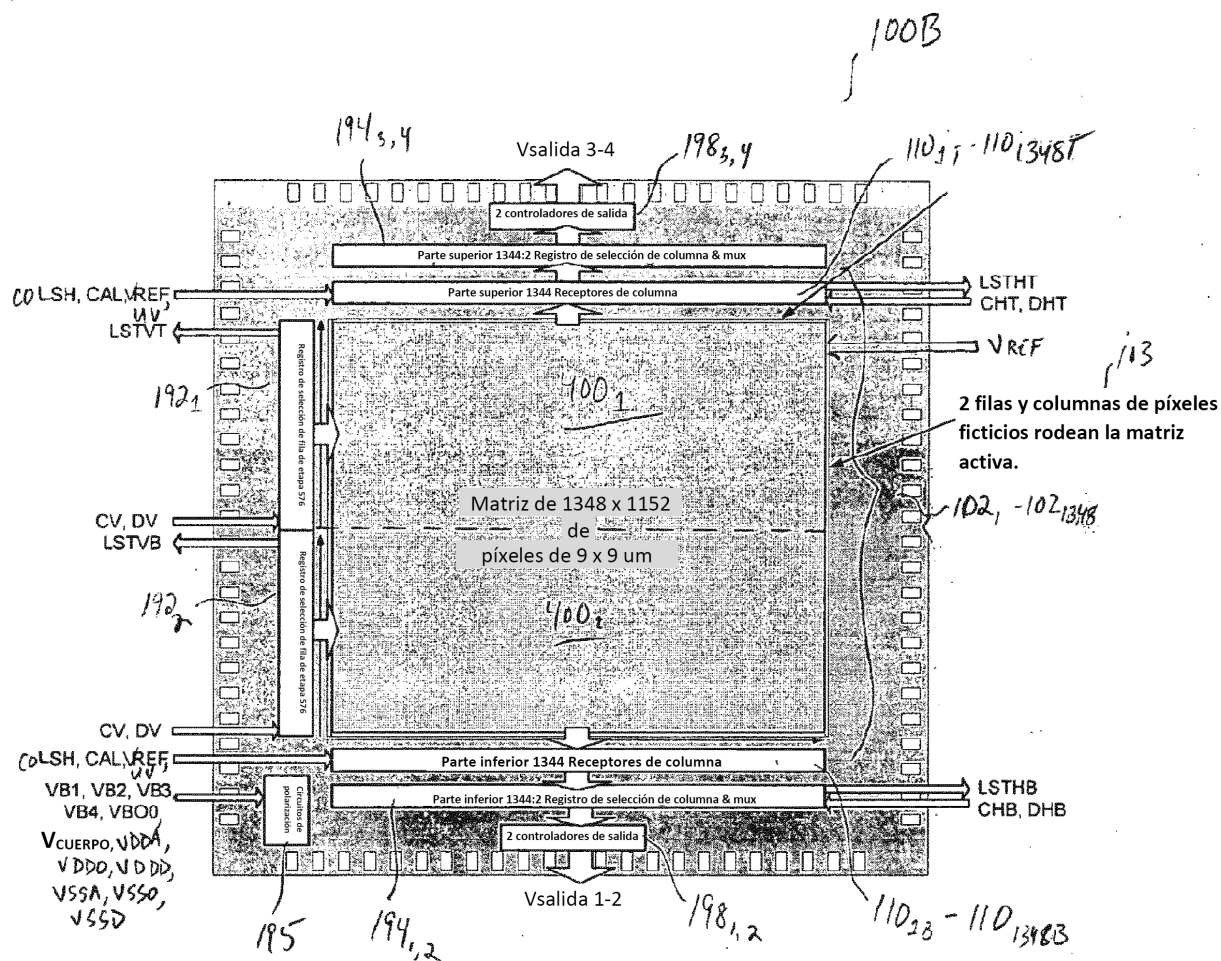


Figura 20

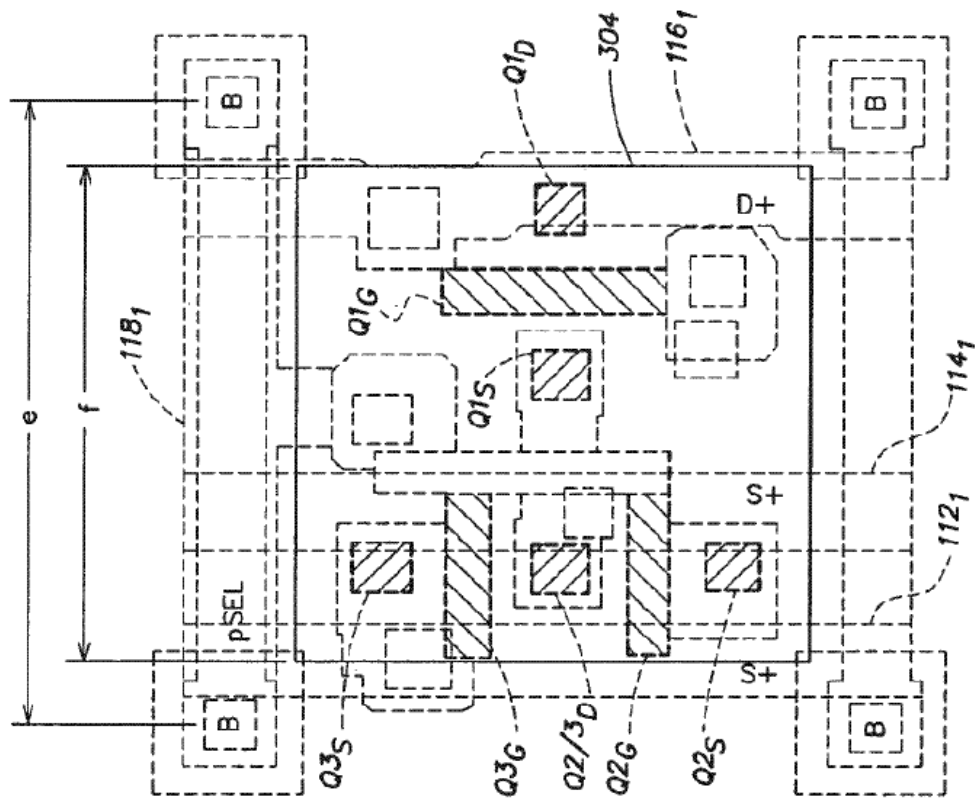


Figura 20A

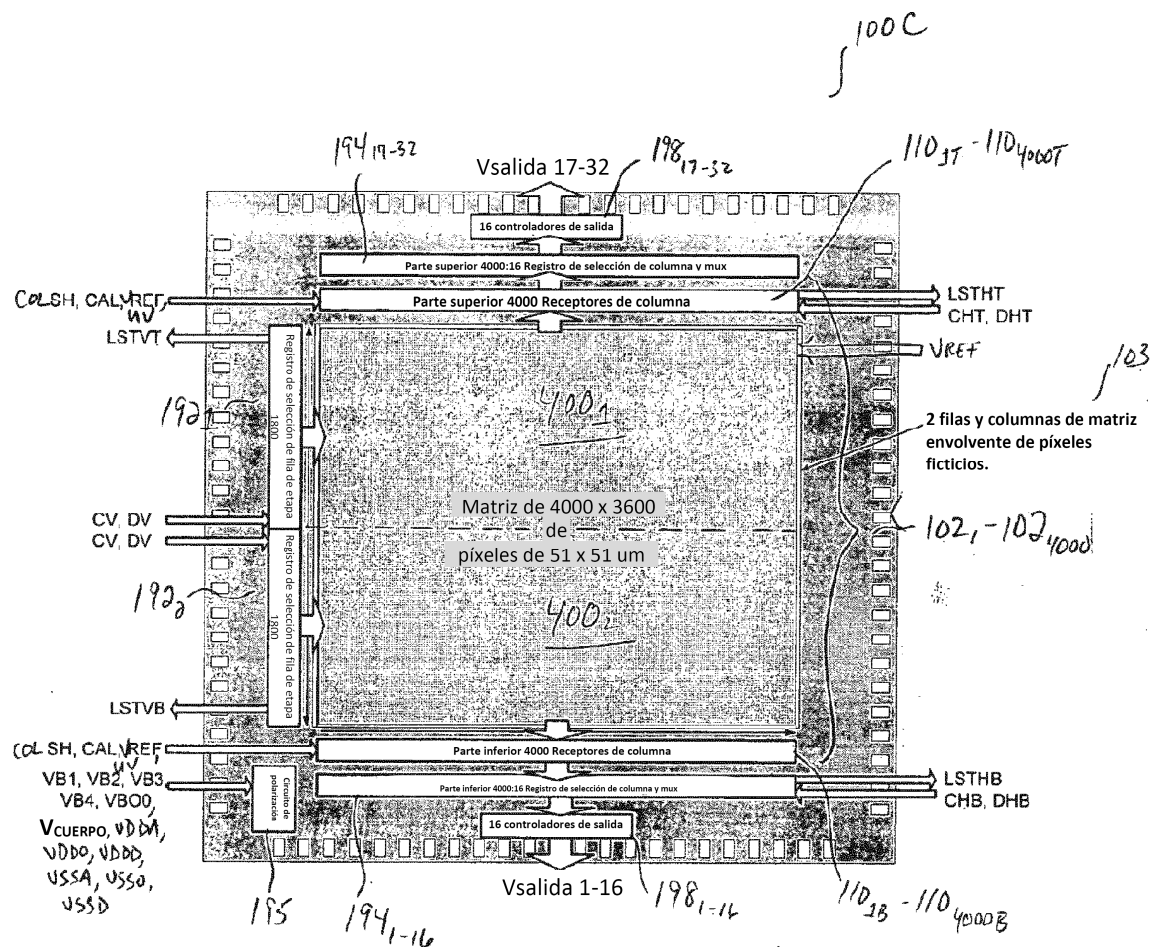


Figura 21

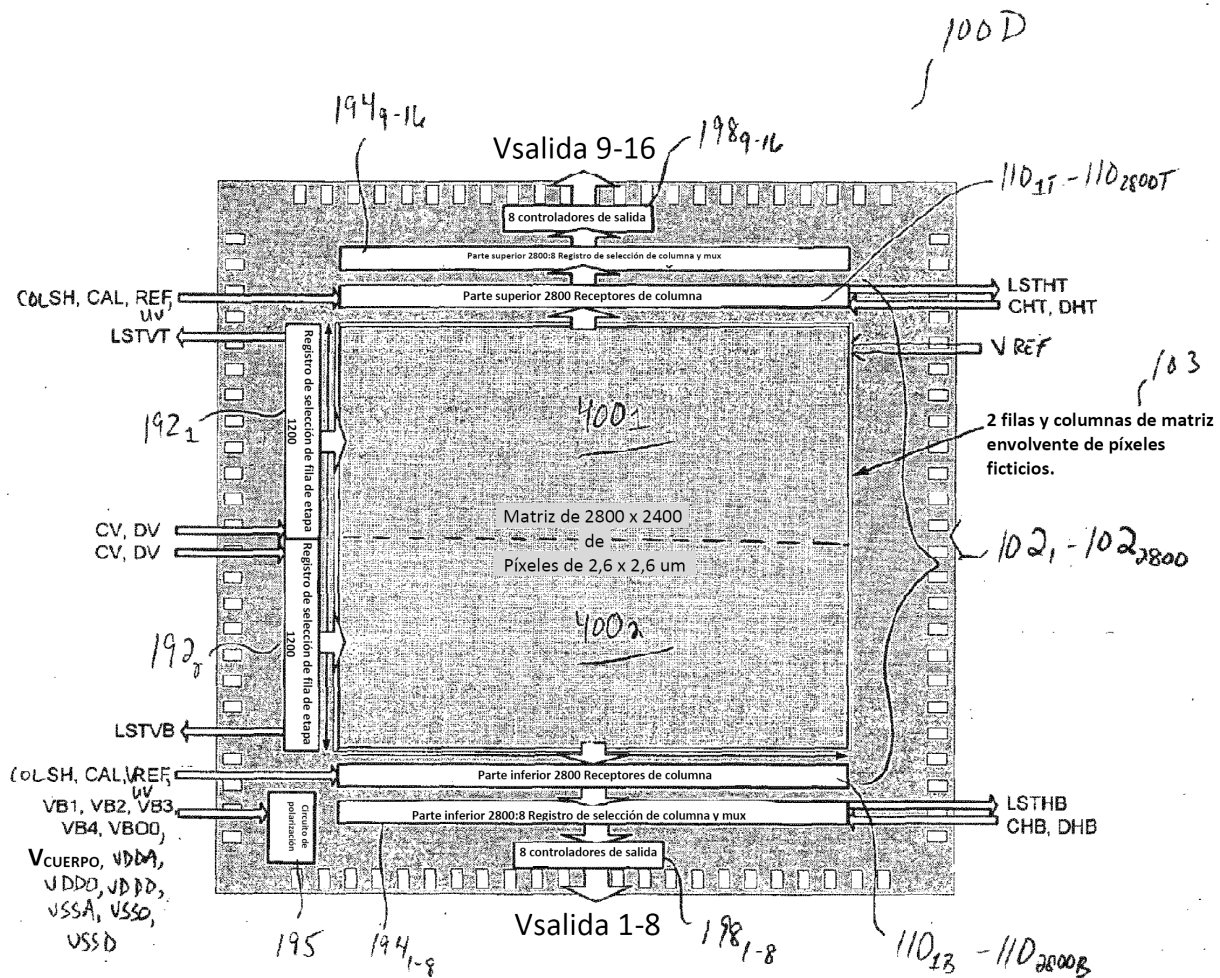


Figura 22

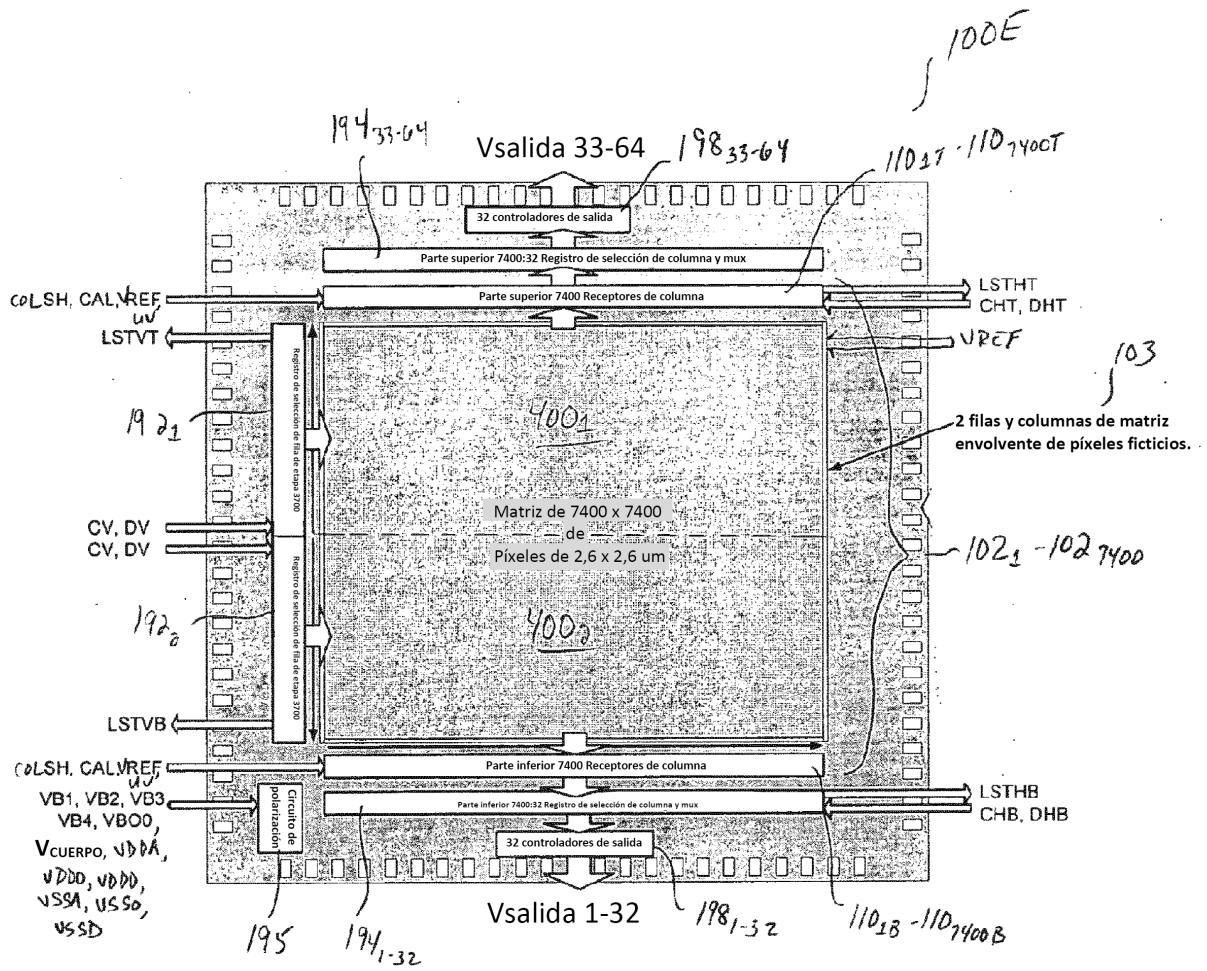


Figura 23

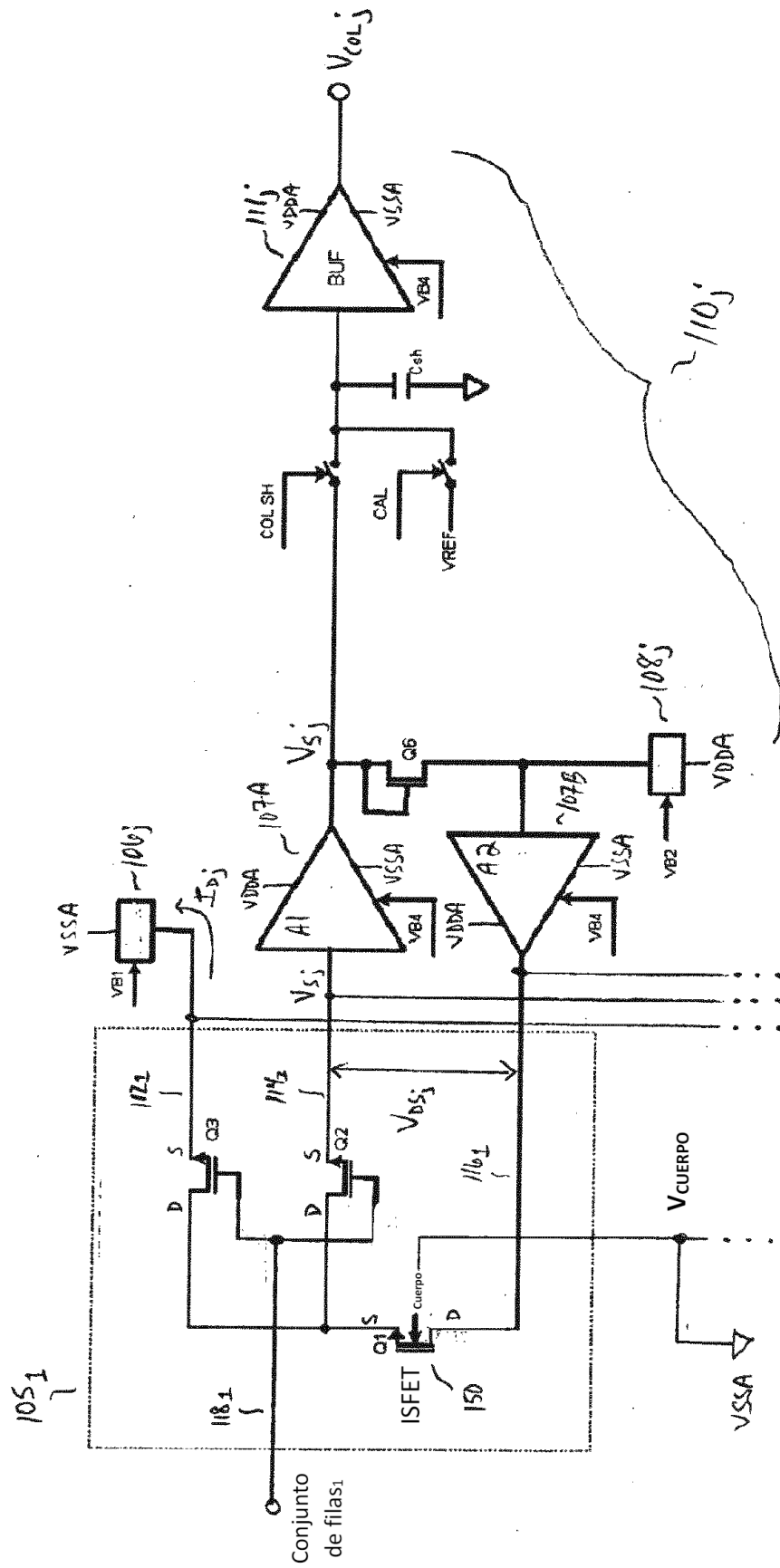


Figura 24

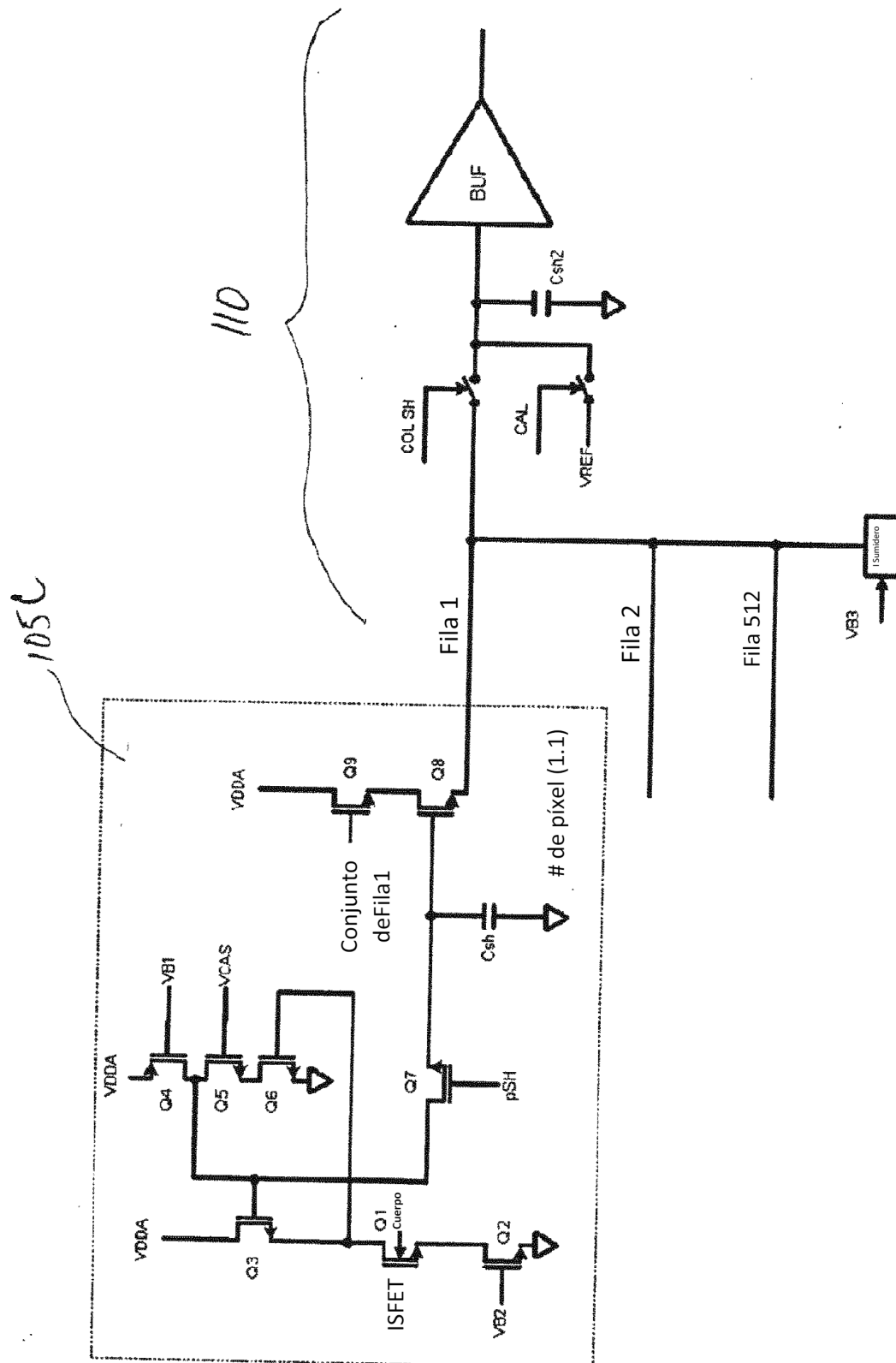


Figura 25

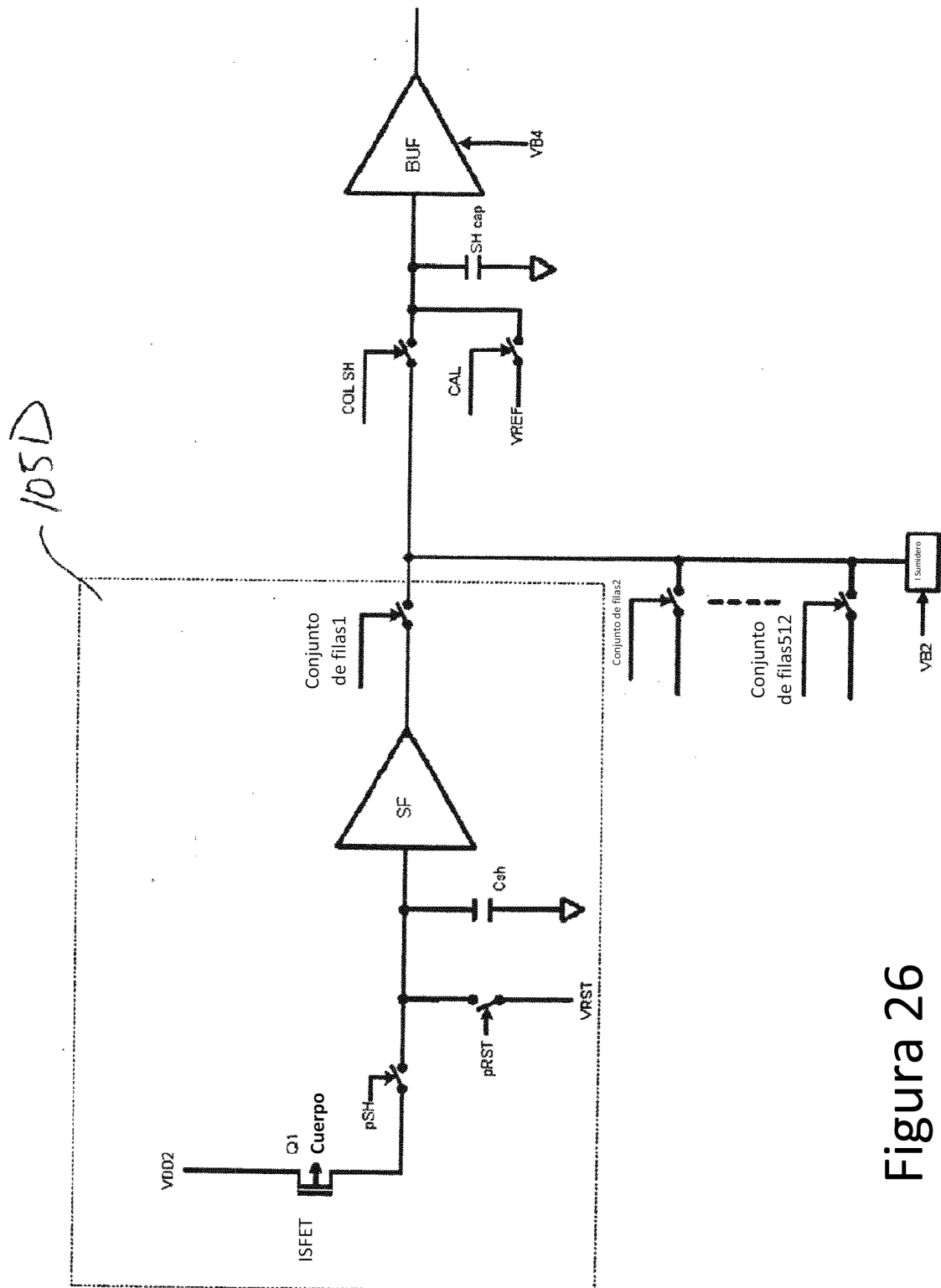


Figura 26

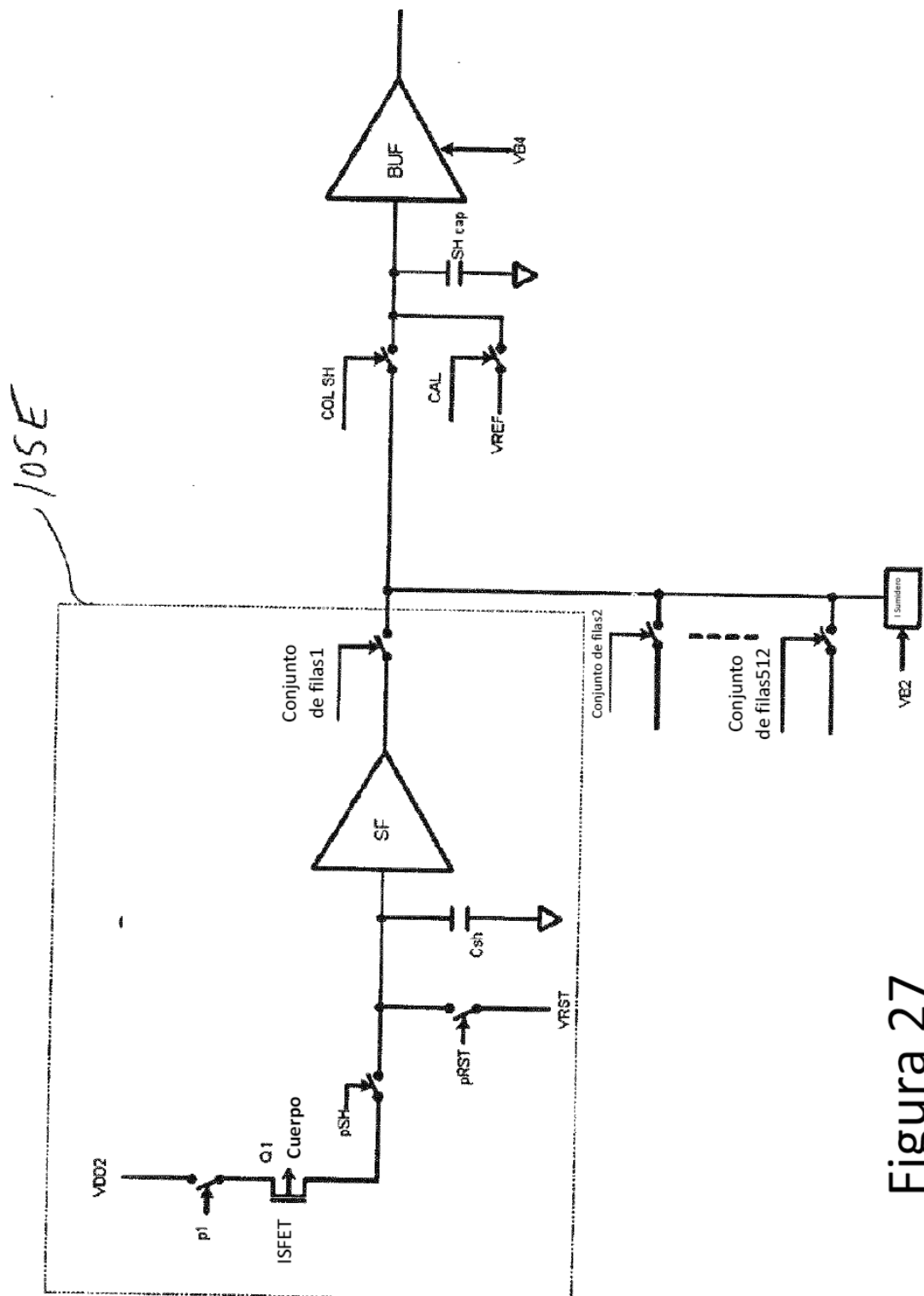
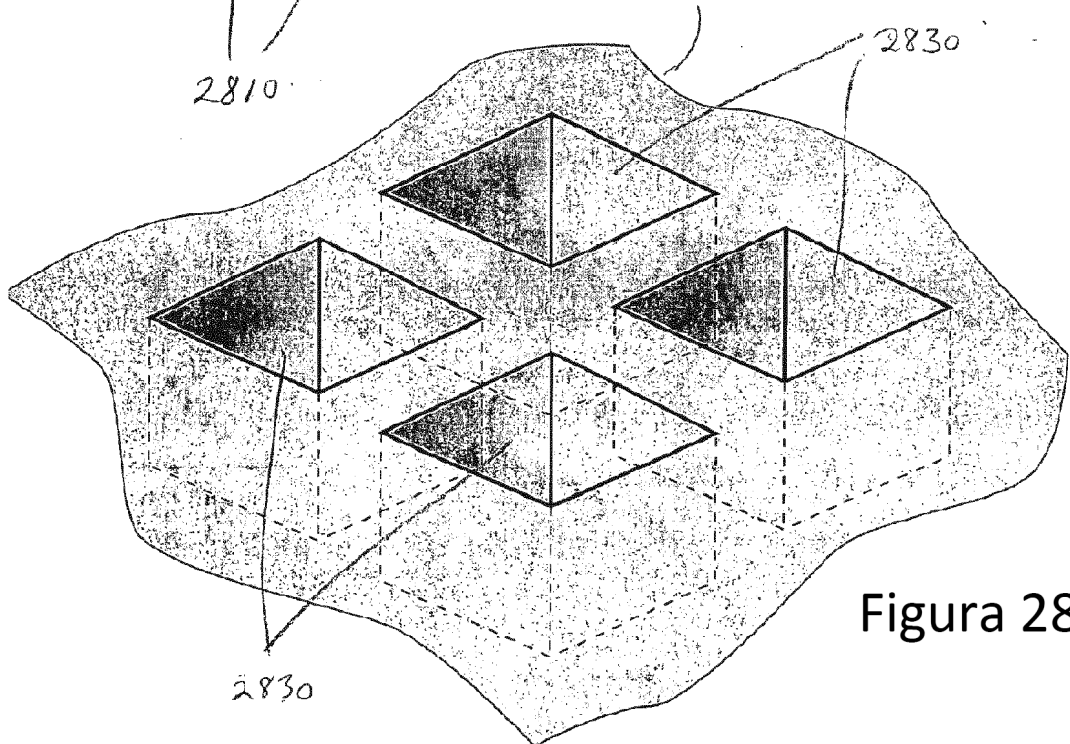
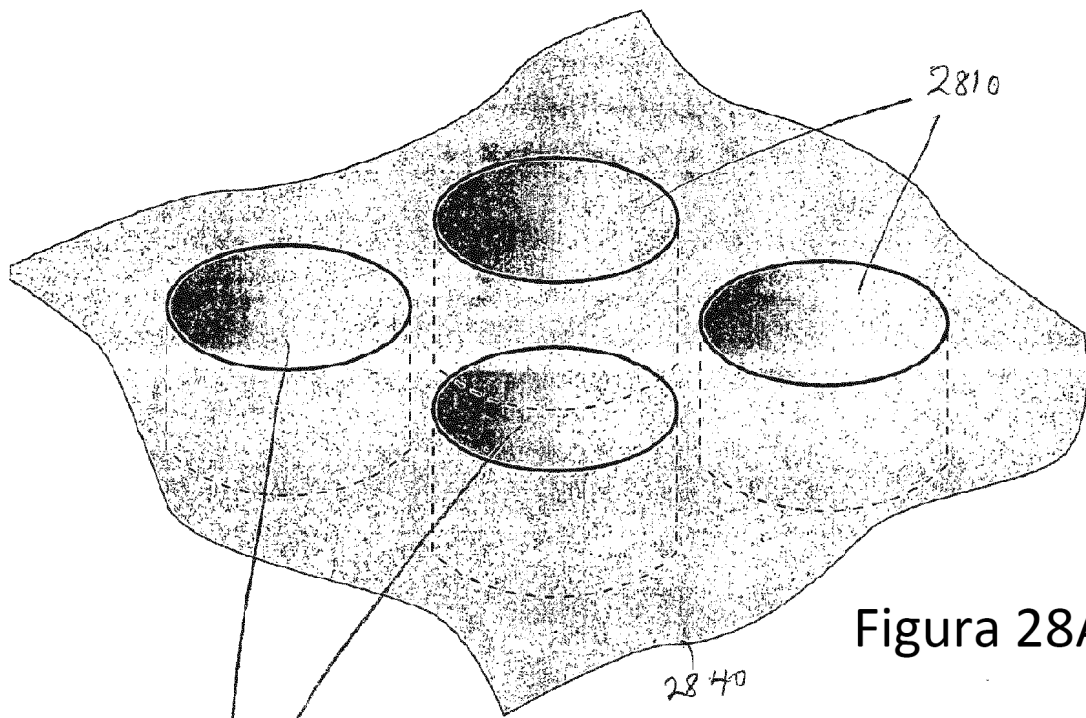


Figura 27



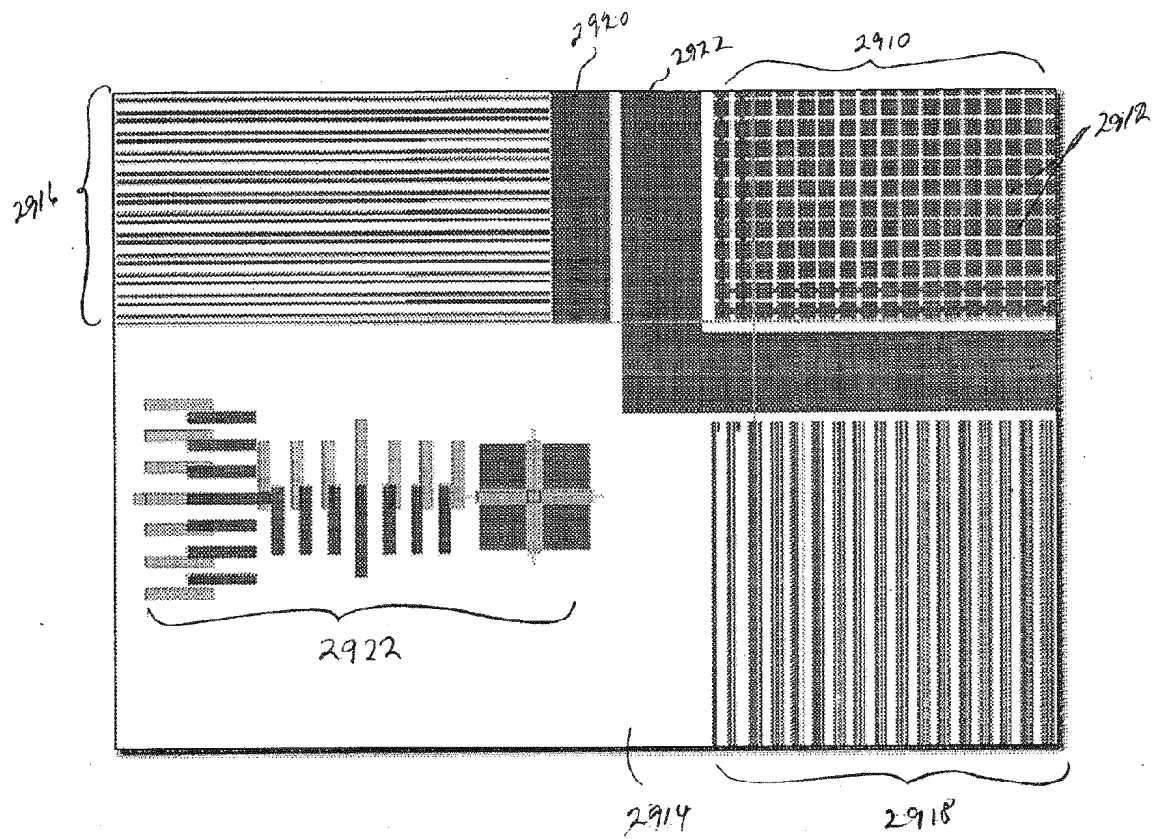


Figura 29

Figura 30

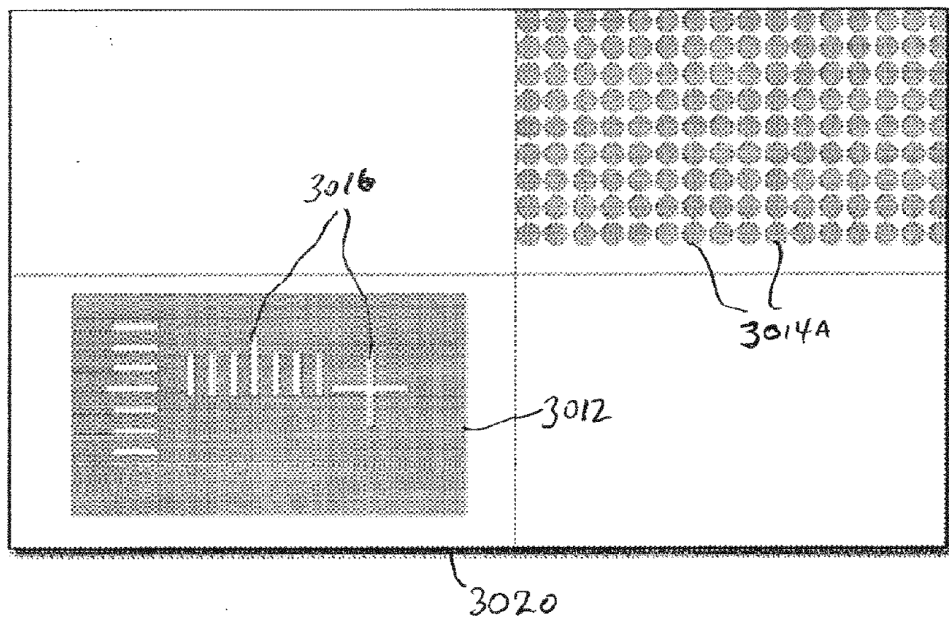
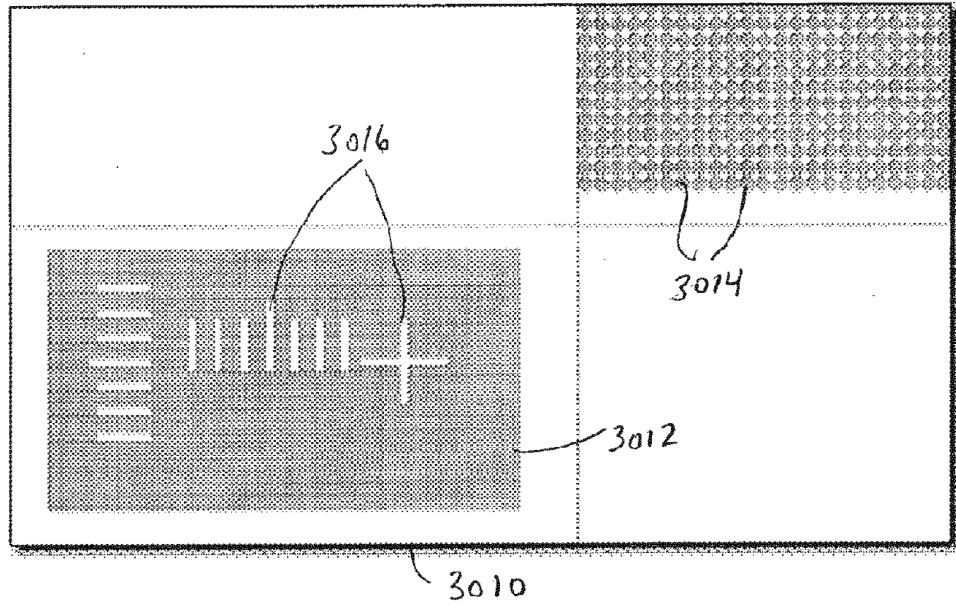


Figura 31

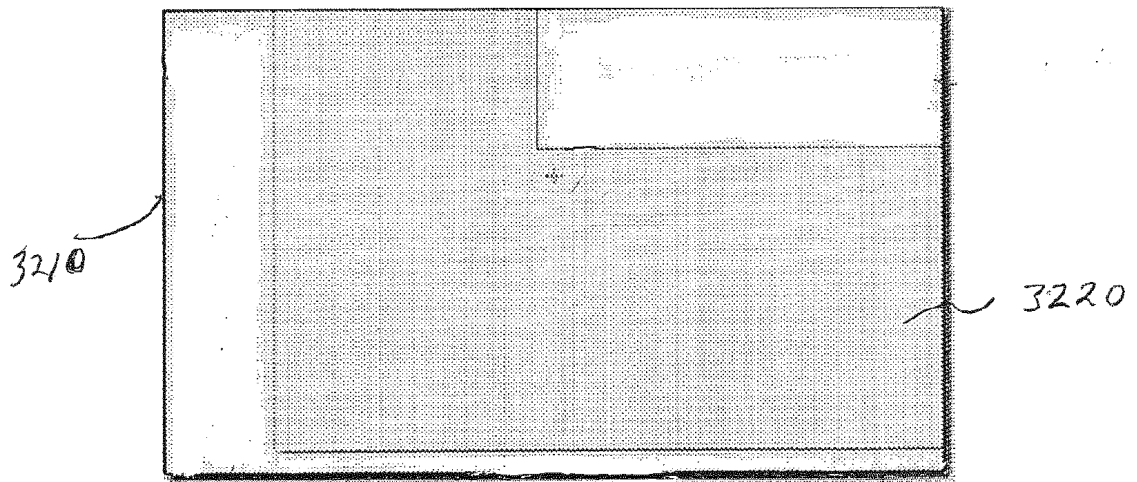


Figura 32

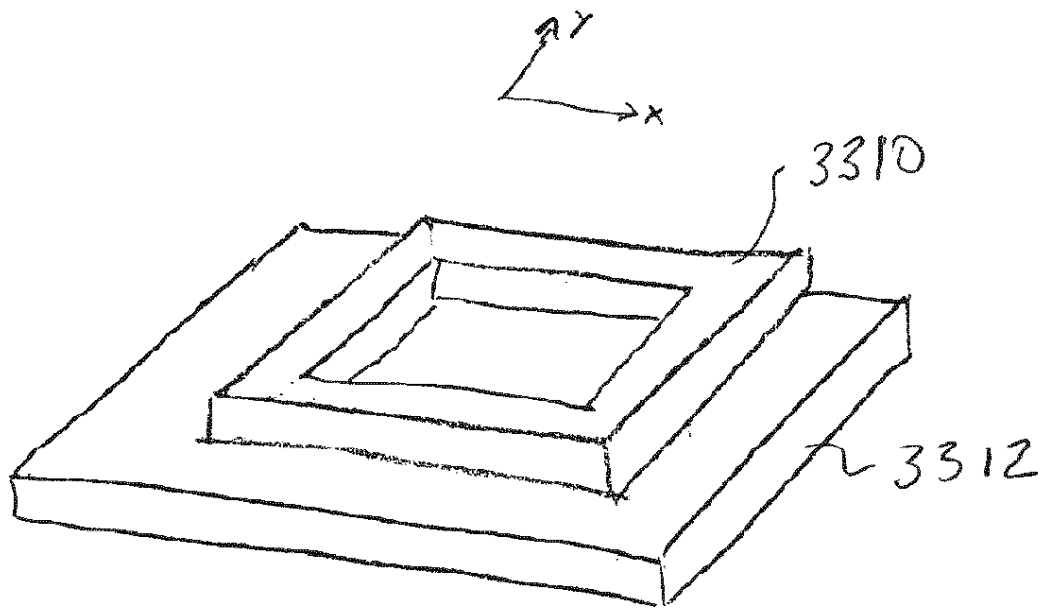


Figura 33

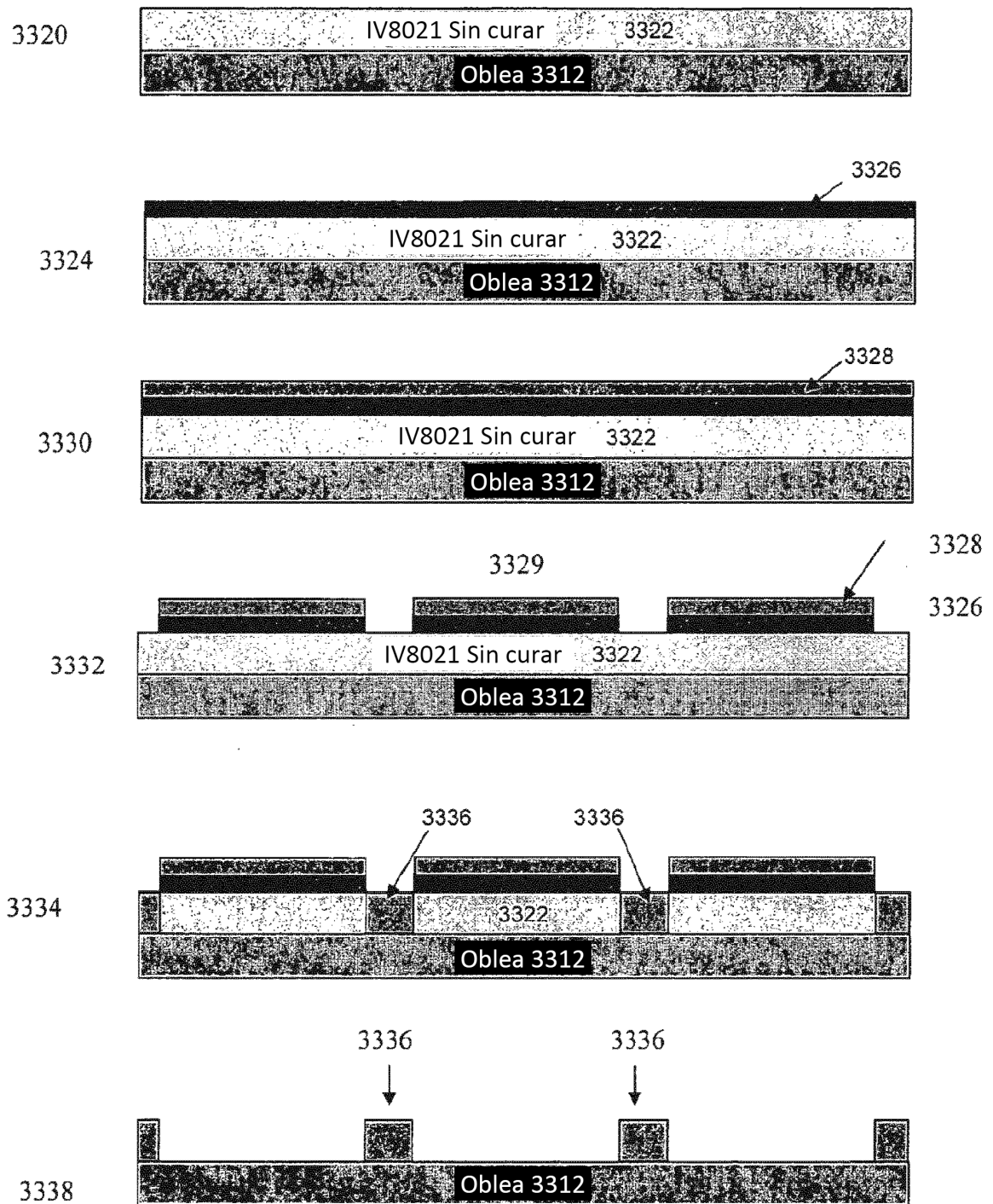


Figura 33A

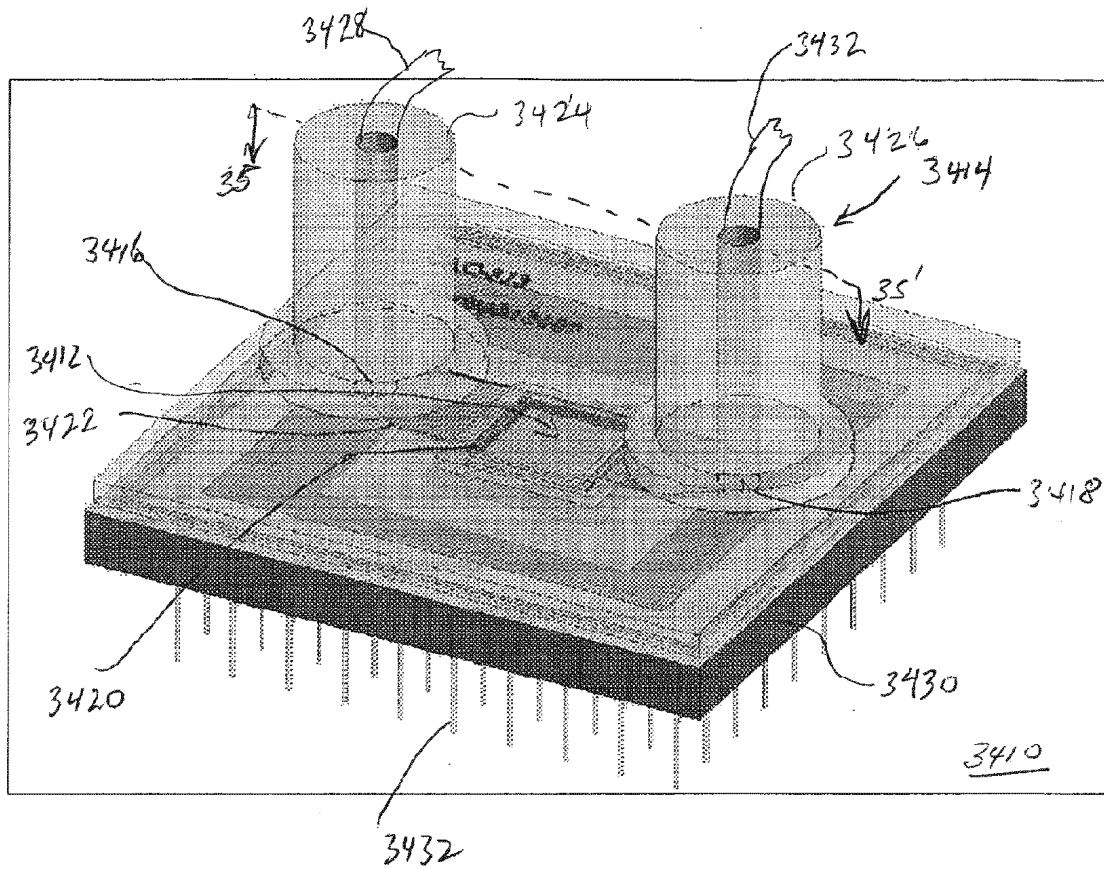


Figura 34

Figura 36

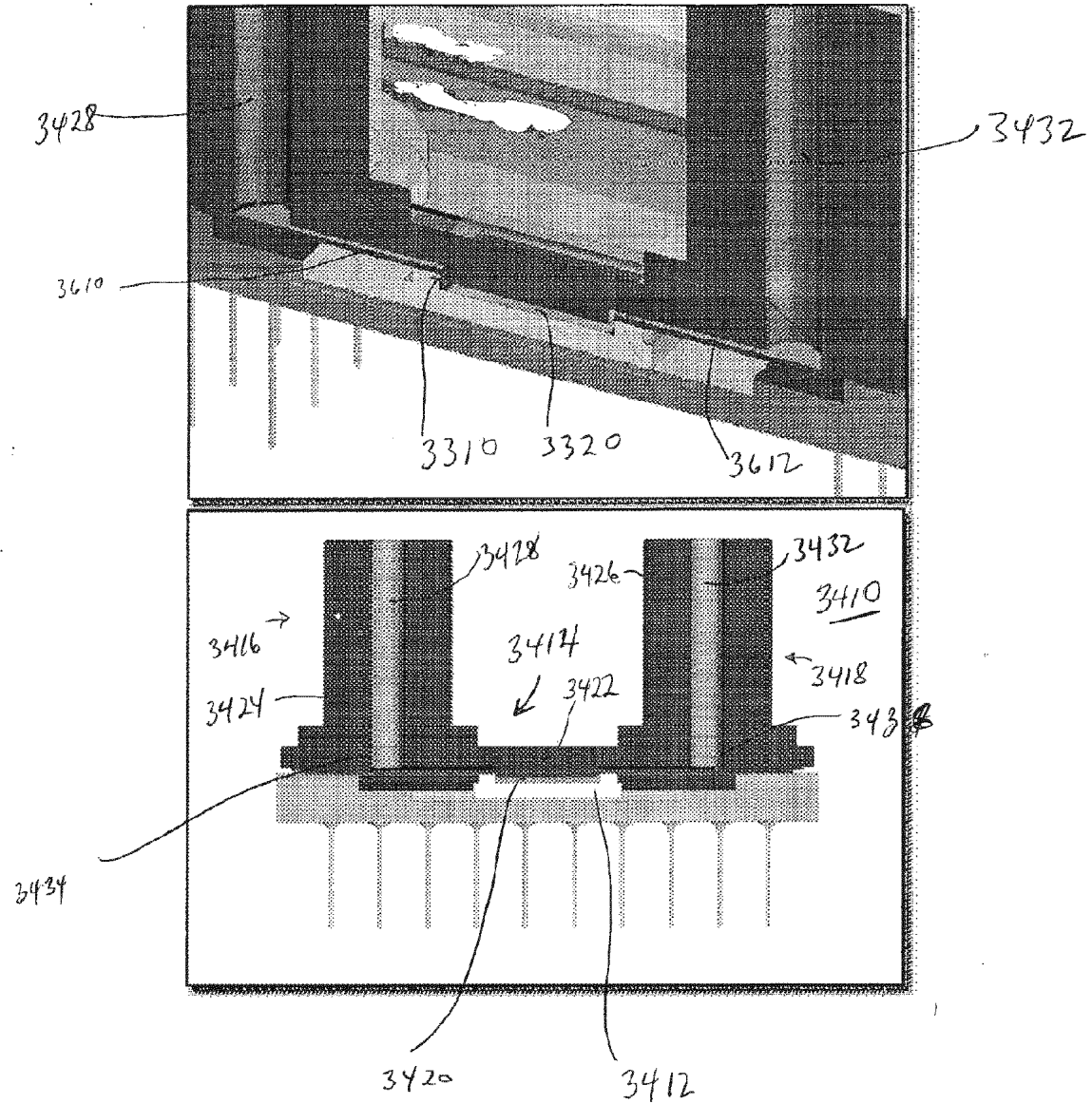


Figura 35

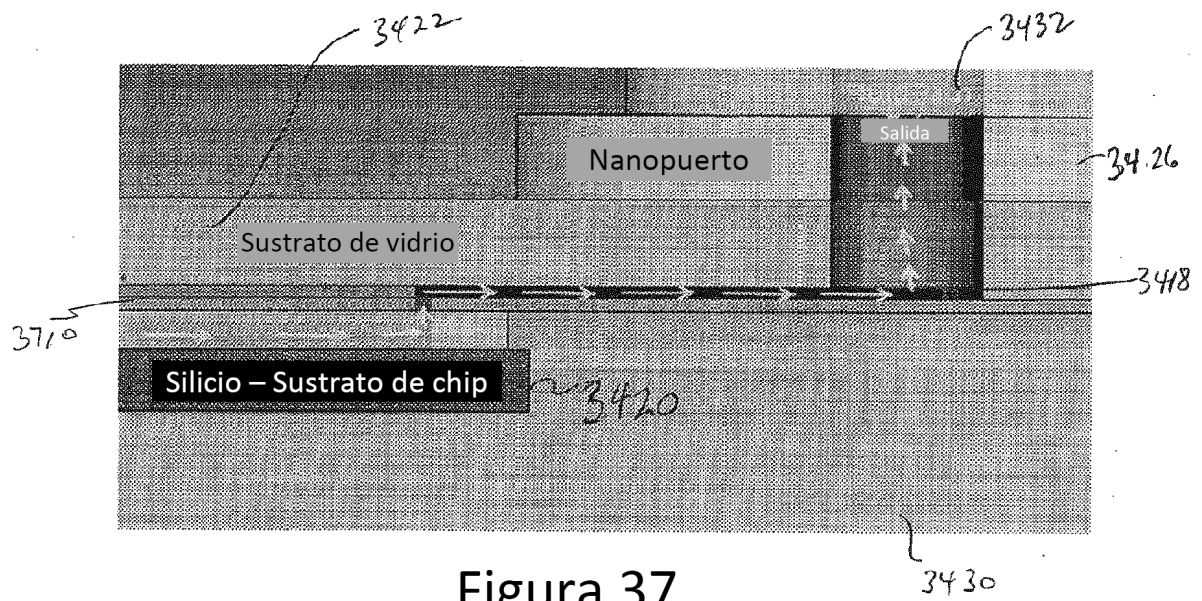


Figura 37

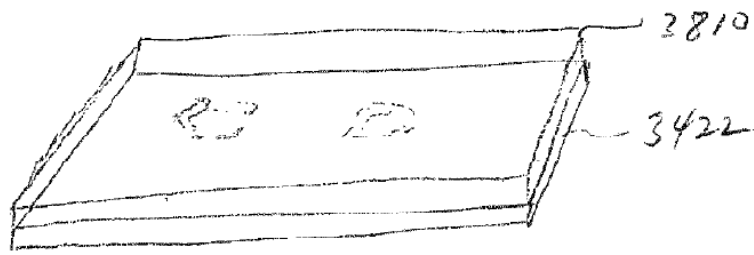


Figura 38

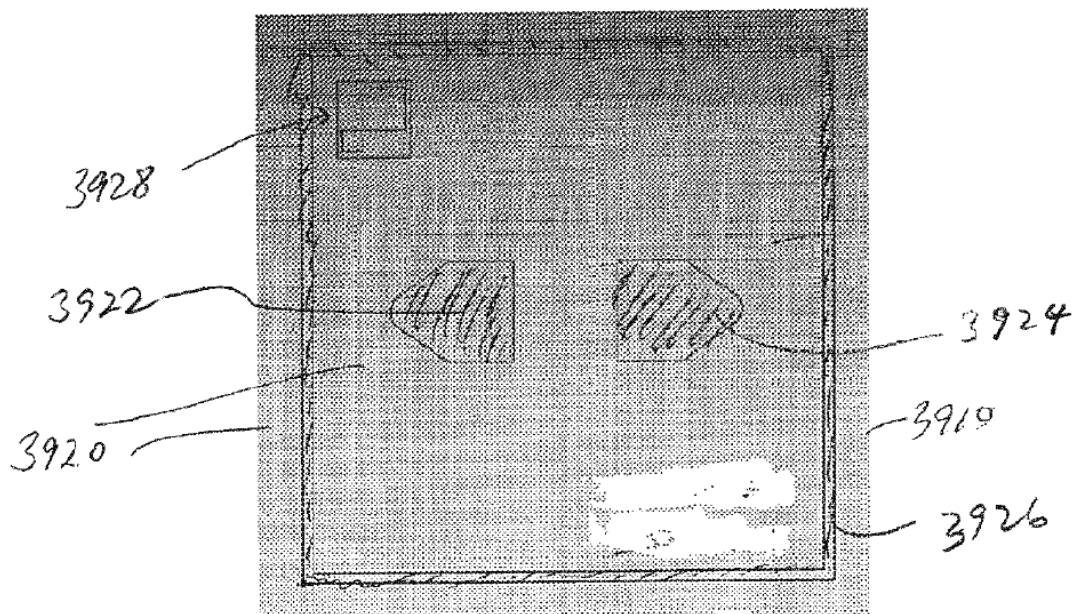


Figura 39

Figura 40

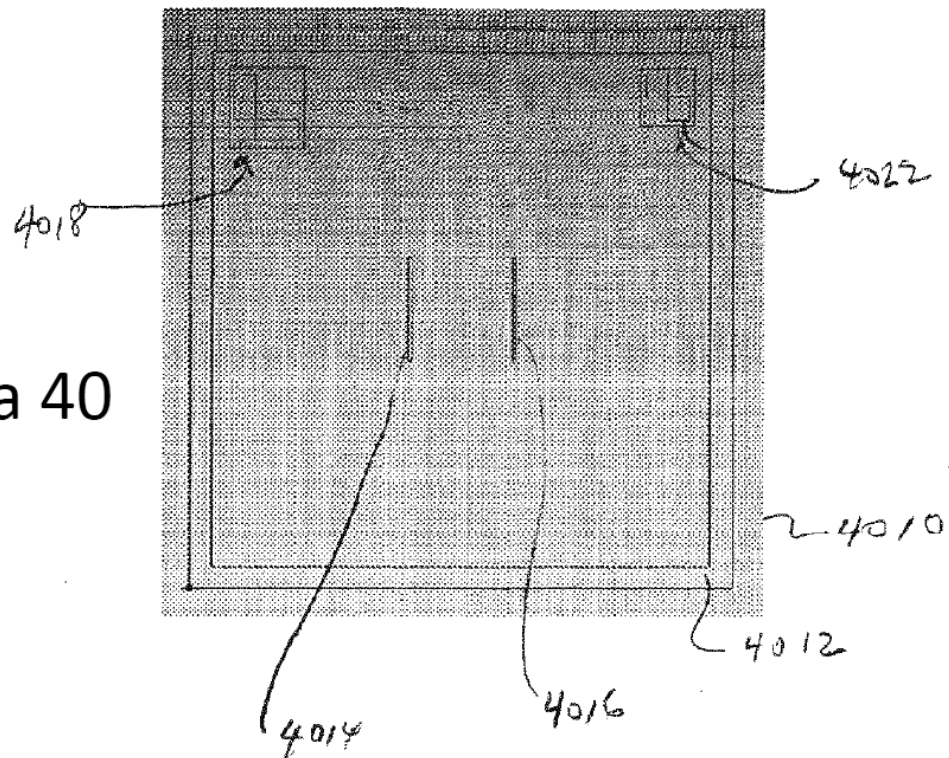
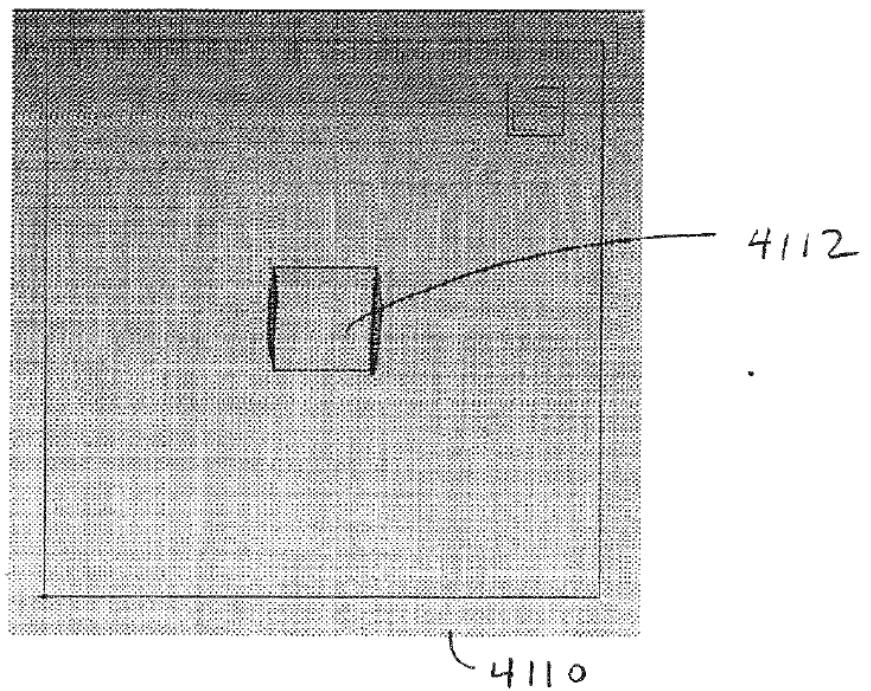


Figura 41



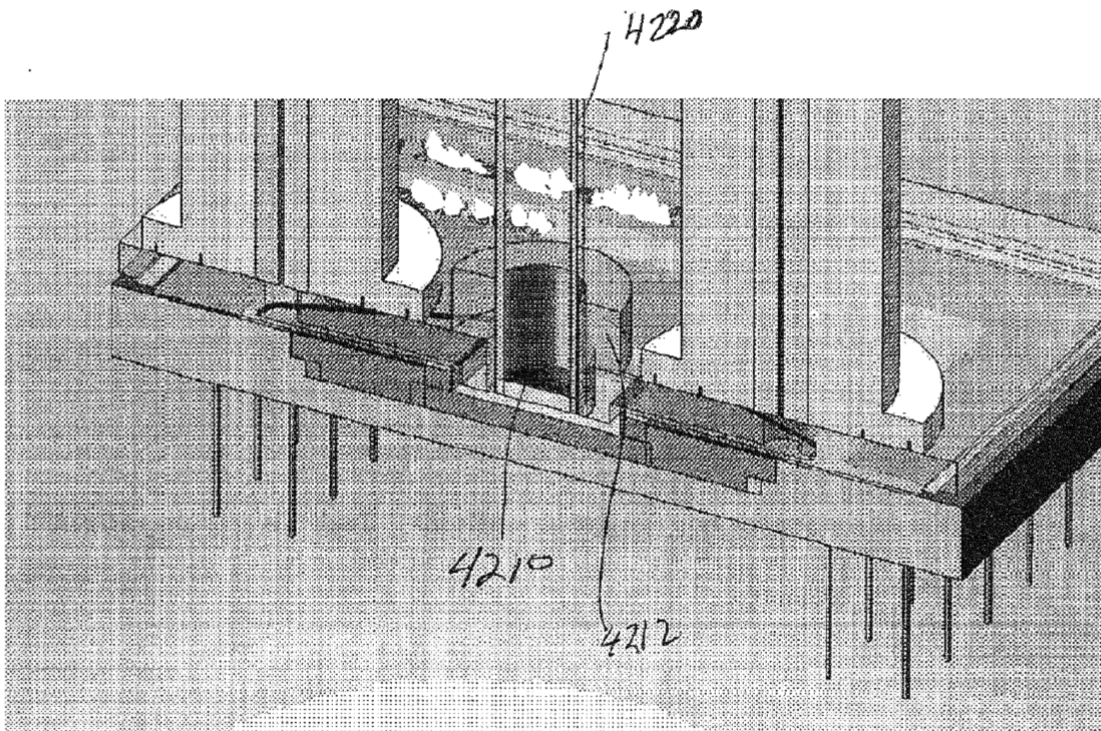


Figura 42

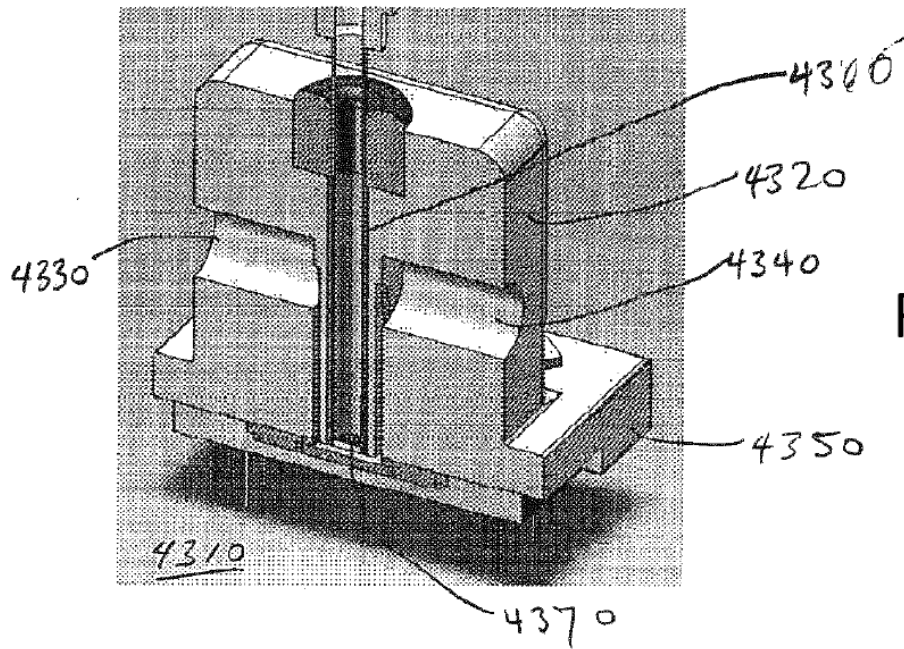


Figura 43

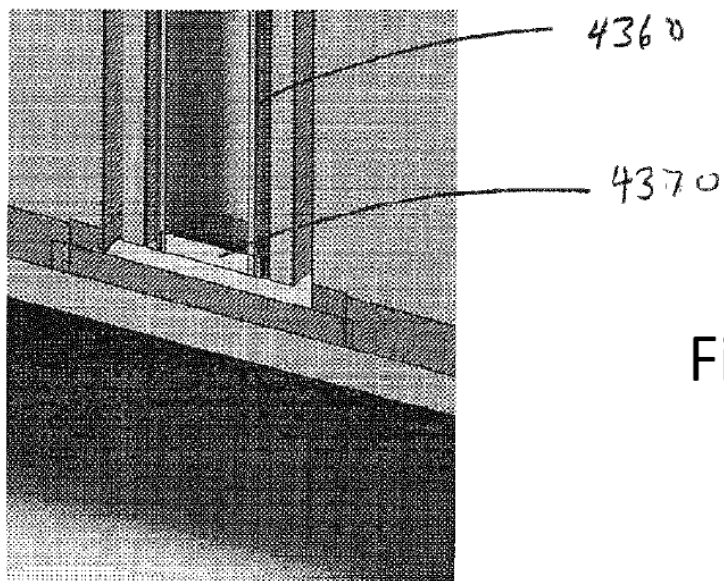


Figura 44

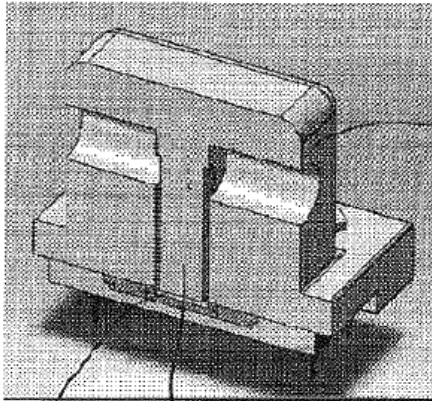


Figura 45

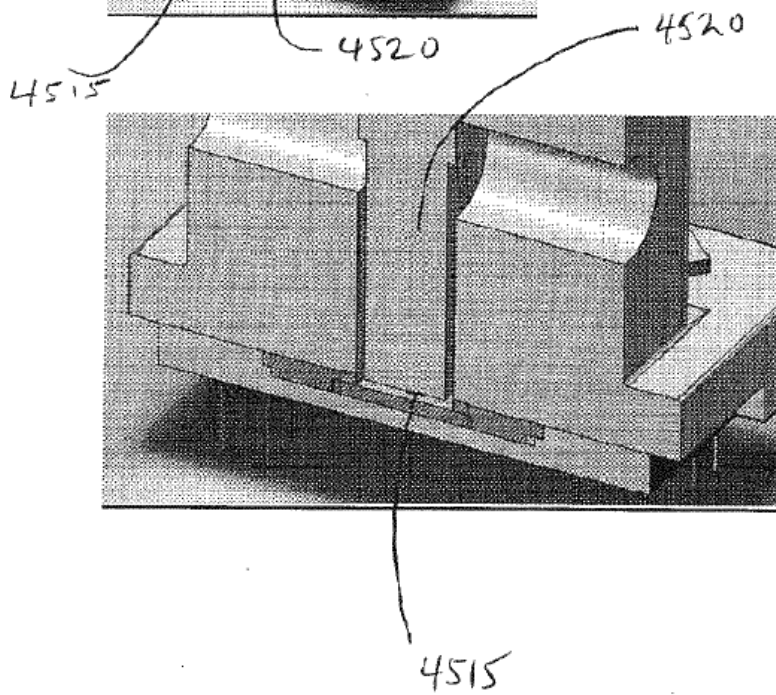


Figura 46

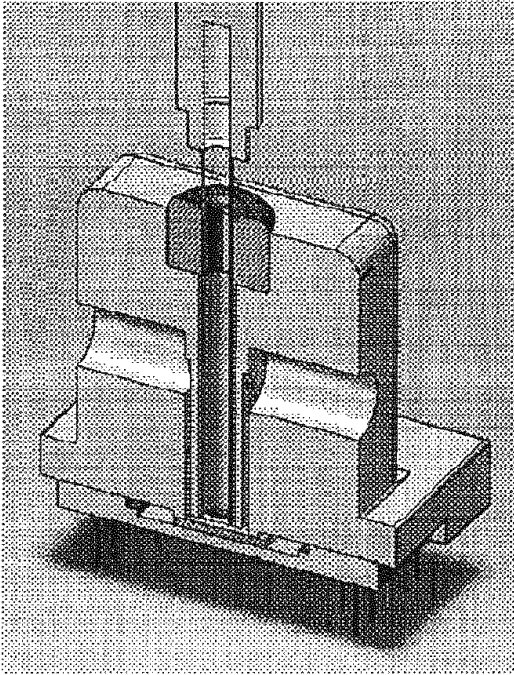


Figura 47

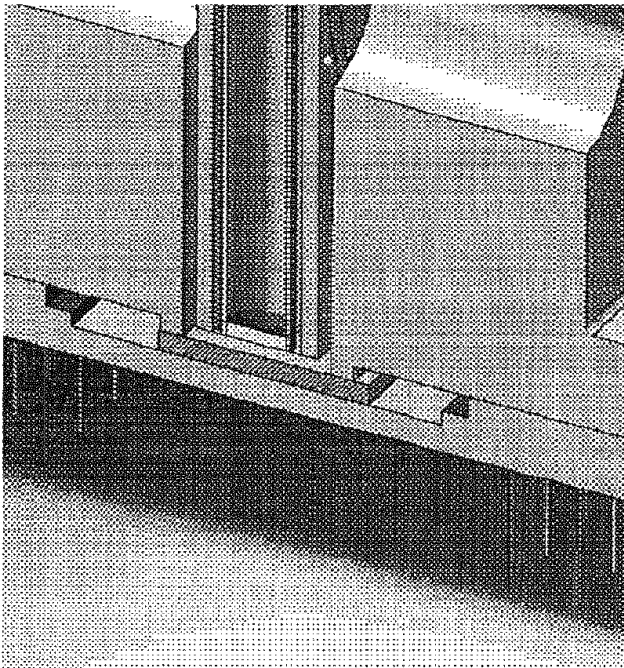


Figura 48

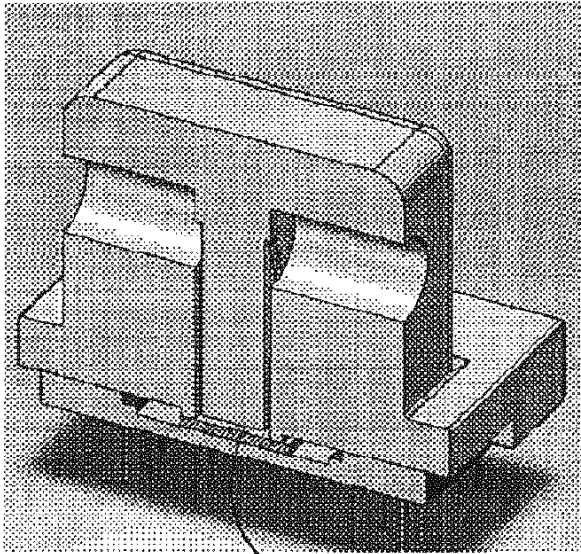


Figura 49

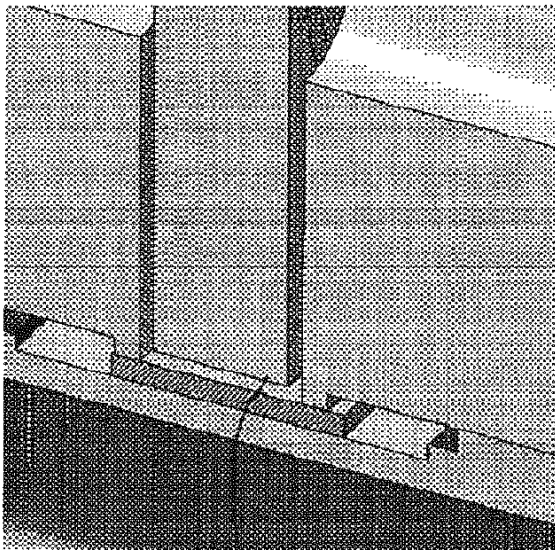


Figura 50

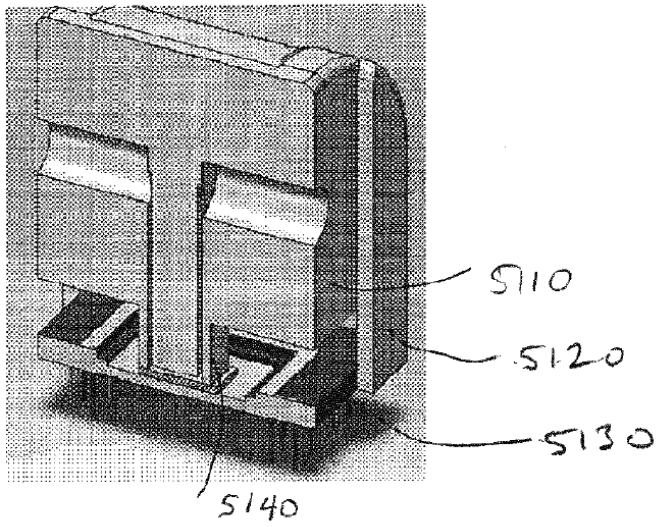


Figura 51

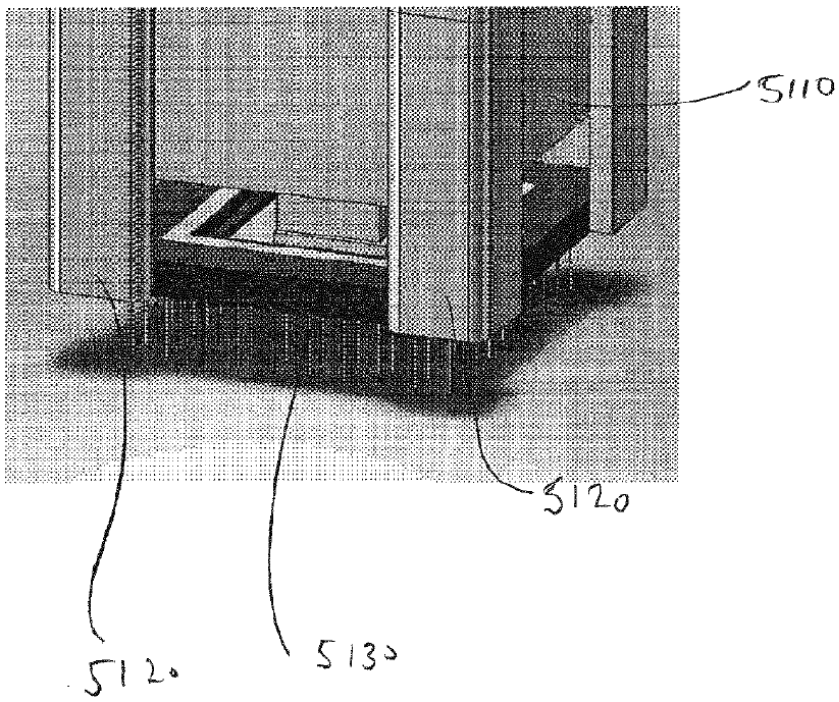


Figura 52

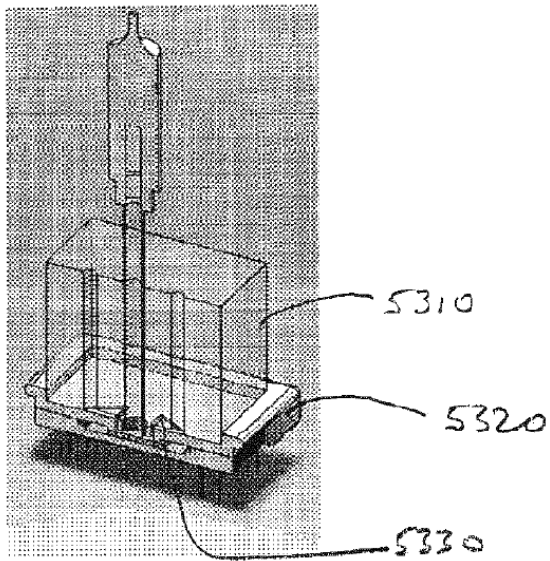


Figura 53

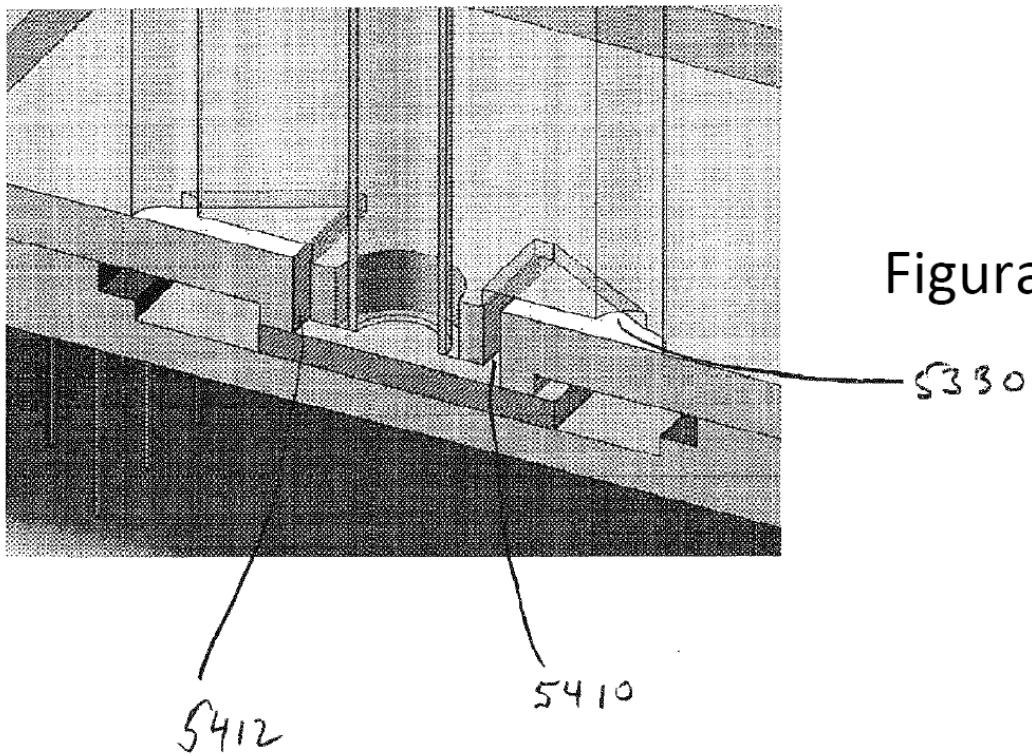


Figura 54

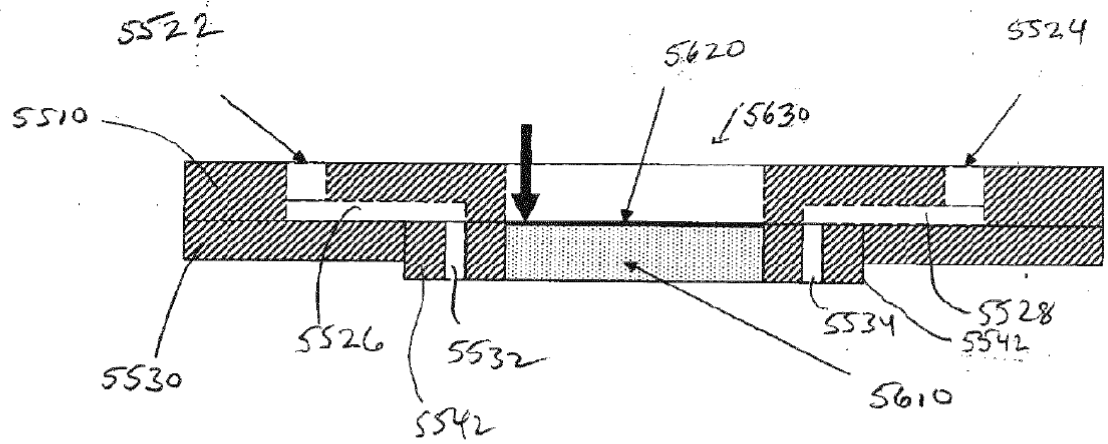


Figura 56

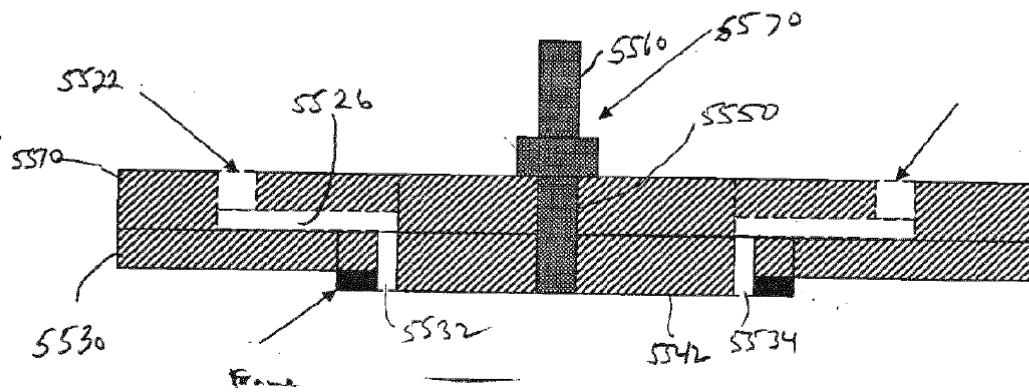


Figura 55

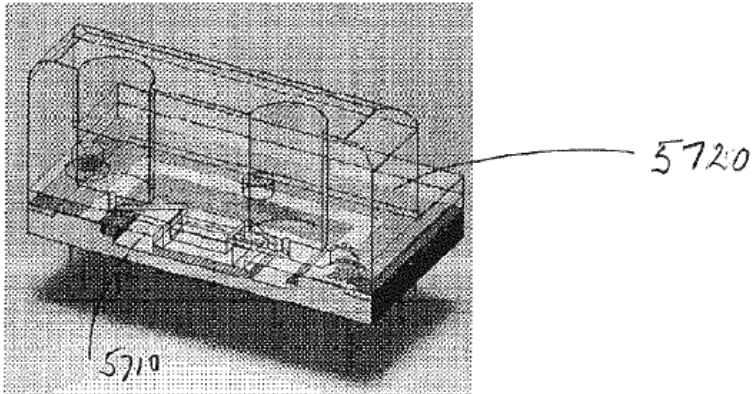


Figura 57

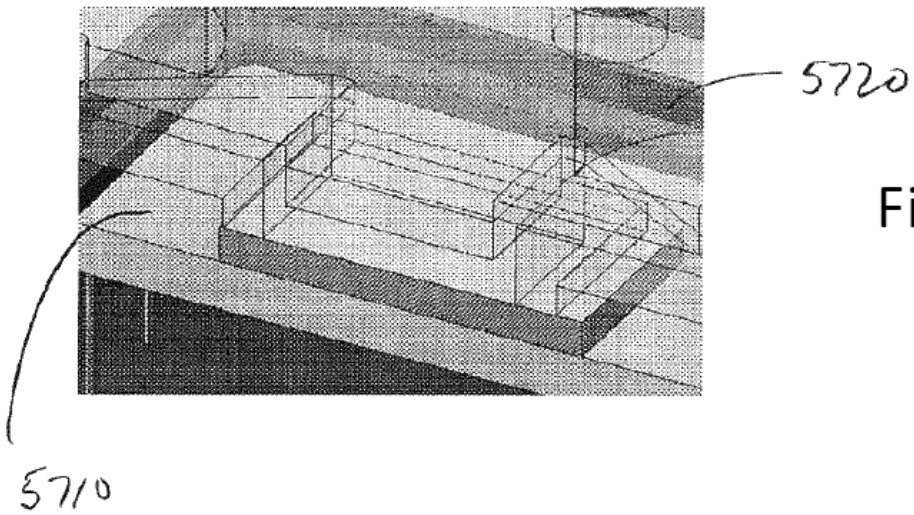


Figura 58

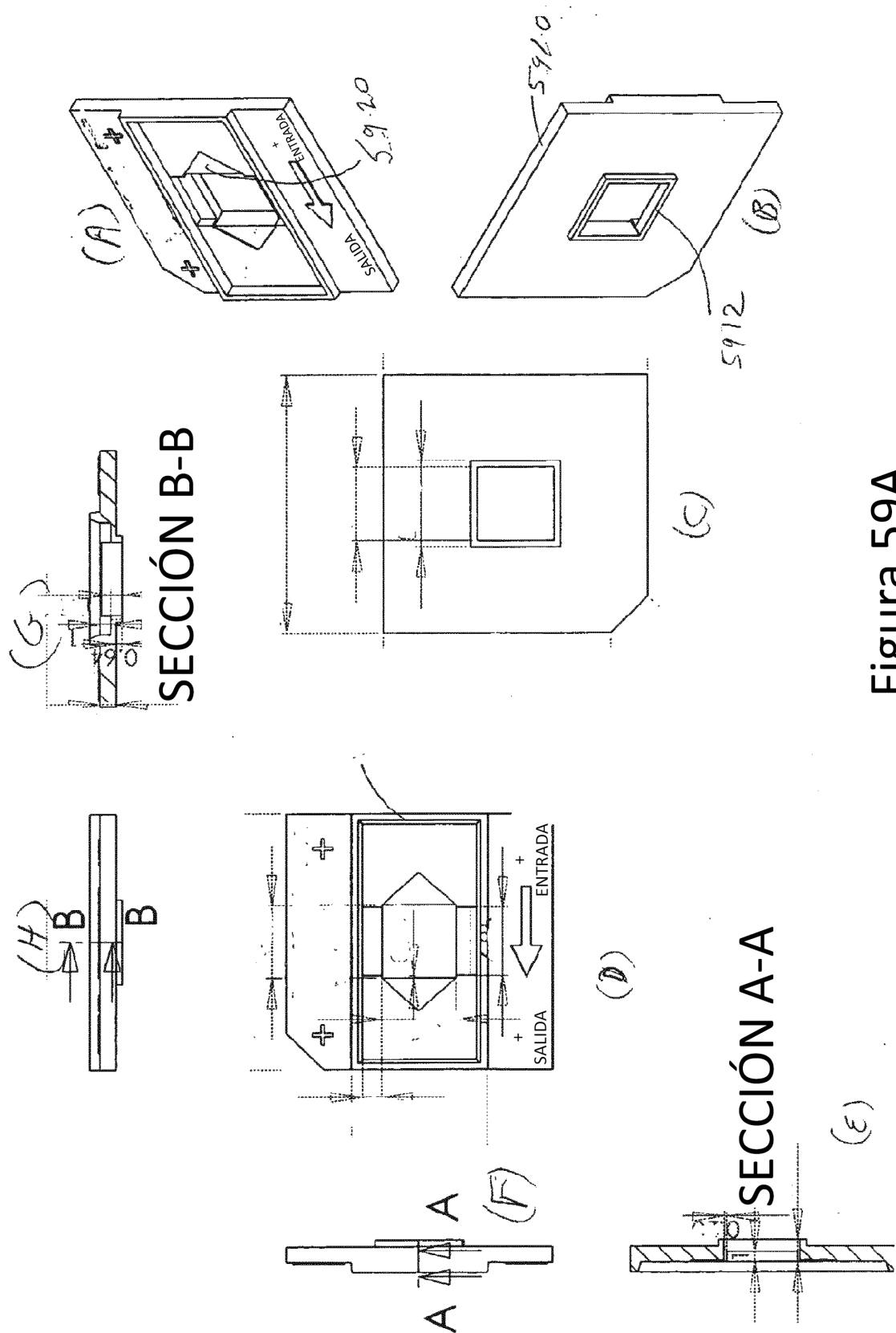


Figura 59A

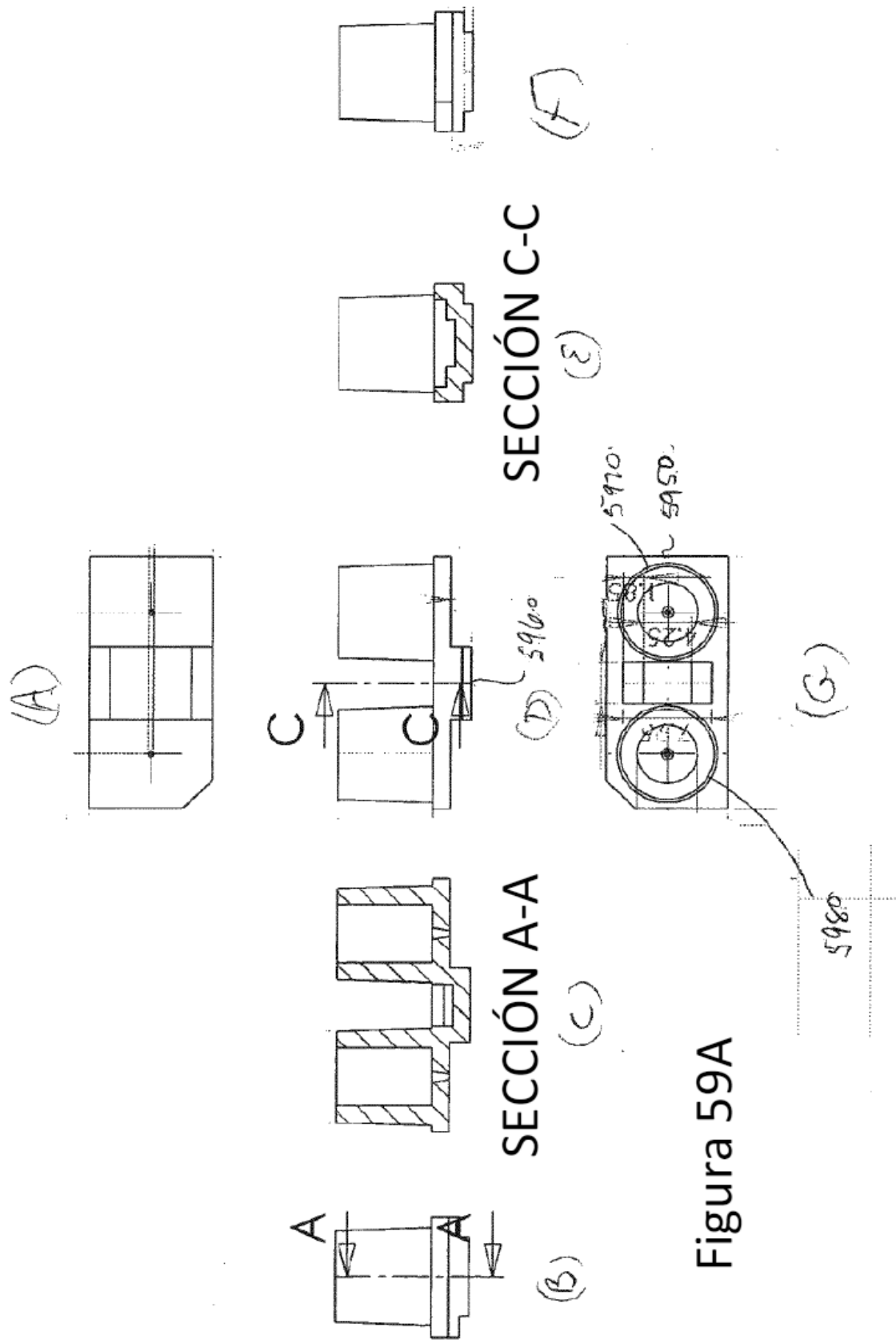
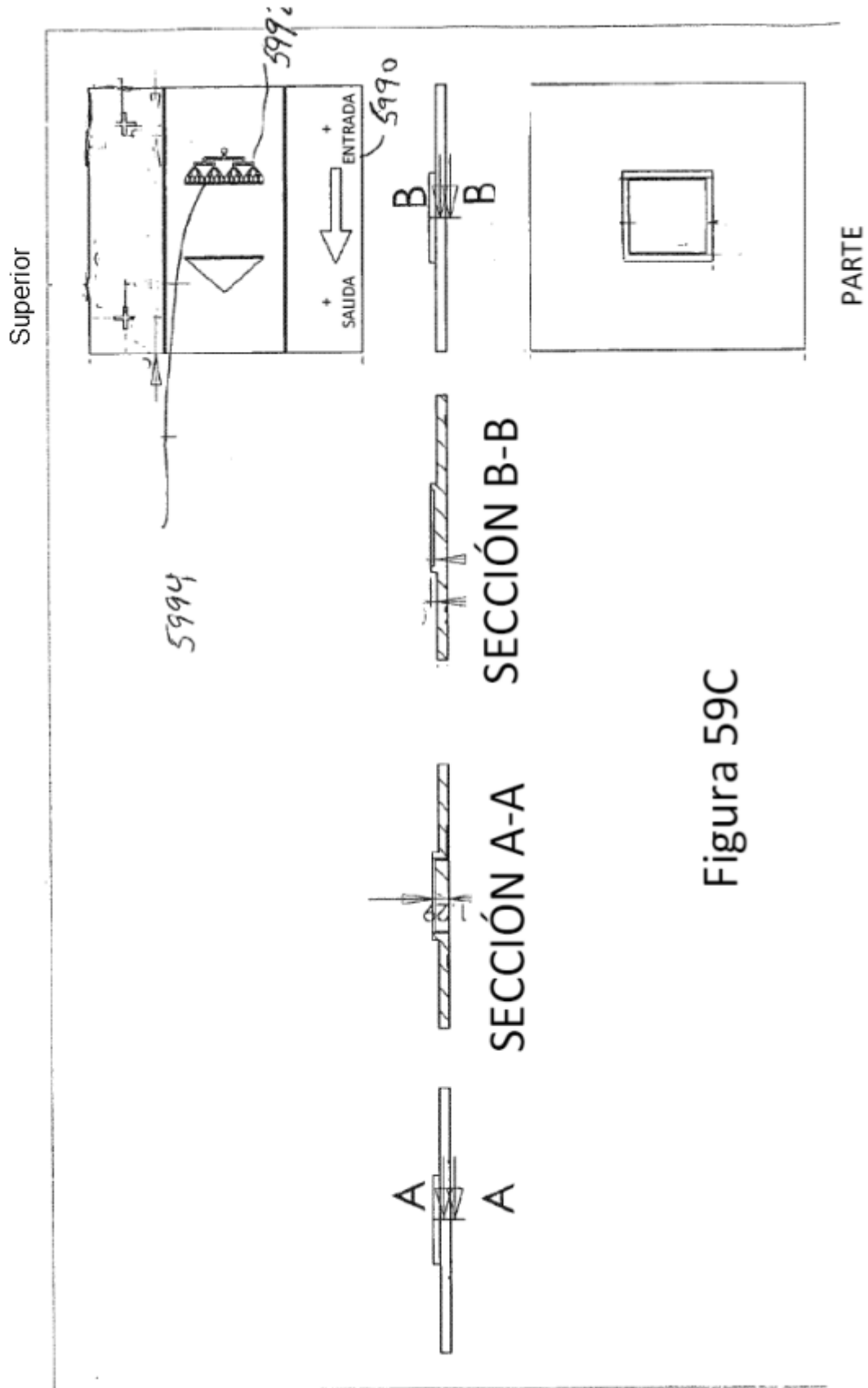


Figura 59A



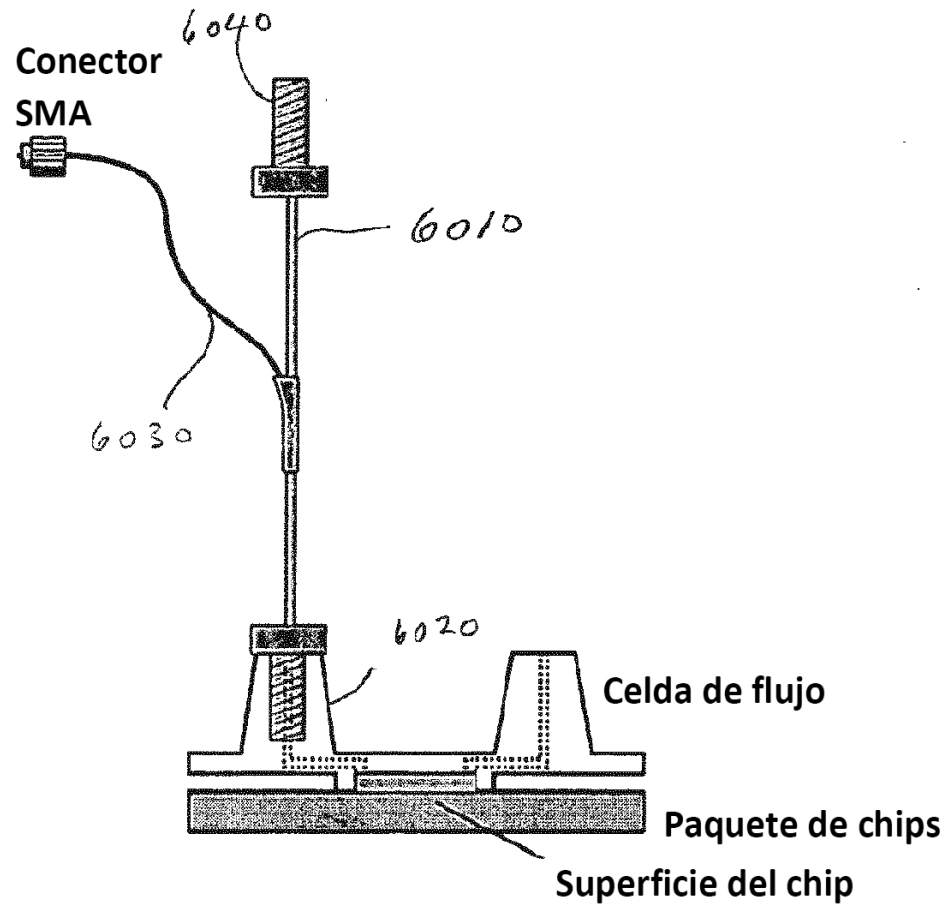


Figura 60

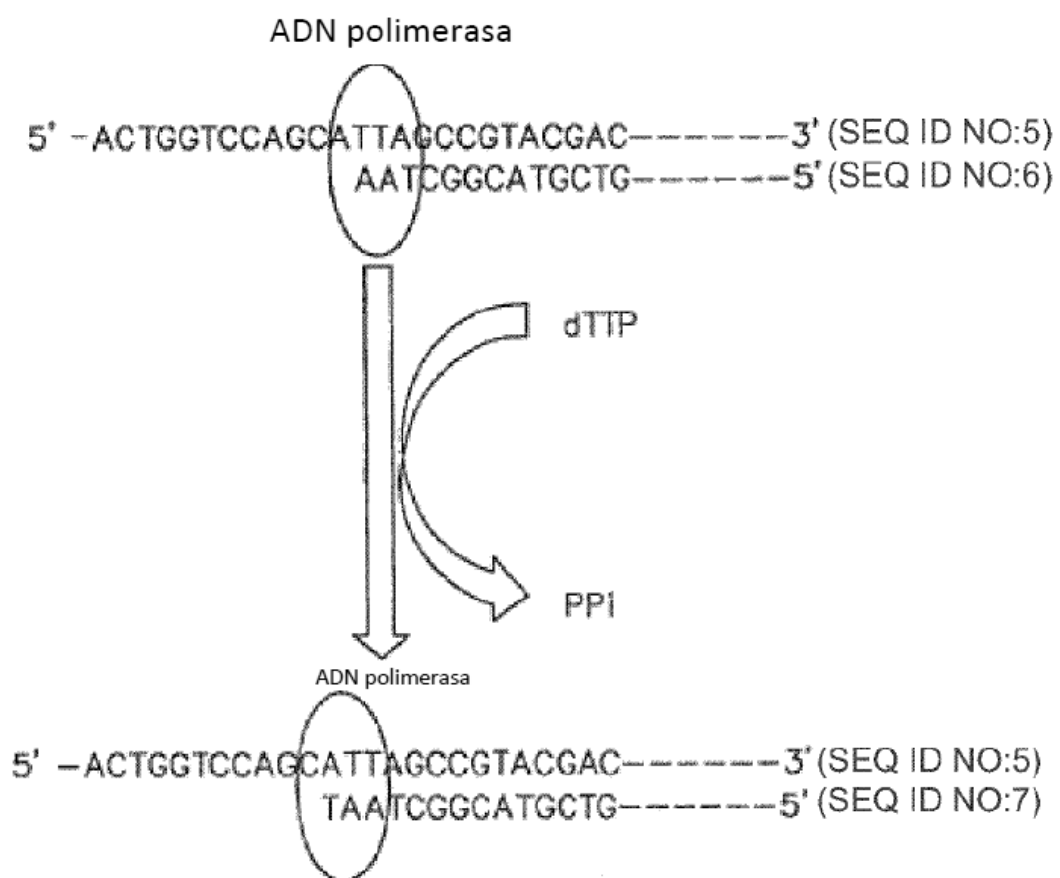


Figura 61

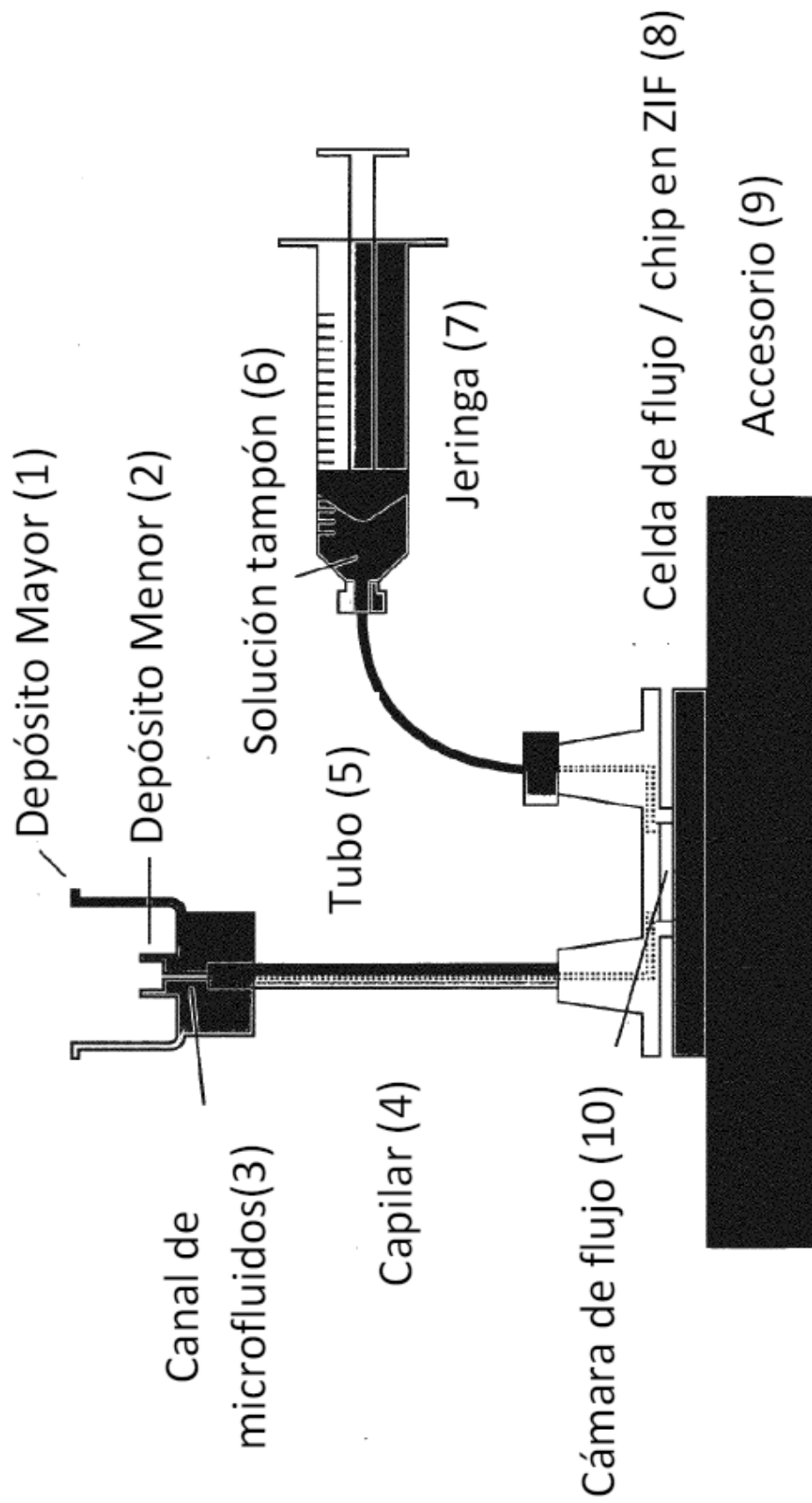


Figura 62

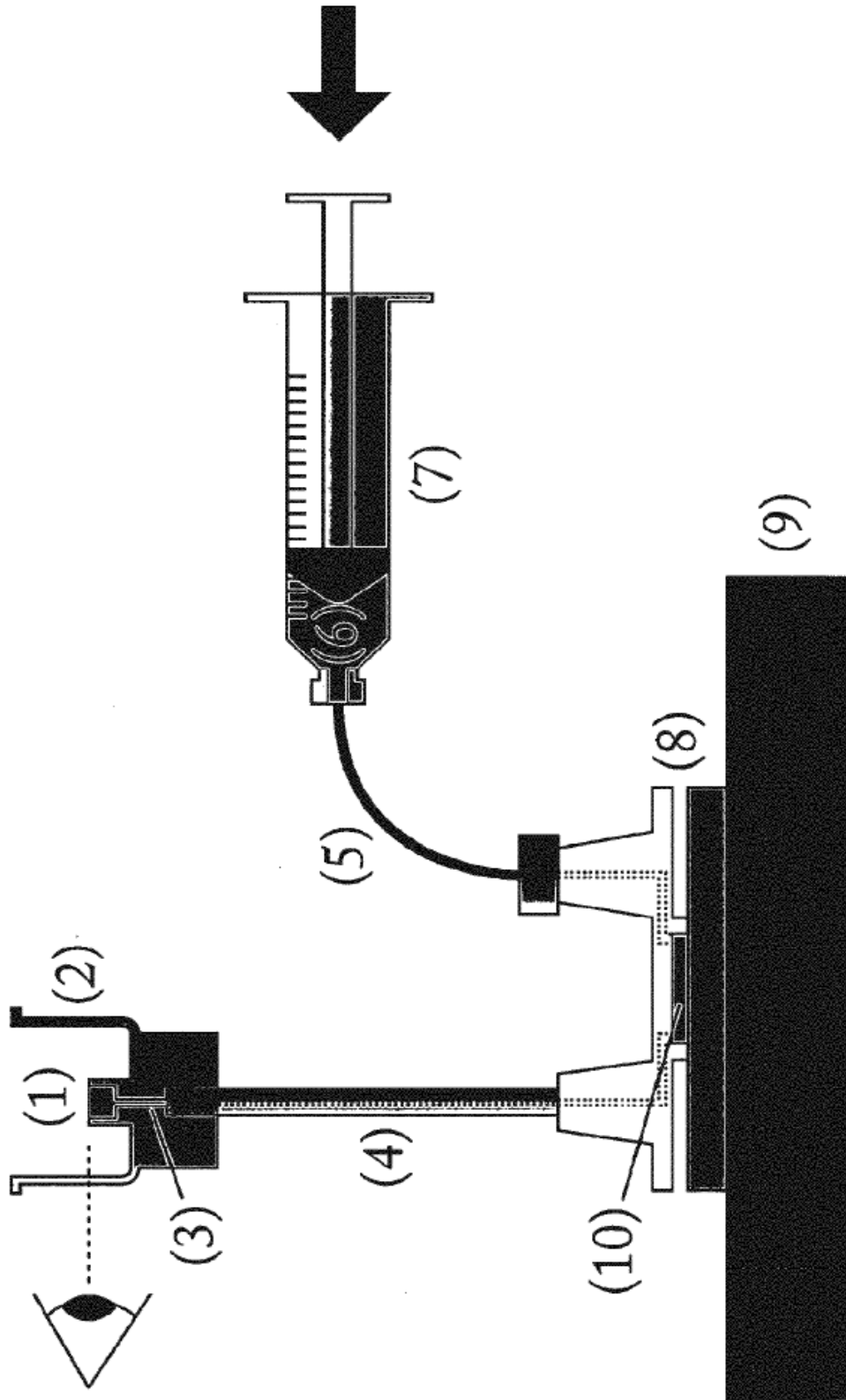


Figura 63

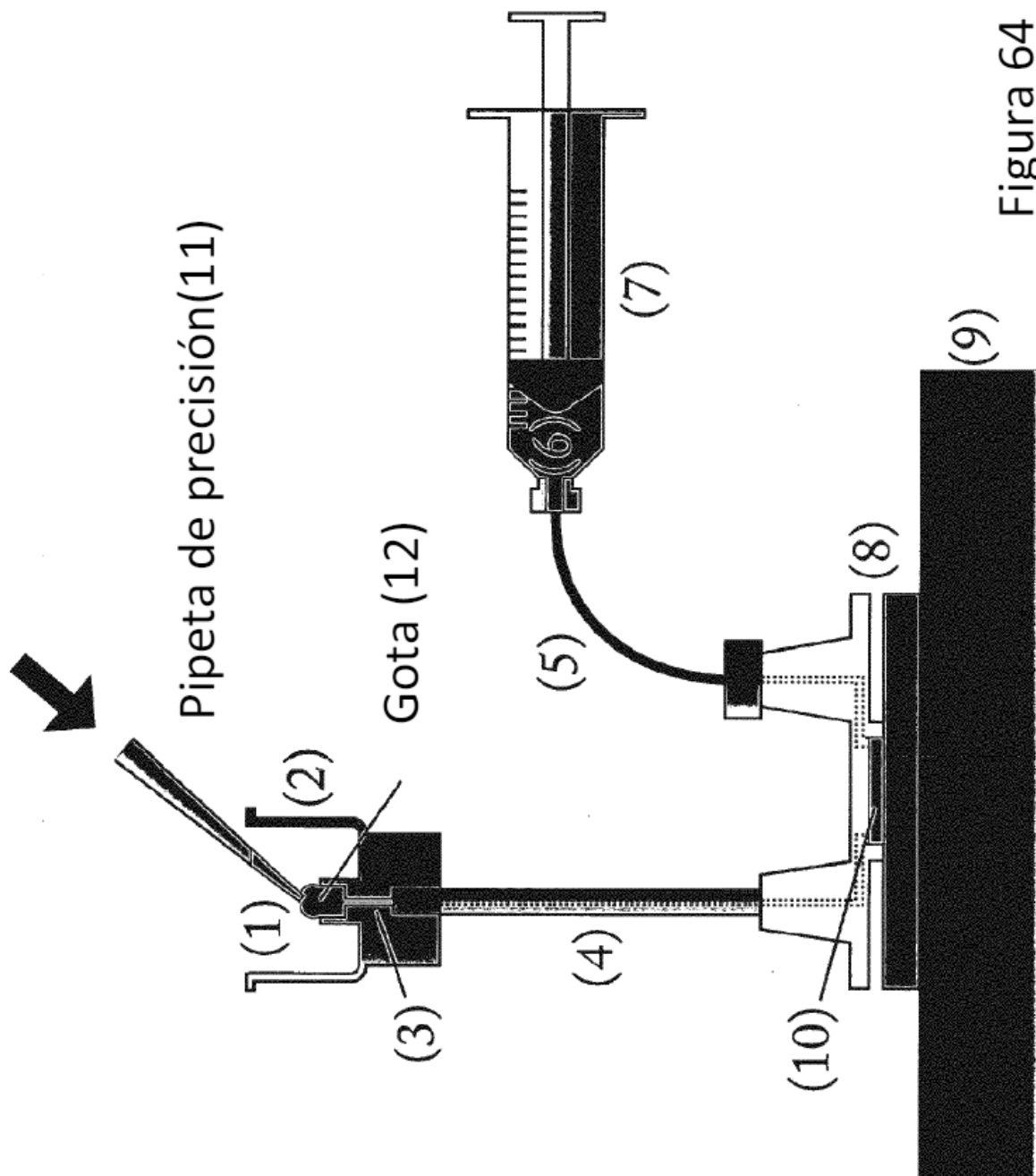


Figura 64

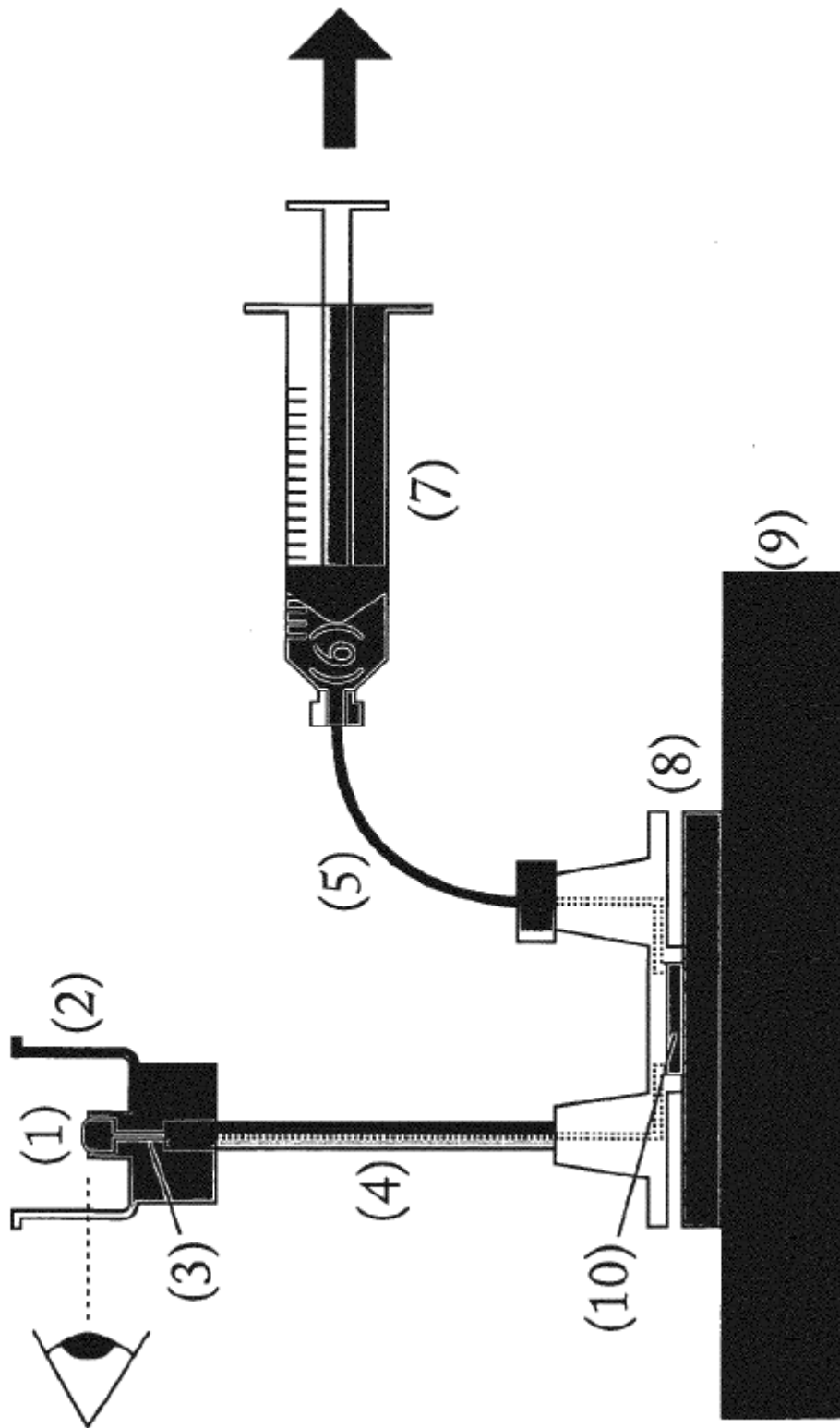


Figura 65

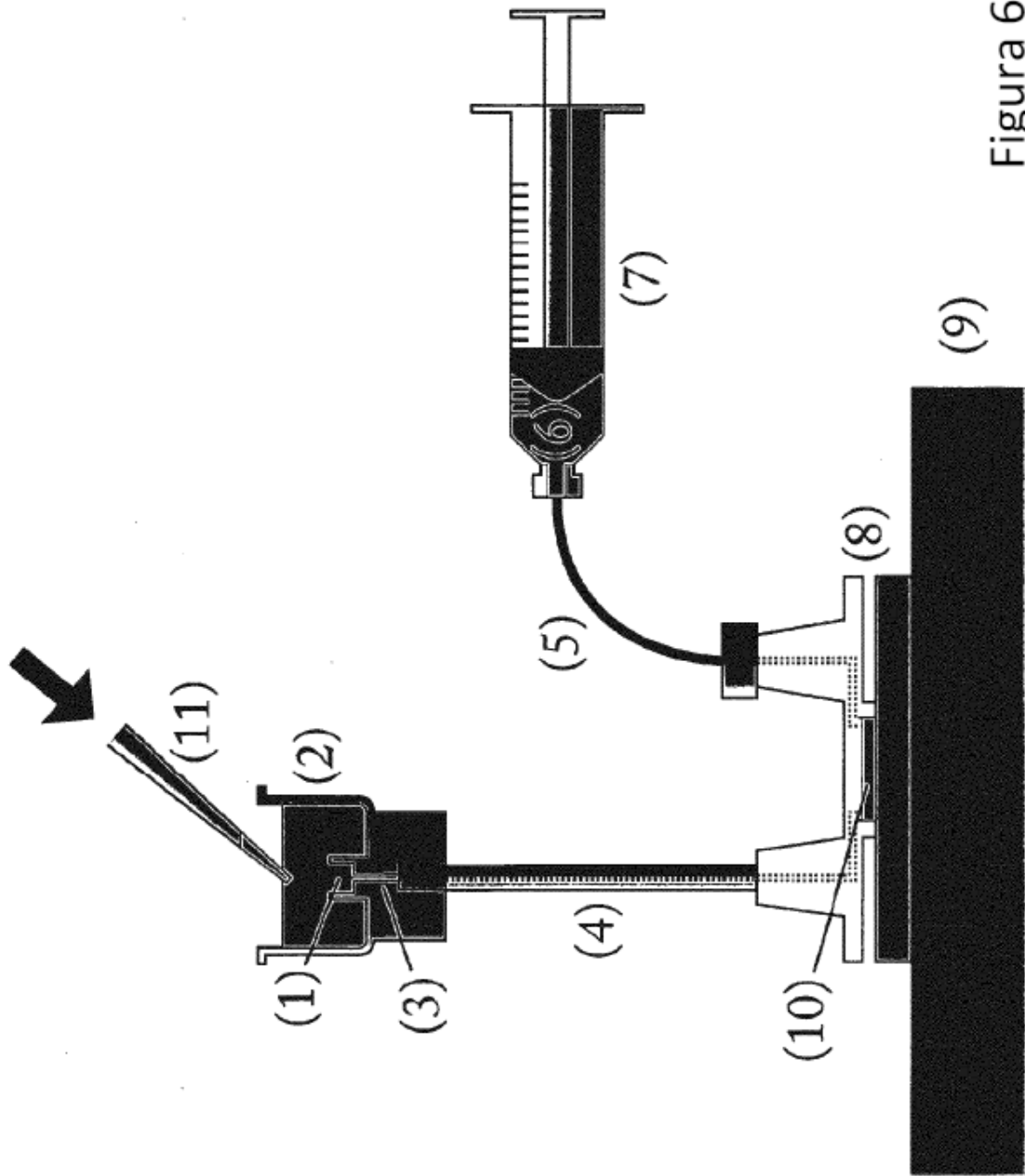


Figura 66

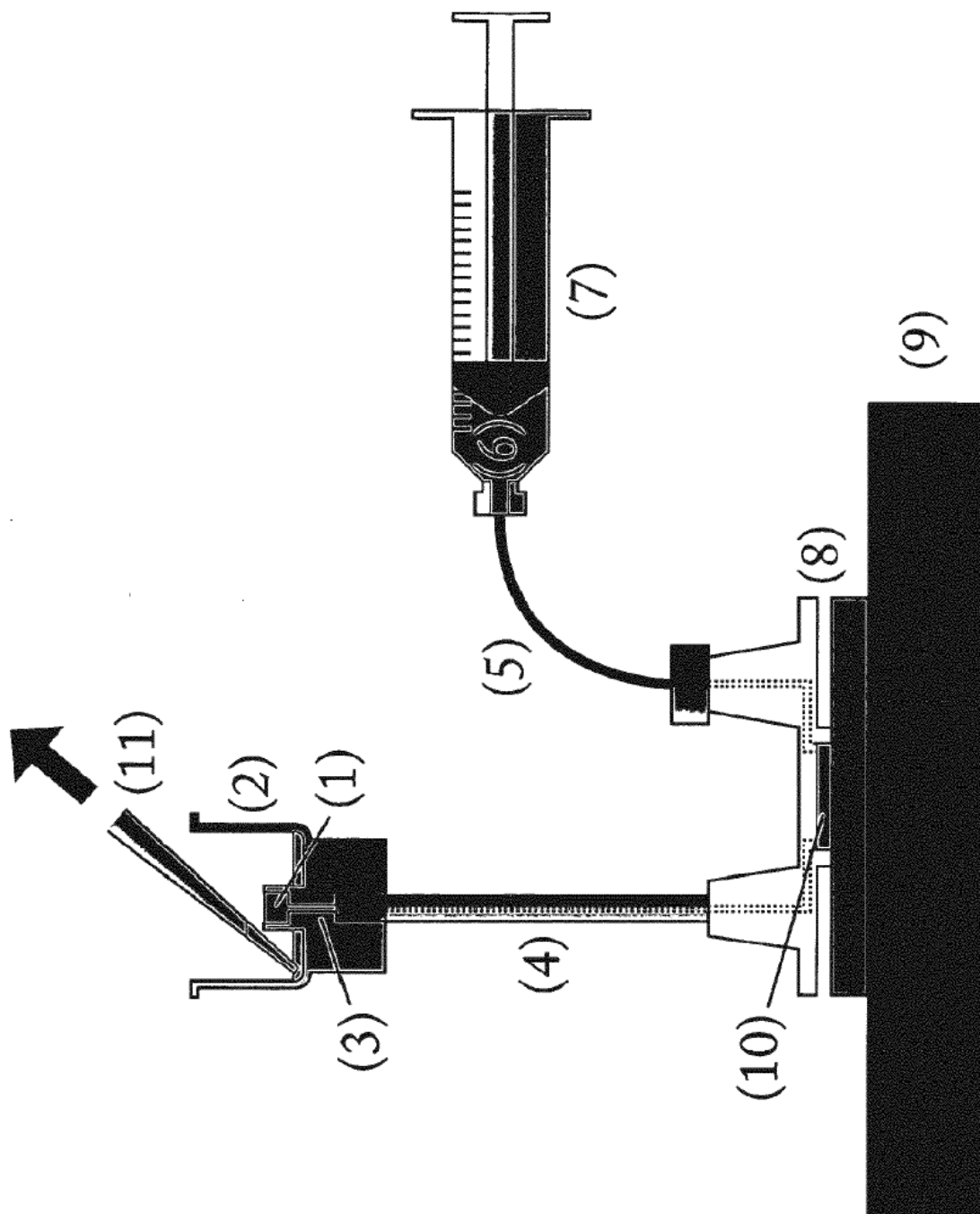


Figura 67

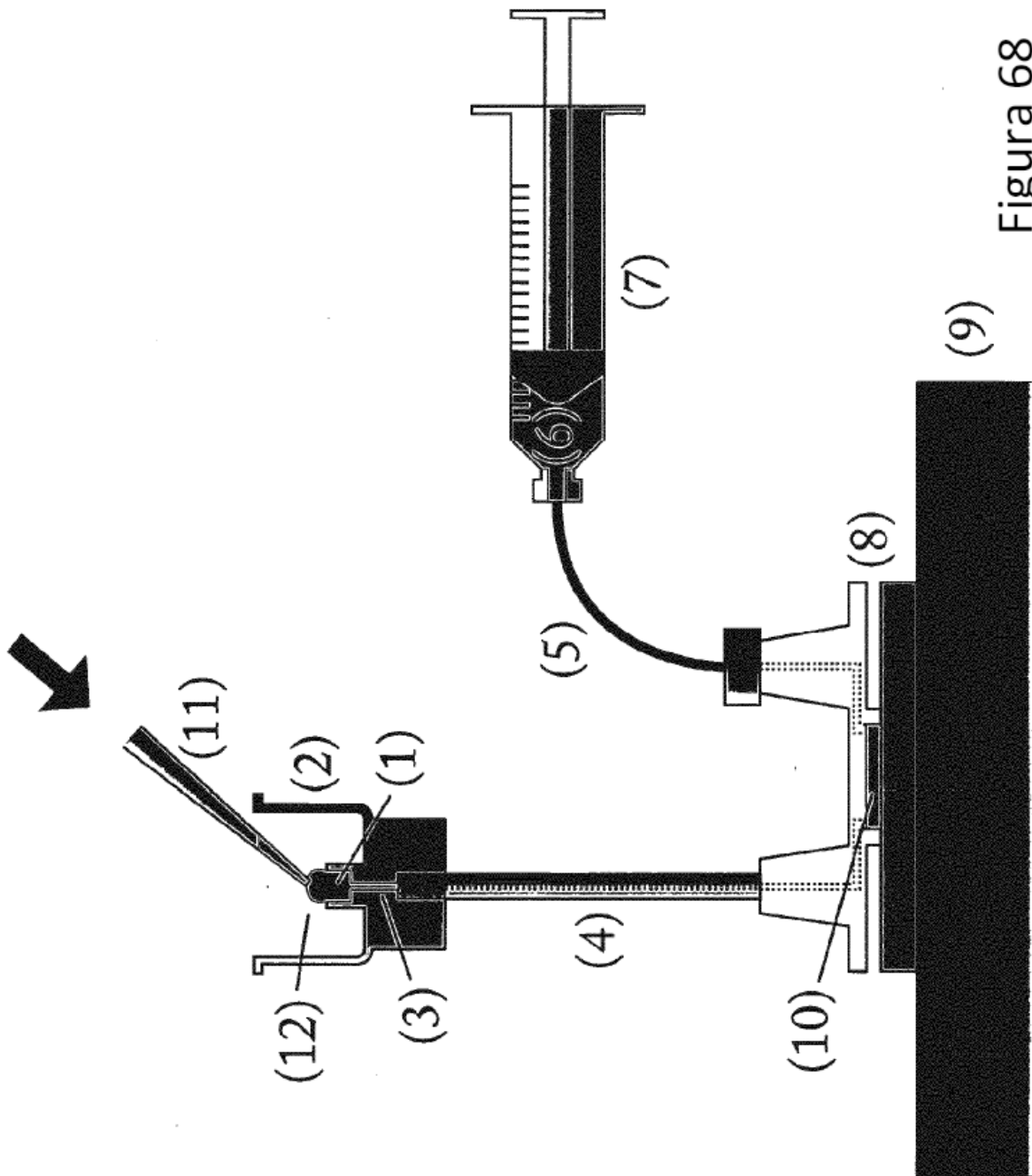


Figura 68

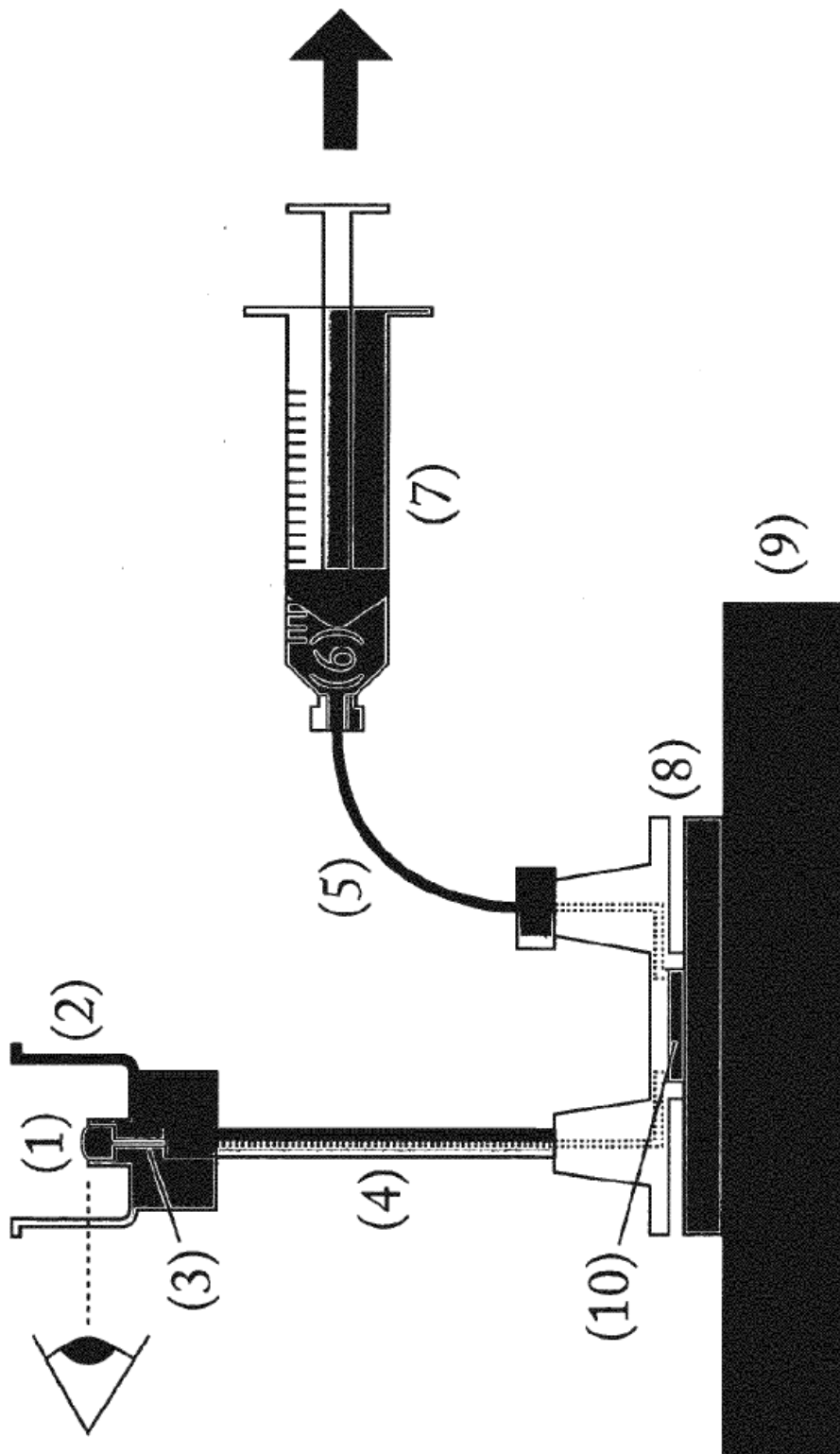


Figura 69

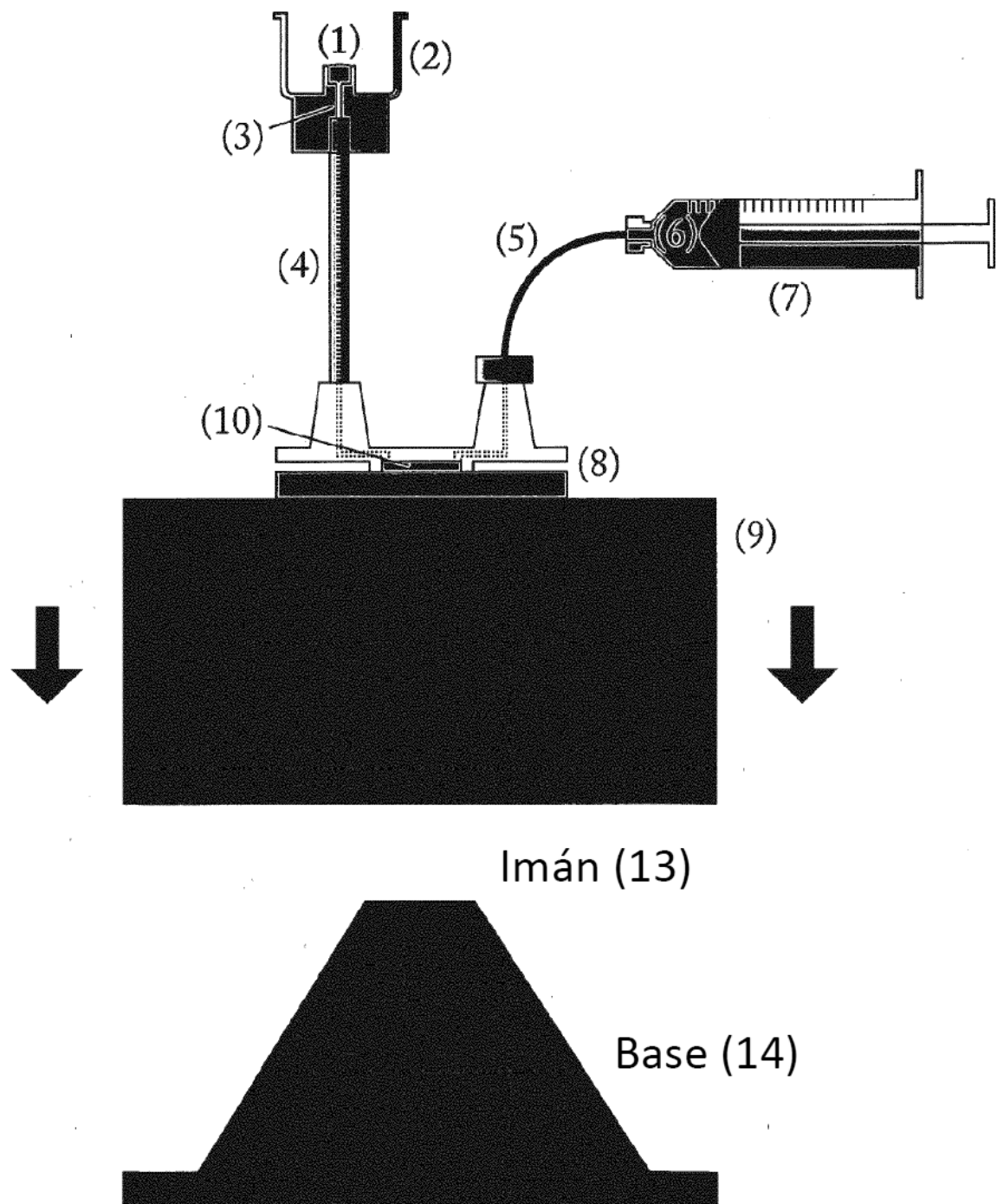


Figura 70

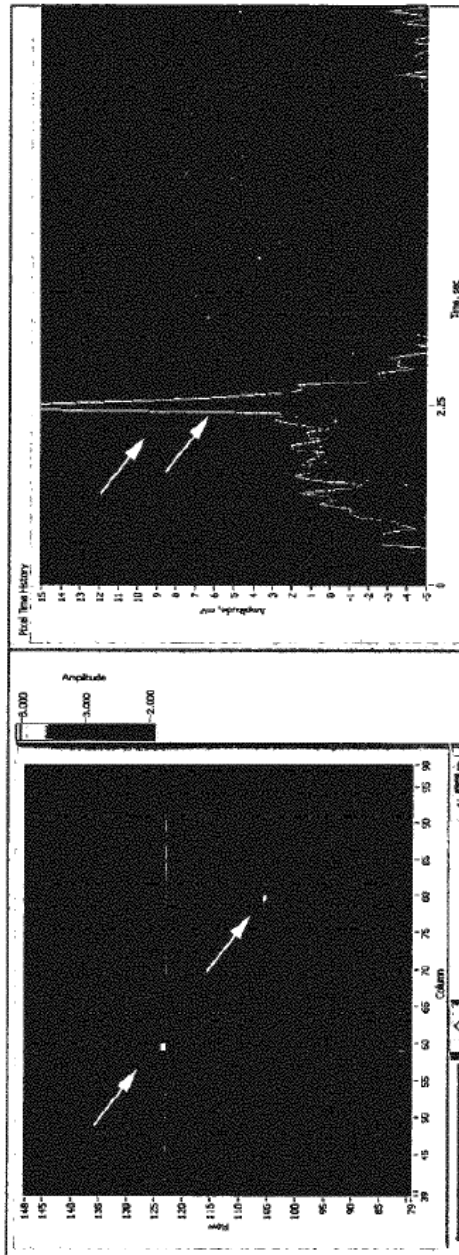


Figura 71A

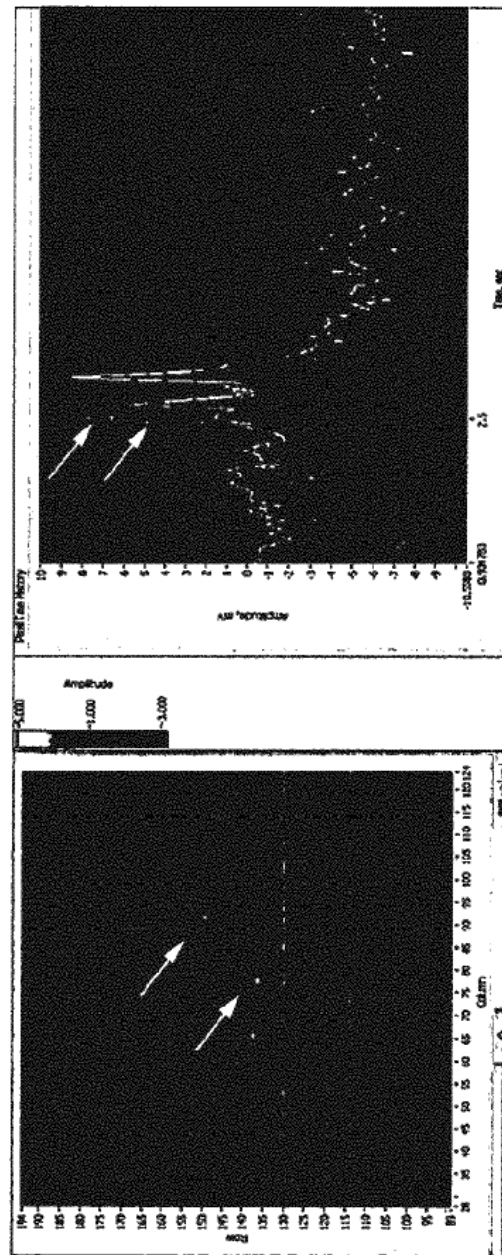


Figura 71B

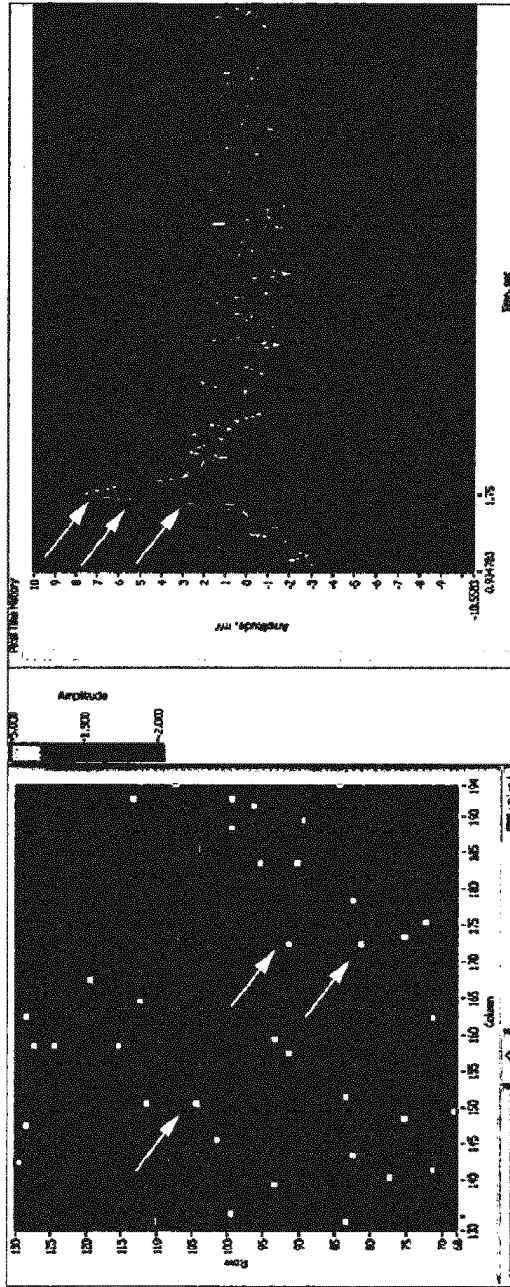


Figura 71C

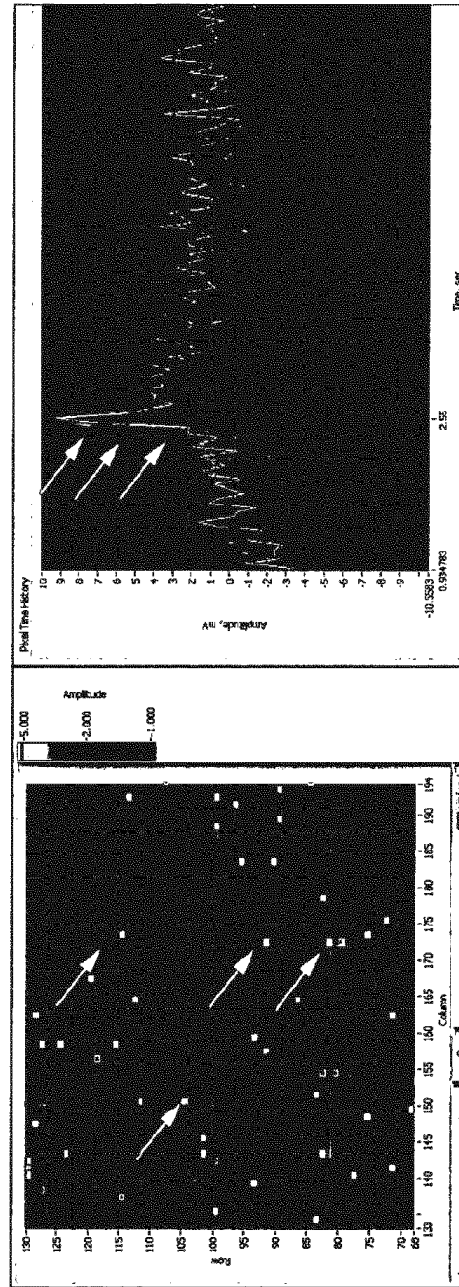


Figura 71D