

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 350**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01J 19/00** (2006.01)

**C12Q 1/6837** (2008.01)

**C12Q 1/6844** (2008.01)

**C12Q 1/6874** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2017 PCT/US2017/024578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17172798**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2017 E 17776477 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 3377226**

54 Título: **Micromatrices de planos múltiples**

30 Prioridad:

**28.03.2016 US 201662313982 P**

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

**06.10.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOWEN, M. SHANE;  
GRAIGE, MICHAEL;  
HONG, STANLEY S.;  
MOON, JOHN A. y  
SIU, MEREK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 861 350 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

Micromatrices de planos múltiples

La presente invención se refiere a micromatrices de planos múltiples.

**Antecedentes**

5 Varios protocolos en la investigación biológica o química implican realizar una gran cantidad de reacciones controladas sobre superficies de soporte sólido o dentro de cámaras de reacción predefinidas. Las reacciones deseadas se pueden observar o detectar a continuación, y el análisis posterior puede ayudar a identificar o revelar las propiedades de los productos químicos involucrados en la reacción. Por ejemplo, en algunos ensayos multiplex, los analitos desconocidos que tienen marcadores identificables (p. ej., marcas fluorescentes) pueden exponerse a miles de sondas conocidas en condiciones controladas. Cada sonda conocida puede depositarse en una ubicación correspondiente sobre una superficie. La observación de reacciones químicas particulares que ocurren entre las sondas conocidas y el analito desconocido sobre la superficie puede ayudar a identificar o revelar las propiedades del analito. Los ejemplos de tales protocolos incluyen procesos de secuenciación de ADN conocidos, tales como secuenciación por síntesis (SBS) o protocolos de micromatrices de ácidos nucleicos conocidos tales como análisis de expresión de ARN o análisis de genotipado.

En algunos protocolos convencionales de detección de fluorescencia, se usa un sistema óptico para dirigir una luz de excitación sobre analitos marcados con fluorescencia y para detectar también las señales fluorescentes que pueden emitirse desde los analitos. La resolución de las técnicas de adquisición de imágenes convencionales está limitada por el número de píxeles disponibles en el dispositivo de detección, entre otras cosas. Como tales, estos sistemas ópticos pueden ser relativamente costosos y requieren una huella de sobremesa relativamente grande cuando se detectan superficies que tienen grandes colecciones de analitos. Por ejemplo, las matrices de ácido nucleico utilizadas en análisis de genotipado, expresión o secuenciación pueden requerir la detección de millones de sitios diferentes sobre la matriz por centímetro cuadrado. Los límites de resolución aumentan el coste y disminuyen la precisión de estos análisis.

Por tanto, existe la necesidad de aparatos y métodos de mayor resolución, por ejemplo, para detectar matrices de ácidos nucleicos. La presente divulgación aborda esta necesidad y también proporciona otras ventajas.

El documento WO 03/101618 describe un método para analizar una micromatriz mediante el uso de un microscopio confocal y cambiar el plano focal del microscopio, así como un sustrato para contener una micromatriz de muestras experimentales. El sustrato comprende una superficie de matriz que tiene una pluralidad de pocillos para contener muestras experimentales respectivas de la micromatriz. El fondo de cada pocillo está en uno de una pluralidad de niveles, estando los fondos de los pocillos vecinos más cercanos a diferentes niveles.

**Breve compendio**

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Algunas realizaciones de la presente divulgación se refieren al análisis biológico o químico y más particularmente a sistemas y métodos que utilizan dispositivos de detección para análisis biológico o químico.

35 La presente divulgación proporciona un sistema que comprende un soporte sólido que tiene una superficie exterior que comprende un primer conjunto de pocillos intercalados con un segundo conjunto de pocillos, el primer conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos donde el primer conjunto de pocillos se yuxtapone con el segundo conjunto de pocillos, teniendo cada pocillo del primer conjunto un primer fondo a una primera elevación, z1, con respecto al soporte sólido, teniendo cada pocillo del segundo conjunto un segundo fondo en una segunda elevación, z2, con respecto al soporte sólido; en donde la altura de la primera elevación, z1, y la segunda elevación, z2, a lo largo del eje z es diferente; en donde el primer conjunto de pocillos tiene un primer paso; donde el segundo conjunto de pocillos tiene un segundo paso; y en donde un paso entre un pocillo del primer conjunto de pocillos y cada pocillo vecino del segundo conjunto de pocillos es menor de 500 nm; y en donde cada pocillo del primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende puntos de anclaje para anclar analitos mediante unión directa o indirecta al soporte sólido, por lo que los primeros pocillos están configurados para anclar analitos a una elevación diferente con respecto a los analitos anclados al segundo conjunto de pocillos; y una guía de ondas acoplada ópticamente de forma selectiva al primer conjunto de pocillos y no acoplada ópticamente al segundo conjunto de pocillos, teniendo cada uno de los pocillos del primer conjunto un primer fondo en la primera elevación z1.

50 La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para detectar una pluralidad de analitos, que comprende: proporcionar una guía de ondas y una matriz que comprende un soporte sólido que tiene una superficie exterior del soporte sólido que comprende un primer conjunto de pocillos intercalados con un segundo conjunto de pocillos, el primer conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos, en donde el primer conjunto de pocillos se yuxtapone al segundo conjunto de pocillos, teniendo cada pocillo del primer conjunto un primer fondo a una primera elevación, z1, con respecto al soporte sólido, teniendo cada pocillo del segundo conjunto un segundo fondo a una segunda elevación, z2, con respecto al soporte sólido, estando la guía de ondas acoplada ópticamente de forma selectiva al primer

conjunto de pocillos, teniendo cada uno un primer fondo en la primera elevación  $z_1$  y no acoplado ópticamente al segundo conjunto de pocillos, detectando señales en la primera elevación,  $z_1$ , en respuesta a los analitos de excitación óptica a través de la guía de ondas, por medio de lo cual los rasgos de los analitos individuales del primer conjunto de pocillos se distinguen entre sí; y detectando señales en la segunda elevación,  $z_2$ , por medio de lo cual los rasgos de los analitos individuales del segundo conjunto de pocillos se distinguen entre sí, en donde la altura entre la primera elevación,  $z_1$ , y la segunda elevación,  $z_2$ , a lo largo del eje  $z$  es diferente, en donde el primer conjunto de pocillos tiene un primer paso, en donde el segundo conjunto de pocillos tiene un segundo paso, y en donde el paso entre el primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos es menor de 500 nm; y donde cada pocillo del primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende puntos de anclaje para anclar analitos mediante unión directa o indirecta al soporte sólido, por medio de lo cual los primeros pocillos están configurados para anclar analitos a una elevación diferente con respecto a los analitos unidos al segundo conjunto de pocillos.

**Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1A muestra una vista en planta de una matriz de rasgos ilustrativa en donde todas los rasgos están a una elevación común de aproximadamente 200 nm.

La Fig. 1B muestra una vista en planta de dos matrices de rasgos ilustrativas que incluyen una primera matriz que tiene rasgos a una elevación de aproximadamente 200 nm y una segunda matriz que tiene rasgos a una elevación de aproximadamente 1000 nm. Las dos matrices ilustrativas tienen el mismo patrón de celosía y paso, pero están desplazadas en las dimensiones  $x$  e  $y$ .

La Fig. 2 muestra una sección transversal de las dos matrices ilustrativas en la Fig. 1B, en donde los rasgos son pocillos que tienen diferentes profundidades.

La Fig. 3 muestra una sección transversal de las dos matrices ilustrativas de la Fig. 1B, en donde los rasgos son postes que tienen diferentes alturas.

La Fig. 4 muestra una sección transversal de las dos matrices ilustrativas de la Fig. 1B, en donde un primer subconjunto de rasgos son postes y un segundo subconjunto de rasgos son pocillos.

La Fig. 5 muestra un ejemplo de uso de epiiluminación para excitar luminóforos tanto en una primera como en una segunda matrices de pocillos, y el uso de una guía de ondas para excitar selectivamente luminóforos en una de las matrices de pocillos.

**Descripción detallada**

La presente divulgación proporciona soportes sólidos que se pueden utilizar para química y biología analíticas. En realizaciones particulares, un soporte sólido tendrá una superficie con dos o más matrices de rasgos, presentando cada rasgo un analito para la detección. Los rasgos de una primera matriz se producirán a una primera elevación y los rasgos de una segunda matriz se producirán a una elevación diferente que se puede distinguir de la primera elevación (p. ej., alterando la profundidad de enfoque). Este desplazamiento de elevación proporciona un empaquetamiento más denso de rasgos de analito sobre una superficie de lo que se podría resolver si la combinación de matrices estuviera a la misma elevación sobre la superficie.

El aumento en la densidad de empaquetamiento proporcionado por las matrices ilustrativas de la presente divulgación se ilustra en la Fig. 1A y la Fig. 1B. La primera figura muestra una matriz con un paso de aproximadamente 500 nm. Los rasgos de la matriz están ubicadas en un plano  $z$  común (es decir, profundidad o elevación) y se pueden resolver en la dimensión  $xy$  utilizando ópticas disponibles comercialmente. Un mayor empaquetamiento de los rasgos en la matriz de la Fig. 1A desafiaría la capacidad de la mayoría de los detectores ópticos para distinguir un rasgo de otro. Sin embargo, en muchas aplicaciones analíticas, tales como la secuenciación de ácidos nucleicos u otras técnicas de detección de ácidos nucleicos, es deseable aumentar el número de analitos en una matriz para maximizar el rendimiento del análisis en vista del tiempo requerido para procesar de forma fluida las matrices analíticas y minimizar costes dado el coste de los reactivos utilizados para procesar matrices analíticas.

La configuración de la matriz de la Fig. 1B puede proporcionar las ventajas de un mayor rendimiento y menores costes para las manipulaciones fluidicas de la matriz al tiempo que evita las limitaciones de detección que afectan a otros intentos de aumentar la densidad de la matriz. Específicamente, como se muestra en la Fig. 1B, los rasgos de dos matrices pueden ubicarse en diferentes planos  $z$  (p. ej., profundidad de aproximadamente 200 nm frente a una profundidad de aproximadamente 1000 nm), de modo que los rasgos que de otro modo serían vecinas entre sí (si estuvieran ubicadas en el mismo plano  $z$ ) se distinguen alterando la profundidad de detección. Incluso más específicamente, los rasgos en la matriz combinada que están separadas por aproximadamente 350 nm (en la dirección  $xy$ ), y que serían difíciles de resolver entre sí si se detectaran juntas, se pueden distinguir adquiriendo una primera imagen enfocando un detector óptico a una profundidad de aproximadamente 200 nm en este ejemplo y a continuación adquiriendo una segunda imagen enfocando el detector óptico a una profundidad de aproximadamente 1 micra en este ejemplo.

Los rasgos que pueden aparecer en diferentes planos  $z$  incluyen, por ejemplo, pocillos que tienen diferentes

profundidades, como se ilustra en la vista en sección transversal de una matriz ilustrativa presentada en la Fig. 2. Por ejemplo, los analitos (indicados por semicírculos) pueden ubicarse en el fondo de los pocillos o a diferentes profundidades dentro de los pocillos. En la configuración ilustrativa de la Fig. 2, los analitos se anclan a los fondos de un primer subconjunto de pocillos a una altura de aproximadamente 200 nm y el segundo subconjunto de pocillos coloca los analitos a una elevación de aproximadamente 1 micra.

Una configuración alternativa puede ser utilizar postes de diferentes alturas como se muestra en la vista de sección transversal ilustrativa de la Fig. 3. Los analitos (nuevamente, indicados por semicírculos) se pueden ubicar en la parte superior de los postes o a diferentes alturas a lo largo de la longitud de los postes. En la de la Fig. 3, los analitos están anclados a la parte superior de un primer subconjunto de postes a una elevación de aproximadamente 200 nm y el segundo subconjunto de postes coloca los analitos a una elevación de aproximadamente 1 micra. Una matriz también puede tener una combinación de postes y pocillos, por ejemplo, como se muestra en el diagrama de la Fig. 4. Puede observarse que en la realización de la Fig. 3, los rasgos están espaciadas entre sí, mientras que en la realización de la Fig. 4, los rasgos son adyacentes. Si bien en ambas los rasgos se pueden considerar "yuxtapuestos", en la realización de la Fig. 4 los rasgos están empaquetados más densamente por su ubicación adyacente sin espacios entre ellos.

En algunas realizaciones, los soportes sólidos que tienen dos o más matrices en diferentes planos z pueden permitir el uso de ópticas de menor resolución. Por ejemplo, los rasgos pueden ser más grandes (y/o más separadas) en cada uno de los planos z que lo discutido anteriormente. Las matrices de la presente divulgación se pueden reparar utilizando cualquiera de una variedad de técnicas que incluyen, pero no se limitan a, fotolitografía, litografía por nanoimpresión o impresión 3D.

Para las realizaciones que utilizan la detección óptica, tales como la luminiscencia, la resolución de los rasgos se puede lograr mediante el enfoque de detección del plano z y la excitación diferencial del plano z. Por ejemplo, la epi-excitación se puede combinar con la excitación por reflexión interna total (TIR). De manera similar, la epi-excitación se puede combinar con la excitación por otras guías de ondas. Como se ilustra en el diagrama de la Fig. 5, la guía de ondas puede entrar en contacto con los pocillos más profundos de una primera matriz, pero no con los pocillos menos profundos de una segunda matriz. La iluminación a través de la guía de ondas excitará selectivamente los pocillos más profundos y la emisión se puede recolectar solo a partir de los pocillos profundos. Las emisiones de los pocillos poco profundos se pueden obtener mediante un método sustractivo. Específicamente, todos los pocillos pueden excitarse mediante epi-iluminación, y la emisión de los pocillos poco profundos se puede identificar restando la emisión que se obtuvo de la iluminación de la guía de ondas de los pocillos más profundos.

Se entenderá que los términos utilizados en el presente documento adquieren su significado habitual en la técnica correspondiente, a menos que se especifique lo contrario. A continuación se exponen varios términos utilizados en el presente documento y sus significados.

Como se emplea en el presente documento, el término "amplicón", cuando se emplea en referencia a un ácido nucleico, significa el producto de copiar el ácido nucleico, en donde el producto tiene una secuencia de nucleótidos que es igual o complementaria a al menos una porción de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico. Un amplicón se puede producir mediante cualquiera de una variedad de métodos de amplificación que utilizan el ácido nucleico, o un amplicón del mismo, como molde, incluyendo, por ejemplo, extensión con polimerasa, reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación de círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), extensión por ligación o reacción en cadena de ligación. Un amplicón puede ser una molécula de ácido nucleico que tiene una única copia de una secuencia de nucleótidos particular (p. ej., un producto de PCR) o múltiples copias de la secuencia de nucleótidos (p. ej., un producto concatémico de RCA). Un primer amplicón de un ácido nucleico diana puede ser una copia complementaria. Los amplicones posteriores son copias que se crean, después de la generación del primer amplicón, a partir del ácido nucleico diana o de un amplicón. Un amplicón posterior puede tener una secuencia que sea sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana o sustancialmente idéntica al ácido nucleico diana.

Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "analito" incluya cualquiera de una variedad de analitos que se van a detectar, caracterizar, modificar, sintetizar o similares. Los analitos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (p. ej., ADN, ARN o análogos de los mismos), proteínas, polisacáridos, células, anticuerpos, epítopos, receptores, ligandos, enzimas (p. ej., quinasas, fosfatasas o polimerasas), candidatos a fármacos de molécula pequeña, o similares. Una matriz puede incluir varias especies diferentes de una biblioteca de analitos. Por ejemplo, las especies pueden ser diferentes anticuerpos de una biblioteca de anticuerpos, ácidos nucleicos que tienen diferentes secuencias de una biblioteca de ácidos nucleicos, proteínas que tienen una estructura y/o función diferente de una biblioteca de proteínas, candidatos a fármacos de una biblioteca combinatoria de moléculas pequeñas, etc.

Como se emplea en el presente documento, el término "anclado" se refiere al estado de dos cosas que se juntan, sujetan, adhieren, conectan o unen entre sí. Por ejemplo, un analito, tal como un ácido nucleico, se puede anclar a un material, tal como un gel o un soporte sólido, mediante un enlace covalente o no covalente. Un enlace covalente se caracteriza por compartir pares de electrones entre átomos. Un enlace no covalente es un enlace químico que no implica compartir pares de electrones y puede incluir, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófilas e interacciones hidrófobas.

Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "punto de anclaje" signifique una ubicación sobre un soporte sólido o gel que está anclado a un analito, capaz de anclarse a un analito o destinado a anclarse a un analito. La ubicación puede acomodar un solo analito o una población de analitos. La ubicación puede tener un área o dimensión o dimensiones como se establece en el presente documento para rasgos o contornos de una matriz.

5 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "contorno" signifique una variación localizada en la forma de una superficie. Los contornos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, pocillos, fosas, canales, postes, pilares y crestas. Los contornos pueden aparecer como cualquiera de una variedad de depresiones en una superficie o proyecciones sobre una superficie. Todo o parte de un contorno puede servir como rasgo en una matriz. Por ejemplo, una parte de un contorno que ocurre en un plano particular de un soporte sólido puede servir como rasgo en ese plano particular.

10 Como se emplea en el presente documento, el término "diferente", cuando se emplea en referencia a ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos tienen secuencias de nucleótidos que no son iguales entre sí. Dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes en toda su longitud. Alternativamente, dos o más ácidos nucleicos pueden tener secuencias de nucleótidos que son diferentes a lo largo de una parte sustancial de su longitud. Por ejemplo, dos o más ácidos nucleicos pueden tener porciones de secuencia de nucleótidos diana que son diferentes para las dos o más moléculas, mientras que también tienen una porción de secuencia universal que es la misma en las dos o más moléculas. El término se puede aplicar de manera similar a proteínas que se pueden distinguir como diferentes entre sí en función de las diferencias en la secuencia de aminoácidos.

15 Como se emplea en el presente documento, el término "cada uno", cuando se emplea en referencia a una colección de artículos, está destinado a identificar un artículo individual en la colección, pero no necesariamente se refiere a todos los artículos de la colección. Pueden aparecer excepciones si la divulgación explícita o el contexto dictan claramente lo contrario.

20 Como se emplea en el presente documento, el término "elevación", cuando se emplea en referencia a un rasgo o contorno de un soporte sólido, se refiere a la altura del rasgo o contorno con respecto a un punto de referencia o nivel de referencia. El punto o nivel de referencia puede estar ubicado en o sobre el soporte sólido, o en una ubicación alejada del soporte sólido, tal como una ubicación donde reside un componente óptico, tal como una lente. La elevación se puede determinar mediante un sistema de coordenadas. Por ejemplo, un plano que corre a lo largo de una superficie exterior de un soporte sólido se puede considerar como un plano  $xy$  en un sistema de coordenadas cartesianas, y la elevación se puede medir a lo largo del eje  $z$ . En otro ejemplo, el plano focal de una lente de objetivo se puede considerar como el plano  $xy$  y la elevación se puede medir a lo largo del eje de la lente.

25 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "superficie exterior" signifique una parte externa o una capa externa de un soporte sólido o material de gel. La superficie puede estar en contacto con otro material, tal como un gas, líquido, gel, polímero, polímero orgánico, una segunda superficie de un material similar o diferente, metal o recubrimiento. La superficie, o regiones de la misma, pueden ser planas (p. ej., tomado como un promedio en un área de superficie extendida). La superficie puede tener contornos de superficie tales como pocillos, fosas, canales, crestas, regiones elevadas, clavijas, postes o similares.

30 Como se emplea en el presente documento, el término "rasgo" significa una ubicación en una matriz que está configurada para anclar un analito particular. La ubicación se puede identificar en uno o más de las dimensiones  $x$ ,  $y$  o  $z$ . Por ejemplo, un rasgo puede ser todo o parte de un contorno, sobre una superficie, que está presente en un plano  $z$  particular y en una coordenada  $xy$  particular a lo largo de la superficie. Un rasgo puede contener solo un único analito o puede contener una población de varios analitos; opcionalmente, los varios analitos pueden ser de la misma especie. En algunas realizaciones, los rasgos están presentes sobre un soporte sólido antes de anclar un analito. En otras realizaciones, el rasgo se crea mediante el anclaje de un analito al soporte sólido.

35 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "celda de flujo" signifique un recipiente que tiene una cámara donde se puede llevar a cabo una reacción, una entrada para suministrar reactivos a la cámara y una salida para eliminar reactivos de la cámara. En algunas realizaciones, la cámara está configurada para la detección de la reacción que ocurre en la cámara (p. ej., sobre una superficie que está en contacto de fluido con la cámara). Por ejemplo, la cámara puede incluir una o más superficies transparentes que permitan la detección óptica de matrices, moléculas marcadas ópticamente o similares en la cámara. Las celdas de flujo ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, las que se utilizan en un aparato de secuenciación de ácidos nucleicos tales como las celdas de flujo para las plataformas Genome Analyzer®, MiSeq®, NextSeq®, HiSeq® o NovaSeq™ comercializadas por Illumina, Inc. (San Diego, CA); o para la plataforma de secuenciación SOLiD™ o Ion Torrent™ comercializadas por Life Technologies (Carlsbad, CA). También se describen celdas de flujo y métodos ilustrativos para su fabricación y uso, por ejemplo, en los documentos WO 2014/142841 A1; Patente de Estados Unidos Núm. 8.241.673, y Patente de Estados Unidos Núm. 8.951.781, a cada uno de los cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

40 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "intercalado", cuando se emplea en referencia a dos patrones de rasgos, signifique que los rasgos de un patrón están intercalados con rasgos del otro patrón, y viceversa, cuando se observan desde una perspectiva particular. Por ejemplo, un primer patrón de rasgos en un primer plano  $xy$  y un segundo patrón en un segundo plano  $xy$  se intercalan cuando ambos planos  $xy$  son evidentes desde

una perspectiva particular. En algunas realizaciones, los rasgos de un primer patrón se pueden intercalar con los rasgos de un segundo patrón en un solo plano xy. De manera similar, los contornos en un primer patrón de contornos de superficie se pueden intercalar con contornos de un segundo patrón de contornos sobre la superficie, por ejemplo, cuando porciones de los contornos se intercalan en un plano xy particular.

- 5 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "lumen", cuando se emplea en referencia a una celda de flujo, se refiera a la cavidad dentro de la celda de flujo. La cavidad se puede llenar con un gas, líquido, gel o una combinación de los mismos.

10 Como se emplea en el presente documento, el término "luminiscente" significa emitir radiación de cuerpo frío. Se pretende que el término sea distinto de incandescencia, que es la radiación emitida por un material como resultado del calor. La luminiscencia se produce cuando una fuente de energía desplaza un electrón de un átomo de su estado fundamental de energía más baja a un estado excitado de energía más alta; a continuación, el electrón devuelve la energía en forma de radiación para que pueda volver a su estado fundamental. Un tipo de rasgo luminiscente particularmente útil es el que emite radiación corporal fría cuando la radiación de excitación proporciona energía. Dichos artículos se denominan "fluorescentes" o "fotoluminiscentes". La fluorescencia o fotoluminiscencia se puede percibir como la emisión de radiación de un rasgo a una longitud de onda que es el resultado de irradiar el rasgo a otra longitud de onda.

20 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "acoplado ópticamente" se refiera a dos cosas que están alineadas o asociadas para transmitir luz funcionalmente entre las dos cosas. Las dos cosas pueden estar en contacto físico, pero no es necesario que estén en contacto físico. Por ejemplo, una lente que transmite luz a un objeto a través de un medio tal como aire o fluido se considera ópticamente acoplada al objeto. En algunas realizaciones, la luz puede modificarse mediante una o ambas cosas que están acopladas ópticamente, por ejemplo, mediante filtración, división, polarización o similares.

25 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "ópticamente detectable" incluya, por ejemplo, una capacidad de producir señales fluorescentes, luminiscentes, de dispersión o de absorción. Las señales ópticas se pueden detectar en el rango ultravioleta (UV) (de aproximadamente 200 a aproximadamente 390 nm), rango visible (VIS) (de aproximadamente 391 a aproximadamente 770 nm), rango infrarrojo (IR) (de aproximadamente 0,771 a aproximadamente 25 micras), u otro rango del espectro electromagnético. Las señales ópticas se pueden detectar de una manera que excluya todo o parte de uno o más de estos rangos.

30 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "paso", cuando se emplea en referencia a rasgos de una matriz, se refiera al espaciado de centro a centro para rasgos adyacentes. El término se refiere al espaciado en la dimensión xy. Un patrón de rasgos se puede caracterizar en términos de paso medio. El patrón se puede ordenar de manera que el coeficiente de variación aproximadamente paso medio sea pequeño o el patrón puede ser aleatorio, en cuyo caso el coeficiente de variación puede ser relativamente grande. En cualquier caso, el paso medio puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 10 nm, aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  o más. Alternativa o adicionalmente, el paso medio puede ser, por ejemplo, como máximo aproximadamente 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$  o menos. Por supuesto, el paso medio para un patrón particular de rasgos puede estar entre uno de los valores más bajos y uno de los valores más altos seleccionados entre los rangos anteriores.

40 Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "patrón de repetición", cuando se emplea en referencia a rasgos, signifique que las ubicaciones relativas de un subconjunto de rasgos en una región del objeto son las mismas que las ubicaciones relativas de un subconjunto de rasgos en al menos otra región del objeto. La repetición ocurre en las dimensiones x e y. Una región puede ser adyacente a la otra región del patrón. Las ubicaciones relativas de los rasgos en una región de un patrón de repetición son predecibles a partir de las ubicaciones relativas de los rasgos en otra región del patrón de repetición. El subconjunto utilizado para la medida puede incluir al menos 2 rasgos pero puede incluir al menos 3, 4, 5, 6, 10 o más rasgos. De forma alternativa o adicional, el subconjunto utilizado para la medida puede incluir no más de 2, 3, 4, 5, 6 o 10 rasgos. Los patrones de repetición ilustrativos incluyen celosías cuadradas, celosías rectangulares, celosías rómbicas, celosías hexagonales y celosías oblicuas. Un patrón de repetición puede incluir múltiples repeticiones de un subpatrón.

50 Como se emplea en el presente documento, se pretende que la referencia a manipular "selectivamente" (o manipulación "selectiva" de) una primera cosa en comparación con la segunda cosa signifique que la manipulación tiene un mayor efecto sobre la primera cosa en comparación con el efecto sobre la segunda cosa. La manipulación no tiene por qué tener ningún efecto sobre la segunda cosa. La manipulación puede tener un efecto sobre la primera cosa que sea al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 10%, aproximadamente 50%, aproximadamente 90% o aproximadamente 99% mayor que el efecto sobre la segunda cosa. La manipulación puede tener un efecto sobre la primera cosa que sea al menos aproximadamente 2 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente  $1 \times 10^3$  veces, aproximadamente  $1 \times 10^4$  veces o aproximadamente  $1 \times 10^6$  veces mayor que el efecto sobre la segunda cosa. La manipulación puede incluir, por ejemplo, detección, excitación, modificación, puesta en contacto, tratamiento, cambio, escisión (p. ej., de un enlace químico), escisión fotoquímica (p. ej., de un enlace químico), formación (p. ej., de un enlace químico), formación fotoquímica (p. ej. de un

enlace químico), modificación covalente, modificación no covalente, destrucción, fotoablación, eliminación, síntesis, polimerización, fotopolimerización, amplificación (p. ej. de un ácido nucleico), copia (p. ej. de un ácido nucleico), extensión (p. ej., de un ácido nucleico), ligación (p. ej., de un ácido nucleico) u otra manipulación establecida en el presente documento o conocida de otro modo en la técnica.

5 Como se emplea en el presente documento, el término "soporte sólido" se refiere a un sustrato rígido que es insoluble en un líquido acuoso. El sustrato puede ser no poroso o poroso. El sustrato puede opcionalmente ser capaz de absorber un líquido (p. ej., debido a la porosidad) pero puede ser lo suficientemente rígido como para que el sustrato no se hinche sustancialmente al absorber el líquido y no se contraiga sustancialmente cuando el líquido se elimine por secado. Un soporte sólido no poroso puede ser impermeable a líquidos o gases. Los soportes sólidos ilustrativos  
10 incluyen, pero no se limitan a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (p. ej., acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, olefinas cíclicas, poliimidadas, etc.), nailon, cerámica, resinas, Zeonor, sílice o materiales a base de sílice que incluyen silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, haces de fibras ópticas y polímeros. Los soportes sólidos particularmente útiles para algunas realizaciones son componentes de una celda de flujo o están ubicados dentro de  
15 un aparato de celda de flujo. Las celdas de flujo ilustrativas se exponen con más detalle en el presente documento.

Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "guía de ondas" signifique una estructura o material que limita la propagación de radiación electromagnética a una ubicación particular. Por ejemplo, una guía de ondas puede guiar la luz a un primer subconjunto de rasgos en una matriz mientras evita que la luz se propague a un segundo subconjunto de rasgos en la matriz. Las guías de onda ilustrativas que se pueden utilizar para acoplar la radiación de excitación a los rasgos de una matriz se establecen en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2006/0057729 A1 o 2015/0293021 A1, o la Patente de Estados Unidos Núm. 8.241.573, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicional.

Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término ventana, cuando se emplea en referencia a una celda de flujo, signifique una pared o barrera de la celda de flujo a través de la cual no puede pasar un fluido o gas, pero a través de la cual se puede transmitir radiación de una longitud de onda particular.

Como se emplea en el presente documento, el término "coordenadas xy" se refiere a información que especifica la ubicación de un punto, línea o área a lo largo de una superficie de un soporte sólido. Las coordenadas xy pueden referirse a un plano que es sustancialmente paralelo a la superficie y/u ortogonal a la dimensión z a lo largo del cual se enfoca un detector cuando se observa la superficie. El término puede especificar, por ejemplo, coordenadas numéricas en un sistema cartesiano. Las coordenadas se pueden proporcionar con respecto a uno o ambos de los ejes x e y o se pueden proporcionar con respecto a otra ubicación en el plano xy. Por ejemplo, las coordenadas de un rasgo de un objeto pueden especificar la ubicación del rasgo con relación a la ubicación de otro rasgo del objeto.

Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "plano xy" signifique un área bidimensional definida por los ejes x e y. Uno o ambos ejes pueden ser rectos o curvos. Por ejemplo, un "plano plano" es un área bidimensional definida por ejes de línea recta x e y. Cuando se utiliza en referencia a un detector y un objeto observado por el detector, el plano plano puede especificarse además como ortogonal a la dirección de observación entre el detector y el objeto que se detecta. Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "plano curvo" signifique un plano que se desvía de un panel plano debido a un arco en uno o ambos de los ejes x o y. Cuando se utiliza en referencia a un detector y un objeto observado por el detector, el plano curvo puede especificarse adicionalmente por tener una tangente que es ortogonal a la dirección de observación entre el detector y el objeto que se detecta.

Como se emplea en el presente documento, se pretende que el término "coordenada z" signifique información que especifica la ubicación de un punto, línea o área a lo largo de un eje que es ortogonal a un plano xy. En realizaciones particulares, el eje z es ortogonal a un área de un objeto que es observado por un detector. Por ejemplo, la dirección de enfoque de un sistema óptico puede especificarse a lo largo del eje z.

Las realizaciones expuestas a continuación y enumeradas en las reivindicaciones pueden entenderse a la vista de las definiciones anteriores.

La presente divulgación proporciona una matriz, que incluye un soporte sólido que tiene una pluralidad de contornos a lo largo de una superficie exterior del soporte sólido, en donde un primer subconjunto de los contornos se coloca a lo largo de la superficie exterior del soporte sólido para formar un primer patrón de rasgos y un segundo subconjunto de los contornos se coloca a lo largo de la superficie exterior del soporte sólido para formar un segundo patrón de rasgos, en donde los contornos del primer subconjunto se yuxtaponen a los contornos del segundo subconjunto a lo largo de la superficie exterior, por lo que el primer y segundo patrones forman un patrón intercalado a lo largo de la superficie exterior, en donde los rasgos del primer patrón aparecen a una primera elevación  $z_1$  y los rasgos del segundo patrón aparecen a una segunda elevación  $z_2$ , y en donde los rasgos incluyen puntos de anclaje para analitos, por lo que los rasgos del primer patrón de repetición están configuradas para anclar analitos a una elevación diferente con respecto a los analitos anclados a los rasgos del segundo patrón de repetición. En algunas realizaciones, el patrón de rasgos son patrones de repetición de rasgos.

Los soportes sólidos que son útiles en un aparato o método de la presente divulgación pueden ser bidimensionales o tridimensionales y pueden ser una superficie plana (p. ej., un chip o portaobjetos) o pueden tener una superficie curva (p. ej., un cilindro o tambor). Los materiales útiles incluyen vidrio, cuarzo, plástico (tal como poliestireno (poliestireno poco entrecruzado y altamente entrecruzado), policarbonato, polipropileno o poli(metacrilato de metilo)), copolímero acrílico, poliamida, silicio, metal (p. ej., oro derivatizado con alcanotiolato), celulosa, nailon, látex, dextrano, matriz de gel (p. ej., gel de sílice), poliacroleína o materiales compuestos.

Como se expone con más detalle a continuación, se puede configurar un soporte sólido para que se ancle a uno o más analitos de interés. El anclaje se puede lograr mediante la unión directa o indirecta al soporte sólido. La unión puede ser por conexión covalente. Véanse Joos et al. (1997) *Analytical Biochemistry*, 247:96-101; Oroskar et al. (1996) *Clin. Chem.*, 42:1547-1555; y Khandjian (1986) *Mol. Bio. Rep.*, 11:107-11, a cada una de los cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Un anclaje preferido para analitos de ácido nucleico, pero que no se limita a ácidos nucleicos, es la unión directa de amina, que en el caso de los ácidos nucleicos puede ocurrir entre un nucleótido terminal del ácido nucleico y un epóxido integrado sobre la superficie. La unión también puede ser a través de una conexión no covalente. Por ejemplo, biotina-estreptavidina (Taylor et al. (1991) *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 24:1443, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente) y digoxigenina con anti-digoxigenina (Smith et al., *Science*, 253:1122 (1992), a la cual se debe hacer referencia adicionalmente) son herramientas habituales para fijar ácidos nucleicos a superficies.

El anclaje de un analito, tal como un ácido nucleico, a una superficie puede ser a través de una estructura intermedia tal como una cuenta, una partícula o un gel (p. ej., un hidrogel). El anclaje de ácidos nucleicos a una matriz a través de un hidrogel se ilustra mediante celdas de flujo disponibles comercialmente de Illumina Inc. (San Diego, CA) o como se describe en las Patentes de Estados Unidos Núm. 8.241.573 y 8.951.781; y 8.759.037, a cada una de los cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Los geles ilustrativos que pueden utilizarse en los métodos y aparatos expuestos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen una estructura coloidal, tales como agarosa; estructura de malla polimérica, tal como gelatina; o estructura de polímero entrecruzado, tal como poli(acrilamida, SFA (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2011/0059865 A1, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente) o PAZAM (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Núm. 9.012.022, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente). El anclaje de ácidos nucleicos a una matriz a través de cuentas se ilustra mediante matrices BeadChip™ disponibles comercialmente de Illumina Inc. o matrices basadas en cuentas expuestas en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.266.459; 6.355.431; 6.770.441; 6.859.570; y 7.622.294, a cada uno de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Tales estructuras intermedias pueden estar presentes en un pocillo, en un poste o en otros contornos de superficie establecidos en el presente documento.

Un soporte sólido puede incluir cualquiera de una variedad de contornos. Los contornos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, depresiones, pocillos, canales, proyecciones, crestas o postes. Tales contornos pueden formar rasgos de una o más matrices. Las características de varios rasgos se establecen en el presente documento. Se entenderá que los contornos pueden incluir o conferir tales características tanto si los contornos funcionan como rasgos en una matriz como si no. Además, un contorno puede admitir múltiples rasgos, de modo que un contorno puede tener múltiples características.

Los rasgos de una matriz pueden tener cualquiera de una variedad de formas. Por ejemplo, cuando se observan en un plano bidimensional, tal como sobre la superficie de una matriz, los rasgos pueden aparecer redondeados, circulares, ovalados, rectangulares, cuadrados, simétricos, asimétricos, triangulares, poligonales o similares. Los rasgos pueden disponerse en un patrón de repetición regular que incluye, por ejemplo, una celosía cuadrada, una celosía rectangular, una celosía rómbica, una celosía hexagonal o una celosía oblicua. También se puede utilizar un patrón aleatorio o no repetitivo en algunas realizaciones. Se puede seleccionar un patrón para lograr el nivel de empaquetamiento deseado. Por ejemplo, los rasgos redondos se empaquetan de manera óptima en una disposición hexagonal. Por supuesto, también se pueden utilizar otras disposiciones de empaquetamiento para rasgos redondos y viceversa.

Un patrón de repetición se puede caracterizar en términos del número de rasgos que están presentes en un subconjunto que forma la unidad repetida más pequeña del patrón. El subconjunto puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 10 o más rasgos. Dependiendo del tamaño y la densidad de los rasgos, la unidad puede ocupar un área de menos de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>, aproximadamente 500 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 100 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 50 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 10 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 500 nm<sup>2</sup>, aproximadamente 100 nm<sup>2</sup>, aproximadamente 50 nm<sup>2</sup>, aproximadamente 10 nm<sup>2</sup> o menos. Alternativa o adicionalmente, la unidad puede ocupar un área superior a aproximadamente 10 nm<sup>2</sup>, aproximadamente 50 nm<sup>2</sup>, aproximadamente 100 nm<sup>2</sup>, aproximadamente 500 nm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 10 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 50 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 100 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 500 μm<sup>2</sup>, aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>, o más. Las características de los rasgos de una unidad, tales como forma, tamaño, paso y similares, pueden seleccionarse entre las que se exponen en el presente documento con respecto a los rasgos de una matriz o patrón.

El tamaño de un rasgo en una matriz (u otro objeto utilizado en un método o sistema en el presente documento) se puede seleccionar para adaptarse a una aplicación particular. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un rasgo de una matriz puede tener un tamaño que aloje solamente a una única molécula de ácido nucleico. Una superficie que tiene una pluralidad de rasgos en este rango de tamaño es útil para construir una matriz de moléculas para la detección con una resolución de una sola molécula. Los rasgos en este rango de tamaño también son útiles para su uso en matrices

que tienen rasgos que contienen cada una una colonia de moléculas de ácido nucleico. Por lo tanto, los rasgos de una matriz pueden tener cada uno un área que no sea mayor de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$ , no mayor de aproximadamente  $500 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no mayor de aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no mayor de aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no mayor de aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no mayor de aproximadamente  $500 \text{ nm}^2$ , o no mayor de aproximadamente  $100 \text{ nm}^2$ , no mayor de aproximadamente  $10 \text{ nm}^2$ , no mayor de aproximadamente  $5 \text{ nm}^2$ , o no mayor de aproximadamente  $1 \text{ nm}^2$ . Alternativa o adicionalmente, los rasgos de una matriz no serán menores de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$ , no menor de aproximadamente  $500 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no menor de aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no menor de aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no menor de aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}^2$ , no menor de aproximadamente  $500 \text{ nm}^2$ , no menor de aproximadamente  $100 \text{ nm}^2$ , no menor de unos  $10 \text{ nm}^2$ , no menor de unos  $5 \text{ nm}^2$ , o no menor de aproximadamente  $1 \text{ nm}^2$ . De hecho, un rasgo puede tener un tamaño que se encuentre en un rango entre un límite superior e inferior seleccionado entre los ilustrados anteriormente. Aunque se han ilustrado varios rangos de tamaño para los rasgos de una superficie con respecto a los ácidos nucleicos y a escala de ácidos nucleicos, se entenderá que los rasgos en estos rangos de tamaño pueden utilizarse para aplicaciones que no incluyan ácidos nucleicos. Se entenderá adicionalmente que el tamaño de los rasgos no necesita limitarse necesariamente a una escala utilizada para aplicaciones de ácidos nucleicos.

Para una matriz de rasgos que están presentes en un plano  $z$  particular, los rasgos pueden ser discretos, estando separados por espacios entre sí. Por ejemplo, los rasgos vecinos más cercanos en un plano  $z$  particular se pueden separar por una distancia de borde a borde de aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$  o menos. Alternativa o adicionalmente, los rasgos vecinos más cercanos en un plano  $z$  particular pueden estar separados por una distancia de borde a borde de al menos aproximadamente  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}$  o más. Estos rangos también se pueden aplicar al espaciado promedio de borde a borde para rasgos que se encuentran en diferentes planos  $z$ .

Una matriz también se puede caracterizar con respecto al paso. Por ejemplo, el tamaño de los rasgos y/o el paso de los rasgos puede variar de manera que las matrices puedan tener la densidad deseada. Por ejemplo, el paso de rasgo promedio en un plano  $z$  particular puede ser como máximo aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$  o menos. Alternativa o adicionalmente, el paso de rasgo promedio en un plano  $z$  particular puede ser de al menos aproximadamente  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}$  o más. De manera similar, el paso máximo de rasgo en un plano  $z$  particular puede ser como máximo aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$  o menos; y/o el paso mínimo de rasgo en un plano  $z$  particular puede ser al menos aproximadamente  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,3 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $50 \text{ }\mu\text{m}$ , aproximadamente  $100 \text{ }\mu\text{m}$  o más. Los rangos anteriores se pueden aplicar al paso promedio, máximo o mínimo entre rasgos que se encuentran en dos o más planos  $z$  (p. ej., en múltiples imágenes en una pila  $z$ ).

La densidad de rasgos en una matriz también se puede entender en términos del número de rasgos presentes por unidad de área. Por ejemplo, la densidad promedio de rasgos para una matriz puede ser de al menos aproximadamente  $1 \times 10^3$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^4$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^5$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^6$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^7$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^8$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , o aproximadamente  $1 \times 10^9$  rasgos/ $\text{mm}^2$  o más alto. Alternativamente o adicionalmente, la densidad promedio de rasgos para una matriz puede ser como máximo de aproximadamente  $1 \times 10^9$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^8$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^7$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^6$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^5$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , aproximadamente  $1 \times 10^4$  rasgos/ $\text{mm}^2$ , o aproximadamente  $1 \times 10^3$  rasgos/ $\text{mm}^2$  o menos. Los rangos anteriores se pueden aplicar a la densidad de rasgos que se encuentran en un solo plano  $z$  o en varios planos  $z$  (p. ej., en múltiples imágenes en una pila  $z$ ).

Una matriz que tiene un patrón regular de rasgos se puede ordenar con respecto a las ubicaciones relativas de los rasgos, pero al azar con respecto a una o más características diferentes de cada rasgo. Por ejemplo, en el caso de una matriz de ácidos nucleicos, los rasgos de los ácidos nucleicos se pueden ordenar con respecto a sus ubicaciones relativas pero al azar con respecto al conocimiento que se tiene de la secuencia de las especies de ácidos nucleicos presentes en cualquier rasgo particular. Como ejemplo más específico, las matrices de ácidos nucleicos formadas sembrando un patrón de repetición de rasgos con ácidos nucleicos molde y amplificando el molde en cada rasgo para formar copias del molde en el rasgo (p. ej., mediante amplificación de agrupación ("cluster") o amplificación en puente) tendrán un patrón regular de rasgos de ácido nucleico, según lo determinado por la posición de los contornos que forman los rasgos, pero será aleatorio con respecto a la distribución de secuencias de ácidos nucleicos a través de la matriz. Por tanto, la detección de la presencia de material de ácido nucleico en la matriz puede producir un patrón de repetición de rasgos, mientras que la detección específica de secuencia puede producir una distribución repetitiva de señales a través de la matriz.

Se entenderá que la descripción en el presente documento de patrones, orden, aleatoriedad y similares se refiere no solo a rasgos en objetos, tales como rasgos en matrices, sino también a rasgos en imágenes. Como tales, los patrones, el orden, la aleatoriedad y similares pueden estar presentes en cualquiera de una variedad de formatos que se utilizan para almacenar, manipular o comunicar datos de imágenes, incluidos, pero sin limitarse a, un medio legible por ordenador o un componente informático tal como una interfaz gráfica de usuario u otro dispositivo de salida.

En algunas realizaciones, los analitos se pueden distribuir en rasgos de modo que los analitos se puedan resolver individualmente. Por ejemplo, no puede estar presente más de una única molécula de cada analito en cada rasgo de esta realización. Alternativamente, los analitos pueden estar presentes como colonias o poblaciones de modo que las moléculas o células individuales no se resuelvan necesariamente. Las colonias o poblaciones pueden ser homogéneas con respecto al hecho de contener solo una única especie de analito (aunque en múltiples copias). Tomando los ácidos nucleicos como ejemplo, cada rasgo en una matriz puede incluir una colonia o población de ácidos nucleicos y cada ácido nucleico en la colonia o población puede tener la misma secuencia de nucleótidos (ya sea de hebra sencilla o de doble hebra). Las colonias de ácidos nucleicos también pueden denominarse "agrupaciones de ácidos nucleicos". Las colonias de ácidos nucleicos se pueden crear opcionalmente mediante técnicas de amplificación de agrupaciones o amplificación en puente como se expone con más detalle en otra parte del presente documento. Pueden estar presentes múltiples repeticiones de una secuencia diana en una sola molécula de ácido nucleico, tal como un concatémero creado utilizando un procedimiento de amplificación de círculo rodante. Por tanto, un rasgo puede contener múltiples copias de una única especie de analito. Alternativamente, una colonia o población de analitos que se encuentran en un rasgo puede incluir dos o más especies diferentes. Por ejemplo, uno o más rasgos en una matriz de paneles pueden contener cada uno una colonia mixta que tenga dos o más especies de ácido nucleico diferentes (es decir, moléculas de ácido nucleico con secuencias diferentes). Las dos o más especies de ácido nucleico en una colonia mixta pueden estar presentes en cantidades no despreciables, por ejemplo, permitiendo que se detecte más de un ácido nucleico en la colonia mixta.

Puede estar presente una especie de analito diferente en cada rasgo de una matriz. Por tanto, diferentes analitos pueden estar presentes en diferentes rasgos de una primera matriz sobre un soporte sólido y diferentes analitos pueden estar presentes en diferentes rasgos de una segunda matriz sobre el soporte sólido. Cada matriz puede incluir al menos aproximadamente 100, aproximadamente  $1 \times 10^3$ , aproximadamente  $1 \times 10^4$ , aproximadamente  $1 \times 10^5$ , aproximadamente  $1 \times 10^6$ , aproximadamente  $1 \times 10^9$  o más especies diferentes de analito. Por consiguiente, pueden estar presentes al menos el doble de analitos diferentes sobre un soporte sólido que tiene dos matrices diferentes, al menos tres veces la cantidad de analitos diferentes pueden estar presentes sobre un soporte sólido que tiene tres matrices diferentes, y así sucesivamente.

Se puede utilizar cualquiera de una variedad de analitos en un método o aparato establecido en el presente documento. Por ejemplo, una matriz puede incluir una colección anclada de células, virus, ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, carbohidratos, moléculas pequeñas (tales como candidatos a fármacos), moléculas biológicamente activas u otros analitos de interés.

Las aplicaciones útiles pueden incluir aquellas que utilizan rasgos que tienen moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos y polipéptidos. Tales micromatrices pueden incluir sondas de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). Estas son específicas para secuencias de nucleótidos presentes en seres humanos y otros organismos. En determinadas aplicaciones, por ejemplo, se pueden anclar sondas individuales de ADN o ARN en rasgos individuales de una matriz. Una muestra de prueba, tal como la de una persona u organismo conocido, puede exponerse a la matriz, de modo que los ácidos nucleicos diana (p. ej., fragmentos de genes, ARNm o amplicones de los mismos) hibriden con sondas complementarias en los rasgos respectivos de la matriz. Las sondas se pueden marcar en un procedimiento específico de la diana (p. ej., debido a las marcas presentes sobre los ácidos nucleicos diana o debido al marcaje enzimático de las sondas o dianas que están presentes en forma hibridada en los rasgos). A continuación, la matriz puede examinarse escaneando frecuencias específicas de luz sobre los rasgos para identificar qué ácidos nucleicos diana están presentes en la muestra.

En algunas realizaciones, se pueden utilizar micromatrices biológicas para secuenciación genética y aplicaciones similares. En general, la secuenciación genética consiste en determinar el orden de los nucleótidos en una longitud de ácido nucleico diana, tal como un fragmento de ADN o ARN. Se pueden secuenciar secuencias relativamente cortas en cada rasgo, y la información de la secuencia resultante se puede utilizar en varios métodos bioinformáticos para ajustar lógicamente los fragmentos de secuencia juntos a fin de determinar de manera fiable la secuencia de longitudes mucho más extensas de material genético del que se obtuvieron los fragmentos. Se han desarrollado algoritmos automatizados basados en ordenador para fragmentos característicos y se han utilizado más recientemente en el mapeo del genoma, identificación de genes y su función, etc. Las micromatrices son particularmente útiles para caracterizar el contenido genómico porque están presentes un gran número de variantes y esto reemplaza la alternativa de realizar muchos experimentos en sondas y dianas individuales. La micromatriz es un formato ideal para realizar tales investigaciones de manera práctica.

Cualquiera de una variedad de métodos conocidos para fabricar matrices de analitos (también denominadas "micromatrices") o composiciones conocidas utilizadas para las matrices pueden adaptarse para su uso en un método o aparato establecido en el presente documento. Una matriz puede contener rasgos, que tengan cada uno una sonda individual o una población de sondas. En el último caso, la población de sondas en cada rasgo puede ser homogénea

con una única especie de sonda. Por ejemplo, en el caso de una matriz de ácido nucleico, cada rasgo puede tener múltiples moléculas de ácido nucleico, teniendo cada una una secuencia común. Sin embargo, en algunas realizaciones, las poblaciones en cada rasgo de una matriz pueden ser heterogéneas. De manera similar, las matrices de proteínas pueden tener rasgos con una sola proteína o una población de proteínas, de manera que tengan la misma secuencia de aminoácidos. Las sondas se pueden unir a la superficie de una matriz, por ejemplo, mediante enlace covalente de las sondas a la superficie o mediante interacciones no covalentes de las sondas con la superficie. En algunas realizaciones, las sondas, tales como las moléculas de ácido nucleico, se pueden anclar a una superficie mediante una capa de gel como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. 9.012.022 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2011/0059865 A1, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

Las matrices ilustrativas incluyen, sin limitación, una matriz BeadChip® disponible de Illumina, Inc. (San Diego, CA) u otras, tales como aquellas en las que las sondas se anclan a cuentas que están presentes sobre una superficie (p. ej., cuentas en pocillos sobre una superficie) tales como las descritas en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.266.459; 6.355.431; 6.770.441; 6.859.570; y 7.622.294, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Otros ejemplos de micromatrices disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, una micromatriz Affymetrix® GeneChip® u otra micromatriz sintetizada de acuerdo con técnicas a veces denominadas tecnologías VLSIPS™ (Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis "Síntesis de Polímeros Inmovilizados a Gran Escala"). También se puede utilizar una micromatriz de puntos en un método o aparato de acuerdo con algunas realizaciones de la presente divulgación. Un ejemplo de micromatriz de puntos es una matriz CodeLink™ disponible de Amersham Biosciences. Otra micromatriz que es útil es una que se fabrica utilizando métodos de impresión de inyección de tinta tal como la tecnología SurePrint™ disponible de Agilent Technologies.

Otras composiciones de matriz y métodos de fabricación útiles incluyen los que se utilizan en aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, las matrices que tienen amplicones de fragmentos genómicos (a menudo denominados agrupaciones) son particularmente útiles, tales como las descritas por Bentley et al., en *Nature* 456:53-59 (2008); documento WO 91/06678; documento WO 07/123744; Patentes de Estados Unidos Núm. 7.329.492; 7.211.414; 7.315.019; 7.405.281, o 7.057.026; 8.343.746; y 9.574.226, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Otro tipo de matriz que es útil para la secuenciación de ácidos nucleicos es una matriz de partículas producidas a partir de una técnica de PCR en emulsión. Los ejemplos son descritos por Dressman et al., en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8817-8822 (2003), documento WO 05/010145, Patentes de Estados Unidos Núm. 7.323.305 y 7.622.280, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

Las matrices con patrones pueden utilizarse para secuenciación de ácidos nucleicos u otras aplicaciones analíticas y pueden modificarse para su uso en el aparato y los métodos de la presente divulgación. Las matrices con patrones ilustrativas, los métodos para su fabricación y los métodos para su uso se exponen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 8.778.848; 8.778.849; 8.895.249; 9.012.022; y 9.512.422; a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Los rasgos de tales matrices con patrones se pueden utilizar para capturar una única molécula molde de ácido nucleico para sembrar la formación posterior de una colonia homogénea, por ejemplo, mediante amplificación en puente. Tales matrices con patrones son particularmente útiles para aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos.

Las técnicas anteriores para preparar y detectar matrices se pueden emplear cuando se prepara y utiliza una matriz que tiene rasgos en múltiples planos z.

En un rasgo puede estar presente cualquiera de una variedad de marcas o radicales. Las marcas y radicales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, luminóforos, fluoróforos, cromóforos, especies quimioluminiscentes, especies de luminiscencia electroquímica, extintores de fluorescencia, donadores y/o aceptores para transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), nanocristales y similares. Los fluoróforos que pueden ser útiles incluyen, por ejemplo, complejos de lantánidos fluorescentes, incluidos los de europio y terbio, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malaquita, Cy3, Cy5, estilbino, amarillo lucifer, Cascade Blue, Texas Red, tintes Alexa, ficoeritrina y otros conocidos en la técnica tales como los descritos por Haugland, *Molecular Probes Handbook*, (Eugene, OR) 6ª Edición; *The Synthegeen catalog* (Houston, TX.), Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2ª Ed., Plenum Press New York (1999), o documento WO 98/59066, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Los extintores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, DACYL (ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico), Black Hole Quenchers (Biosearch Technologies, Novato, CA), extintores Qxl (Anaspec, Fremont, CA), extintores Iowa Black, extintores DABCYL, BHQ1, BHQ2, QSY7, QSY9, QSY21, QSY35, BHQ0, BHQ1, BHQ2, QXL680, ATTO540Q, ATTO580Q, ATTO612Q, DYQ660, DYQ661 e IRDye QC-1. Las especies quimioluminiscentes incluyen, por ejemplo, reactivos luminales utilizados para la detección en pirosecuenciación, aequorina y otras especies conocidas en la técnica. Las especies de luminiscencia electroquímica ilustrativas incluyen, pero no se limitan a Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, tintes Bodipy, derivados luminales, ésteres de acridina y otros conocidos en la técnica.

Puede seleccionarse una marca o radical para adaptarse a una aplicación particular de un aparato o método establecido en el presente documento. Por ejemplo, la marca o radical se pueden asociar con un analito diana que está presente en un rasgo y se detecta utilizando una técnica establecida en el presente documento.

En realizaciones particulares, los analitos diana incluyen radicales luminiscentes y un detector está acoplado

ópticamente con la matriz para detectar la emisión de los radicales luminiscentes. Un aparato que incluye los radiales fluorescentes puede incluir adicionalmente un conjunto de excitación como se expone en el presente documento o se conoce de otro modo en la técnica. Un aparato con un conjunto de excitación también es útil cuando se utilizan extintores, donadores y/o aceptores de fluorescencia para transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o nanocristales.

Dos matrices que están sobre un soporte sólido aparentemente pueden estar intercaladas entre sí cuando se ven en dimensiones xy independientemente de las diferencias de elevación para los rasgos de las matrices en la dimensión z. Por consiguiente, los contornos de un primer subconjunto de contornos sobre un soporte sólido pueden interponerse en contornos vecinos más cercanos de un segundo subconjunto de contornos sobre el soporte sólido. Por otra parte, los contornos del segundo subconjunto pueden interponerse en contornos vecinos más cercanos del primer subconjunto. De esta manera, los patrones primero y segundo forman un patrón intercalado a lo largo de la superficie exterior del soporte sólido.

En realizaciones particulares, un primer patrón de repetición de contornos sobre un soporte sólido tendrá el mismo patrón de celosía que un segundo patrón de repetición de contornos sobre el soporte sólido, y el primer patrón de repetición está desplazado del segundo patrón de repetición a lo largo de la superficie exterior del soporte sólido. Sean los patrones de celosía iguales o no, el área para cada uno de los contornos (p. ej., las áreas que forman rasgos) del primer patrón de repetición puede ser la misma que el área para cada uno de los contornos del segundo patrón de repetición. Por supuesto, las áreas para los contornos o rasgos pueden diferir dentro de una matriz particular o entre diferentes matrices sobre un soporte sólido. Se entenderá adicionalmente que un primer patrón de repetición puede tener opcionalmente el mismo paso que el segundo patrón de repetición.

Un primer subconjunto de contornos sobre un soporte sólido incluye pocillos que tienen un fondo a elevación  $z_1$  y un segundo subconjunto de contornos sobre el soporte sólido incluye pocillos que tienen un fondo a elevación  $z_2$ . De manera similar, un primer subconjunto de contornos sobre un soporte sólido puede incluir postes o crestas con una parte superior a elevación  $z_1$  y un segundo subconjunto de contornos sobre el soporte sólido puede incluir postes o crestas que tienen una parte superior a elevación  $z_2$ . Como se ilustra en estos ejemplos, los subconjuntos de contornos sobre un soporte sólido pueden tener la misma forma o morfología. Alternativamente, diferentes subconjuntos de contornos pueden tener diferentes formas o morfologías. En consecuencia, los contornos de un primer subconjunto incluyen pocillos que tienen un fondo a elevación  $z_1$  y los contornos de un segundo subconjunto pueden incluir postes o crestas que tienen una parte superior a elevación  $z_2$ . Las configuraciones ilustrativas se muestran en las Fig. 2 a 4.

La diferencia de elevaciones para los contornos de dos subconjuntos diferentes (p. ej., en  $z_1$  y  $z_2$ ) puede diferir en cualquier cantidad apropiada o deseada para lograr la resolución entre dos matrices diferentes formadas por los contornos. En algunos casos, los rasgos vecinos más cercanos estarán separados por el elemento de volumen de resolución óptica del sistema de detección que se esté utilizando. Por ejemplo,  $z_1$  y  $z_2$  (o la distancia entre los rasgos vecinos más cercanos en z) pueden estar al menos aproximadamente  $0,2 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $2 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $25 \mu\text{m}$  o más separados. Alternativa o adicionalmente, la distancia puede ser como máximo de aproximadamente  $25 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $10 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $5 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $2 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $1 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,5 \mu\text{m}$ , aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}$  de separación o menos.

En algunas realizaciones, un primer patrón de rasgos estará en un primer plano plano a lo largo de un soporte sólido y un segundo patrón de rasgos sobre el soporte sólido estará en un segundo plano plano que es paralelo al primer plano plano. No es necesario que los planos formados por los rasgos sean planos. Por ejemplo, un primer patrón de rasgos puede formar un primer plano curvo (p. ej., a lo largo del exterior de un cilindro o tambor) y puede aparecer un segundo patrón de rasgos en un segundo plano curvo. Opcionalmente, los dos planos curvos pueden ser sustancialmente concéntricos entre sí.

Una matriz de la presente divulgación puede ponerse en contacto con una muestra fluidica. Se puede producir contacto masivo por medio del cual los rasgos del primer y segundo patrones a lo largo de un soporte sólido están en comunicación de fluido simultánea con un fluido. Como tal, el procesamiento fluidoico ocurre simultáneamente para ambas matrices que están sobre la superficie del soporte sólido. Una celda de flujo es particularmente útil para tratar una matriz con reactivos fluidos. Por consiguiente, esta divulgación proporciona una celda de flujo que aloja una matriz expuesta en el presente documento de manera que la superficie exterior del soporte sólido está en contacto con el lumen de la celda de flujo. Como tales, los rasgos de las matrices pueden estar en contacto con el lumen de la celda de flujo, independientemente de las diferencias en sus elevaciones en la dimensión z. En realizaciones particulares, dos o más patrones de rasgos, aunque estén presentes en diferentes elevaciones, estarán presentes en el mismo lado del lumen de una celda de flujo. Por tanto, una única ventana de una celda de flujo puede tener una matriz con dos o más patrones de rasgos, en donde los rasgos se encuentran a diferentes elevaciones.

Una celda de flujo puede incluir opcionalmente entradas o salidas fluidicas para permitir la introducción o eliminación de varios fluidos, por ejemplo, fluidos que contienen reactivos utilizados en métodos para depositar, sintetizar, marcar o detectar analitos. Varios métodos ilustrativos se exponen con más detalle en otra parte del presente documento, tales como amplificación, detección y secuenciación de ácidos nucleicos. Una celda de flujo puede incluir adicionalmente ventanas para la detección de analitos en los rasgos de una matriz. En algunas realizaciones, el

soporte sólido que contiene contornos puede ser transparente a longitudes de onda de luz particulares utilizadas para la detección óptica de analitos en los contornos. Una celda de flujo puede incluir una o más ventanas de detección. Por ejemplo, una primera ventana de la celda de flujo y una segunda ventana de la celda de flujo pueden ser paralelas entre sí, estando separada la primera ventana de la segunda ventana por el lumen de la celda de flujo.

5 Una o ambas ventanas de una celda de flujo pueden funcionar como soportes sólidos sobre los que se forman las matrices de la presente divulgación. Las matrices pueden estar presentes sobre una superficie de la ventana que  
 10 contacta con el lumen de la celda de flujo. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona una matriz que incluye un soporte sólido que tiene una pluralidad de contornos a lo largo de una superficie exterior del soporte sólido, en donde un primer subconjunto de los contornos se coloca a lo largo de la superficie exterior del soporte sólido para formar un primer patrón de rasgos y un segundo subconjunto de los contornos se coloca a lo largo de la superficie exterior del  
 15 soporte sólido para formar un segundo patrón de rasgos, en donde los contornos del primer subconjunto se yuxtaponen a los contornos del segundo subconjunto a lo largo de la superficie exterior, por medio de lo cual los patrones primero y segundo forman un patrón intercalado a lo largo de la superficie exterior, en donde los rasgos del primer patrón aparecen a una primera elevación  $z_1$  y los rasgos del segundo patrón ocurren a una segunda elevación  $z_2$ , y en donde  
 20 los rasgos incluyen puntos de anclaje para analitos, por lo que los rasgos del primer patrón están configurados para anclar analitos a una elevación diferente con respecto a los analitos anclados a los rasgos del segundo patrón, en donde el soporte sólido funciona como una primera ventana de un celda de flujo y la celda de flujo incluye una segunda ventana que es paralela a la primera ventana, estando la primera ventana separada de la segunda ventana por el lumen de la celda de flujo, en donde la segunda ventana funciona como una segunda superficie exterior que incluye  
 25 un tercer subconjunto de contornos colocados a lo largo de la segunda superficie exterior para formar un tercer patrón de rasgos y un cuarto subconjunto de contornos a lo largo de la segunda superficie exterior para formar un cuarto patrón de rasgos, en donde los contornos del tercer subconjunto se yuxtaponen a los contornos del cuarto subconjunto a lo largo de la segunda superficie exterior, por lo que los patrones tercero y cuarto forman un segundo patrón intercalado a lo largo de la segunda superficie exterior, y en donde los rasgos del tercer patrón aparecen en una tercera elevación  $z_3$  y los rasgos del cuarto patrón aparecen a una cuarta elevación  $z_4$ . Los métodos para preparar y detectar matrices ubicadas en múltiples ventanas de una celda de flujo se conocen en la técnica, como se expone, por ejemplo, en Patente de Estados Unidos Núm. 8.039.817 (a la cual se debe hacer referencia adicionalmente) y se pueden modificar fácilmente para su uso con los métodos y aparatos expuestos en el presente documento.

30 La presente divulgación proporciona adicionalmente un método para detectar una pluralidad de analitos, que incluye las etapas de (a) proporcionar una matriz que incluye un soporte sólido que tiene un primer patrón de rasgos de analito y un segundo patrón de rasgos de analito a lo largo de una superficie exterior del soporte sólido, en donde los rasgos del analito del primer patrón aparecen a una primera elevación  $z_1$  y los rasgos del analito del segundo patrón aparecen a una segunda elevación  $z_2$ , y donde el primer y segundo patrones forman un patrón intercalado a lo largo de la superficie exterior, (b) detectar señales ópticas en la primera elevación  $z_1$ , por medio de lo cual los rasgos de los  
 35 analitos individuales del primer patrón se distinguen entre sí; (c) detectar señales ópticas en la segunda elevación  $z_2$ , por medio de lo cual los rasgos de los analitos individuales del segundo patrón se distinguen entre sí, en donde los rasgos del analito en el primer patrón se distinguen de los rasgos del analito vecino más cercano en el segundo patrón mediante la detección selectiva de rasgos en la primera elevación  $z_1$  en comparación con los rasgos en la segunda elevación  $z_2$ . Opcionalmente, el primer y/o segundo patrón de rasgos del analito puede ser un patrón de repetición de rasgos del analito.

40 Un método de la presente divulgación puede incluir una etapa de detección de señales ópticas de una matriz, por ejemplo, obteniendo una imagen. Los aparatos de detección que son capaces de obtener imágenes de superficies de alta resolución son particularmente útiles. En realizaciones particulares, el aparato de detección tendrá una resolución suficiente para distinguir rasgos en las densidades, pasos y/o tamaños de rasgos establecidos en el presente documento. Son particularmente útiles los aparatos de detección capaces de obtener imágenes o datos de imágenes de superficies. Los detectores ilustrativos son aquellos que están configurados para mantener un objeto y un detector en una relación estática mientras se obtiene una imagen de área. También se puede utilizar un aparato de exploración.

45 Las realizaciones descritas en el presente documento pueden utilizar un procedimiento con multisegmentos estáticos ("step-and-shoot") en donde diferentes partes de una matriz (en un plano  $xy$ ) se detectan individualmente o se obtienen imágenes entre (o después) de los movimientos relativos del detector y la muestra. Por ejemplo, cada área de la matriz se puede excitar con un láser u otra fuente de radiación apropiada y se puede detectar la emisión. Los ejemplos de componentes ópticos con multisegmentos estáticos que se pueden modificar de acuerdo con la presente divulgación se exponen en Patente de Estados Unidos Núm. 8.951.781, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente. Las realizaciones descritas en el presente documento pueden utilizar un procedimiento de exploración en donde diferentes partes de una matriz (en un plano  $xy$ ) se detectan o se obtienen imágenes durante el movimiento entre los rasgos y los componentes ópticos. En algunas realizaciones, el conjunto de formación de imágenes incluye un sistema de integración de retardo de tiempo de exploración (TDI). Además, las sesiones de imágenes pueden incluir exploración de líneas de modo que se explore una región focal lineal de luz (en un plano  $xy$ ) a través de la matriz de paneles. Algunos métodos de exploración de líneas que pueden modificarse de acuerdo con la presente divulgación se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.329.860 y 8.039.817, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. La exploración también puede incluir mover una región de luz focal puntual en un patrón de trama a través de una matriz de rasgos. Ya se utilicen multisegmentos estáticos, exploración, recolección de imágenes estáticas u otras configuraciones, las realizaciones se pueden configurar para la generación

de imágenes epi-fluorescentes o la generación de imágenes de fluorescencia de reflectancia interna total (TIRF). Los componentes ópticos y disposiciones ilustrativos que pueden modificarse a este respecto se exponen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.329.860; 8.241.573; 8.951.781; y 9.193.996, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

5 Ciertas realizaciones incluyen lentes de objetivo que tienen valores de apertura numérica (AN) altos. Los intervalos de AN altos ilustrativos para los que las realizaciones pueden ser particularmente útiles incluyen valores de AN de al menos aproximadamente 0,6. Por ejemplo, la AN puede ser al menos aproximadamente 0,65, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,75, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,85, aproximadamente 0,9, aproximadamente 0,95 o superior. Los expertos en la técnica apreciarán que la AN, que depende del índice de refracción del medio en el que  
10 está funcionando la lente, puede ser mayor, incluyendo, por ejemplo, hasta aproximadamente 1,0 para el aire, aproximadamente 1,33 para el agua pura o superior para otros medios como aceites. Sin embargo, otras realizaciones pueden tener valores de AN más bajos que los ejemplos enumerados anteriormente. Los datos de imagen obtenidos por el conjunto óptico pueden tener una resolución de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 micras o, más particularmente, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 micras. Los conjuntos ópticos pueden tener  
15 una resolución que sea suficiente para resolver individualmente los rasgos o sitios que están separados por una distancia de menos de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,2  $\mu\text{m}$  o menos.

Una ventaja de utilizar las matrices de la presente divulgación, en las que los contornos de las matrices intercaladas muestran rasgos a diferentes elevaciones, es que los rasgos pueden resolverse incluso si los contornos a los que  
20 están anclados están más juntos en las dimensiones xy aparentes de lo que sería posible si todos los rasgos tuvieran la misma elevación. Como tales, los contornos del vecino más cercano en un patrón intercalado que se distinguen entre sí tienen un paso que es menor que aproximadamente 500 nm, aproximadamente 250 nm, aproximadamente 100 nm, aproximadamente 50 nm o menos.

Los rasgos que se detectan y resuelven utilizando un método o aparato en el presente documento pueden tener un  
25 área en el plano xy que sea más pequeña que aproximadamente 100  $\mu\text{m}^2$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}^2$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}^2$ , aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}^2$  o más pequeña. Alternativa o adicionalmente, los rasgos pueden tener un área en el plano xy que tiene al menos aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}^2$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}^2$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}^2$ , aproximadamente 100  $\mu\text{m}^2$  o más grande.

En general, el valor AN de una lente de objetivo es una medida de la amplitud de ángulos por los que la lente de objetivo  
30 puede recibir luz. Cuanto mayor sea el valor de AN, más luz podrá captar la lente del objetivo para un aumento fijo determinado. Esto se debe a que aumentan la eficiencia de recolección y la resolución. Como resultado, se pueden distinguir múltiples rasgos más fácilmente cuando se utilizan lentes de objetivo con valores de AN más altos. Por lo tanto, en general, un valor de AN más alto para la lente del objetivo puede ser beneficioso para la generación de imágenes.

Un detector que se utiliza en un método establecido en el presente documento puede configurarse para detectar de  
35 forma selectiva rasgos sobre un soporte sólido en un plano z frente a otros planos z a lo largo del soporte sólido. Por ejemplo, un detector puede configurarse para detección confocal u otros modos de detección que recogen señales en una posición z particular mientras rechazan señales en posiciones z por encima y por debajo de la posición que se detecta. Un aparato de detección particularmente útil que se puede utilizar para explorar líneas en un plano z definido y, opcionalmente, utilizar un formato de integración retardada en el tiempo, se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2016/019693, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente.  
40

En algunas realizaciones, los rasgos que aparecen en diferentes planos z se pueden distinguir por desconvolución. Por ejemplo, una pila z de imágenes se puede comparar entre sí para determinar el plano z donde reside cada rasgo o para eliminar los rasgos desenfocados. Las técnicas de desconvolución de imágenes ilustrativas son descritas por  
45 Sibarita JB, Deconvolution Microscopy. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 95 (2005) 201-43, o McNally JG et al., Three-dimensional imaging by deconvolution Microscopy. *Methods* 19: 3 (1999) 373-85, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

El ancho del área de detección en z se puede configurar para la detección selectiva de rasgos que tienen diferencias de elevación establecidas en el presente documento. Por ejemplo, el ancho en z para el área focal (p. ej., el grosor en z para un plano focal, en el caso de un detector de área xy) puede ser de menos de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ ,  
50 aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  o aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ . Alternativa o adicionalmente, la anchura en z puede ser de al menos aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 25  $\mu\text{m}$  o más.

Puede ser deseable utilizar un detector que tenga un plano focal con un grosor en z que es menor que la distancia  
55 entre  $z_1$  y  $z_2$ , donde  $z_1$  es la elevación de rasgos de una primera matriz sobre un soporte sólido y  $z_2$  es la elevación de rasgos de una segunda matriz sobre el soporte sólido. En consecuencia, los rasgos del analito en la primera matriz se distinguen de los rasgos del analito vecino más cercano en la segunda matriz enfocando selectivamente el detector óptico a la primera elevación  $z_1$  en comparación con la segunda elevación  $z_2$ . De manera similar, los rasgos del analito en la segunda matriz se distinguen de los rasgos del analito vecino más cercano en la primera matriz al enfocar

selectivamente un detector óptico a la segunda elevación  $z_2$  en comparación con la primera elevación  $z_1$ .

Los rasgos distintivos a diferentes elevaciones se pueden lograr mediante la adquisición selectiva de señales, por ejemplo, utilizando el enfoque del detector, la confocalidad u otras técnicas establecidas anteriormente. Alternativa o adicionalmente, la resolución en  $z$  se puede lograr mediante la excitación selectiva de los luminóforos a una primera elevación en comparación con los luminóforos a una segunda elevación. Por ejemplo, los rasgos del analito en una primera matriz se pueden distinguir de los rasgos del analito vecino más cercano en una segunda matriz excitando selectivamente los luminóforos a una primera elevación  $z_1$  en comparación con una segunda elevación  $z_2$ . Tal excitación selectiva se puede lograr utilizando guías de ondas que se acoplan selectivamente a rasgos en la primera elevación  $z_1$  en comparación con los rasgos en la segunda elevación  $z_2$ . De manera similar, los rasgos del analito en la segunda matriz se pueden distinguir de los rasgos del analito vecino más cercano en la primera matriz excitando selectivamente los luminóforos en la segunda elevación  $z_2$  en comparación con la primera elevación  $z_1$ .

Como se ilustra en la Fig. 5, la excitación diferencial de las matrices se puede lograr alternando la aplicación de iluminación de guía de ondas y epi-iluminación. En el ejemplo que se muestra, la epi-iluminación se utiliza para excitar los luminóforos tanto en un primer como en un segundo conjunto de pocillos. Se utiliza una guía de ondas para excitar selectivamente los luminóforos en la segunda matriz de pocillos (los rasgos de la primera matriz no están acoplados ópticamente a la guía de ondas). Por lo tanto, los rasgos de la segunda matriz se distinguen de los rasgos de la primera matriz por excitación selectiva a través de la guía de ondas y los rasgos de la primera matriz pueden detectarse selectivamente mediante procesamiento de imágenes para restar los rasgos de la segunda matriz (cuyas ubicaciones se identifican a partir de la imagen excitada de la guía de ondas).

Un método de la presente divulgación puede incluir adicionalmente una etapa de suministro de datos desde una imagen objetivo a un ordenador. Se pueden llevar a cabo varios procesos y etapas de los métodos expuestos en el presente documento utilizando un ordenador. El ordenador puede incluir un procesador que sea parte de un dispositivo de detección, conectado en red con un dispositivo de detección utilizado para obtener los datos que son procesados por el ordenador o separados del dispositivo de detección. En algunas realizaciones, la información (p. ej., datos de imagen) puede transmitirse entre componentes de un sistema divulgado en el presente documento directamente o mediante una red informática. Una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN) puede ser una red informática corporativa, incluido el acceso a Internet, a la que se conectan los ordenadores y los dispositivos informáticos que componen el sistema. En una realización, la LAN se ajusta a la norma industrial del Protocolo de Control de Transmisión/Protocolo de Internet (TCP/IP). En algunos casos, la información (p. ej., datos de imagen) se introduce en un sistema descrito en el presente documento a través de un dispositivo de entrada (p. ej., unidad de disco, reproductor de disco compacto, puerto USB, etc.). En algunos casos, la información se recibe cargando la información, p. ej., desde un dispositivo de almacenamiento tal como un disco o una unidad flash.

Un procesador que se utiliza para ejecutar un algoritmo u otro procedimiento establecido en el presente documento puede comprender un microprocesador. El microprocesador puede ser cualquier microprocesador convencional de uno o varios chips de uso general, tal como un procesador Pentium™ fabricado por Intel Corporation. Un ordenador particularmente útil puede utilizar un procesador Intel Ivybridge dual de 12 núcleos, un controlador raid LSI, que tiene 128 GB de RAM y una unidad de disco de estado sólido de 2 TB. Además, el procesador puede comprender cualquier procesador de propósito especial convencional, tal como un procesador de señales digitales o un procesador de gráficos. El procesador puede tener líneas de direcciones convencionales, líneas de datos convencionales y una o más líneas de control convencionales.

Las realizaciones descritas en el presente documento pueden implementarse como un método, aparato, sistema o artículo de fabricación utilizando técnicas convencionales de programación o ingeniería para producir soporte lógico, soporte lógico inalterable, soporte físico o cualquier combinación de los mismos. El término "artículo de fabricación" en este contexto se refiere a código o lógica implementados en soporte físico o medios legibles por ordenador tales como dispositivos de almacenamiento óptico y dispositivos de memoria volátiles o no volátiles. Tal soporte físico puede incluir, pero sin limitarse a, matriz de puertas lógicas programable en campo (FPGA), circuitos integrados para aplicaciones específicas (ASIC), dispositivos lógicos programables complejos (CPLD), matrices lógicas programables (PLA), microprocesadores u otros dispositivos de procesamiento similares. En realizaciones particulares, la información o los algoritmos establecidos en el presente documento están presentes en medios de almacenamiento no transitorios.

En realizaciones particulares, un método implementado por ordenador establecido en el presente documento se puede producir en tiempo real mientras se obtienen múltiples imágenes de un objeto. Tal análisis en tiempo real es particularmente útil para aplicaciones de secuenciación de ácidos nucleicos en donde una serie de ácidos nucleicos se somete a ciclos repetidos de etapas fluídicas y de detección. El análisis de los datos de secuenciación a menudo puede ser computacionalmente intensivo, de modo que puede ser beneficioso realizar los métodos establecidos en el presente documento en tiempo real o en segundo plano mientras se están procesando otros algoritmos de adquisición o análisis de datos. Los métodos de análisis en tiempo real ilustrativos que se pueden utilizar con los presentes métodos son los utilizados para los dispositivos de secuenciación MiSeq e HiSeq disponibles comercialmente en Illumina, Inc. (San Diego, CA) y/o descritos en Patente de Estados Unidos Núm. 8.965.076, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente.

Un método de la presente divulgación puede incluir una etapa de captura de analitos, tales como ácidos nucleicos,

para formar rasgos de analito sobre una superficie de soporte sólido. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos (u otros analitos) están en un fluido que se pone en contacto con un soporte sólido. Los ácidos nucleicos se capturan del fluido de manera que terminan aleatoriamente en rasgos particulares sobre la superficie. Como tales, los rasgos a los que se anclan los fragmentos pueden ser aleatorios con respecto a la predictibilidad o al conocimiento de dónde se anclará cualquier especie de ácido nucleico específica (es decir, qué secuencia de ácido nucleico estará presente en una ubicación particular), tanto si el patrón espacial de los rasgos es aleatorio, como si no.

Los analitos que se encuentran en un fluido se pueden transportar aleatoriamente a los rasgos sobre una superficie mediante difusión pasiva o transporte activo. Las condiciones y técnicas ilustrativas que se pueden utilizar para tal transporte se conocen en la técnica o se ilustran en el presente documento en el contexto del transporte de ácidos nucleicos modificados a una superficie.

Un método de la presente divulgación puede incluir adicionalmente una etapa de amplificación de ácidos nucleicos en rasgos para producir amplicones. Los amplicones se pueden detectar, por ejemplo, mediante una técnica de secuenciación de ácidos nucleicos como se expone a continuación. En realizaciones particulares, los ácidos nucleicos se pueden amplificar utilizando al menos un cebador que está anclado a la superficie. Un cebador que se utiliza para amplificación puede, al menos en algunas configuraciones, hibridar con un sitio de cebado en un ácido nucleico. El cebador se puede extender para producir los amplicones que se anclan a la superficie. Los métodos de extensión en fase sólida se pueden utilizar como se establece con más detalle a continuación.

Un método de la presente divulgación puede incluir una etapa de amplificación de porciones de un ácido nucleico diana, ácido nucleico modificado o fragmentos del mismo. Puede utilizarse cualquier metodología de amplificación adecuada conocida en la técnica. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se amplifican en un rasgo que está presente sobre un soporte sólido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se amplifican utilizando metodologías de amplificación en puente como se ilustra mediante las divulgaciones de las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.641.658; 7.115.400; 7.741.463; 7.790.418; las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Núm. 2002/0055100; 2004/0002090; y 2008/0009420, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Los métodos de amplificación en puente permiten inmovilizar productos de amplificación sobre un soporte sólido para formar matrices compuestas por agrupaciones (o "colonias") de moléculas de ácido nucleico inmovilizadas. Cada agrupación o colonia sobre tal matriz se forma a partir de una pluralidad de hebras polinucleotídicas inmovilizadas idénticas y una pluralidad de hebras polinucleotídicas complementarias inmovilizadas idénticas. Las matrices así formadas pueden denominarse en el presente documento "matrices agrupadas". Los productos de las reacciones de amplificación en fase sólida son las llamadas estructuras "puenteadas" cuando se forman por pares reasociados de hebras polinucleotídicas inmovilizadas y hebras complementarias inmovilizadas, estando ambas hebras inmovilizadas sobre el soporte sólido en el extremo 5', preferiblemente mediante un anclaje covalente. Las metodologías de amplificación en puente son ejemplos de métodos en donde se utiliza un molde de ácido nucleico inmovilizado para producir amplicones inmovilizados. También se pueden utilizar otras metodologías adecuadas para producir amplicones inmovilizados a partir de ácidos nucleicos inmovilizados producidos de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, se pueden formar una o más agrupaciones o colonias a través de la reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida (PCR), amplificación de desplazamiento múltiple en fase sólida (MDA), amplificación de círculo rodante en fase sólida (RCA), etc., si se inmovilizan uno o ambos cebadores de cada par de cebadores de amplificación.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos diana, los ácidos nucleicos modificados o sus fragmentos se amplifican en solución. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los cebadores de amplificación hibridan con sitios de cebado de insertos en solución. En otras realizaciones, los cebadores de amplificación hibridan con los insertos cuando se anclan ácidos nucleicos modificados o fragmentos de los mismos a un soporte sólido. Los ácidos nucleicos se pueden amplificar en solución antes de ser anclados a los rasgos. Los amplicones anclados se pueden amplificar opcionalmente una segunda vez utilizando los métodos de amplificación en fase sólida expuestos en el presente documento.

Se apreciará que cualquiera de las metodologías de amplificación descritas en el presente documento o conocidas en la técnica se puede utilizar con cebadores universales o específicos de la diana para amplificar fragmentos de ADN inmovilizados. Los métodos adecuados para la amplificación incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.003.354, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente. Los métodos de amplificación anteriores se pueden emplear para amplificar uno o más ácidos nucleicos de interés. Por ejemplo, se pueden utilizar PCR, PCR multiplex, SDA, TMA, NASBA y similares para amplificar fragmentos de ácido nucleico inmovilizados. En algunas realizaciones, los cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés se incluyen en la reacción de amplificación.

Otros métodos adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir extensión y ligación de oligonucleótidos, amplificación de círculo rodante (RCA) (Lizardi et al., *Nat. Genet.* 19:225-232 (1998), a la cual se debe hacer referencia adicionalmente) y ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Véanse las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.582.420, 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907; y en los documentos EP 0 320 308 B1; EP 0 336 731 B1; EP 0 439 182 B1; WO 90/01069; WO 89/12696; y WO 89/09835, a cada uno de los cuales se debe hacer referencia adicionalmente). Se apreciará que estas metodologías de amplificación se pueden diseñar para amplificar

ácidos nucleicos inmovilizados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método de amplificación puede incluir reacciones de amplificación con sonda de ligación o ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) que contienen cebadores dirigidos específicamente al ácido nucleico de interés. En algunas realizaciones, el método de amplificación puede incluir una reacción de ligación-extensión de cebadores que contiene cebadores dirigidos específicamente al

5 ácido nucleico de interés. Como ejemplo no limitante de los cebadores de la extensión y ligación de cebadores que pueden diseñarse específicamente para amplificar un ácido nucleico de interés, la amplificación puede incluir cebadores utilizados para el ensayo GoldenGate® (Illumina, Inc., San Diego, CA) como se ilustra en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.582.420 y 7.611.869, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

Puede utilizarse una técnica de amplificación isotérmica en un método de la presente divulgación. Los ejemplos de métodos de amplificación isotérmica incluyen, pero no se limitan a, Amplificación de Desplazamiento Múltiple (MDA) como ilustran, por ejemplo, Dean et al., en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5261-66 (2002) o amplificación de ácido nucleico por desplazamiento de hebra isotérmica como se ilustra, por ejemplo, mediante la Patente de Estados Unidos Núm. 6.214.587, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Otros métodos no basados en PCR que se pueden utilizar en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) que describen, por ejemplo, Walker et al., en *Molecular Methods for Virus Detection*, Academic Press, Inc., 1995; Patentes de Estados Unidos Núm. 5.455.166, y 5.130.238, y Walker et al., en *Nucl. Acids Res.* 20:1691-96 (1992) o amplificación por desplazamiento de hebra hiperramificada que describen, por ejemplo, Lage et al., en *Genome Research* 13:294-307 (2003), a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. La descripción adicional de las reacciones, condiciones y componentes de amplificación se expone en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.670.810, a la cual se debe hacer referencia adicionalmente. Otras técnicas de amplificación isotérmica útiles incluyen técnicas de amplificación facilitadas por recombinasa tales como las comercializadas como kits TwistAmp™ por TwistDx (Cambridge, Reino Unido). Los componentes útiles del reactivo de amplificación facilitado por recombinasa y las condiciones de reacción se exponen en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.223.414 y 7.399.590, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. La amplificación dependiente de

10

15

20

25

se debe hacer referencia adicionalmente.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir una etapa de secuenciación de ácidos nucleicos en matrices. Un ejemplo es la secuenciación por síntesis (SBS). En la SBS, se controla la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico para determinar la secuencia de nucleótidos en el molde. El cebador puede hibridar con un sitio de cebado que está presente en un inserto como se expuso anteriormente. El procedimiento químico subyacente puede ser la polimerización (p. ej., catalizada por una enzima polimerasa). En una realización de SBS basada en polimerasa particular, los nucleótidos marcados con fluorescencia se añaden a un cebador (extendiendo así el cebador) de una manera dependiente del molde, de modo que la detección del orden y tipo de nucleótidos añadidos al cebador se puede utilizar para determinar la secuencia del molde. Una pluralidad de diferentes fragmentos de ácido nucleico que se han anclado en diferentes ubicaciones de una matriz utilizando las etapas expuestas en el presente documento pueden someterse a una técnica de SBS en condiciones en las que se pueden distinguir los eventos que ocurren para diferentes moldes debido a su ubicación en la matriz.

30

35

Las celdas de flujo proporcionan un formato conveniente para albergar una matriz de ácidos nucleicos que se produce mediante los métodos de la presente divulgación y que se somete a una SBS u otra técnica de detección que implica el suministro repetido de reactivos en ciclos. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, uno o más nucleótidos marcados, ADN polimerasa, etc., pueden fluir hacia/a través de una celda de flujo que alberga una matriz de ácidos nucleicos. Se pueden detectar aquellos rasgos de una matriz donde la extensión del cebador (p. ej., mediante la hibridación del cebador a un sitio de cebado ubicado en un inserto anclado a un ácido nucleico) hace que se incorpore un nucleótido marcado. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir adicionalmente una propiedad de terminación reversible que termina la extensión adicional del cebador una vez que se ha añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, un análogo de nucleótido que tiene un radical terminador reversible puede añadirse a un cebador de manera que la extensión posterior no pueda ocurrir hasta que se suministre un agente de desbloqueo para eliminar el radical. Por tanto, para las realizaciones que utilizan terminación reversible, se puede suministrar un reactivo de desbloqueo a la celda de flujo (antes o después de que se produzca la detección). Se pueden realizar lavados entre las distintas etapas de suministro. A continuación, el ciclo puede repetirse n veces para extender el cebador en n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n. Los procedimientos de SBS, sistemas fluidicos y plataformas de detección ilustrativos que pueden adaptarse fácilmente para su uso con una matriz producida por los métodos de la presente divulgación son descritos, por ejemplo, por Bentley et al., en *Nature* 456:53-59 (2008), Patentes de Estados Unidos Núm. 7.057.026; 7.329.492; 7.211.414; 7.315.019; 7.405.281; 8.343.746; y en los documentos WO 04/018497; WO 91/06678; WO 07/123744, a cada uno de los cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

40

45

50

55

Se pueden utilizar otros procedimientos de secuenciación que utilizan reacciones cíclicas, tales como la pirosecuenciación. La pirosecuenciación detecta la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) a medida que se incorporan nucleótidos particulares a una hebra de ácido nucleico naciente (Ronaghi, et al., *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi et al. *Science* 281(5375), 363 (1998); Patentes de Estados Unidos Núm. 6.210.891; 6.258.568; y 6.274.320, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente). En la pirosecuenciación, el PPi liberado puede detectarse convirtiéndolo en trifosfato de adenosina (ATP) por la ATP sulfurilasa, y el nivel de ATP generado puede detectarse mediante fotones producidos por luciferasa. Por tanto, la reacción de secuenciación se puede controlar mediante un sistema de detección de

60

luminiscencia. Las fuentes de radiación de excitación utilizadas para los sistemas de detección basados en fluorescencia no son necesarias para los procedimientos de pirosecuenciación. Los sistemas, detectores y procedimientos fluidicos útiles que se pueden utilizar para la aplicación de pirosecuenciación a los métodos de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 7.244.559; 7.595.883; y 9.096.899 y la Publicación de Patente de Estados Unidos Núm. 2005/0191698 A1, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

Las reacciones de secuenciación por ligación también son útiles, incluidas, por ejemplo, las descritas por Shendure et al. *Science* 309:1728-1732 (2005); Patentes de Estados Unidos Núm. 5.599.675; y 5.750.341, a cada una de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. Algunas realizaciones pueden incluir procedimientos de secuenciación por hibridación como describen, por ejemplo, Bains et al., *Journal of Theoretical Biology* 135(3), 303-7 (1988); Drmanac et al., *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor et al., *Science* 251(4995), 767-773 (1995); y documento WO 1989/10977, a cada uno de las cuales se debe hacer referencia adicionalmente. En los procedimientos tanto de secuenciación por ligación como de secuenciación por hibridación, los ácidos nucleicos diana (o amplicones de los mismos) que están presentes en los rasgos de una matriz se someten a ciclos repetidos de suministro y detección de oligonucleótidos. Los sistemas fluidicos para los métodos de SBS como se establece en el presente documento o en las referencias citadas en el presente documento se pueden adaptar fácilmente para el suministro de reactivos para procedimientos de secuenciación por ligación o secuenciación por hibridación. Los oligonucleótidos pueden marcarse con fluorescencia y pueden detectarse utilizando detectores de fluorescencia similares a los descritos con respecto a los procedimientos de SBS en el presente documento o en las referencias citadas en el presente documento.

Algunas realizaciones pueden utilizar métodos que implican el seguimiento en tiempo real de la actividad de la ADN polimerasa. Por ejemplo, las incorporaciones de nucleótidos pueden detectarse mediante interacciones de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre una polimerasa que lleva fluoróforo y nucleótidos marcados con  $\gamma$ -fosfato. Las técnicas y reactivos para la secuenciación basada en FRET son descritas, por ejemplo, por Levene et al. en *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist et al. *Opp. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); y Korklach et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008), a las cuales se debe hacer referencia adicionalmente.

Los analitos pueden comprender restos ópticamente detectables. La pluralidad de analitos en cada uno de los rasgos puede comprender amplicones de un molde de ácido nucleico. Por otra parte, los analitos pueden seleccionarse del grupo que consiste en ácidos nucleicos, proteínas, células, núcleos, carbohidratos, candidatos a fármacos y miembros de una biblioteca de moléculas pequeñas.

En cuanto a los patrones, el primer patrón de rasgos puede estar en un primer plano plano y el segundo patrón de rasgos en un segundo plano plano que es paralelo al primer plano plano. El primer patrón de rasgos puede estar en un primer plano curvo y el segundo patrón de rasgos en un segundo plano curvo. Por otra parte, un área para cada uno de los rasgos del primer patrón puede ser la misma que el área para cada una de los rasgos del segundo patrón. El primer patrón tiene el mismo paso que el segundo patrón. En algunas realizaciones, los patrones pueden tener una configuración seleccionada del grupo que consiste en una celosía cuadrada, una celosía rectangular, una celosía rómbica, una celosía hexagonal y una celosía oblicua. Los rasgos del primer y segundo patrones pueden estar en comunicación de fluido simultánea con un fluido. Los rasgos del primer patrón pueden acoplarse ópticamente a una guía de ondas, mientras que los rasgos del segundo patrón no están sustancialmente acoplados ópticamente a la guía de ondas. En tales casos, la detección de las señales ópticas en la primera elevación  $z_1$  puede comprender excitar ópticamente los rasgos del analito del primer patrón a través de una guía de ondas. Los rasgos del analito del segundo patrón pueden no estar acoplados ópticamente sustancialmente a la guía de ondas.

Adicionalmente, como se indica, los rasgos y el soporte pueden proporcionarse en una celda de flujo o pueden ser parte de ella. La superficie exterior del soporte sólido puede estar en contacto con el lumen de la celda de flujo. El soporte sólido puede comprender una primera ventana de la celda de flujo y la celda de flujo puede comprender una segunda ventana que es paralela a la primera ventana, estando separada la primera ventana de la segunda ventana por el lumen de la celda de flujo. La segunda ventana puede comprender una segunda superficie exterior que comprende un tercer subconjunto de contornos colocados a lo largo de la segunda superficie exterior para formar un tercer patrón de rasgos y un cuarto subconjunto de contornos a lo largo de la segunda superficie exterior para formar un cuarto patrón de rasgos. En tales realizaciones, los contornos del tercer subconjunto pueden yuxtaponerse a los contornos del cuarto subconjunto a lo largo de la segunda superficie exterior, por lo que los patrones tercero y cuarto forman un segundo patrón intercalado a lo largo de la segunda superficie exterior, y los rasgos del tercer patrón ocurren aparecen a una tercera elevación  $z_3$  y los rasgos del cuarto patrón aparecen en una cuarta elevación  $z_4$ .

Con respecto a las señales y la detección de señales y analitos, la tecnología de detección puede ser óptica y puede comprender detección confocal. Los rasgos del analito en el segundo patrón pueden distinguirse de los rasgos del analito vecino más cercano en el primer patrón enfocando selectivamente un detector óptico a la segunda elevación  $z_2$  en comparación con la primera elevación  $z_1$ . Por otra parte, los rasgos del analito en el primer patrón pueden distinguirse de los rasgos del analito vecino más cercano en el segundo patrón excitando selectivamente los luminóforos en la primera elevación  $z_1$  en comparación con la segunda elevación  $z_2$ . Los rasgos del analito en el segundo patrón pueden distinguirse de los rasgos del analito vecino más cercano en el primer patrón excitando selectivamente los luminóforos en la segunda elevación  $z_2$  en comparación con la primera elevación  $z_1$ . Aquí

nuevamente, los rasgos del analito pueden comprender depresiones, pocillos, canales, proyecciones, crestas o postes. Los rasgos del analito pueden comprender también o en su lugar pocillos y la detección de las señales ópticas comprende la detección de analitos en los pocillos. La detección de las señales ópticas en la primera elevación z1 puede comprender la detección de analitos en pocillos que tienen un fondo en la elevación z1 y la detección de señales ópticas en la primera elevación z2 puede comprender la detección de analitos en pocillos que tienen un fondo en la elevación z2. Y de nuevo, los rasgos del analito pueden comprender postes y la detección de las señales ópticas puede comprender la detección de analitos sobre la parte superior de los postes. En tales casos, la detección de señales ópticas en la primera elevación z1 puede comprender la detección de analitos sobre postes que tienen una parte superior en la elevación z1 y la detección de señales ópticas en la primera elevación z1 puede comprender la detección de analitos sobre postes que tienen una parte superior en la elevación z2. La detección de las señales ópticas puede comprender características distintivas que tengan un área en el plano xy menor de aproximadamente  $1 \mu\text{m}^2$ . Las elevaciones z1 y z2 pueden estar separadas por al menos  $2 \mu\text{m}$ . La detección puede utilizar un plano focal que tenga un grosor inferior a aproximadamente  $2 \mu\text{m}$ . En alguna realización, la detección utiliza un plano focal que tiene un grosor que es menor que la distancia entre z1 y z2.

Asimismo, para la detección, la detección de señales, tales como señales ópticas, puede comprender un movimiento relativo entre la matriz y un detector óptico en un procedimiento de exploración de puntos, exploración de líneas o formación de imágenes por multisegmentos estáticos. El movimiento relativo puede estar en las dimensiones xy. El movimiento relativo para la detección de las señales ópticas en la primera elevación z1 puede ser paralelo al movimiento relativo para la detección de las señales ópticas en la segunda elevación z2. Cuando la superficie exterior del soporte sólido es curva, el movimiento relativo puede ser a lo largo de un plano curvo. El movimiento relativo para la detección de las señales ópticas en la primera elevación z1 puede ser concéntrico al movimiento relativo para la detección de las señales ópticas en la segunda elevación z2.

Como también se comentó anteriormente, la tecnología también puede incluir poner en contacto la matriz con un fluido que comprende un reactivo que modifica los rasgos del analito, en donde los rasgos del primer y segundo patrones están en comunicación de fluido simultánea con el fluido. En tales casos, los rasgos del analito pueden comprender ácidos nucleicos y el reactivo puede comprender un reactivo utilizado en una reacción de secuenciación de ácidos nucleicos. Los rasgos del analito pueden comprender ácidos nucleicos y el reactivo puede comprender ácidos nucleicos complementarios que hibridan con los ácidos nucleicos.

Los términos "sustancialmente" y "aproximadamente" utilizados a lo largo de esta divulgación, incluidas las reivindicaciones, se utilizan para describir y dar cuenta de pequeñas fluctuaciones, tales como las debidas a variaciones en el procesamiento. Por ejemplo, pueden referirse a menor o igual a  $\pm 5\%$ , tal como menor o igual a  $\pm 2\%$ , tal como menor o igual a  $\pm 1\%$ , tal como menor o igual a  $\pm 0,5\%$ , tal como menor o igual a  $\pm 0,2\%$ , tal como menor o igual a  $\pm 0,1\%$ , tal como menor o igual a  $\pm 0,05\%$ .

En el presente documento, se pretende que el término que comprende sea de un extremo abierto, que incluye no solo los elementos enumerados, sino que además abarque cualquier elemento adicional.

Se han descrito varias realizaciones. No obstante, se entenderá que se pueden realizar varias modificaciones. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema que comprende:

una matriz que comprende

un soporte sólido que tiene una superficie exterior que comprende un primer conjunto de pocillos intercalados con un segundo conjunto de pocillos, el primer conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos;

en donde el primer conjunto de pocillos se yuxtapone al segundo conjunto de pocillos,

teniendo cada pocillo del primer conjunto un primer fondo a una primera elevación,  $z_1$ , con respecto al soporte sólido,

teniendo cada pocillo del segundo conjunto un segundo fondo a una segunda elevación,  $z_2$ , con respecto al soporte sólido;

en donde la altura de la primera elevación,  $z_1$ , y la segunda elevación,  $z_2$ , a lo largo del eje  $z$  es diferente; y

en donde cada pocillo del primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende puntos de anclaje para anclar analitos mediante unión directa o indirecta al soporte sólido, por medio de lo cual los primeros pocillos están configurados para anclar analitos a una elevación diferente con respecto a los analitos anclados al segundo conjunto de pocillos; el sistema está **caracterizado porque** un paso entre un pocillo del primer conjunto de pocillos y cada pocillo vecino del segundo conjunto de pocillos en la matriz es menor de 500 nm **y porque** el sistema comprende adicionalmente

una guía de ondas acoplada ópticamente de forma selectiva al primer conjunto de pocillos y no acoplada ópticamente al segundo conjunto de pocillos.

2. El sistema de la reivindicación 1, en donde cada uno de los pocillos en el primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos ocupa un área que es menor de  $1 \mu\text{m}^2$ .

3. El sistema de la reivindicación 1, en donde la diferencia de altura entre la primera elevación,  $z_1$ , y la segunda elevación,  $z_2$ , a lo largo del eje  $z$  es superior a  $2 \mu\text{m}$ .

4. El sistema de la reivindicación 1, en donde cada pocillo del primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos incluye un material que es capaz de anclarse a un analito.

5. El sistema de la reivindicación 1, en donde el primer conjunto de pocillos tiene el mismo patrón de celosía que el segundo conjunto de pocillos.

6. Un método para detectar una pluralidad de analitos, que comprende:

proporcionar una guía de ondas y una matriz que comprende un soporte sólido que tiene una superficie exterior del soporte sólido que comprende un primer conjunto de pocillos intercalados con un segundo conjunto de pocillos en donde el primer conjunto de pocillos se yuxtapone al segundo conjunto de pocillos,

el primer conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende un patrón de repetición de pocillos, teniendo cada pocillo del primer conjunto un primer fondo a una primera elevación,  $z_1$ , con respecto al soporte sólido, teniendo cada pocillo del segundo conjunto un segundo fondo a una segunda elevación,  $z_2$ , con respecto al soporte sólido, estando la guía de ondas acoplada ópticamente de forma selectiva al primer conjunto de pocillos, cada uno de los cuales tiene un primer fondo a la primera elevación  $z_1$  y no acoplada ópticamente al segundo conjunto de pocillos,

detectar señales a la primera elevación,  $z_1$ , que responden a los analitos de excitación óptica a través de la guía de ondas, por medio de lo cual los rasgos de los analitos individuales del primer conjunto de pocillos se distinguen entre sí; y

detectar señales a la segunda elevación,  $z_2$ , por medio de lo cual los rasgos de los analitos individuales del segundo conjunto de pocillos se distinguen entre sí,

en donde la altura entre la primera elevación,  $z_1$ , y la segunda elevación,  $z_2$ , a lo largo del eje  $z$  es diferente,

y en donde un paso entre el primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos es menor de 500 nm; y en donde cada pocillo del primer conjunto de pocillos y el segundo conjunto de pocillos comprende puntos de anclaje para anclar analitos mediante unión directa o indirecta al soporte sólido, por medio de lo cual los primeros pocillos están configurados para anclar analitos a una elevación diferente con respecto a los analitos anclados al segundo conjunto de pocillos.

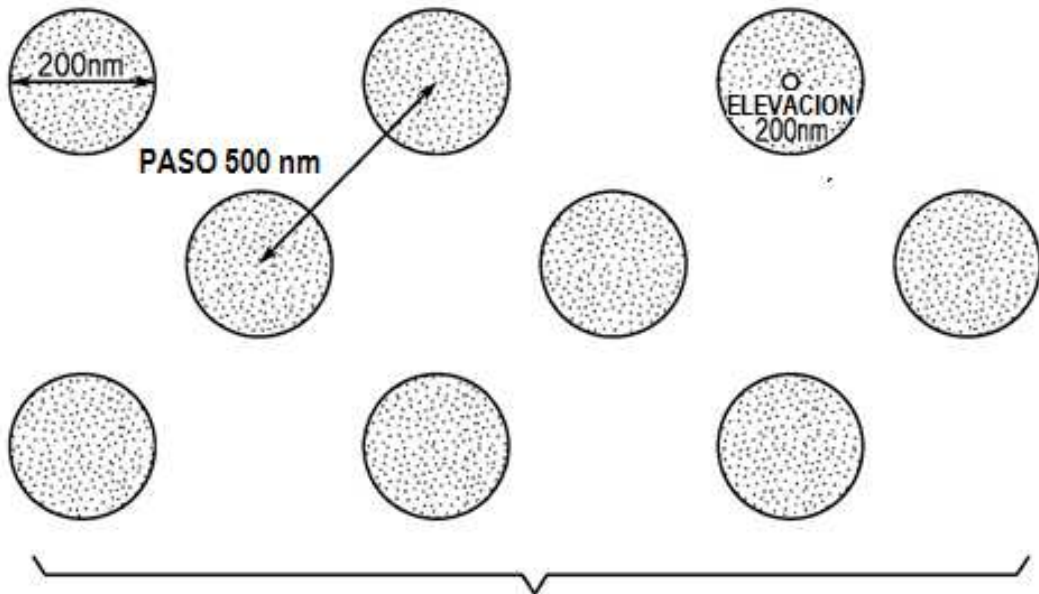


FIG. 1A

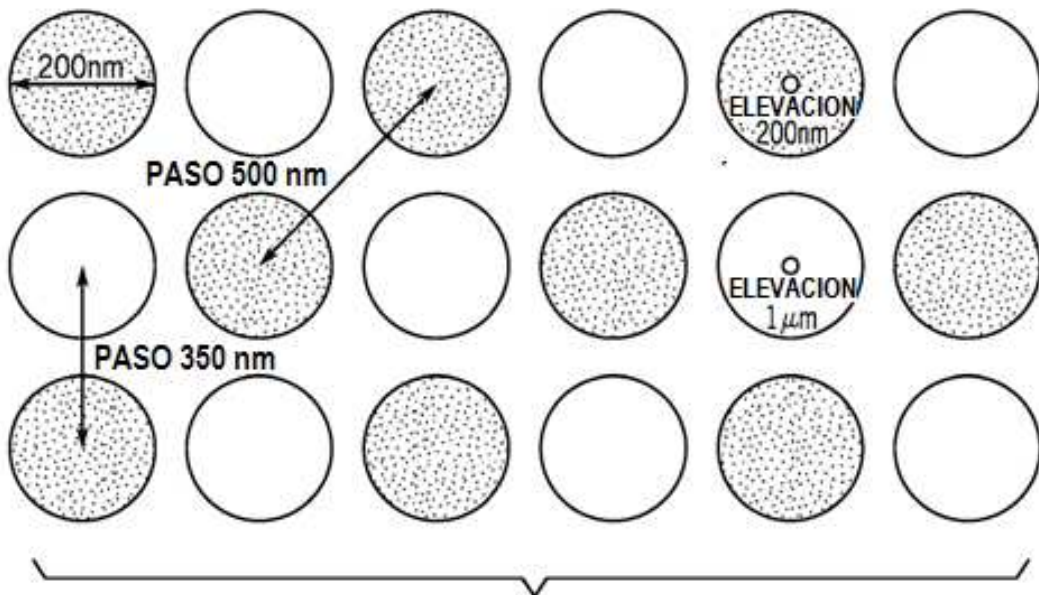
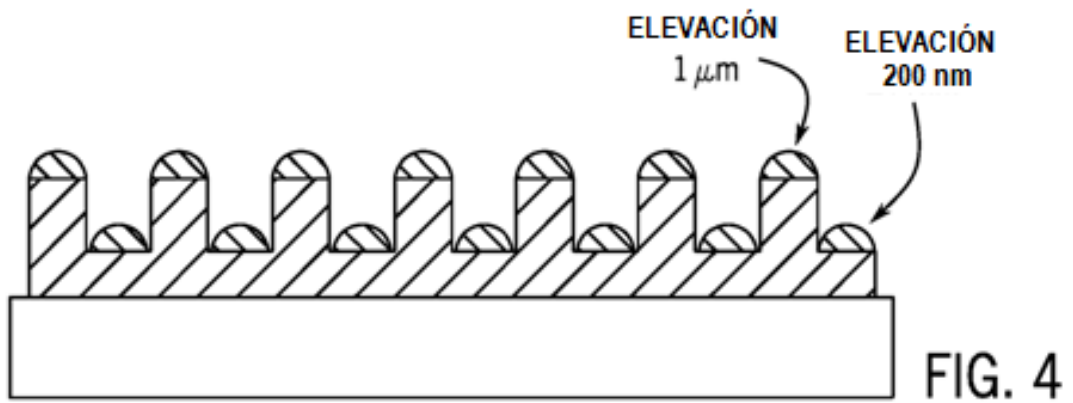
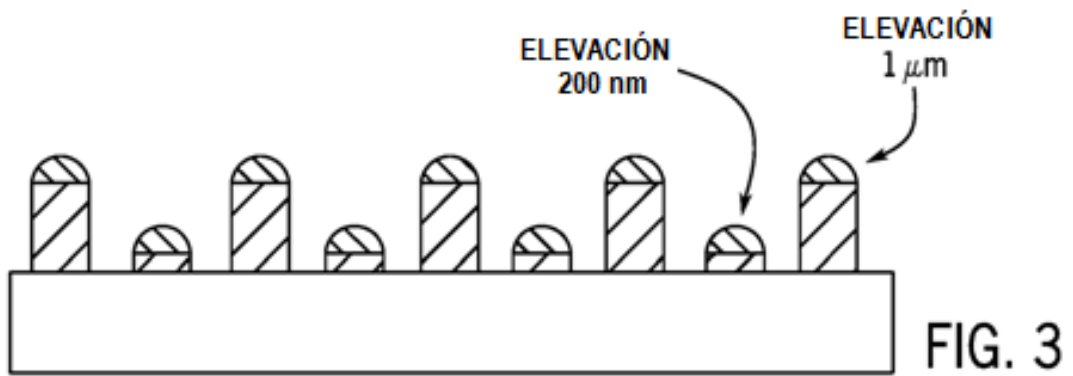
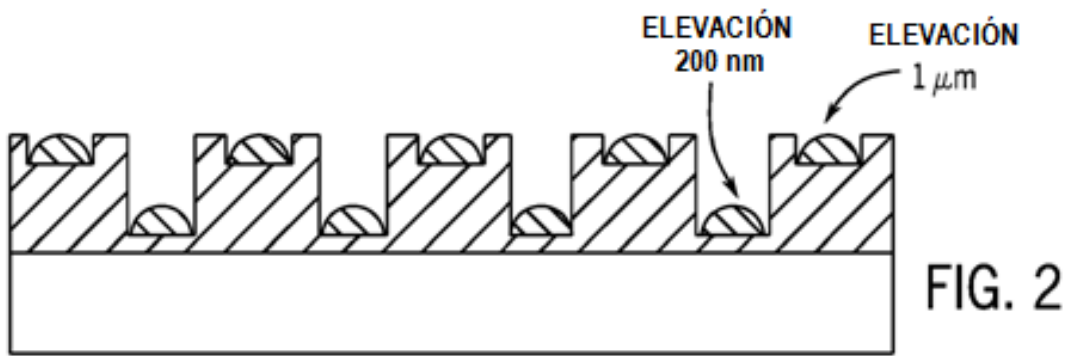


FIG. 1B



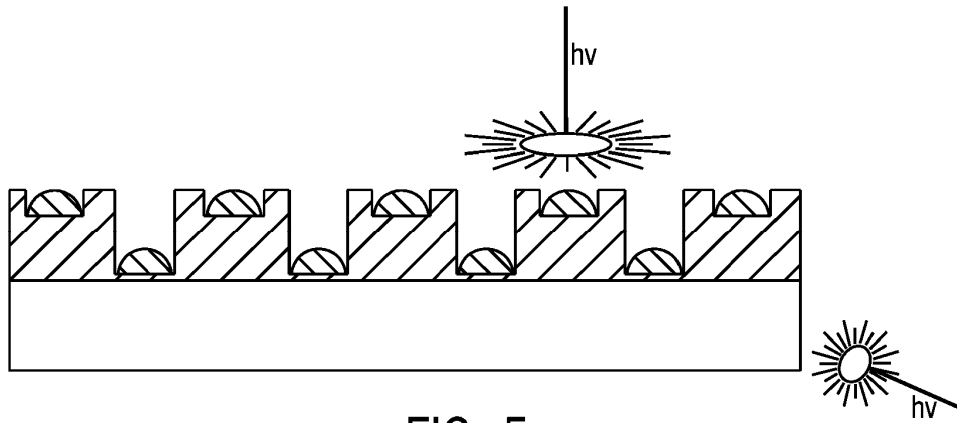


FIG. 5