

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 024**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

C12Q 1/6869 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2019 E 21184096 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3913358**

54 Título: **Secuenciación de alto rendimiento con detección basada en semiconductor**

30 Prioridad:

08.01.2018 US 201862614934 P

08.01.2018 US 201862614930 P

12.04.2018 NL 2020758

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

03.04.2024

73 Titular/es:

ILLUMINA INC (100.0%)

5200 Illumina Way

San Diego CA 92122, US

72 Inventor/es:

DEHLINGER, DIETRICH;

AGAH, ALI;

FUNG, HELEN TRACY y

KOSTEM, EMRAH

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 964 024 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

Secuenciación de alto rendimiento con detección basada en semiconductor

Solicitudes prioritarias

Esta solicitud reivindica la prioridad o el beneficio de las siguientes solicitudes:

solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/614930, titulada “HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING WITH SEMICONDUCTOR-BASED DETECTION”, presentada el 8 de enero de 2018 (n.º de expediente del abogado ILLM 1003-1/IP-1653-PRV);

solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/614.934, titulada “SYSTEMS AND DEVICES FOR HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING WITH SEMICONDUCTOR-BASED DETECTION”, presentada el 8 de enero de 2018 (n.º de expediente del abogado ILLM 1003-2/IP-1656-PRV); y

solicitud de patente provisional estadounidense n.º 2020758, titulada “HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING WITH SEMICONDUCTOR-BASED DETECTION”, presentada el 12 de abril de 2018 (n.º de expediente del abogado ILLM 1003-6/IP-1653-NL).

Las solicitudes prioritarias se identifican como referencia.

Referencia a otras solicitudes

Las siguientes solicitudes de patente se identifican como referencia:

solicitud de patente no provisional estadounidense titulada “SYSTEMS AND DEVICES FOR HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING WITH SEMICONDUCTOR-BASED DETECTION”, presentada simultáneamente (n.º de expediente del abogado ILLM 1003-4/IP-1656-US);

solicitud de patente provisional de estadounidense titulada “MULTIPLEXING OF AN ACTIVE SENSOR DETECTOR USING STRUCTURED ILLUMINATION”, presentada el 8 de enero de 2018 (n.º de expediente del abogado IP-1623-PRV);

solicitud de patente no provisional estadounidense n.º 13/833.619, titulada “BIOSENSORS FOR BIOLOGICAL OR CHEMICAL ANALYSIS AND SYSTEMS AND METHODS FOR SAME”, presentada el 15 de marzo de 2013 (n.º de expediente del abogado IP-0626-US);

solicitud de patente no provisional estadounidense n.º 15/175.489, titulada “BIOSENSORS FOR BIOLOGICAL OR CHEMICAL ANALYSIS AND METHODS OF MANUFACTURING THE SAME”, presentada el 7 de junio de 2016 (n.º de expediente del abogado IP-0689-US);

solicitud de patente no provisional estadounidense n.º 13/882.088, titulada “MICRODEVICES AND BIOSENSOR CARTRIDGES FOR BIOLOGICAL OR CHEMICAL ANALYSIS AND SYSTEMS AND METHODS FOR THE SAME”, presentada el 26 de abril de 2013 (n.º de expediente del abogado IP-0462-US); y

solicitud de patente no provisional estadounidense n.º 13/624.200, titulada “METHODS AND COMPOSITIONS FOR NUCLEIC ACID SEQUENCING”, presentada el 21 de septiembre de 2012 (n.º de expediente del abogado IP-0538-US).

Campo de la tecnología descrita

Las realizaciones de la tecnología descrita se refieren, en líneas generales, a la secuenciación con detección basada en CMOS y, más particularmente, a sistemas y métodos para aumentar el rendimiento de secuenciación con detección basada en CMOS.

Antecedentes

En la investigación biológica o química, diversos protocolos implican realizar una gran cantidad de reacciones controladas en superficies de soporte locales o dentro de cámaras (o pocillos) de reacción predefinidas. Las reacciones deseadas, pueden después observarse o detectarse y un análisis posterior puede ayudar a identificar o revelar propiedades de productos químicos implicados en la reacción. Por ejemplo, en algunos ensayos múltiples, un analito desconocido (p. ej., clústeres de ácidos nucleicos amplificados clonalmente) que tiene una etiqueta identificable (p. ej., una etiqueta fluorescente) puede exponerse a miles de sondas conocidas en condiciones controladas. Cada sonda

conocida puede depositarse en un pocillo correspondiente de una microplaca o cubeta de lectura. Observar cualesquiera reacciones químicas que se produzcan entre las sondas conocidas y el analito desconocido dentro de los pocillos puede ayudar a identificar o revelar propiedades del analito. Otros ejemplos de tales protocolos incluyen procesos de secuenciación de ADN conocidos, tales como secuenciación por síntesis (SBS) o secuenciación de matriz

En algunos protocolos convencionales de detección fluorescente, se utiliza un sistema óptico para dirigir una luz de excitación sobre los analitos etiquetados con fluorescencia y también para detectar las señales fluorescentes que puedan emitir los analitos. Sin embargo, tales sistemas ópticos pueden ser relativamente costosos y requieren una superficie de sobremesa más grande. Por ejemplo, el sistema óptico puede incluir una disposición de lentes, filtros y fuentes de luz. En otros sistemas de detección propuestos, las reacciones controladas se producen inmediatamente sobre un generador de imágenes de estado sólido (p. ej., un dispositivo de carga acoplado (CCD, *charged-coupled device*) o un sensor semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS, *complementary metal-oxide-semiconductor*) que no requiere un gran conjunto óptico para detectar las emisiones fluorescentes.

En el documento US 2017/349944 A1 de Rothberg y col., titulado “PULSE CALLER AND BASE CALLER”, se describe un sistema y métodos para identificar nucleótidos basándose en datos adquiridos de un sensor durante la secuenciación de ácidos nucleicos.

En el documento US 2015/266022 A1 de Eltoukhy y col., titulado “MICRODEVICES AND BIOSENSOR CARTRIDGES FOR BIOLOGICAL OR CHEMICAL ANALYSIS AND SYSTEMS AND METHODS FOR THE SAME”, se describe una cubeta de lectura que incluye puertos de entrada y de salida en comunicación fluida entre sí a través de un canal de flujo que se extiende entre ambos. El fluido fluye a través de la región difusora en una primera dirección de flujo y a través de la región de campo en una segunda dirección de flujo. La primera y segunda direcciones de flujo son sustancialmente perpendiculares.

En el documento US 2016/356715 A1 de Zhong y col., titulado “BIOSENSORS FOR BIOLOGICAL OR CHEMICAL ANALYSIS AND METHODS OF MANUFACTURING THE SAME”, se describe un biosensor que incluye una base de dispositivo que tiene una matriz sensora de sensores de luz y una matriz de guía de guías de luz.

En el documento US 2014/274746 A1 de Khurana y col., titulado “SUPER RESOLUTION IMAGING”, se describe un aparato de detección que incluye una matriz de almohadillas sensibles sobre una superficie de sustrato.

En el documento WO 2017/184997 A1 de Topolancik y col., titulado “PHOTONIC STRUCTURE-BASED DEVICES AND COMPOSITIONS FOR USE IN LUMINESCENT IMAGING OF MULTIPLE SITES WITHIN A PIXEL, AND METHODS OF USING THE SAME”, se describe un dispositivo para su uso en la generación de imágenes luminiscentes. El dispositivo puede incluir una matriz de píxeles de generación de imágenes y una estructura fotónica dispuesta sobre la matriz de píxeles de generación de imágenes.

Sin embargo, los sistemas de generación de imágenes de estado sólido propuestos pueden tener algunas limitaciones. Por ejemplo, los generadores de imágenes de estado sólido están limitados a un clúster de lectura de nucleótidos por sensor (o píxel) y su rendimiento depende de la densidad de píxeles de los sensores, que es una función del paso de píxel. Dado que existen limitaciones a la hora de reducir significativamente el paso de píxel, resulta conveniente explorar otras soluciones para aumentar el rendimiento de los generadores de imágenes de estado sólido.

Surge una oportunidad para aumentar el rendimiento de los sistemas de generación de imágenes de estado sólido mediante la lectura de nucleótidos (o lectura de bases nucleotídicas, *base calling*) de múltiples clústeres por sensor (o píxel) y para proporcionar sistemas y dispositivos que faciliten la lectura de nucleótidos de múltiples clústeres por sensor (o píxel).

Las realizaciones de la presente descripción se refieren, en general, a análisis biológicos o químicos y, más particularmente, a sistemas y métodos que utilizan dispositivos de detección para análisis biológicos o químicos.

En la investigación biológica o química, diversos protocolos implican realizar una gran cantidad de reacciones controladas en superficies de soporte locales o dentro de cámaras de reacción predefinidas. Las reacciones deseadas, pueden después observarse o detectarse y un análisis posterior puede ayudar a identificar o revelar propiedades de productos químicos implicados en la reacción. Por ejemplo, en algunos ensayos múltiples, un analito desconocido que tiene una etiqueta identificable (por ejemplo, una etiqueta fluorescente) puede exponerse a miles de sondas conocidas en condiciones controladas. Cada sonda conocida puede depositarse en una superficie en una ubicación correspondiente. La observación de cualquiera de las reacciones químicas que se producen entre las sondas conocidas y el analito desconocido en la superficie, puede ayudar a identificar o revelar propiedades del analito. Otros ejemplos de tales protocolos incluyen procesos de secuenciación de ADN conocidos, tales como secuenciación por síntesis (SBS) o secuenciación de matriz cíclica.

En algunos protocolos convencionales de detección fluorescente, se utiliza un sistema óptico para dirigir una luz de excitación sobre los analitos etiquetados con fluorescencia y también para detectar las señales fluorescentes que

puedan emitir los analitos. El rendimiento de las técnicas estándar de generación de imágenes está limitado, entre otras cosas, por el número de píxeles disponibles en el dispositivo de detección. Como tales, estos sistemas ópticos pueden ser relativamente costosos y requieren una superficie de sobremesa relativamente grande cuando se detectan superficies que tienen grandes colecciones de analitos. Por ejemplo, las matrices de ácidos nucleicos utilizadas en análisis de genotipificación, expresión o secuenciación, pueden requerir la detección de millones de sitios diferentes en la matriz por centímetro cuadrado. Los límites del rendimiento aumentan el coste y disminuyen la precisión de estos análisis.

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

Breve descripción de la tecnología descrita

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un biosensor como se define en la reivindicación 1. Según un segundo aspecto, se proporciona un sistema para la lectura de nucleótidos como se define en la reivindicación 3. Según un tercer aspecto, se proporciona un método de lectura de nucleótidos como se define en la reivindicación 12. Según un cuarto aspecto, se proporciona un medio de almacenamiento no transitorio legible por ordenador como se define en la reivindicación 16. Otras realizaciones se proporcionan como se define en las reivindicaciones dependientes. Independientemente de lo que se menciona en la siguiente descripción detallada, el alcance de "la invención" está únicamente limitado y definido por las reivindicaciones adjuntas.

Los resultados de la secuencia de acontecimientos de muestreo pueden corresponder a bases de nucleótidos en los clústeres.

Los acontecimientos de muestreo pueden comprender dos fases de iluminación en secuencia temporal, y las secuencias de señales de píxel en la pluralidad de secuencias de señales de píxel pueden incluir un conjunto de muestras de señales para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto al menos una señal de píxel de cada una de las dos fases de iluminación.

El procesador de señales puede incluir lógica para clasificar resultados para dos clústeres de las secuencias de señales de píxel de un único sensor en la matriz de sensores. La lógica para clasificar resultados para dos clústeres puede incluir mapear una primera señal de píxel del conjunto de muestras de señales para un acontecimiento de muestreo de un sensor particular en al menos cuatro contenedores, y mapear una segunda señal de píxel del conjunto de muestras de señales para el acontecimiento de muestreo en al menos cuatro contenedores, y combinar lógicamente el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para clasificar los resultados de dos clústeres.

Los sensores de la matriz de sensores pueden comprender detectores de luz.

Los acontecimientos de muestreo pueden comprender dos fases de iluminación en secuencia temporal, y las secuencias de señales de píxel en la pluralidad de secuencias de señales de píxel pueden incluir un conjunto de muestras de señales para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto al menos una señal de píxel de cada una de las dos fases de iluminación. La primera fase de iluminación puede inducir la iluminación desde un clúster dado que indica las bases de nucleótidos A y T y la segunda fase de iluminación puede inducir la iluminación desde un clúster dado que indica las bases de nucleótidos C y T, y dichos resultados de clasificación pueden comprender la lectura de una de las bases de nucleótidos A, C, T o G.

Los clústeres pueden distribuirse irregularmente sobre las áreas de píxel de la superficie de muestra, y el procesador de señales puede ejecutar un análisis de secuencia temporal y espacial de la pluralidad de secuencias de señales de píxel para detectar patrones de iluminación correspondientes a clústeres individuales en la superficie de muestra, y clasificar los resultados de los acontecimientos de muestreo para los clústeres individuales. La pluralidad de secuencias de señales de píxel codifica la interferencia diferencial entre al menos dos clústeres resultantes de su distribución irregular sobre las áreas de píxel.

La superficie de muestra puede comprender una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, incluidos dos pocillos por área de píxel, los dos pocillos por área de píxel pueden incluir un pocillo dominante y un pocillo subordinado, el pocillo dominante puede tener una mayor sección transversal sobre el área de píxel que el pocillo subordinado.

La superficie de muestra puede comprender una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, y los acontecimientos de muestreo pueden incluir al menos una fase química con un número K de fases de iluminación donde K es un número entero positivo. Las fases de iluminación de las K fases de iluminación pueden iluminar las áreas de píxel con diferentes ángulos de iluminación, y las secuencias de señales de píxel pueden incluir un conjunto de muestras de señales para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto el número K de señales de píxel para al menos una fase química de los acontecimientos de muestreo.

La superficie de muestra puede comprender una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, y los acontecimientos de muestreo pueden incluir una primera fase química con un número K de fases de iluminación donde K es un número

- entero positivo. Las fases de iluminación de las K fases de iluminación pueden iluminar las áreas de píxel con diferentes ángulos de iluminación, y una segunda fase química con un número J de fases de iluminación donde J es un número entero positivo. Las fases de iluminación de las K fases de iluminación en la primera fase química y de las J fases de iluminación en la segunda fase química pueden iluminar los pocillos en la matriz de pocillos con diferentes ángulos de iluminación, y las secuencias de señales de píxel pueden incluir un conjunto de muestras de señales para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto el número K de señales de píxel para la primera fase química más el número J de señales de píxel para la segunda fase química de los acontecimientos de muestreo.
- Un área de píxel puede recibir luz de un pocillo en la superficie de muestra y el pocillo puede contener más de un clúster durante el ciclo de lectura de nucleótidos.
- Un clúster puede comprender una pluralidad de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (abreviado ADN) monocatenario, que tienen una secuencia de ácido nucleico idéntica.
- El método también puede incluir mapear la primera señal de píxel en al menos cuatro contenedores y mapear la segunda señal de píxel en al menos cuatro contenedores, y combinar el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos incorporadas.
- El método también puede incluir aplicar el método para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en una pluralidad de áreas de píxel durante el ciclo de lectura de nucleótidos.
- El método también puede incluir repetir el método a lo largo de sucesivos ciclos de lectura de nucleótidos para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel durante cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos.
- Para cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos, el método también puede incluir detectar y almacenar la primera y segunda señal de píxel emitidas por la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel, y después los ciclos de lectura de nucleótidos, utilizando la combinación de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel durante cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos anteriores.
- La primera área de píxel puede recibir luz de un pocillo asociado en una superficie de muestra. La primera área de píxel puede recibir luz de más de un pocillo asociado en la superficie de muestra. La primera y segunda señal de píxel pueden recogerse en un primer sensor de la primera zona de píxel. La primera y segunda señal de píxel puede detectarse mediante un procesador de señales configurado para procesar señales de píxel recogidas por el primer sensor. La primera fase de iluminación puede inducir la iluminación del primer y segundo clúster para producir emisiones de las bases de nucleótidos A y T etiquetadas y la segunda fase de iluminación puede inducir la iluminación del primer y segundo clúster para producir emisiones de las bases de nucleótidos C y T etiquetadas.
- En otra realización, se proporciona un método para identificar áreas de píxel con más de un clúster en una superficie de muestra de un biosensor y clústeres de lectura de nucleótidos en las áreas de píxel identificadas como se define en la reivindicación 14 adjunta.
- El método puede incluir un ajuste que comprende el uso de uno o más algoritmos, incluido un algoritmo de clusterización K-medias, un algoritmo de clusterización similar a K-medias, un algoritmo de maximización de expectativas y un algoritmo basado en histograma.
- El método puede incluir la normalización de los valores de intensidad.
- El área de píxel puede recibir luz desde un pocillo asociado en la superficie de muestra.
- En otra realización, se proporciona un sistema para la lectura de nucleótidos como se define en la reivindicación 3 adjunta.
- El procesador de señales puede usar los patrones de iluminación detectados para localizar el número $N + M$ de clústeres individuales en la superficie de muestra a partir del número N de sensores activos.
- En otra realización, el sistema puede comprender una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, incluidos dos pocillos por área de píxel. Los dos pocillos por área de píxel incluyen un pocillo dominante y un pocillo subordinado. El pocillo dominante tiene una mayor sección transversal sobre el área de píxel que el pocillo subordinado.
- Los dos pocillos pueden tener diferentes desviaciones con respecto a un centro del área de píxel. Durante un acontecimiento de muestreo, el área de píxel puede recibir diferentes cantidades de iluminación de los dos pocillos. Cada uno de los dos pocillos puede contener al menos un clúster durante el acontecimiento de muestreo. Durante el acontecimiento de muestreo, el área de píxel puede recibir una cantidad de iluminación de un clúster más claro en el

pocillo dominante que es mayor que la cantidad de iluminación recibida de un clúster más oscuro en el pocillo subordinado.

El biosensor puede acoplarse a un procesador de señales. El procesador de señales puede configurarse para recibir y procesar la pluralidad de secuencias de señales de píxel para identificar bases de nucleótidos presentes en un número $N + M$ de clústeres a partir del número N de sensores activos. Para el clúster más claro y más oscuro, esto puede incluir mapear en al menos cuatro contenedores una primera señal de píxel generada por un sensor correspondiente al área de píxel durante una primera fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, mapear en al menos cuatro contenedores una segunda señal de píxel generada por el sensor durante una segunda fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, y combinar lógicamente el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos presentes en el clúster más claro y el clúster más oscuro.

El biosensor también tiene una matriz de sensores configurada para generar una pluralidad de secuencias de señales de píxel. La matriz tiene un número N de sensores activos. Los sensores de la matriz están dispuestos con respecto a la superficie de muestra para generar señales de píxel respectivas durante la secuencia de acontecimientos de muestreo del número N de áreas de píxel correspondientes de la superficie de muestra para producir la pluralidad de secuencias de señales de píxel. El biosensor también tiene un puerto de comunicación que emite la pluralidad de secuencias de señales de píxel.

En otra realización más, el sistema puede comprender un sistema de iluminación. El sistema de iluminación ilumina las áreas de píxel con diferentes ángulos de iluminación durante una secuencia de acontecimientos de muestreo, incluyendo para un acontecimiento de muestreo en la secuencia de acontecimientos de muestreo iluminar cada uno de los pocillos con iluminación fuera del eje para producir regiones de pocillos iluminadas asimétricamente en cada uno de los pocillos.

Las regiones iluminadas asimétricamente de un pocillo pueden incluir al menos una región de pocillo dominante y una región de pocillo subordinado, de modo que durante el acontecimiento de muestreo la región de pocillo dominante esté más iluminada que la región de pocillo subordinado. El pocillo puede contener más de un clúster durante el acontecimiento de muestreo, incluyendo cada una de las regiones de pocillo dominante y subordinado un clúster. Durante el acontecimiento de muestreo, un área de píxel que cubre el pocillo puede recibir una cantidad de iluminación de un clúster más claro en la región del pocillo dominante que sea mayor que la cantidad de iluminación recibida de un clúster más oscuro en la región del pocillo subordinado.

La iluminación fuera del eje puede tener un ángulo de cuarenta y cinco grados. En algunas realizaciones, se superpone un pocillo por área de píxel. En otras realizaciones, se superponen dos pocillos por área de píxel.

El biosensor puede acoplarse a un procesador de señales. El procesador de señales puede configurarse para recibir y procesar la pluralidad de secuencias de señales de píxel para identificar bases de nucleótidos presentes en un número $N + M$ de clústeres a partir del número N de sensores activos. Para el clúster más claro y más oscuro, esto puede incluir mapear en al menos cuatro contenedores una primera señal de píxel generada por un sensor correspondiente al área de píxel durante una primera fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, mapear en al menos cuatro contenedores una segunda señal de píxel generada por el sensor durante una segunda fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, y combinar lógicamente el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos presentes en el clúster más claro y el clúster más oscuro.

El biosensor también tiene una matriz de sensores configurada para generar una pluralidad de secuencias de señales de píxel. La matriz tiene un número N de sensores activos. Los sensores de la matriz están dispuestos con respecto a la superficie de muestra para generar señales de píxel respectivas durante la secuencia de acontecimientos de muestreo a partir del número N de áreas de píxel correspondientes de la superficie de muestra para producir la pluralidad de secuencias de señales de píxel. El biosensor también tiene un puerto de comunicación que emite la pluralidad de secuencias de señales de píxel.

Los resultados de la secuencia de acontecimientos de muestreo pueden corresponder a bases de nucleótidos en los clústeres.

Los acontecimientos de muestreo pueden comprender dos fases de iluminación en secuencia temporal, y dicha al menos una secuencia de señales de píxel en la pluralidad de secuencias de señales de píxel puede incluir una señal de píxel que incluya información de al menos dos clústeres en el área de píxel correspondiente de cada una de las dos fases de iluminación.

El procesador de señales puede incluir lógica para clasificar resultados de dos clústeres de las secuencias de señales de píxel de dicha al menos una secuencia de señales de píxel. La lógica para clasificar resultados para dos clústeres puede incluir mapear una primera señal de píxel en dicha al menos una secuencia de señales de píxel de un sensor particular en al menos cuatro contenedores, y mapear una segunda señal de píxel en dicha al menos una secuencia de señales de píxel en al menos cuatro contenedores, y combinar lógicamente el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para clasificar los resultados de dos clústeres.

Los sensores de la matriz de sensores pueden comprender detectores de luz.

Los acontecimientos de muestreo pueden comprender dos fases de iluminación en una secuencia temporal, y las secuencias de señales de píxel en la pluralidad de secuencias de señales de píxel incluyen al menos una señal de píxel de cada una de las dos fases de iluminación. La primera fase de iluminación puede inducir iluminación desde uno o más clústeres en las áreas de píxel de los sensores que indican las bases de nucleótidos A y T y la segunda fase de iluminación induce iluminación desde uno o más clústeres en las áreas de píxel de los sensores que indican las bases de nucleótidos C y T y dichos resultados de clasificación comprenden la lectura de una de las bases de nucleótidos A, C, T o G para al menos dos clústeres utilizando dicha al menos una secuencia.

Los clústeres pueden distribuirse irregularmente sobre las áreas de píxel de la superficie de muestra, y el procesador de señales puede ejecutar un análisis de secuencia temporal y espacial de la pluralidad de secuencias de señales de píxel para detectar patrones de iluminación correspondientes a clústeres individuales en la superficie de muestra, y clasificar los resultados de los acontecimientos de muestreo para los clústeres individuales. La pluralidad de secuencias de señales de píxel codifica la interferencia diferencial entre al menos dos clústeres resultantes de su distribución irregular sobre las áreas de píxel.

La superficie de muestra puede comprender una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, incluidos dos pocillos por área de píxel, los dos pocillos por área de píxel pueden incluir un pocillo dominante y un pocillo subordinado, el pocillo dominante puede tener una mayor sección transversal sobre el área de píxel que el pocillo subordinado.

La superficie de muestra puede comprender una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, y los acontecimientos de muestreo pueden incluir al menos una fase química con un número K de fases de iluminación donde K es un número entero positivo. Las fases de iluminación de las K fases de iluminación pueden iluminar las áreas de píxel con diferentes ángulos de iluminación, y las secuencias de señales de píxel pueden incluir el número K de señales de píxel para al menos una fase química de los acontecimientos de muestreo.

La superficie de muestra puede comprender una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, y los acontecimientos de muestreo pueden incluir una primera fase química con un número K de fases de iluminación donde K es un número entero positivo. Las fases de iluminación de las K fases de iluminación pueden iluminar las áreas de píxel con diferentes ángulos de iluminación, y una segunda fase química con un número J de fases de iluminación donde J es un número entero positivo. Las fases de iluminación de las K fases de iluminación en la primera fase química y de las J fases de iluminación en la segunda fase química, pueden iluminar los pocillos en la matriz de pocillos con diferentes ángulos de iluminación, y las secuencias de señales de píxel pueden incluir el número K de señales de píxel para la primera fase química más el número J de señales de píxel para la segunda fase química de los acontecimientos de muestreo.

Un área de píxel puede recibir luz de un pocillo en la superficie de muestra y el pocillo puede contener más de un clúster durante el ciclo de lectura de nucleótidos.

Un clúster puede comprender una pluralidad de fragmentos monocatenarios que tienen una secuencia de bases idéntica.

En una realización adicional, se proporciona un método de lectura de nucleótidos. Para un ciclo de lectura de nucleótidos de una ejecución de secuenciación por síntesis (cuya abreviatura es SBS), el método incluye detectar: (1) una primera señal de píxel que representa la luz recogida de al menos dos clústeres en una primera área de píxel durante una primera fase de iluminación del ciclo de lectura de nucleótidos y (2) una segunda señal de píxel que representa la luz recogida de dichos al menos dos clústeres en la primera área de píxel durante una segunda fase de iluminación del ciclo de lectura de nucleótidos. La primera área de píxel subyace a una pluralidad de clústeres que comparten la primera área de píxel. El método incluye el uso de una combinación de la primera y segunda señal de píxel para identificar bases de nucleótidos incorporadas en cada clúster de los al menos dos clústeres durante el ciclo de lectura de nucleótidos.

El método también puede incluir mapear la primera señal de píxel en al menos cuatro contenedores y mapear la segunda señal de píxel en al menos cuatro contenedores, y combinar el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos incorporadas.

El método también puede incluir aplicar el método para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en una pluralidad de áreas de píxel durante el ciclo de lectura de nucleótidos.

El método también puede incluir repetir el método a lo largo de sucesivos ciclos de lectura de nucleótidos para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel durante cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos.

Para cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos, el método también puede incluir detectar y almacenar la primera y segunda señal de píxel emitidas por la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel, y después los ciclos de lectura de nucleótidos, utilizando la combinación de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel durante cada uno de los

5 ciclos de lectura de nucleótidos anteriores.

La primera área de píxel puede recibir luz de un pocillo asociado en una superficie de muestra. La primera área de píxel puede recibir luz de más de un pocillo asociado en la superficie de muestra. La primera y segunda señal de píxel pueden recogerse en un primer sensor de la primera zona de píxel. La primera y segunda señal de píxel puede detectarse mediante un procesador de señales configurado para procesar señales de píxel recogidas por el primer sensor. La primera fase de iluminación puede inducir la iluminación del primer y segundo clúster para producir emisiones de las bases de nucleótidos A y T etiquetadas y la segunda fase de iluminación puede inducir la iluminación del primer y segundo clúster para producir emisiones de las bases de nucleótidos C y T etiquetadas.

10

El método puede incluir un ajuste que comprende el uso de uno o más algoritmos, incluido un algoritmo de clusterización K-medias, un algoritmo de clusterización similar a K-medias, un algoritmo de maximización de expectativas y un algoritmo basado en histograma.

15

El método puede incluir la normalización de los valores de intensidad.

20

El área de píxel puede recibir luz desde un pocillo asociado en la superficie de muestra.

El procesador de señales puede usar los patrones de iluminación detectados para localizar el número $N + M$ de clústeres individuales en la superficie de muestra a partir del número N de sensores activos.

25

La superficie de muestra puede incluir áreas de píxel y una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, incluyendo el biosensor dos pocillos y dos clústeres por área de píxel. Los dos pocillos por área de píxel incluyen un pocillo dominante y un pocillo subordinado. El pocillo dominante tiene una mayor sección transversal sobre el área de píxel que el pocillo subordinado.

30

El biosensor también tiene una matriz de sensores configurada para generar una pluralidad de secuencias de señales de píxel. Cada sensor en la matriz detecta información de los dos clústeres dispuestos en áreas de píxel correspondientes de la superficie de muestra para generar una señal de píxel en un acontecimiento de muestreo. La matriz tiene un número N de sensores activos. Los sensores de la matriz están dispuestos con respecto a la superficie de muestra para generar señales de píxel respectivas durante la secuencia de acontecimientos de muestreo a partir del número N de áreas de píxel correspondientes de la superficie de muestra para producir la pluralidad de secuencias de señales de píxel. El biosensor también tiene un puerto de comunicación que emite la pluralidad de secuencias de señales de píxel.

35

Los dos pocillos pueden tener diferentes desviaciones con respecto a un centro del área de píxel. Durante un acontecimiento de muestreo, el área de píxel puede recibir diferentes cantidades de iluminación de los dos pocillos. La señal de píxel para cada acontecimiento de muestreo en al menos una secuencia de señales de píxel en la pluralidad de secuencias de señales de píxel representa información detectada de los dos clústeres en el área de píxel correspondiente. Cada uno de los dos pocillos puede contener al menos un clúster durante el acontecimiento de muestreo. Durante el acontecimiento de muestreo, el área de píxel puede recibir una cantidad de iluminación de un clúster más claro en el pocillo dominante que es mayor que la cantidad de iluminación recibida de un clúster más oscuro en el pocillo subordinado.

45

El biosensor puede acoplarse a un procesador de señales. El procesador de señales puede configurarse para recibir y procesar la pluralidad de secuencias de señales de píxel para identificar bases de nucleótidos presentes en un número $N + M$ de clústeres a partir del número N de sensores activos. Para el clúster más claro y más oscuro, esto puede incluir mapear en al menos cuatro contenedores una primera señal de píxel generada por un sensor correspondiente al área de píxel durante una primera fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, mapear en al menos cuatro contenedores una segunda señal de píxel generada por el sensor durante una segunda fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, y combinar lógicamente el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos presentes en el clúster más claro y el clúster más oscuro.

50

La superficie de muestra puede incluir áreas de píxel y una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, con al menos dos clústeres por área de píxel. El dispositivo comprende además un sistema de iluminación. El sistema de iluminación ilumina las áreas de píxel con diferentes ángulos de iluminación durante una secuencia de acontecimientos de muestreo, incluyendo para un acontecimiento de muestreo en la secuencia de acontecimientos de muestreo iluminar cada uno de los pocillos con iluminación fuera del eje para producir regiones de pocillos iluminadas asimétricamente en cada uno de los pocillos.

60

Las regiones iluminadas asimétricamente de un pocillo pueden incluir al menos una región de pocillo dominante y una región de pocillo subordinado, de modo que durante el acontecimiento de muestreo la región de pocillo dominante

65

esté más iluminada que la región de pocillo subordinado. El pocillo puede contener más de un clúster durante el acontecimiento de muestreo, incluyendo cada una de las regiones de pocillo dominante y subordinado un clúster. Durante el acontecimiento de muestreo, un área de píxel que cubre el pocillo puede recibir una cantidad de iluminación de un clúster más claro en la región del pocillo dominante que sea mayor que la cantidad de iluminación recibida de un clúster más oscuro en la región del pocillo subordinado.

La iluminación fuera del eje puede tener un ángulo de cuarenta y cinco grados. En algunas realizaciones, se superpone un pocillo por área de píxel. En otras realizaciones, se superponen dos pocillos por área de píxel.

El biosensor también tiene una matriz de sensores configurada para generar una pluralidad de secuencias de señales de píxel. Cada sensor en la matriz detecta información de al menos dos clústeres dispuestos en áreas de píxel correspondientes de la superficie de muestra para generar una señal de píxel en un acontecimiento de muestreo. La matriz tiene un número N de sensores activos. Los sensores de la matriz están dispuestos con respecto a la superficie de muestra para generar señales de píxel respectivas durante la secuencia de acontecimientos de muestreo a partir del número N de áreas de píxel correspondientes de la superficie de muestra para producir la pluralidad de secuencias de señales de píxel. El biosensor también tiene un puerto de comunicación que emite la pluralidad de secuencias de señales de píxel.

El biosensor puede acoplarse a un procesador de señales. El procesador de señales puede configurarse para recibir y procesar la pluralidad de secuencias de señales de píxel para identificar bases de nucleótidos presentes en un número $N + M$ de clústeres a partir del número N de sensores activos. Para el clúster más claro y más oscuro, esto puede incluir mapear en al menos cuatro contenedores una primera señal de píxel generada por un sensor correspondiente al área de píxel durante una primera fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, mapear en al menos cuatro contenedores una segunda señal de píxel generada por el sensor durante una segunda fase de iluminación del acontecimiento de muestreo, y combinar lógicamente el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos presentes en el clúster más claro y el clúster más oscuro.

Otros rasgos y aspectos de la tecnología descrita resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada junto con las figuras adjuntas, que ilustran, como ejemplo, los rasgos según las realizaciones de la tecnología descrita. Esta breve descripción no pretende limitar el alcance de ninguna de las invenciones descritas en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

La presente descripción, según una o más realizaciones, se describe en detalle con referencia a las siguientes figuras. Las figuras se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y simplemente ejemplos de realizaciones. Además, cabe señalar que para mayor claridad y facilidad de ilustración, en las figuras, los elementos no se han dibujado necesariamente a escala.

Algunas de las figuras incluidas en la presente memoria ilustran diversas realizaciones de la tecnología descrita desde diferentes puntos de vista. Aunque el texto descriptivo adjunto puede referirse a dichas vistas como “superior”, “inferior” o “lateral”, dichas referencias son meramente descriptivas y no implican ni requieren que la tecnología divulgada se implemente o utilice en una orientación espacial concreta, a menos que se indique explícitamente lo contrario.

La Figura 1 es un diagrama de bloques de un sistema de lectura de nucleótidos según una realización.

La Figura 2 es un diagrama de bloques de un controlador de sistema que puede utilizarse en el sistema de la Figura 1.

La Figura 3 ilustra una sección transversal de un biosensor que se puede utilizar en diversas realizaciones. El biosensor de la Figura 3 tiene áreas de píxel que, cada una de ellas, puede contener más de un clúster durante un ciclo de lectura de nucleótidos (p. ej., 2 clústeres por área de píxel).

La Figura 4 muestra una sección transversal de un biosensor que puede utilizarse en diversas realizaciones. El biosensor de la Figura 4 tiene pocillos que, cada uno de ellos, puede contener más de un clúster durante un ciclo de lectura de nucleótidos (p. ej., 2 clústeres por pocillo).

Las Figuras 5A y 5B son gráficos de dispersión que representan la lectura de nucleótidos de clústeres más claros y más oscuros de un par de clústeres utilizando sus respectivas señales de píxel detectadas por un sensor (o píxel) compartido según una realización.

La Figura 6 es un gráfico de dispersión que representa dieciséis distribuciones producidas por valores de intensidad de clústeres más claros y más oscuros de un par de clústeres según una realización.

La Figura 7A es una tabla de detección que ilustra un esquema de lectura de nucleótidos de un protocolo de secuenciación con tinción y dos fases de iluminación según una realización.

5 La Figura 7B es una tabla de lectura de nucleótidos que muestra un esquema de clasificación para clasificar señales de píxel combinadas de clústeres más claros y más oscuros de un par de clústeres en uno de dieciséis contenedores según una realización.

10 La Figura 8 muestra un método de lectura de nucleótidos analizando señales de píxel emitidas por una pluralidad de clústeres que comparten un área de píxel según una realización.

La Figura 9 representa un método para identificar áreas de píxel con más de un clúster en una superficie de muestra de un biosensor y clústeres de lectura de nucleótidos en las áreas de píxel identificadas según una realización.

15 La Figura 10 ilustra una vista en planta superior de una superficie de muestra que tiene áreas de píxel en las que una pluralidad de clústeres se distribuye irregularmente según una realización.

La Figura 11A ilustra una vista lateral de una superficie de muestra que tiene dos pocillos por área de píxel que incluye un pocillo dominante y un pocillo subordinado según una realización.

20 La Figura 11B representa una vista en planta superior de la superficie de muestra de la Figura 11A.

Las Figuras 12A y 12B muestran la iluminación fuera del eje de un pocillo que cubre un área de píxel de una superficie de muestra.

25 La Figura 12C ilustra regiones de pocillo iluminadas asimétricamente producidas por la iluminación fuera del eje de las Figuras 12A y 12B según una realización.

Descripción detallada

30 Las realizaciones descritas en la presente memoria pueden usarse en diversos procesos y sistemas biológicos o químicos para el análisis académico o comercial. Más específicamente, las realizaciones descritas en la presente memoria, pueden utilizarse en diversos procesos y sistemas cuando se desee detectar un acontecimiento, una propiedad, una calidad o una característica que sea indicativa de una reacción deseada. Por ejemplo, las realizaciones descritas en el presente documento incluyen cartuchos, biosensores y sus componentes, así como sistemas de
35 bioensayo que funcionan con cartuchos y biosensores. En realizaciones particulares, los cartuchos y biosensores incluyen una cubeta de lectura y uno o más sensores, píxeles, detectores de luz o fotodiodos que están acoplados entre sí en una estructura sustancialmente unitaria.

40 Los sistemas de bioensayo pueden configurarse para realizar una pluralidad de reacciones deseadas, que pueden detectarse individualmente o en conjunto. Los sensores y los sistemas de bioensayo pueden configurarse para realizar numerosos ciclos en los cuales la pluralidad de reacciones deseadas se produce en paralelo. Por ejemplo, pueden utilizarse sistemas de bioensayo para secuenciar una matriz densa de características de ADN a través de ciclos iterativos de manipulación enzimática y adquisición de datos. Como tales, los cartuchos y biosensores pueden incluir uno o más canales microfluídicos que suministren reactivos u otros componentes de reacción a un sitio de reacción.
45 En algunas realizaciones, los sitios de reacción están distribuidos irregularmente a lo largo de una superficie sustancialmente plana. En otras realizaciones, los sitios de reacción tienen un patrón a lo largo de una superficie sustancialmente plana de una manera predeterminada. Cada uno de los sitios de reacción puede estar asociado con uno o más sensores, píxeles, detectores de luz o fotodiodos que detectan la luz procedente del sitio de reacción asociado. Incluso en otras realizaciones, los sitios de reacción están ubicados en cámaras (o pocillos) de reacción que
50 compartimentan las reacciones deseadas en ellas.

La siguiente descripción detallada de determinadas realizaciones se entenderá mejor cuando se lea junto con los dibujos adjuntos. En la medida en que las figuras ilustran diagramas de los bloques funcionales de diversas realizaciones, los bloques funcionales no son necesariamente indicativos de la división entre los circuitos de hardware.
55 Por tanto, por ejemplo, uno o más de los bloques funcionales (p. ej., procesadores o memorias) pueden implementarse en una sola pieza de hardware (p. ej., un procesador de señales de propósito general o una memoria de acceso aleatorio, un disco duro o similar). De manera similar, los programas pueden ser programas independientes, pueden incorporarse como subrutinas en un sistema operativo, pueden ser funciones en un paquete de *software* instalado, y similares. Debe entenderse que las diversas realizaciones no se limitan a las disposiciones e instrumentos mostrados
60 en los dibujos.

Como se utiliza en la presente memoria, un elemento o una etapa citado en singular y precedido por la palabra “un” o “uno(a)” debe entenderse como que no excluye el plural de dichos elementos o etapas, a menos que dicha exclusión se indique explícitamente. Además, las referencias a “una realización” no pretenden interpretarse como excluyentes
65 de la existencia de realizaciones adicionales que también incorporan las características citadas. Así mismo, a menos que se indique explícitamente lo contrario, las realizaciones “que comprenden” o “que tienen” o “que incluyen” un

elemento o una pluralidad de elementos que tienen una propiedad particular, pueden incluir elementos adicionales tengan o no esa propiedad.

Como se utiliza en la presente memoria, una “reacción deseada” incluye un cambio en al menos una propiedad (o calidad) química, eléctrica, física u óptica de un analito de interés. En ejemplos particulares, la reacción conveniente es un acontecimiento de unión positiva (p. ej., la incorporación de una biomolécula etiquetada con fluorescencia con el analito de interés). Más generalmente, la reacción conveniente puede ser una transformación química, un cambio químico o una interacción química. La reacción conveniente también puede ser un cambio de las propiedades eléctricas. Por ejemplo, la reacción conveniente puede ser un cambio de la concentración de iones dentro de una solución. Como reacciones ilustrativas se incluyen, pero sin limitación, reacciones químicas, tales como reducción, oxidación, adición, eliminación, reordenamiento, esterificación, amidación, eterificación, ciclación o sustitución; interacciones de unión en las cuales se une una primera sustancia química a una segunda sustancia química; reacciones de disociación en las cuales se separan dos o más sustancias químicas entre sí; fluorescencia; luminiscencia; bioluminiscencia; quimioluminiscencia; y reacciones biológicas, tales como la replicación de ácidos nucleicos, la amplificación de ácidos nucleicos, la hibridación de ácidos nucleicos, el ligamiento de ácidos nucleicos, la fosforilación, la catálisis enzimática, la unión a receptores o la unión a ligandos. La reacción conveniente también puede ser una adición o eliminación de un protón, por ejemplo, detectable como un cambio del pH de una solución o entorno circundante. Una reacción conveniente adicional puede ser detectar el flujo de iones a través de una membrana (p. ej., membrana bicapa natural o sintética), por ejemplo, cuando los iones fluyen a través de una membrana, la corriente se interrumpe y se puede detectar la interrupción.

En ejemplos particulares, la reacción conveniente incluye la incorporación de una molécula etiquetada con fluorescencia a un analito. El analito puede ser un oligonucleótido y la molécula etiquetada con fluorescencia puede ser un nucleótido. La reacción conveniente puede detectarse cuando se dirige una luz de excitación hacia el oligonucleótido que tiene el nucleótido etiquetado, y el fluoróforo emite una señal fluorescente detectable. En realizaciones alternativas, la fluorescencia detectada es el resultado de quimioluminiscencia o bioluminiscencia. Una reacción deseada también puede aumentar la transferencia de energía por resonancia (FRET, *resonance energy transfer*) (o de Forster), por ejemplo, acercando un fluoróforo donante a un fluoróforo aceptor, disminuyendo la FRET separando los fluoróforos donador y aceptor, aumentando la fluorescencia separando un inactivador de un fluoróforo o disminuyendo la fluorescencia colocando conjuntamente un inactivador y un fluoróforo.

Como se utiliza en la presente memoria, un “componente de reacción” o “reactivo” incluye cualquier sustancia que pueda usarse para obtener una reacción deseada. Por ejemplo, los componentes de reacción incluyen reactivos, enzimas, muestras, otras biomoléculas y soluciones tampón. Normalmente, los componentes de reacción se suministran a un sitio de reacción en una solución y/o se inmovilizan en un sitio de reacción. Los componentes de reacción pueden interactuar directa o indirectamente con otra sustancia, tal como el analito de interés.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “sitio de reacción” es una región localizada donde puede producirse una reacción deseada. Un sitio de reacción puede incluir superficies de soporte de un sustrato donde se puede inmovilizar una sustancia sobre el mismo. Por ejemplo, un sitio de reacción puede incluir una superficie sustancialmente plana en un canal de una cubeta de lectura que tenga sobre ella una colonia de ácidos nucleicos. Normalmente, pero no siempre, los ácidos nucleicos de la colonia tienen la misma secuencia, siendo, por ejemplo, copias clonales de un molde monocatenario o bicatenario. Sin embargo, en algunas realizaciones, un sitio de reacción puede contener únicamente una sola molécula de ácido nucleico, por ejemplo, en forma monocatenaria o bicatenaria. Además, una pluralidad de sitios de reacción puede distribuirse irregularmente a lo largo de la superficie de soporte o disponerse de una manera predeterminada (p. ej., uno al lado del otro en una matriz, tal como en micromatrices). Un sitio de reacción también puede incluir una cámara (o pocillo) de reacción que define, al menos parcialmente, una región o un volumen espacial configurado para compartimentar la reacción deseada.

En esta solicitud, las expresiones “cámara de reacción” y “pocillo” se utilizan indistintamente. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “cámara de reacción” o “pocillo” incluye una región espacial que está en comunicación fluida con un canal de flujo. La cámara de reacción puede estar separada, al menos parcialmente, del entorno circundante o de otras regiones espaciales. Por ejemplo, una pluralidad de cámaras de reacción pueden estar separadas entre sí por paredes compartidas. Como ejemplo más específico, la cámara de reacción puede incluir una cavidad definida por las superficies interiores de un pocillo y tener una abertura u orificio para que la cavidad pueda estar en comunicación fluida con un canal de flujo. Los biosensores que incluyen dichas cámaras de reacción se describen con mayor detalle en la solicitud internacional n.º PCT/US2011/057111, presentada el 20 de octubre de 2011.

En algunas realizaciones, las cámaras de reacción tienen un tamaño y una forma en relación con los sólidos (incluidos los semisólidos) de manera que los sólidos puedan introducirse, total o parcialmente, en ellas. Por ejemplo, la cámara de reacción puede tener un tamaño y una forma adecuados para alojar una sola perla de captura. La perla de captura puede tener ADN amplificado clonalmente u otras sustancias sobre la misma. De forma alternativa, las cámaras de reacción pueden tener un tamaño y una forma para recibir un número aproximado de perlas o sustratos sólidos. Como otro ejemplo, las cámaras de reacción también pueden llenarse con un gel o una sustancia porosa que esté configurado para controlar la difusión o filtrar los fluidos que pueden fluir hacia la cámara de reacción.

En realizaciones según la presente invención, los sensores (p. ej., detectores de luz, fotodiodos) están asociados a áreas de píxel correspondientes de una superficie de muestra de un biosensor. Como tal, un área de píxel es una construcción geométrica que representa un área en la superficie de muestra del biosensor para un sensor (o píxel). Un sensor que está asociado a un área de píxel detecta emisiones de luz recogidas del área de píxel asociada cuando se ha producido una reacción deseada en un sitio de reacción o en una cámara de reacción que cubre el área de píxel asociada. En una realización de superficie plana, las áreas de píxel pueden superponerse. En algunos casos, se pueden asociar una pluralidad de sensores con un único sitio de reacción o una única cámara de reacción. En otros casos, un único sensor puede estar asociado con un grupo de sitios de reacción o un grupo de cámaras de reacción.

Como se utiliza en la presente memoria, un “biosensor” incluye una estructura que tiene una pluralidad de sitios de reacción y/o cámaras (o pocillos) de reacción. Un biosensor incluye un dispositivo generador de imágenes de estado sólido (p. ej., un generador de imágenes CCD o CMOS) y, opcionalmente, una cubeta de lectura instalada en el mismo. La cubeta de lectura puede incluir al menos un canal de flujo que esté en comunicación fluida con los sitios de reacción y/o las cámaras de reacción. Como un ejemplo específico, el biosensor está configurado para acoplarse de manera eléctrica y fluidica a un sistema de bioensayo. El sistema de bioensayo puede suministrar reactivos a los sitios de reacción y/o a las cámaras de reacción según un protocolo predeterminado (p. ej., secuenciación por síntesis) y realizar una pluralidad de sucesos de generación de imágenes. Por ejemplo, el sistema de bioensayo puede dirigir las soluciones para que fluyan a lo largo de los sitios de reacción y/o las cámaras de reacción. Al menos una de las soluciones puede incluir cuatro tipos de nucleótidos que tengan las mismas o diferentes etiquetas fluorescentes. Los nucleótidos pueden unirse a los correspondientes oligonucleótidos ubicados en los sitios de reacción y/o las cámaras de reacción. Después, el sistema de bioensayo puede iluminar los sitios de reacción y/o las cámaras de reacción utilizando una fuente de luz de excitación (p. ej., fuentes de luz de estado sólido, tales como diodos emisores de luz o LED). La luz de excitación puede tener una o más longitudes de onda predeterminadas, incluyendo un intervalo de longitudes de onda. Las etiquetas fluorescentes excitadas proporcionan señales de emisión que pueden capturar los sensores.

En ejemplos alternativos, el biosensor puede incluir electrodos u otros tipos de sensores configurados para detectar otras propiedades identificables. Por ejemplo, los sensores pueden configurarse para detectar un cambio en la concentración de iones. En otro ejemplo, los sensores pueden configurarse para detectar el flujo de corriente de iones a través de una membrana.

Como se utiliza en la presente memoria, un “cartucho” incluye una estructura configurada para contener un biosensor. En algunas realizaciones, el cartucho puede incluir rasgos adicionales, tales como una fuente de luz (p. ej., LED) que se configura para proporcionar luz de excitación a los sitios de reacción y/ a las cámaras de reacción del biosensor. El cartucho también puede incluir un sistema de almacenamiento de fluido (p. ej., almacenamiento de reactivos, muestra y tampón) y un sistema de control de fluido (p. ej., bombas, válvulas y similares) para transportar de manera fluida los componentes de la reacción, la muestra y similares, a los sitios de reacción y/o a las cámaras de reacción. Por ejemplo, después de preparar o fabricar el biosensor, éste puede acoplarse a una carcasa o recipiente del cartucho. En algunas realizaciones, los biosensores y los cartuchos pueden ser unidades independientes y desechables. Sin embargo, otras realizaciones pueden incluir un conjunto con partes extraíbles que permitan a un usuario acceder al interior del biosensor o cartucho para el mantenimiento o el reemplazo de componentes o muestras. El biosensor y el cartucho pueden acoplarse o encajarse de manera extraíble a sistemas de bioensayo más grandes, tal como un sistema de secuenciación, que lleve a cabo reacciones controladas en el mismo.

Como se utiliza en la presente memoria, cuando los términos “extraíble” y “acoplado” (o “encajado”) se utilizan conjuntamente para describir una relación entre el biosensor (o cartucho) y un receptáculo del sistema o interfaz de un sistema de bioensayo, los términos pretenden significar que una conexión entre el biosensor (o cartucho) y el receptáculo del sistema se puede separar fácilmente sin destruir ni dañar el receptáculo del sistema y/o el biosensor (o cartucho). Los componentes son fácilmente separables cuando pueden separarse entre sí sin un esfuerzo indebido o sin invertir una cantidad significativa de tiempo para separar los mismos. Por ejemplo, el biosensor (o cartucho) puede acoplarse o encajarse de manera extraíble al receptáculo del sistema de manera eléctrica, de modo que no se destruyan ni se dañen los contactos de acoplamiento del sistema de bioensayo. El biosensor (o cartucho) también puede acoplarse o encajarse de manera extraíble con el receptáculo del sistema de manera mecánica, de modo que no se destruyan ni se dañen los rasgos que sujetan el sensor (o cartucho). El biosensor (o cartucho) también puede acoplarse o encajarse de manera extraíble con el receptáculo del sistema de manera fluidica, de modo que no se destruyan ni se dañen los puertos del receptáculo del sistema. El receptáculo o un componente del sistema no se considera que esté destruido o dañado si, por ejemplo, sólo es necesario realizar un simple ajuste del componente (p. ej., una realineación) o una simple sustitución (p. ej., la sustitución de una boquilla).

Como se utiliza en la presente memoria, un “clúster” es una colonia de moléculas o secuencias de nucleótidos o cadenas de ADN similares o idénticas. Por ejemplo, un clúster puede ser un oligonucleótido amplificado o cualquier otro grupo de un polinucleótido o polipéptido con una secuencia igual o similar. En otras realizaciones, un clúster puede ser cualquier elemento o grupo de elementos que ocupe un área física en una superficie de muestra. En las realizaciones, durante un ciclo de lectura de nucleótidos, los clústeres se inmovilizan en un sitio de reacción y/o en una cámara de reacción.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “inmovilizado/a”, cuando se utiliza con respecto a una biomolécula o sustancia biológica o química, incluye la fijación sustancial de la biomolécula o sustancia biológica o química a nivel molecular a una superficie. Por ejemplo, una biomolécula o sustancia biológica o química puede inmovilizarse en una superficie del material de sustrato utilizando técnicas de adsorción que incluyen interacciones no covalentes (p. ej., fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y deshidratación de interfases hidrófobas), y técnicas de unión covalente donde grupos o enlazadores funcionales faciliten la fijación de las biomoléculas a la superficie. La inmovilización de biomoléculas o sustancias biológicas o químicas en una superficie de un material de sustrato puede basarse en las propiedades de la superficie de sustrato, en el medio líquido que lleva la biomolécula o sustancia biológica o química y/o en las propiedades de las propias biomoléculas o sustancias biológicas o químicas. En algunos casos, la superficie de un sustrato puede funcionalizarse (p. ej., modificarse química o físicamente) para facilitar la inmovilización de las biomoléculas (o sustancias biológicas o químicas) en la superficie del sustrato. La superficie del sustrato puede modificarse primero para que tenga grupos funcionales unidos a la misma. Después, los grupos funcionales pueden unirse a biomoléculas o a sustancias biológicas o químicas para inmovilizarlas sobre los mismos. Una sustancia puede inmovilizarse en una superficie mediante un gel, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º US 2011/0059865 A1.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden fijarse a una superficie y amplificarse utilizando amplificación por puente. Se describen métodos útiles de amplificación por puente, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.641.658 A; en el documento WO 2007/010251 A2, en la patente estadounidense n.º 6.090.592 A; en la publicación de patente estadounidense n.º 2002/0055100 A1; en la patente estadounidense n.º 7.115.400 B1; en la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0096853 A1; en la publicación de patente estadounidense n.º 2004/0002090 A1; en la publicación de patente estadounidense n.º 2007/0128624 A1; y en la publicación de patente estadounidense n.º 2008/0009420 A1. Otro método útil para amplificar ácidos nucleicos en una superficie es la amplificación por círculo rodante (RCA, *rolling circle amplification*), por ejemplo, utilizando los métodos expuestos más adelante con mayor detalle. En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos pueden fijarse a una superficie y amplificarse utilizando uno o más pares de cebadores. Por ejemplo, uno de los cebadores puede estar en solución y el otro cebador puede inmovilizarse sobre la superficie (p. ej., fijarse en la posición 5'). Como ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede hibridar con uno de los cebadores en la superficie, seguido de la extensión del cebador inmovilizado para producir una primera copia del ácido nucleico. Después, el cebador en solución hibrida con la primera copia del ácido nucleico que puede extenderse utilizando, como molde, la primera copia del ácido nucleico. En algunos ejemplos, después de producir la primera copia del ácido nucleico, la molécula de ácido nucleico original puede hibridar con un segundo cebador inmovilizado en la superficie, y puede extenderse al mismo tiempo o después de que se extienda el cebador en solución. En cualquier realización, las rondas repetidas de extensión (p. ej., amplificación) utilizando el cebador inmovilizado y el cebador en solución proporcionan múltiples copias del ácido nucleico.

En realizaciones particulares, los protocolos de ensayo ejecutados por los sistemas y métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de nucleótidos naturales y también de enzimas que se configuran para interactuar con los nucleótidos naturales. Los nucleótidos naturales incluyen, por ejemplo, ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN). Los nucleótidos naturales pueden estar en forma mono, di o trifosfato y pueden tener una base seleccionada entre adenina (A), timina (T), uracilo (U), guanina (G) o citosina (C). Sin embargo, deberá entenderse que pueden utilizarse nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados o análogos de los nucleótidos mencionados anteriormente. A continuación se exponen algunos ejemplos de nucleótidos no naturales útiles con respecto a la secuenciación basada en terminadores reversibles mediante métodos de síntesis.

En realizaciones que incluyen cámaras de reacción, los elementos o sustancias sólidas (incluidas las sustancias semisólidas) pueden disponerse dentro de las cámaras de reacción. Una vez dispuesto, el elemento o sólido puede retenerse físicamente o inmovilizarse dentro de la cámara de reacción mediante un ajuste de interferencia, adhesión o retención. Elementos o sólidos ilustrativos que pueden disponerse dentro de las cámaras de reacción incluyen perlas de polímero, gránulos, gel de agarosa, polvos, puntos cuánticos u otros sólidos que pueden comprimirse y/o mantenerse dentro de la cámara de reacción. En realizaciones particulares, una superestructura de ácido nucleico, tal como una bola de ADN, puede disponerse en o sobre una cámara de reacción, por ejemplo, fijándose a una superficie interior de la cámara de reacción o residiendo en un líquido dentro de la cámara de reacción. Puede formarse previamente una bola de ADN u otra superestructura de ácido nucleico, y después disponerse en o sobre la cámara de reacción. De forma alternativa, en la cámara de reacción puede sintetizarse una bola de ADN *in situ*. Puede sintetizarse una bola de ADN mediante amplificación en círculo rodante para producir un concatámero de una secuencia de ácido nucleico particular y el concatámero puede tratarse con condiciones que formen una bola relativamente compacta. Por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 2008/0242560 A1 o 2008/0234136 A1, se describen bolas de ADN y métodos para sintetizarlas. Una sustancia que se mantiene o se dispone en una cámara de reacción puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso.

Como se utiliza en la presente memoria, “lectura de nucleótidos” identifica una base nucleotídica en una secuencia de ácido nucleico. Lectura de nucleótidos se refiere al proceso de determinación de una lectura de nucleótidos (A, C, G, T) para cada clúster en un ciclo específico. Como ejemplo, la lectura de nucleótidos puede realizarse utilizando métodos y sistemas de cuatro canales, dos canales o un canal descritos de los materiales de la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2013/0079232. En realizaciones particulares, un ciclo de lectura de nucleótidos se

denomina “acontecimiento de muestreo”. En un protocolo de secuenciación con tinción y dos canales, un acontecimiento de muestreo comprende dos fases de iluminación en secuencia temporal, de modo que en cada fase se genera una señal de píxel. La primera fase de iluminación induce la iluminación desde un clúster determinado que indica las bases de nucleótidos A y T en una señal de píxel AT, y la segunda fase de iluminación induce la iluminación desde un clúster determinado que indica las bases de nucleótidos C y T en una señal de píxel CT.

Sistema de lectura de nucleótidos

La Figura 1 es un diagrama de bloques de un sistema de lectura de nucleótidos 100 según una realización. El sistema de lectura de nucleótidos 100 puede funcionar para obtener cualquier información o datos relacionados con al menos una sustancia biológica o química. En algunas realizaciones, el sistema de lectura de nucleótidos 100 es una estación de trabajo que puede ser similar a un dispositivo de mesa o a un ordenador de sobremesa. Por ejemplo, la mayoría de (o todos) los sistemas y componentes para realizar las reacciones deseadas pueden estar dentro de una carcasa 116 común.

En realizaciones particulares, el sistema de lectura de nucleótidos 100 es un sistema de secuenciación (o secuenciador) de ácidos nucleicos configurado para diversas aplicaciones, incluyendo, pero sin limitación, secuenciación de novo, resecuenciación de genomas completos o de regiones genómicas diana, y metagenómica. El secuenciador también se puede utilizar para análisis de ADN o ARN. En algunas realizaciones, el sistema de lectura de nucleótidos 100 también puede configurarse para que genere reacciones en un biosensor. Por ejemplo, el sistema de lectura de nucleótidos 100 puede configurarse para recibir una muestra y generar clústeres unidos a la superficie de ácidos nucleicos amplificados clonalmente derivados de la muestra. Cada clúster puede constituir o ser parte de un sitio de reacción en el biosensor.

El sistema de lectura de nucleótidos 100 ilustrativo puede incluir una interfaz o receptáculo del sistema 112 que está configurado para interactuar con un biosensor 102 para realizar reacciones deseadas dentro del biosensor 102. En la siguiente descripción con respecto a la Figura 1, el biosensor 102 se carga en el receptáculo del sistema 112. Sin embargo, se entiende que, en el receptáculo del sistema 112, puede insertarse un cartucho que incluya el biosensor 102 y, en algunos estados, el cartucho puede extraerse temporal o permanentemente. Como se describe en la presente memoria, el cartucho puede incluir, entre otras cosas, componentes de control de fluido y de almacenamiento de fluido.

En realizaciones particulares, el sistema de lectura de nucleótidos 100 está configurado para realizar una gran cantidad de reacciones paralelas dentro del biosensor 102. El biosensor 102 incluye uno o más sitios de reacción donde pueden producirse reacciones deseadas. Los sitios de reacción pueden estar, por ejemplo, inmovilizados en una superficie sólida del biosensor o inmovilizados en perlas (u otros sustratos móviles) ubicadas dentro de las correspondientes cámaras de reacción del biosensor. Los sitios de reacción pueden incluir, por ejemplo, clústeres de ácidos nucleicos amplificados clonalmente. El biosensor 102 puede incluir un dispositivo generador de imágenes de estado sólido (p. ej., un generador de imágenes CCD o CMOS) y una cubeta de lectura instalada en el mismo. La cubeta de lectura puede incluir uno o más canales de flujo que reciban una solución del sistema 100 de lectura de nucleótidos y dirijan la solución hacia los sitios de reacción. Opcionalmente, el biosensor 102 puede configurarse para encajar con un elemento térmico para transferir energía térmica dentro o fuera del canal de flujo.

El sistema de lectura de nucleótidos 100 puede incluir varios componentes, conjuntos y sistemas (o subsistemas) que interactúen entre sí para llevar a cabo un método o protocolo de ensayo predeterminado para el análisis biológico o químico. Por ejemplo, el sistema de lectura de nucleótidos 100 incluye un controlador de sistema 104 que puede comunicarse con los diversos componentes, conjuntos y subsistemas del sistema de lectura de nucleótidos 100 y también con el biosensor 102. Por ejemplo, además del receptáculo del sistema 112, el sistema de lectura de nucleótidos 100 también puede incluir un sistema de control de fluido 106 para controlar el flujo de fluido a través de una red de fluido del sistema de lectura de nucleótidos 100 y del biosensor 102; un sistema de almacenamiento de fluido 108 que está configurado para contener todos los fluidos (p. ej., gases o líquidos) que pueda utilizar el sistema de bioensayo; un sistema de control de temperatura 110 que puede regular la temperatura del fluido en la red de fluido, el sistema de almacenamiento de fluido 108 y/o el biosensor 102; y un sistema de iluminación 109 que está configurado para iluminar el biosensor 102. Como se ha descrito anteriormente, si se carga un cartucho con el biosensor 102 en el receptáculo del sistema 112, el cartucho también puede incluir componentes de control de fluido y de almacenamiento de fluido.

También se muestra, que el sistema de lectura de nucleótidos 100 puede incluir una interfaz de usuario 114 que interactúa con el usuario. Por ejemplo, la interfaz de usuario 114 puede incluir una pantalla 113 para mostrar información o solicitar información al usuario, y un dispositivo de entrada 115 del usuario para recibir entradas de usuario. En algunas realizaciones, la pantalla 113 y el dispositivo de entrada 115 del usuario son el mismo dispositivo. Por ejemplo, la interfaz de usuario 114 puede incluir una pantalla táctil configurada para detectar la presencia del toque de un individuo y también identificar una ubicación del toque en la pantalla. Sin embargo, se pueden utilizar otros dispositivos de entrada 115 de usuario, tales como un ratón, un panel táctil, un teclado numérico, un escáner de mano, un sistema de reconocimiento de voz, un sistema de reconocimiento de movimiento y dispositivos similares. Como se analizará con mayor detalle a continuación, el sistema de lectura de nucleótidos 100 puede comunicarse con varios

componentes, incluido el biosensor 102 (p. ej., en forma de cartucho), para realizar las reacciones deseadas. El sistema de lectura de nucleótidos 100 también puede configurarse para analizar los datos obtenidos del biosensor para proporcionar al usuario la información deseada.

El controlador del sistema 104 puede incluir cualquier sistema basado en procesador o microprocesador, incluidos sistemas que utilicen microcontroladores, ordenadores de conjunto de instrucciones reducidas (RISC), circuitos integrados de aplicación específica (ASIC), matrices de puertas programables en campo (FPGA), circuitos lógicos y cualquier otro circuito o procesador capaz de ejecutar las funciones descritas en la presente memoria. Los ejemplos anteriores son meramente ilustrativos y, por tanto, no pretenden limitar en modo alguno la definición y/o el significado de la expresión controlador del sistema. En un ejemplo, el controlador del sistema 104 ejecuta un conjunto de instrucciones que se almacenan en uno o más elementos de almacenamiento, memorias o módulos para, al menos, obtener y analizar datos de detección. Los datos de detección pueden incluir una pluralidad de secuencias de señales de píxel, de modo que se pueda detectar una secuencia de señales de píxel de cada uno de los millones de sensores (o píxeles) durante muchos ciclos de lectura de nucleótidos. Los elementos de almacenamiento pueden estar en forma de fuentes de información o elementos de memoria física dentro del sistema de lectura de nucleótidos 100.

El conjunto de instrucciones puede incluir varias órdenes que indiquen al sistema de lectura de nucleótidos 100 o al biosensor 102 que realice operaciones específicas, tales como los métodos y procesos de las diversas realizaciones descritas en la presente memoria. El conjunto de instrucciones puede adoptar la forma de un programa de *software*, que puede formar parte de uno o más medios legibles por ordenador tangibles y no transitorios. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “*software*” y “*firmware*” son intercambiables, e incluyen cualquier programa informático almacenado en la memoria para su ejecución por un ordenador, incluyendo memoria RAM, memoria ROM, memoria EPROM, memoria EEPROM y memoria RAM no volátil (NVRAM). Los tipos de memoria anteriores son sólo ilustrativos y, por tanto, no limitan los tipos de memoria utilizables para el almacenamiento de un programa informático.

El *software* puede adoptar varias formas, tal como un *software* de sistema o un *software* de aplicación. Además, el *software* puede adoptar la forma de una colección de programas independientes, o un módulo de programa dentro de un programa más amplio o una parte de un módulo de programa. El *software* también puede incluir programación modular en forma de programación orientada a objetos. Después de obtener los datos de detección, éstos pueden procesarse automáticamente por el sistema de lectura de nucleótidos 100, procesarse en respuesta a entradas del usuario o procesarse en respuesta a una petición realizada por otra máquina de procesamiento (p. ej., una petición remota a través de un enlace de comunicación). En la realización ilustrada, el controlador del sistema 104 incluye el procesador de señales 138. En otras realizaciones, el controlador del sistema 104 no incluye el procesador de señales 138 y en su lugar tiene acceso al procesador de señales 138 (p. ej., el procesador de señales 138 puede estar alojado por separado en la nube).

El controlador del sistema 104 puede estar conectado al biosensor 102 y a los otros componentes del sistema de lectura de nucleótidos 100 a través de enlaces de comunicación. El controlador del sistema 104 también puede estar conectado de manera comunicativa a sistemas o servidores externos. Los enlaces de comunicación pueden estar conectados directamente, por cable o ser inalámbricos. El controlador del sistema 104 puede recibir entradas u órdenes del usuario, desde la interfaz de usuario 114 y el dispositivo de entrada de usuario 115.

El sistema de control de fluido 106 incluye una red de fluido y se configura para dirigir y regular el flujo de uno o más fluidos a través de la red de fluido. La red de fluido puede estar en comunicación fluida con el biosensor 102 y el sistema de almacenamiento de fluido 108. Por ejemplo, pueden extraerse fluidos seleccionados del sistema de almacenamiento de fluido 108 y dirigirse al biosensor 102 de manera controlada, o pueden extraerse fluidos desde el biosensor 102 y dirigirse, por ejemplo, hacia un receptáculo de desechos en el sistema de almacenamiento de fluido 108. Aunque no se muestra, el sistema de control de fluido 106 puede incluir sensores de flujo que detecten un caudal o presión de los fluidos dentro de la red de fluido. Los sensores pueden comunicarse con el controlador del sistema 104.

El sistema de control de temperatura 110 se configura para regular la temperatura de los fluidos en diferentes regiones de la red de fluido, el sistema de almacenamiento de fluido 108 y/o el biosensor 102. Por ejemplo, el sistema de control de temperatura 110 puede incluir un termociclador que interactúe con el biosensor 102 y controle la temperatura del fluido que fluye a lo largo de los sitios de reacción en el biosensor 102. El sistema de control de temperatura 110 también puede regular la temperatura de elementos sólidos o componentes del sistema de lectura de nucleótidos 100 o del sensor 102. Aunque no se muestra, el sistema de control de temperatura 110 puede incluir sensores para detectar la temperatura del fluido o de otros componentes. Los sensores pueden comunicarse con el controlador del sistema 104.

El sistema de almacenamiento de fluido 108 está en comunicación fluida con el biosensor 102 y puede almacenar diversos componentes de reacción o reactivos que se utilizan para realizar en su interior las reacciones deseadas. El sistema de almacenamiento de fluido 108 también puede almacenar fluidos para lavar o limpiar la red de fluido y el biosensor 102 y para diluir los reactivos. Por ejemplo, el sistema de almacenamiento de fluido 108 puede incluir varios depósitos para almacenar muestras, reactivos, enzimas, otras biomoléculas, soluciones tampón, soluciones acuosas y no polares, y similares. Además, el sistema de almacenamiento de fluido 108 también puede incluir depósitos de

residuos para recibir productos residuales desde el biosensor 102. En realizaciones que incluyen un cartucho, el cartucho puede incluir uno o más de un sistema de almacenamiento de fluido, un sistema de control de fluido o un sistema de control de temperatura. En consecuencia, uno o más de los componentes expuestos en la presente memoria, en relación con esos sistemas, pueden estar contenidos en una carcasa de cartucho. Por ejemplo, un

El sistema de iluminación 109 puede incluir una fuente de luz (p. ej., uno o más LED) y una pluralidad de componentes ópticos para iluminar el biosensor. Algunos ejemplos de fuente de luz pueden incluir, por ejemplo, láseres, lámparas de arco, dispositivos LED o diodos láser. Los componentes ópticos pueden ser, por ejemplo, reflectores, dicroicos, divisores de haz, colimadores, lentes, filtros, cuñas, prismas, espejos, detectores y similares. En las realizaciones que utilizan un sistema de iluminación, el sistema de iluminación 109 puede estar configurado para dirigir una luz de excitación a los sitios de reacción. Como ejemplo, los fluoróforos pueden excitarse con longitudes de onda de luz verde, por lo que la longitud de onda de la luz de excitación puede ser de aproximadamente 532 nm. En una realización, el sistema de iluminación 109 está configurado para producir iluminación que es paralela a una superficie normal de una superficie del biosensor 102. En otra realización, el sistema de iluminación 109 está configurado para producir iluminación que está fuera de ángulo con respecto a la superficie normal de la superficie del biosensor 102. En otra realización más, el sistema de iluminación 109 está configurado para producir iluminación que tiene varios ángulos, incluyendo algo de iluminación paralela y algo de iluminación fuera de ángulo.

La interfaz o el receptáculo del sistema 112 se configura para encajarse al biosensor 102 en al menos una de una manera mecánica, eléctrica o fluidica. El receptáculo 112 del sistema puede contener el biosensor 102 en una orientación deseada para facilitar el flujo de fluido a través del biosensor 102. El receptáculo del sistema 112 también puede incluir contactos eléctricos que se configuran para encajarse al biosensor 102 para que el sistema de lectura de nucleótidos 100 pueda comunicarse con el biosensor 102 y/o proporcionar energía al biosensor 102. Además, el receptáculo del sistema 112 puede incluir puertos (p. ej., boquillas) de fluido que están configurados para encajarse al biosensor 102. En algunas realizaciones, el biosensor 102 se acopla de manera extraíble al receptáculo del sistema 112 de manera mecánica, eléctrica y también fluidica.

Además, el sistema de lectura de nucleótidos 100 puede comunicarse de forma remota con otros sistemas o redes, o con otros sistemas de bioensayo 100. Los datos de detección obtenidos por el sistema o sistemas de bioensayo 100 pueden almacenarse en una base de datos remota.

La Figura 2 es un diagrama de bloques de un controlador del sistema 104 que puede utilizarse en el sistema de la Figura 1. En una realización, el controlador del sistema 104 incluye uno o más procesadores o módulos que pueden comunicarse entre sí. Cada uno de los procesadores o módulos puede incluir un algoritmo (p. ej., instrucciones almacenadas en un medio de almacenamiento legible por ordenador, tangible y/o no transitorio) o subalgoritmos para realizar procesos particulares. El controlador del sistema 104 se ilustra conceptualmente como una colección de módulos, pero puede implementarse utilizando cualquier combinación de placas *hardware* dedicadas, DSP, procesadores, etc. De forma alternativa, el controlador del sistema 104 puede implementarse utilizando un PC estándar con un solo procesador o múltiples procesadores, estando las operaciones funcionales distribuidas entre los procesadores. Como opción adicional, los módulos que se describen a continuación pueden implementarse utilizando una configuración híbrida en la que determinadas funciones modulares se realizan utilizando *hardware* dedicado, mientras que las funciones modulares restantes se realizan utilizando un PC estándar o similar. Los módulos también pueden implementarse como módulos de *software* dentro de una unidad de procesamiento.

Durante el funcionamiento, un puerto de comunicación 120 puede transmitir información (p. ej., órdenes) o recibir información (p. ej., datos) desde el sensor 102 (figura 1) y/o los subsistemas 106, 108, 110 (figura 1). En realizaciones, el puerto de comunicación 120 puede emitir una pluralidad de secuencias de señales de píxel. Un enlace de comunicación 122 puede recibir una entrada del usuario desde la interfaz de usuario 114 (figura 1) y transmitir datos o información a la interfaz de usuario 114. Durante una sesión de bioensayo, el controlador del sistema 104, puede procesar los datos procedentes del biosensor 102 o subsistemas 106, 108, 110 en tiempo real. De forma adicional o alternativa, los datos pueden almacenarse temporalmente en una memoria del sistema durante una sesión de bioensayo y procesarse en una operación más lenta que en tiempo real o sin conexión.

Como se muestra en la Figura 2, el controlador del sistema 104, puede incluir una pluralidad de módulos 131-139 que se comunican con un módulo de control 130 principal. El módulo de control 130 principal puede comunicarse con la interfaz de usuario 114 (figura 1). Aunque los módulos 131-139 se muestran en comunicación directa con el módulo de control 130 principal, los módulos 131-139 también pueden comunicarse directamente entre sí, con la interfaz de usuario 114 y con el biosensor 102. Además, los módulos 131-139 pueden comunicarse con el módulo de control 130 principal a través de los otros módulos.

La pluralidad de módulos 131-139 incluye módulos del sistema 131-133, 139 que se comunican con los subsistemas 106, 108, 110 y 111, respectivamente. El módulo de control de fluido 131 puede comunicarse con el sistema de control

de fluido 106, para controlar las válvulas y con los sensores de flujo de la red de fluido para controlar el flujo de uno o más fluidos a través de la red de fluido. El módulo de almacenamiento de fluido 132 puede notificar al usuario cuando los fluidos están bajos o cuando el depósito de residuos está lleno o casi lleno. El módulo de almacenamiento de fluido 132 también puede comunicarse con el módulo de control de temperatura 133 para que los fluidos puedan almacenarse a la temperatura deseada. El módulo de iluminación 139 puede comunicarse con el sistema de iluminación 109 para iluminar los sitios de reacción en momentos designados durante un protocolo, tal como después de que se hayan producido las reacciones deseadas (p. ej., acontecimientos de unión). En algunas realizaciones, el módulo de iluminación 139 puede comunicarse con el sistema de iluminación 109 para iluminar los sitios de reacción en ángulos designados.

La pluralidad de módulos 131-139 también puede incluir un módulo de dispositivo 134 que se comunica con el biosensor 102 y un módulo de identificación 135 que determina la información de identificación relacionada con el biosensor 102. El módulo del dispositivo 134 puede, por ejemplo, comunicarse con el receptáculo del sistema 112 para confirmar que el biosensor ha establecido una conexión eléctrica y fluidica con el sistema de lectura de nucleótidos 100. El módulo de identificación 135 puede recibir señales que identifique el biosensor 102. El módulo de identificación 135 puede usar la identidad del biosensor 102 para proporcionar otra información al usuario. Por ejemplo, el módulo de identificación 135 puede determinar, y después mostrar, un número de lote, una fecha de fabricación o un protocolo recomendable para ejecutar con el biosensor 102.

La pluralidad de módulos 131-139 también puede incluir un módulo de procesamiento de señales o procesador de señales 138 que reciba y analice los datos de señales (p. ej., datos de imágenes) desde el biosensor 102. El procesador de señales 138 incluye memoria 140 (p. ej., RAM o Flash) para almacenar datos de detección. Los datos de detección pueden incluir una pluralidad de secuencias de señales de píxel, de modo que se pueda detectar una secuencia de señales de píxel de cada uno de los millones de sensores (o píxeles) durante muchos ciclos de lectura de nucleótidos. Los datos de señal pueden almacenarse para un análisis posterior o pueden transmitirse a la interfaz de usuario 114 para mostrarle la información deseada. En algunas realizaciones, los datos de señal pueden procesarse a través del generador de imágenes de estado sólido (p. ej., el sensor de imágenes CMOS) antes de que el procesador de señales 138 reciba los datos de señal.

Los módulos de protocolo 136 y 137 se comunican con el módulo de control 130 principal para controlar el funcionamiento de los subsistemas 106, 108 y 110 cuando se realizan protocolos de ensayo predeterminados. Los módulos de protocolo 136 y 137 pueden incluir conjuntos de instrucciones para dar instrucciones al sistema de lectura de nucleótidos 100 para que realice operaciones específicas según protocolos predeterminados. Como se muestra, el módulo de protocolo puede ser un módulo de secuenciación por síntesis (SBS) 136 que está configurado para emitir diversas órdenes para realizar procesos de secuenciación por síntesis. En la SBS, para determinar la secuencia de nucleótidos en el molde, se controla la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de un molde de ácido nucleico. El procedimiento químico subyacente puede ser polimerización (p. ej., catalizada por una enzima polimerasa) o ligamiento (p. ej., catalizado por una enzima ligasa). En una realización particular de SBS basada en polimerasa, se añaden nucleótidos etiquetados con fluorescencia a un cebador (extendiéndose de ese modo el cebador) de una manera dependiente del molde, de modo que, para determinar la secuencia del molde, pueda utilizarse la detección del orden y tipo de nucleótidos añadidos al cebador. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo de SBS, se pueden dar órdenes para suministrar uno o más nucleótidos etiquetados, ADN polimerasa, etc., en/a través de una cubeta de lectura que contenga una matriz de moldes de ácido nucleico. Los moldes de ácido nucleico pueden ubicarse en sitios de reacción correspondientes. Aquellos sitios de reacción donde la extensión del cebador provoque la incorporación de un nucleótido etiquetado, pueden detectarse a través de un acontecimiento de generación de imágenes. Durante un acontecimiento de generación de imágenes, el sistema de iluminación 109 puede proporcionar una luz de excitación a los sitios de reacción. Opcionalmente, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que finalice la extensión adicional del cebador una vez que se haya añadido un nucleótido a un cebador. Por ejemplo, a un cebador se le puede añadir un análogo de nucleótido que tenga una fracción de terminación reversible, de modo que no se pueda producir la extensión posterior hasta que se suministre un agente desbloqueante para eliminar la fracción. Por tanto, en realizaciones que utilicen terminación reversible, se puede dar una orden para suministrar un reactivo de desbloqueo a la cubeta de lectura (antes o después de que se produzca la detección). Se pueden dar una o más órdenes para efectuar el(los) lavado(s) entre las diversas etapas de suministro. A continuación, el ciclo puede repetirse n veces para extender el cebador por n nucleótidos, detectando de ese modo una secuencia de longitud n. Se describen técnicas de secuenciación ilustrativas, por ejemplo, en Bentley y col., *Nature* 456:53-59 (2008), WO 2004/018497 A2; US 7.057.026 B2; WO 91/06678 A1; WO 2007/123744 A2; US 7.329.492 B2; US 7.211.414 B2; US 7.315.019 B2; US 7.405.281 B2 y US 2008/0108082 A1.

Para la etapa de suministro de nucleótidos de un ciclo de SBS, puede suministrarse un solo tipo de nucleótido cada vez o pueden suministrarse múltiples tipos de nucleótidos diferentes (por ejemplo, A, C, T y G juntos). Para una configuración de suministro de nucleótidos donde solo haya un único tipo de nucleótido a la vez, no es necesario que los diferentes nucleótidos tengan distintas etiquetas, ya que pueden diferenciarse basándose en la separación temporal intrínseca en el suministro individualizado. En consecuencia, un método o aparato de secuenciación puede usar detección de un solo color. Por ejemplo, una fuente de excitación sólo necesita proporcionar excitación a una única longitud de onda o en un único intervalo de longitudes de onda. Para una configuración de suministro de nucleótidos, cuando el suministro dé como resultado la presencia de múltiples nucleótidos diferentes en la cubeta de

lectura al mismo tiempo, pueden diferenciarse los sitios que incorporen diferentes tipos de nucleótidos basándose en diferentes etiquetas fluorescentes que se fijan a los respectivos tipos de nucleótidos en la mezcla. Por ejemplo, pueden usarse cuatro nucleótidos diferentes, cada uno con uno de cuatro fluoróforos diferentes. En una realización, los cuatro fluoróforos diferentes pueden diferenciarse utilizando excitación en cuatro regiones diferentes del espectro. Por ejemplo, se pueden usar cuatro fuentes de radiación de excitación diferentes. De forma alternativa, se pueden usar menos de cuatro fuentes de excitación diferentes, pero se puede usar filtración óptica de la radiación de excitación desde una sola fuente para producir diferentes intervalos de radiación de excitación en la cubeta de lectura.

En algunas realizaciones, en una mezcla que tenga cuatro nucleótidos diferentes, se pueden detectar menos de cuatro colores diferentes. Por ejemplo, los pares de nucleótidos pueden detectarse a la misma longitud de onda, pero diferenciarse basándose en una diferencia de intensidad para un miembro del par en comparación con el otro, o basándose en un cambio en un miembro del par (p. ej., mediante modificación química, modificación fotoquímica o modificación física) que hace que aparezca o desaparezca una señal aparente en comparación con la señal detectada para el otro miembro del par. Se describen aparatos y métodos ilustrativos para diferenciar cuatro nucleótidos diferentes utilizando la detección de menos de cuatro colores, por ejemplo, en las solicitudes de patente estadounidense n.º 61/538.294 y 61/619.878. La solicitud estadounidense n.º 13/624.200, presentada el 21 de septiembre de 2012, es relevante en este contexto.

La pluralidad de módulos de protocolo también puede incluir un módulo de preparación (o generación) de muestras 137 que está configurado para emitir órdenes al sistema de control de fluido 106 y al sistema de control de temperatura 110 para amplificar un producto dentro del biosensor 102. Por ejemplo, el biosensor 102 puede encajarse al sistema de lectura de nucleótidos 100. El módulo de amplificación 137 puede emitir instrucciones al sistema de control de fluido 106 para suministrar los componentes de amplificación necesarios a las cámaras de reacción dentro del biosensor 102. En otras realizaciones, los sitios de reacción pueden contener ya algunos componentes para la amplificación, tal como el ADN molde y/o los cebadores. Después de suministrar los componentes de amplificación a las cámaras de reacción, el módulo de amplificación 137 puede indicar al sistema de control de temperatura 110 que pase por diferentes fases de temperatura según protocolos de amplificación conocidos. En algunas realizaciones, la amplificación y/o la incorporación de nucleótidos se realizan de forma isotérmica.

El módulo de SBS 136 puede emitir órdenes para realizar una PCR en puente donde se forman clústeres de amplicones clonales en áreas localizadas dentro de un canal de una cubeta de lectura. Después de generar los amplicones a través de la PCR en puente, los amplicones pueden “linealizarse” para producir ADN molde monocatenario, o ADNmmc, y un cebador de secuenciación puede hibridarse con una secuencia universal que flanquee una región de interés. Por ejemplo, puede usarse un método de secuenciación por síntesis basado en terminador reversible como se ha expuesto anteriormente o como se expone a continuación.

Cada ciclo de secuenciación o de lectura de nucleótidos puede extender un ADNmmc mediante una sola base, lo que puede lograrse, por ejemplo, utilizando una ADN polimerasa modificada y una mezcla de cuatro tipos de nucleótidos. Los diferentes tipos de nucleótidos pueden tener etiquetas fluorescentes únicas, y cada nucleótido puede tener además un terminador reversible que permita que, en cada ciclo, solo se produzca la incorporación de una sola base. Después de añadir una sola base al ADNmmc, la luz de excitación puede incidir sobre los sitios de reacción y pueden detectarse emisiones fluorescentes. Después de la detección, la etiqueta fluorescente y el terminador pueden escindirse químicamente del ADNmmc. A esto puede seguirle otro ciclo de secuenciación o de lectura de nucleótidos similar. En dicho protocolo de secuenciación, el módulo de SBS 136 puede indicar al sistema de control de fluido 106 que dirija un flujo de soluciones de reactivos y enzimas a través del biosensor 102. En la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0166705 A1, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0188901 A1, en la patente estadounidense n.º 7.057.026 B2, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0240439 A1, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0281109 A1, en la publicación PCT n.º WO 2005/065814 A1, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0100900 A1, en la publicación PCT n.º WO 2006/064199 A1 y en la publicación PCT n.º WO 2007/010251 A2, se describen métodos ilustrativos de SBS basados en terminadores reversibles que pueden utilizarse con el aparato y los métodos expuestos en la presente memoria. Se describen reactivos ilustrativos de SBS basada en terminadores reversibles en los documentos US 7.541.444 B2; US 7.057.026 B2; US 7.414.116 B2; US 7.427.673 B2; US 7.566.537 B2; US 7.592.435 B2 y WO 2007/135368 A2.

En algunas realizaciones, los módulos de amplificación y SBS pueden funcionar en un único protocolo de ensayo donde, por ejemplo, se amplifique el ácido nucleico molde y posteriormente se secuencie en el mismo cartucho.

El sistema de lectura de nucleótidos 100 también puede permitir al usuario reconfigurar un protocolo de ensayo. Por ejemplo, el sistema de lectura de nucleótidos 100 puede ofrecer opciones al usuario a través de la interfaz de usuario 114 para modificar el protocolo determinado. Por ejemplo, si se determina que va a utilizarse el biosensor 102 para la amplificación, el sistema de lectura de nucleótidos 100 puede solicitar una temperatura para el ciclo de hibridación. Además, el sistema de lectura de nucleótidos 100 puede emitir advertencias a un usuario si éste ha proporcionado entradas de usuario que generalmente no son aceptables para el protocolo de ensayo seleccionado.

En realizaciones, el biosensor 102 incluye millones de sensores (o píxeles), cada uno de los cuales genera una pluralidad de secuencias de señales de píxel durante ciclos sucesivos de lectura de nucleótidos. El procesador de señales 130 detecta la pluralidad de secuencias de señales de píxel y las atribuye a los sensores (o píxeles) correspondientes según la ubicación en filas y/o columnas de los sensores en una matriz de sensores.

Biosensor

La Figura 3 ilustra una sección transversal de un biosensor 300 que puede usarse en diversas realizaciones. El biosensor 300 tiene áreas de píxel 306', 308', 310', 312' y 314' que pueden contener, cada una de ellas, más de un clúster durante un ciclo de lectura de nucleótidos (p. ej., 2 clústeres por área de píxel). El biosensor 300 puede tener rasgos similares a los del biosensor 102 (figura 1) descrito anteriormente y puede usarse, por ejemplo, en el cartucho. Como se muestra, el biosensor 300 puede incluir una cubeta de lectura 302 que está instalada en un dispositivo de muestreo 304. En la realización ilustrada, la cubeta de lectura 302 está fijada directamente al dispositivo de muestreo 304. Sin embargo, en realizaciones alternativas, la cubeta de lectura 302 puede estar acoplada de forma extraíble al dispositivo de muestreo 304. El dispositivo de muestreo 304 tiene una superficie de muestra 334 que puede funcionalizarse (p. ej., modificarse química o físicamente de una manera adecuada para realizar reacciones deseadas). Por ejemplo, la superficie de muestra 334 puede estar funcionalizada y puede incluir una pluralidad de áreas de píxel 306', 308', 310', 312' y 314' que pueden contener, cada una de ellas, más de un clúster durante un ciclo de lectura de nucleótidos (p. ej., teniendo cada una de ellas un par de clústeres correspondientes 306AB, 308AB, 310AB, 312AB y 314AB inmovilizados en ella). Cada área de píxel está asociada a un sensor (o píxel o fotodiodo) 306, 308, 310, 312 y 314 correspondiente, de modo que el sensor correspondiente captura la luz recibida por el área de píxel. Un área de píxel 306' también puede asociarse a un sitio de reacción 306'' correspondiente en la superficie de muestra 334 que contiene un par de clústeres, de modo que la luz emitida desde el sitio de reacción 306'' se recibe en el área de píxel 306' y la capturada el sensor 306 correspondiente. Como resultado de esta estructura de detección, en el caso de que haya dos o más clústeres en un área de píxel de un sensor particular durante un ciclo de lectura de nucleótidos (p. ej., teniendo cada uno un par de clústeres correspondiente), la señal de píxel en ese ciclo de lectura de nucleótidos lleva información basada en los dos o más clústeres. Como resultado, el procesamiento de señales descrito en el presente documento, se utiliza para diferenciar cada clúster, donde hay más clústeres que señales de píxel en un acontecimiento de muestreo dado de un ciclo de lectura de nucleótidos particular.

En la realización ilustrada, la cubeta de lectura 302 incluye paredes laterales 338, 340 y una cubierta de flujo 336 que se apoya en las paredes laterales 338, 340. Las paredes laterales 338, 340 están acopladas a la superficie de muestra 334 y se extienden entre la cubierta de flujo 336 y las paredes laterales 338, 340. En algunas realizaciones, las paredes laterales 338, 340 están formadas por una capa adhesiva curable que une la cubierta de flujo 336 al dispositivo de muestreo 304.

Las paredes laterales 338, 340 tienen un tamaño y una forma de manera que exista un canal de flujo 344 entre la cubierta de flujo 336 y el dispositivo de muestreo 304. Como se muestra, el canal de flujo 344 puede incluir una altura (*height*) H_1 que está determinada por las paredes laterales 338, 340. La altura H_1 puede estar comprendida entre aproximadamente 50-400 μm (micrómetros) o, más particularmente, entre aproximadamente 80-200 μm . En la realización ilustrada, la altura H_1 es de aproximadamente 100 μm . La cubierta de flujo 336 puede incluir un material que sea transparente a la luz de excitación 301 que se propaga desde un exterior del biosensor 300 al interior del canal de flujo 344. Como se muestra en la Figura 3, la luz de excitación 301 se aproxima a la cubierta de flujo 336 en un ángulo no ortogonal. Sin embargo, esto es sólo para fines ilustrativos, ya que la luz de excitación 301 puede acercarse a la cubierta de flujo 336 desde diferentes ángulos.

Como también se muestra, la cubierta de flujo 336 puede incluir puertos de entrada y salida 342, 346 que están configurados para encajarse de manera fluidica a otros puertos (no mostrados). Por ejemplo, los otros puertos pueden ser del cartucho o de la estación de trabajo. El canal de flujo 344 tiene un tamaño y una forma para dirigir un fluido a lo largo de la superficie de muestra 334. La altura H_1 y otras dimensiones del canal de flujo 344 pueden configurarse para conservar un flujo sustancialmente uniforme de un fluido a lo largo de la superficie de muestra 334. Las dimensiones del canal de flujo 344 también pueden configurarse para controlar la formación de burbujas.

Como se muestra en la Figura 3 ilustrativa, las paredes laterales 338, 340 y la cubierta de flujo 336 son componentes individuales que están acoplados entre sí. En realizaciones alternativas, las paredes laterales 338, 340 y la cubierta de flujo 336 pueden estar formadas integralmente de manera que las paredes laterales 338, 340 y la cubierta de flujo 336 estén formadas de una pieza continua de material. Como ejemplo, la cubierta de flujo 336 (o la cubeta de lectura 302) puede comprender un material transparente, tal como vidrio o plástico. La cubierta de flujo 336 puede constituir un bloque sustancialmente rectangular que tenga una superficie exterior plana y una superficie interior plana que defina el canal de flujo 344. El bloque puede instalarse las paredes laterales 338, 340. De forma alternativa, la cubeta de lectura 302 puede grabarse para definir la cubierta de flujo 336 y las paredes laterales 338, 340. Por ejemplo, en el material transparente, puede grabarse químicamente un rebaje. Cuando el material grabado se instala en el dispositivo de muestreo 304, el rebaje puede convertirse en el canal de flujo 344.

El dispositivo de muestreo 304 puede ser similar, por ejemplo, a un circuito integrado que comprenda una pluralidad de capas de sustrato 320-326 apiladas. Las capas de sustrato 320-326 pueden incluir un sustrato base 320, un

generador de imágenes de estado sólido 322 (p. ej., un sensor de imágenes CMOS), un filtro o capa de tratamiento de luz 324 y una capa de pasivación 326. Cabe señalar que lo anterior es sólo ilustrativo y que otras realizaciones pueden incluir menos capas o capas adicionales. Así mismo, cada una de las capas de sustrato 320-326 puede incluir una pluralidad de subcapas. Como se describirá con mayor detalle a continuación, el dispositivo de muestreo 304

5 puede fabricarse utilizando procesos similares a los utilizados en la fabricación de circuitos integrados, tales como sensores de imágenes CMOS y CCD. Por ejemplo, las capas de sustrato 320-326, o partes de las mismas, pueden crecer, depositarse, grabarse y similar, para formar el dispositivo de muestreo 304.

10 La capa de pasivación 326 está configurada para proteger la capa de filtro 324 del entorno de fluidos del canal de flujo 344. En algunos casos, la capa de pasivación 326 también está configurada para proporcionar una superficie sólida (es decir, la superficie de muestra 334) que permita la inmovilización en ella de biomoléculas u otros analitos de interés. Por ejemplo, cada uno de los sitios de reacción puede incluir un clúster de biomoléculas que se inmovilizan en la superficie de muestra 334. Por tanto, la capa de pasivación 326 puede estar formada por un material que permita inmovilizar en ella los sitios de reacción. La capa de pasivación 326 también puede comprender un material que sea

15 al menos transparente a una luz fluorescente deseada. Como ejemplo, la capa de pasivación 326 puede incluir nitruro de silicio (Si_3N_4) y/o sílice (SiO_2). Sin embargo, puede utilizarse otro material o materiales adecuado(s). En la realización ilustrada, la capa de pasivación 326 puede ser sustancialmente plana. Sin embargo, en realizaciones alternativas, la capa de pasivación 326 puede incluir rebajes, tales como fosos, pocillos, ranuras y similares. En la realización ilustrada, la capa de pasivación 326 tiene un grosor de aproximadamente 150-200 nm y, más particularmente, de aproximadamente 170 nm.

20 La capa de filtro 324 puede incluir diversos rasgos que afecten la transmisión de luz. En algunas realizaciones, la capa de filtro 324 puede realizar múltiples funciones. Por ejemplo, la capa de filtro 324 puede configurarse para (a) filtrar señales de luz no deseadas, tales como señales de luz de una fuente de luz de excitación; (b) dirigir señales de emisión desde los sitios de reacción hacia los sensores 306, 308, 310, 312 y 314 correspondientes, que están configurados para detectar las señales de emisión desde los sitios de reacción; o (c) bloquear o impedir la detección de señales de emisión no deseadas procedentes de sitios de reacción adyacentes. Como tal, la capa de filtro 324 también puede denominarse capa de tratamiento de luz. En la realización ilustrada, la capa de filtro 324 tiene un grosor de aproximadamente 1-5 μm y, más particularmente, de aproximadamente 3-4 μm . En realizaciones alternativas, la capa de filtro 324 puede incluir una matriz de microlentes u otros componentes ópticos. Cada una de las microlentes puede configurarse para dirigir señales de emisión desde un sitio de reacción asociado a un sensor.

25 En algunas realizaciones, el generador de imágenes de estado sólido 322 y el sustrato base 320 pueden proporcionarse juntos como un dispositivo de generación de imágenes de estado sólido previamente construido (p. ej., un chip CMOS). Por ejemplo, el sustrato base 320 puede ser una oblea de silicio y el generador de imágenes de estado sólido 322 puede instalarse sobre él. El generador de imágenes de estado sólido 322 incluye una capa de material semiconductor (p. ej., silicio) y los sensores 306, 308, 310, 312 y 314. En la realización ilustrada, los sensores son fotodiodos configurados para detectar luz. En otras realizaciones, los sensores comprenden detectores de luz. El generador de imágenes de estado sólido 322 puede fabricarse como un único chip mediante un proceso de fabricación basado en CMOS.

30 El generador de imágenes de estado sólido 322 puede incluir una densa matriz de sensores 306, 308, 310, 312 y 314 que están configurados para detectar actividad indicativa de una reacción deseada desde dentro o a lo largo del canal de flujo 344. En algunas realizaciones, cada sensor tiene un área de píxel (o área de detección) que es de aproximadamente 1-3 micrómetros cuadrados (μm^2). La matriz puede incluir 500.000 sensores, 5 millones de sensores, 10 millones de sensores o incluso 130 millones de sensores. Los sensores 306, 308, 310, 312 y 314 pueden configurarse para detectar una longitud de onda de luz predeterminada que sea indicativa de las reacciones deseadas.

35 En algunas realizaciones, el dispositivo de muestreo 304 incluye una disposición de microcircuito, tal como la disposición de microcircuito descrita en la patente estadounidense n.º 7.595.883. Más específicamente, el dispositivo de muestreo 304 puede comprender un circuito integrado que tenga una matriz plana de los sensores 306, 308, 310, 312 y 314. La matriz de los sensores 306, 308, 310, 312 y 314 puede acoplarse de manera comunicativa a un decodificador de fila y a un amplificador o decodificador de columna. El amplificador de columna también puede acoplarse de manera comunicativa a un convertidor analógico digital de columna (Column ADC/Mux). A los componentes anteriores puede acoplarse otro circuito electrónico, incluidos un procesador de señal digital y una memoria. El circuito electrónico formado dentro del dispositivo de muestreo 304 puede configurarse para al menos uno de amplificación, digitalización, almacenamiento y procesamiento de señales. El circuito electrónico puede recoger y analizar la luz fluorescente detectada y generar señales de píxel (o señales de detección) para comunicar datos de detección al procesador de señales 138. El circuito electrónico también puede realizar un procesamiento adicional de señales analógicas y/o digitales en el dispositivo de muestreo 304. El dispositivo de muestreo 304 puede incluir vías conductoras 330 que realizan el enrutamiento de señales (p. ej., transmiten las señales de píxel al procesador de señales 138). Las señales de píxel también pueden transmitirse a través de contactos eléctricos 332 del dispositivo de muestreo 304.

40 Sin embargo, el dispositivo de muestreo 304 no se limita a las construcciones o a los usos que se han descrito anteriormente. En realizaciones alternativas, el dispositivo de muestreo 304 puede adoptar otras formas. Por ejemplo,

el dispositivo de muestreo 304 puede comprender un dispositivo CCD, tal como una cámara CCD, que esté acoplado a una cubeta de lectura o que se desplace para interconectarse con una cubeta de lectura que tenga sitios de reacción en su interior. En otras realizaciones, el dispositivo de muestreo 304 puede ser un sensor fabricado basado en CMOS, que incluye transistores de efecto campo químicamente sensibles (chemFET, *chemically sensitive field effect transistors*), transistores de efecto campo sensibles a iones (ISFET, *ion-sensitive field effect transistors*) y/o transistores de efecto campo semiconductor de óxido metálico (MOSFET, *metal oxide semiconductor field effect transistors*). Dichas realizaciones pueden incluir una matriz de transistores de efecto campo (FET, *field effect transistors*) que puede configurarse para detectar un cambio en las propiedades eléctricas dentro de las cámaras de reacción. Por ejemplo, los FET (transistores de efecto campo) pueden detectar al menos uno de los cambios de presencia y concentración de varios analitos. Como ejemplo, la matriz de FET puede controlar cambios en la concentración de iones de hidrógeno. Dichos dispositivos de muestreo se describen con mayor detalle en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2009/0127589, para su uso en la comprensión de dichas matrices de FET.

La Figura 4 muestra una sección transversal de un biosensor 400 que puede usarse en diversas realizaciones. El biosensor 400 tiene pocillos 406, 408, 410, 412 y 414, cada uno de los cuales puede contener más de un clúster durante un ciclo de lectura de nucleótidos (p. ej., 2 clústeres por pocillo). Como se muestra en la Figura 3, la superficie de muestra 334 puede ser sustancialmente plana. Sin embargo, en realizaciones alternativas, la superficie de muestra 334 puede configurarse para definir pocillos (o cámaras de reacción) donde cada pocillo tiene uno o más sitios de reacción. Los pocillos pueden estar definidos, por ejemplo, por paredes de pocillo que separen de manera eficaz el(los) sitio(s) de reacción de un pocillo del(los) sitio(s) de reacción de un pocillo adyacente.

Como se muestra en la Figura 4, los pocillos 406, 408, 410, 412 y 414 pueden distribuirse en un patrón a lo largo de la superficie de muestra 334. Por ejemplo, los pocillos 406, 408, 410, 412 y 414 pueden ubicarse en filas y columnas a lo largo de la superficie de muestra 334 de una manera que sea similar a la de una micromatriz. Sin embargo, se entiende que pueden usarse diversos patrones de pocillos 406, 408, 410, 412 y 414. En realizaciones particulares, cada uno de los pocillos 406, 408, 410, 412 y 414 incluye más de un clúster de biomoléculas (p. ej., oligonucleótidos) que están inmovilizados en la superficie de muestra 334. Por ejemplo, el pocillo 406 contiene el par de clústeres 306AB, el pocillo 408 contiene el par de clústeres 308AB, el pocillo 410 contiene el par de clústeres 310AB, el pocillo 412 contiene el par de clústeres 312AB y el pocillo 414 contiene el par de clústeres 314AB.

Los sensores están configurados para detectar señales de luz que se emiten desde el interior de los pocillos. En realizaciones particulares, las áreas de píxel 306', 308', 310', 312' y 314' también pueden asociarse a pocillos correspondientes 406, 408, 410, 412 y 414 en la superficie de muestra 334, de modo que la luz emitida desde los pocillos 406, 408, 410, 412 y 414 sea recibida por las áreas de píxel 306', 308', 310', 312' y 314' asociadas y capturada por los sensores 306, 308, 310, 312 y 314 correspondientes.

En realizaciones, la superficie de muestra 334 tiene una posición fija con respecto al dispositivo de muestreo 304 de modo que los pocillos 406, 408, 410, 412 y 414 tengan ubicaciones espaciales conocidas con respecto a al menos un sensor (o píxel) predeterminado. El al menos un sensor predeterminado detecta actividad de las reacciones deseadas del pocillo suprayacente. Como tales, los pocillos 406, 408, 410, 412 y 414 pueden asignarse a al menos uno de los sensores 306, 308, 310, 312 y 314. Con este fin, el circuito electrónico del dispositivo de muestreo 304 puede incluir núcleos que asocian automáticamente señales de píxel (o señales de detección) proporcionadas por sensores 306, 308, 310, 312 y 314 predeterminados con los pocillos 406, 408, 410, 412 y 414 asignados. Como ejemplo, cuando las señales de píxel son generadas por el sensor 306 mostrado en la Figura 4, estas señales se asociarán automáticamente con el pocillo 406 mostrado en la Figura 4. Dicha configuración puede facilitar el procesamiento y análisis de los datos de detección. Por ejemplo, las señales de píxel de un pocillo pueden ubicarse automáticamente en una determinada posición en la matriz basándose en la descodificación por filas y/o por columnas.

En algunas realizaciones, los sensores (o píxeles) están subyacentes o por debajo de los clústeres. En otras realizaciones, los sensores (o píxeles) están superpuestos o por encima de los clústeres. En otras realizaciones, los sensores (o píxeles) están al lado de los clústeres (p. ej., a la derecha y/o izquierda).

Lectura de nucleótidos de múltiples clústeres por sensor (o Píxel)

En realizaciones, la tecnología descrita aumenta el rendimiento del biosensor 300 utilizando señales de píxel procedentes de menos sensores (o píxeles) en comparación con una cantidad de clústeres de lectura de nucleótidos en un ciclo de lectura de nucleótidos. En realizaciones particulares, si el biosensor 300 tiene N sensores activos, entonces la tecnología descrita utiliza señales de píxel de los N sensores activos para la lectura de nucleótidos de N + M clústeres, donde M es un número entero positivo. En realizaciones, esto se logra mediante la lectura de nucleótidos de múltiples clústeres por sensor (o píxel), como se describe a continuación.

En realizaciones según la presente invención, un sensor (o píxel) en la superficie de muestra 334 está configurado para recibir emisiones de luz de al menos dos clústeres. En realizaciones según la presente invención, el sensor recibe simultáneamente las emisiones de luz de al menos dos clústeres.

En realizaciones particulares, la intensidad de las respectivas emisiones de luz de los dos clústeres es significativamente diferente de modo que uno de los dos clústeres es un clúster “más claro” y el otro es un clúster “más oscuro”. En realizaciones, los valores de intensidad varían entre los ciclos de lectura de nucleótidos y, por tanto, la clasificación de más claro y más oscuro también puede cambiar entre ciclos. En otras realizaciones, un clúster más claro se denomina clúster “principal” o “dominante” y un clúster más oscuro se denomina clúster “secundario” o “subordinado”. Algunos ejemplos de relaciones de valores de intensidad de emisiones entre clústeres más claros y más oscuros incluyen 0,55:0,45, 0,60:0,40, 0,65:0,35, 0,70:0,30, 0,75:0,25, 0,80:0,20, 0,85:0,15, 0,90:0,10 y 0,95:0,05.

En otras realizaciones, los al menos dos clústeres no son clústeres más claros y más oscuros, sino clústeres con diferentes intensidades o clústeres que generan diferentes tipos de señales.

Durante cada acontecimiento de muestreo (p. ej., cada fase de iluminación o cada fase de adquisición de imágenes), el procesador de señales 138 recibe una señal de píxel única y común para al menos dos clústeres (p. ej., tanto el clúster más claro como el más oscuro). La señal de píxel única y común generada en cada acontecimiento de muestreo incluye/representa/refleja/transporta emisiones de luz/señales de intensidad/luz capturada/información detectada para o desde al menos dos clústeres (p. ej., tanto el clúster más claro como el más oscuro). En otras palabras, los al menos dos clústeres (p. ej., tanto el clúster más claro como el más oscuro) contribuyen a la señal de píxel única y común generada en cada acontecimiento de muestreo. En consecuencia, las emisiones de luz de los al menos dos clústeres (p. ej., tanto el clúster más claro como el más oscuro), se detectan simultáneamente en cada acontecimiento de muestreo y la señal de píxel única y común refleja las emisiones de luz de los al menos dos clústeres (p. ej., tanto el clúster más claro como el más oscuro).

Por ejemplo, en las Figuras 3 y 4, el par de clústeres 306AB incluye dos clústeres 306A y 306B que comparten un sensor 306. Como tal, el clúster 306A puede ser el clúster más oscuro y el clúster 306B puede ser el clúster más claro, dependiendo de sus respectivos valores de intensidad. El procesador de señales 138 utiliza entonces un algoritmo de lectura de nucleótidos para clasificar las señales de píxel de los clústeres más claros y más oscuros en una de dieciséis distribuciones, como se describe más adelante. En realizaciones particulares, el clúster más claro y más oscuro ocupan conjuntamente un pocillo, tal como el pocillo 406. Por lo tanto, el emparejamiento de clústeres puede definirse basándose en un área de píxel compartida o en un pocillo compartido, o en ambas cosas.

Las Figuras 5A y 5B son diagramas de dispersión 500A y 500B que representan la lectura de nucleótidos de los clústeres más claros y más oscuros utilizando sus respectivas señales de píxel detectadas por el sensor compartido según una realización. El eje X de los diagramas de dispersión 500A y 500B representa las señales de píxel de AT detectadas durante una segunda fase de iluminación del acontecimiento de muestreo que induce iluminación desde un clúster dado que indica las bases de nucleótidos A y T. El eje Y de los diagramas de dispersión 500A y 500B representa las señales de píxel de CT detectadas durante una primera fase de iluminación de un acontecimiento de muestreo que induce iluminación desde un clúster dado que indica las bases de nucleótidos C y T.

El diagrama de dispersión 500A muestra cuatro distribuciones 502, 504, 506 y 508 donde el procesador de señales 138 clasifica las señales de píxel del clúster más claro. En la realización ilustrada, la distribución 502 representa la base de nucleótido C en el clúster más claro, la distribución 504 representa la base de nucleótido T en el clúster más claro, la distribución 506 representa la base de nucleótido G en el clúster más claro y la distribución 508 representa la base de nucleótido A en el clúster más claro.

El diagrama de dispersión 500B muestra dieciséis subdistribuciones (o distribuciones) 502A-D, 504A-D, 506A-D y 508A-D, con cuatro subdistribuciones para cada una de las cuatro distribuciones 502, 504, 506 y 508 del diagrama de dispersión 500A), en el que el procesador de señales 138 clasifica las señales de píxel del clúster más oscuro. En la realización ilustrada, las subdistribuciones anotadas con la letra “A” representan la base de nucleótido C en el clúster más oscuro, las subdistribuciones anotadas con la letra “B” representan la base de nucleótido T en el clúster más oscuro, las subdistribuciones anotadas con la letra “C” representan la base de nucleótido G en el clúster más oscuro y las subdistribuciones anotadas con la letra “D” representan la base de nucleótido A en el clúster más oscuro. En otras realizaciones, pueden utilizarse diferentes codificaciones de las bases. Cuando el procesador de señales clasifica señales de píxel de un clúster más oscuro en una de las dieciséis subdistribuciones, la clasificación de los clústeres más claros correspondientes está determinada por la distribución que incluye la subdistribución del clúster más oscuro. Por ejemplo, si un clúster más oscuro se clasifica en la subdistribución 508B (base de nucleótido T), entonces la distribución para el clúster más claro correspondiente es 508 (base de nucleótido A). Como resultado, el procesador de señales 138 lee los nucleótidos del clúster más claro como A y los del clúster más oscuro como T.

La Figura 6 es un diagrama de dispersión 600 que representa dieciséis distribuciones (o contenedores) producidas por valores de intensidad de clústeres más claros y más oscuros de un par de clústeres según una realización. En realizaciones, los dieciséis contenedores se producen a lo largo de una pluralidad de ciclos de lectura de nucleótidos. El procesador de señales 138 combina señales de píxel de los clústeres más claros y más oscuros y las asigna a uno de los dieciséis contenedores. Cuando para un ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 612, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como C y el del clúster más oscuro como C. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 614, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como C y el del clúster más

oscuro como T. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 616, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como C y el del clúster más oscuro como G. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 618, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como C y el del clúster más oscuro como A.

Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 622, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como T y el del clúster más oscuro como C. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 624, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como T y el del clúster más oscuro como T. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 626, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como T y el del clúster más oscuro como G. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 628, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como T y el del clúster más oscuro como A.

Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 632, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como G y el del clúster más oscuro como C. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 634, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como G y el del clúster más oscuro como T. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 636, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como G y el del clúster más oscuro como G. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 638, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como G y el del clúster más oscuro como A.

Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 642, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como A y el del clúster más oscuro como C. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 644, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como A y el del clúster más oscuro como T. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 646, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como A y el del clúster más oscuro como G. Cuando para el ciclo de lectura de nucleótidos las señales de píxel combinadas se mapean al contenedor 648, el procesador de señales 138 lee el nucleótido del clúster más claro como A y el del clúster más oscuro como A.

La Figura 7A es una tabla de detección 700A que ilustra un esquema de lectura de nucleótidos de un protocolo de secuenciación con tinción y dos fases de iluminación según una realización. Una forma de diferenciar entre las distintas estrategias para detectar la incorporación de nucleótidos en una reacción de secuenciación utilizando un colorante fluorescente (o dos o más colorantes de espectros de excitación/emisión iguales o similares) consiste en caracterizar las incorporaciones en términos de presencia o ausencia relativa, o niveles intermedios, de transición de fluorescencia, que se produce durante un ciclo de secuenciación. Como tales, las estrategias de secuenciación pueden ilustrarse por su perfil fluorescente para un ciclo de secuenciación. Para las estrategias descritas en la presente memoria, "1" y "0" indican un estado fluorescente en el que un nucleótido está en un estado de señal (p. ej., detectable por fluorescencia) o si un nucleótido está en un estado oscuro (p. ej., no detectado o mínimamente detectado en una etapa de generación de imágenes). Un estado "0" no se refiere necesariamente a una carencia total, o ausencia de señal. También se contempla incluir la señal de fluorescencia mínima o disminuida (p. ej., señal de fondo) en el alcance de un estado "0" siempre que pueda distinguirse con fiabilidad un cambio en la fluorescencia del primer al segundo acontecimiento de iluminación (o viceversa). En una realización, una estrategia ilustrativa para detectar y determinar la incorporación de nucleótidos en una reacción de secuenciación utilizando un colorante fluorescente (o dos colorantes de espectros de excitación/emisión iguales o similares) y dos acontecimientos de iluminación, se ilustra mediante la tabla de detección 700A.

En la realización ilustrada, durante la primera fase de iluminación (señal de AT), la base de nucleótido A está etiquetada o activada (representada por el bit 1), la base de nucleótido C no está etiquetada o está desactivada (representada por el bit 0), la base de nucleótido G no está etiquetada o está desactivada (representada por el bit 0) y la base de nucleótido T está etiquetada o activada (representada por el bit 1). Durante la segunda fase de iluminación (señal de CT), la base de nucleótido A no está etiquetada o está desactivada (representada por el bit 0), la base de nucleótido C está etiquetada o activada (representada por el bit 1), la base de nucleótido G no está etiquetada o está desactivada (representada por el bit 0) y la base de nucleótido T está etiquetada o activada (representada por el bit 1).

La Fig. 7B es una tabla de lectura de nucleótidos 700B que muestra un esquema de clasificación para clasificar señales de píxel combinadas, incluyendo cada señal de píxel información de los clústeres más claros y más oscuros de un par de clústeres, en uno de dieciséis contenedores según una realización.

La tecnología descrita genera una señal de píxel que representa información detectada desde todos los múltiples clústeres en un área de píxel de un sensor compartido. Después, una secuencia de dichas señales de píxel de todos los clústeres, se mapea a contenedores para la lectura de nucleótidos de todos los clústeres. Por tanto, no se genera

una señal de píxel independiente y distinta para cada clúster. Esto tiene la ventaja de reducir varias veces la adquisición de imágenes y, por lo tanto, reducir el tiempo de secuenciación y acelerar el procesamiento de secuencias.

Se considera la Figura 7B, en la que un clúster más claro y un clúster más oscuro en un área de píxel realizan la lectura de nucleótidos. En cada ciclo, se muestrean dos señales de píxel: una señal de AT y una señal de CT. Durante el primer acontecimiento de muestreo, en la señal de AT se registran las emisiones de luz de los dos clústeres más claros y más oscuros de adeninas (A) y timinas (T) etiquetadas con fluorescencia, en lugar de dos señales de AT distintas, es decir, una para el clúster más claro y la otra para el más oscuro. De manera similar, durante el segundo acontecimiento de muestreo, en la señal de CT se registran las emisiones de luz de los clústeres más claros y más oscuros de citosinas (C) y timinas (T) etiquetadas con fluorescencia, en lugar de dos señales de CT distintas, es decir, una para el clúster más claro y la otra para el más oscuro.

De esta manera, las emisiones de luz de ambos clústeres se reciben durante un único acontecimiento de muestreo y producen una señal común de un solo píxel. Por lo tanto, para cada acontecimiento de muestreo, las emisiones de los clústeres más claros y más oscuros se representan conjuntamente en una señal común de un solo píxel.

Además, en cada ciclo, se utiliza una sola secuencia común de señales de píxel para la lectura conjunta de nucleótidos de los clústeres más claros y más oscuros. En la Figura 7B, las señales de AT y de CT juntas forman la única secuencia común de señales de píxel. Por tanto, la tecnología descrita no utiliza dos secuencias de señales de píxel distintas, es decir, una para el clúster más claro y otra para el clúster más oscuro, para leer por separado los nucleótidos de los clústeres más claros y más oscuros. Esto tiene la ventaja de reducir varias veces el procesamiento de señales y, por lo tanto, reducir el tiempo de secuenciación y acelerar el procesamiento de secuencias.

La lectura de nucleótidos descrita implica mapear la secuencia única y común de señales de píxel en contenedores. Por ejemplo, en la Figura 7B, con los valores 1 y 0, la secuencia de señales de AT y CT se mapea al contenedor 1 y a los clústeres más claros y más oscuros se les asignan las lecturas de nucleótidos A y A, respectivamente.

En el ejemplo mostrado en la Figura 7B, se utiliza una relación determinista de intensidad de clúster más claro a más oscuro de 0,7:0,3. En realizaciones, la relación de intensidad es indeterminada, como tal, produce clústeres más claros y más oscuros detectables que comparten un área de píxel o comparten un pocillo, o ambas cosas.

Como resultado de que la relación de intensidad es de 0,7:0,3 (es decir, los valores de intensidad de las emisiones de luz de los clústeres más claros y más oscuros son significativamente diferentes), las señales de píxel leídas desde el sensor compartido durante las dos fases de iluminación a lo largo de una pluralidad de ciclos de lectura de nucleótidos producen dieciséis contenedores 701 (contenedores 1-16). Cada contenedor tiene un par único de valores de señal de píxel (p. ej., un par único 710 para el contenedor 1), el par comprende un primer valor de señal de píxel 706 para los dos clústeres en la primera fase de iluminación (señal de AT) y un segundo valor de señal de píxel 708 para los dos clústeres en la segunda fase de iluminación (señal de CT).

Cada valor de señal de píxel 706 o 708 está compuesto a su vez por dos partes de señal 706A y 706B o 708A y 708B, que se combinan de forma aditiva para producir los valores de señal de píxel 706 o 708 correspondientes. Por tanto, se genera una señal común de un solo píxel tanto en los clústeres más claros como en los más oscuros.

Para cada valor de señal de píxel 706 o 708, se determina una primera parte de señal 706A o 708A a partir del valor de intensidad de las emisiones de luz del primer clúster y se determina una segunda parte de señal 706B o 708B a partir del valor de intensidad de las emisiones de luz del segundo clúster. En el ejemplo mostrado en la tabla de lectura de nucleótidos 700B, el primer clúster es el clúster más claro 702 y el segundo clúster es el clúster más oscuro 704.

Dado que la relación de intensidad es de 0,7:0,3, la primera y segunda señal de píxel pueden tomar uno de los cuatro valores posibles: 1, 0, 0,7 o 0,3. Además, cuando el clúster más claro produce un contenedor "activado", su contribución o parte de señal (706A, 708A) es de 0,7. Por el contrario, cuando el clúster más oscuro produce un contenedor "activado", su contribución o parte de señal (706B, 708B) es de 0,3. Una contribución o parte de señal que representa un contenedor "desactivado" se identifica con 0 para ambos clústeres. Dieciséis combinaciones únicas de los cuatro valores posibles 1, 0, 0,7 y 0,3 producen los dieciséis contenedores 701.

Una vez que el procesador de señales 138 identifica los dieciséis contenedores 701 de un par de clústeres más claros-más oscuros que se superponen a un sensor o pocillo compartido durante una pluralidad de ciclos de lectura de nucleótidos, el procesador de señales 138 utiliza la tabla 700B de lectura de nucleótidos para leer los nucleótidos del clúster más claro y más oscuro en ciclos sucesivos de lectura de nucleótidos. En una realización, la identificación da como resultado la clasificación del pocillo como poseedor de más de un clúster (es decir, el clúster más claro y el clúster más oscuro). Por tanto, en un ciclo de lectura de nucleótidos sucesivo, el procesador de señales realiza una primera lectura de píxel del sensor compartido para la primera fase de iluminación (señal de AT). Esta primera lectura de píxel produce una primera señal de píxel. De manera similar, una segunda lectura de píxel para la segunda fase de iluminación (señal de CT) produce una segunda señal de píxel. La primera y segunda señal de píxel producen valores de intensidad que se combinan para formar un par de valores. Este par de valores se puede comparar con uno de los dieciséis pares de valores únicos en la tabla de lectura de nucleótidos 700B. Basándose en la comparación,

se selecciona uno de los dieciséis contenedores. La lectura de nucleótidos de los clústeres más claros y más oscuros se realiza según las bases de nucleótidos asignadas al contenedor seleccionado. Este proceso se repite para ciclos de lectura de nucleótidos posteriores para identificar las bases de nucleótidos presentes en las respectivas secuencias de nucleótidos del clúster más claro y más oscuro.

Por lo tanto, la tecnología descrita trata las emisiones de todos los clústeres como útiles para la lectura de nucleótidos, independientemente de su fuerza relativa. Esto se debe a que los clústeres que tienen emisiones más débiles (p. ej., el clúster más oscuro) no realizan la lectura de nucleótidos por separado; en lugar de ello, la lectura de nucleótidos es conjunta con clústeres que tienen emisiones más fuertes (p. ej., clústeres más claros) utilizando una secuencia única y común de señales de píxel que transportan tanto las emisiones más fuertes como las más débiles.

Como se mencionó anteriormente, el sensor compartido captura fotones de dos clústeres diferentes (p. ej., un clúster más claro y un clúster más oscuro). En algunas realizaciones, las partes de señal se detectan desconvolucionando las lecturas de señal del sensor compartido para diferenciar las partes de señal individuales generadas por cada uno de los clústeres.

La Figura 8 muestra un método 800 de lectura de nucleótidos analizando señales de píxel emitidas por una pluralidad de clústeres que comparten un área de píxel según una realización. En la acción 802, se detecta una primera señal de píxel que representa la luz recogida de múltiples clústeres en una primera área de píxel durante una primera fase de iluminación del ciclo de lectura de nucleótidos. En algunas realizaciones, la primera área de píxel recibe luz desde un pocillo asociado en la superficie de muestra 334. En otras realizaciones, la primera área de píxel recibe luz desde más de un pocillo asociado en la superficie de muestra 334.

En la acción 804, se detecta una segunda señal de píxel que representa la luz recogida de múltiples clústeres en la primera área de píxel durante una segunda fase de iluminación del ciclo de lectura de nucleótidos.

En realizaciones, la primera área de píxel subyace a una pluralidad de clústeres que comparten la primera área de píxel. La primera y segunda señal de píxel pueden recogerse en un primer sensor de la primera zona de píxel. La primera y segunda señal de píxel pueden detectarse en el procesador de señales 138, que está configurado para procesar señales de píxel recogidas por el primer sensor.

En algunas realizaciones, la primera fase de iluminación puede inducir la iluminación del primer y segundo clúster para producir emisiones de las bases de nucleótidos A y T etiquetadas, y la segunda fase de iluminación puede inducir la iluminación del primer y segundo clúster para producir emisiones de las bases de nucleótidos C y T etiquetadas.

En la acción 806, se utiliza una combinación de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en cada clúster de la pluralidad de clústeres durante el ciclo de lectura de nucleótidos. En realizaciones, esto incluye mapear la primera señal de píxel en al menos cuatro contenedores y mapear la segunda señal de píxel en al menos cuatro contenedores, y combinar el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para la lectura de nucleótidos.

En realizaciones, el método 800 se aplica para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en una pluralidad de áreas de píxel durante el ciclo de lectura de nucleótidos. En realizaciones, el método 800 se repite durante ciclos sucesivos de lectura de nucleótidos para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel durante cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos.

En algunas realizaciones, para cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos, se detectan y almacenan la primera y segunda señal de píxel emitidas por la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel. Después de los ciclos de lectura de nucleótidos, la combinación de la primera y segunda señal de píxel se utiliza para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres en la pluralidad de áreas de píxel durante cada uno de los ciclos de lectura de nucleótidos anteriores.

La Figura 9 representa un método 900 de identificación de áreas de píxel con más de un clúster en la superficie de muestra 334 del biosensor 300 y clústeres de lectura de nucleótidos en las áreas de píxel identificadas según una realización. En la acción 902, se realiza una pluralidad de ciclos de lectura de nucleótidos. Cada ciclo de lectura de nucleótidos tiene una primera fase de iluminación y una segunda fase de iluminación.

En la acción 904, un sensor asociado con un área de píxel de la superficie de muestra 334 captura - (a) un primer conjunto de valores de intensidad generados durante la primera fase de iluminación de los ciclos de lectura de nucleótidos y (b) un segundo conjunto de valores de intensidad generados durante la segunda fase de iluminación de los ciclos de lectura de nucleótidos. En realizaciones, los valores de intensidad se normalizan. Además, en algunas realizaciones, el área de píxel recibe luz desde un pocillo asociado en la superficie de muestra 334.

En la acción 906, el procesador de señales 138 ajusta (mostrado en la Figura 6) el primer y segundo conjunto de valores de intensidad a uno de un conjunto de distribuciones (donde una distribución es un área en el gráfico bidimensional de la Figura 6), incluyendo dieciséis distribuciones en este ejemplo y, basándose en el ajuste, clasifica

el área de píxel como si tuviera más de un clúster. En realizaciones, el procesador de señales 138 utiliza uno o más algoritmos para ajustar las dieciséis distribuciones. Como ejemplos de algoritmos se incluyen un algoritmo de clusterización K-medias, un algoritmo de clusterización similar a K-medias, un algoritmo de maximización de expectativas y un algoritmo basado en histograma.

En la acción 908, para un ciclo de lectura de nucleótidos sucesivo, el procesador de señales 138 detecta el primer y segundo conjunto de valores de intensidad para un grupo de clústeres en el área de píxel. En la acción 910, el procesador de señales 138 selecciona una distribución para el grupo de clústeres entre las dieciséis distribuciones. La distribución identifica una base de nucleótidos presente en cada clúster del grupo de clústeres.

En algunas realizaciones, las relaciones de intensidad son una propiedad intrínseca de los clústeres más claros y más oscuros que producen emisiones de luz significativamente diferentes. En otras realizaciones, las relaciones de intensidad y las emisiones de luz, significativamente diferentes entre clústeres, se activan mediante las siguientes realizaciones, tales como distribución irregular de clústeres en una superficie plana, dobles pocillos por sensor (o píxel) e iluminación fuera del eje.

Análisis espacial basado en superficies planas de clústeres distribuidos irregularmente

La Figura 10 ilustra una vista en planta superior 1000 de la superficie de muestra 334 que tiene áreas de píxel (representadas como rectángulos) en las que una pluralidad de clústeres (representados como círculos) se distribuyen irregularmente según una realización. Las posiciones de los clústeres en el pocillo 334 de superficie pueden no estar confinadas por pocillos con respecto a las ubicaciones de los sensores (o píxeles). Dicha disposición de clústeres sobre la superficie de muestra 334 se denomina distribución irregular. En realizaciones particulares, los clústeres se distribuyen irregularmente en una configuración “plana” de la superficie de muestra 334 que no incluye pocillos. En dicha realización de superficie plana, las áreas de píxel pueden superponerse.

En la realización ilustrada, se consideran dos ejemplos de clústeres 1002 y 1004 que comparten cuatro áreas de píxel A, B, C y D. Dependiendo de la posición relativa del clúster con respecto a los centros de las áreas de píxel A, B, C y D, los sensores (o píxeles) correspondientes reciben diferentes cantidades de emisiones de luz. Esto produce patrones de iluminación que crean una interferencia diferencial entre los clústeres 1002 y 1004 a lo largo de una pluralidad de ciclos de lectura de nucleótidos de una ejecución de secuenciación, que puede utilizarse para construir un mapa de ubicaciones de clústeres en la superficie de muestra 334, como se describe más adelante. La interferencia diferencial se materializa en las señales de píxel como información de dos o más clústeres en una señal de píxel.

El procesador de señales 138 ejecuta un análisis de secuencia temporal y espacial de una pluralidad de secuencias de señales de píxel para que los clústeres detecten patrones de iluminación correspondientes a clústeres individuales distribuidos irregularmente en la superficie de muestra 334. La pluralidad de secuencias de señales de píxel codifica la interferencia diferencial entre al menos dos clústeres resultantes de su distribución irregular sobre las áreas de píxel.

El análisis espacial incluye el uso de secuencias de señales de píxel recogidas de un grupo de áreas de píxel para determinar las características espaciales de un clúster dado, incluida la ubicación del clúster dado en la superficie de muestra 334. Después de identificar las ubicaciones de los clústeres y sus patrones de iluminación a lo largo de la pluralidad de ciclos de lectura de nucleótidos, el procesador de señales 138 puede leer los nucleótidos utilizando uno de los protocolos de secuenciación comentados anteriormente.

En la realización de análisis espacial, la tecnología descrita aumenta el rendimiento del biosensor 300 utilizando N sensores (o píxeles) para localizar y leer nucleótidos de clústeres $N + M$ distribuidos irregularmente en la superficie de muestra 334, donde M es un número entero positivo. En algunas realizaciones, M es igual a N o casi igual a N. En otras realizaciones, cuando dos clústeres, que comparten (u ocupan conjuntamente) un área de píxel y/o un pocillo, no son detectables por separado debido a una diferencia inadecuada en los valores de intensidad, M podría no ser igual a N o incluso ser menor que N.

Dobles pocillos por sensor (o píxel)

La Figura 11A ilustra una vista lateral 1100A de una superficie de muestra que tiene dos pocillos por área de píxel que incluye un pocillo dominante (o principal) y un pocillo subordinado (o secundario) según una realización. La Figura 11B representa una vista en planta superior 1100B de la superficie de muestra de la Figura 11A.

En la realización ilustrada, el sensor 1106 (o píxel) compartido, corresponde a dos pocillos 1102 y 1104 en la superficie de muestra 334. El pocillo dominante tiene una mayor sección transversal sobre el área de píxel que el pocillo subordinado. Dado que el pocillo 1104 tiene una mayor sección transversal sobre el sensor 1106, el pocillo 1104 es el pocillo dominante y el pocillo 1102 es el pocillo subordinado.

En realizaciones, los dos pocillos tienen diferentes desviaciones con respecto a un centro del área de píxel 1106'. En la realización ilustrada, el pocillo dominante 1104 está más próximo al centro del área de píxel 1106A que el pocillo

subordinado 1102 (es decir, el pocillo dominante 1104 tiene un desplazamiento menor con respecto al centro del área de píxel 1106A que el pocillo subordinado 1102).

Debido a la cobertura transversal diferencial y al resultado de las desviaciones relativas, el sensor 1106 recibe diferentes cantidades de iluminación de los dos pocillos durante las fases de iluminación del ciclo de lectura de nucleótidos (o acontecimiento de muestreo). Dado que cada uno de los pocillos 1102 y 1104 contiene un clúster 1102A y 1104A correspondiente, las diferentes cantidades de iluminación permiten la identificación de uno de los clústeres como más claro (o principal) y el otro como más oscuro (o secundario). En la realización ilustrada, el clúster 1102A dentro del pocillo dominante 1102 se identifica como el clúster más claro y el clúster 1104A dentro del pocillo subordinado 1104 se identifica como el clúster más oscuro. En realizaciones, el sensor 1106 recibe una cantidad de iluminación del clúster más claro 1102A que es mayor que una cantidad de iluminación recibida del clúster más oscuro 1104A en el pocillo subordinado 1104.

Después de identificar los clústeres más claros y más oscuros, el procesador de señales 138 puede realizar la lectura de nucleótidos utilizando uno de los protocolos de secuenciación comentados anteriormente. En algunas realizaciones de doble pocillo por sensor (o píxel), la tecnología descrita aumenta el rendimiento del biosensor 300 realizando la lectura de nucleótidos de dos clústeres 1102A y 1102B contenidos en dos pocillos 1102 y 1104 correspondientes utilizando un sensor 1106 compartido. En otras realizaciones de doble pocillo por sensor (o píxel), la tecnología descrita aumenta el rendimiento del biosensor 300 utilizando N sensores para la lectura de nucleótidos de N + M clústeres en N + M pocillos correspondientes de la superficie de muestra 334, donde M es un número entero positivo. En algunas realizaciones, M es igual a N o casi igual a N. En otras realizaciones, M podría no ser igual a N o incluso ser menor que N.

Iluminación fuera del eje

Las Figuras 12A y 12B muestran la iluminación fuera del eje 1200A y 1200B de un pocillo que cubre un área de píxel de una superficie de muestra. El sistema de iluminación 109 está configurado para iluminar las áreas de píxel 1204' y 1214' (asociadas con sensores 1204 y 1214) con diferentes ángulos de señales de iluminación 1201 y 1211 durante las fases de iluminación de un ciclo de lectura de nucleótidos. Como resultado, los pocillos 1202 y 1212 se iluminan con señales de iluminación fuera del eje o no ortogonal. Esto produce regiones de pocillo iluminadas asimétricamente en cada uno de los pocillos 1202 y 1212, representados en las Figuras 12A y 12B con áreas sombreadas claras y oscuras en cada pocillo. Las regiones de pocillo iluminadas asimétricamente de un pocillo incluyen al menos una región de pocillo dominante 1202B' o 1212A' (representada en un tono más claro) y una región de pocillo subordinado 1202A' o 1212 B' (representada en un tono más oscuro), de modo que durante el ciclo de lectura de nucleótidos la región de pocillo dominante se ilumina más que la región de pocillo subordinado.

Cada pocillo está configurado para contener más de un clúster durante el ciclo de lectura de nucleótidos, incluyendo cada una de las regiones de pocillo dominante y subordinado un clúster. En la realización ilustrada, el pocillo 1202 contiene dos clústeres 1202A y 1202B, estando el clúster 1202A dentro de la región de pocillo subordinado 1202A' y el clúster 1202B dentro de la región de pocillo dominante 1202B'. El pocillo 1212 contiene dos clústeres 1212A y 1212B, estando el clúster 1212A dentro de la región de pocillo dominante 1212A' y el clúster 1212B dentro de la región de pocillo subordinado 1202B'.

Debido a la iluminación fuera del eje, las áreas de píxel 1204' y 1214' de los pocillos 1202 y 1212 reciben diferentes cantidades de iluminación de las regiones de un pocillo dominante y subordinado. Como resultado, durante el ciclo de lectura de nucleótidos, los clústeres en las regiones de pocillo dominante producen mayores cantidades de iluminación que los clústeres en las regiones de pocillo subordinado. Para cada pocillo, esto permite identificar uno de los clústeres como más claro (o principal) y el otro como más oscuro (o secundario). En la realización ilustrada, para el pocillo 1202, el clúster 1202B dentro de la región de pocillo dominante 1202B' se identifica como el clúster más claro y el clúster 1202A dentro de la región de pocillo subordinado 1202A' se identifica como el clúster más oscuro. Para el pocillo 1212, el clúster 1212A dentro de la región de pocillo dominante 1212A' se identifica como el clúster más claro y el clúster 1212B dentro de la región de pocillo subordinado 1212B' se identifica como el clúster más oscuro.

Después de identificar los clústeres más claros y más oscuros para cada pocillo, el procesador de señales 138 realiza la lectura de nucleótidos utilizando uno de los protocolos de secuenciación comentados anteriormente. En la realización de iluminación fuera del eje, la tecnología descrita aumenta el rendimiento del biosensor 300 utilizando N sensores (o píxeles) para la lectura de nucleótidos de N + M clústeres dentro de N pocillos iluminados no ortogonalmente en la superficie de muestra 334, donde M es un número entero positivo. En algunas realizaciones, M es igual a N o casi igual a N. En otras realizaciones, cuando dos clústeres, que comparten (u ocupan conjuntamente) un área de píxel y/o un pocillo, no son detectables por separado debido a una diferencia inadecuada en los valores de intensidad, M podría no ser igual a N o incluso ser menor que N.

En una realización, la iluminación fuera del eje tiene un ángulo de cuarenta y cinco grados. En algunas realizaciones, se superpone un pocillo por área de píxel. En otras realizaciones, se superponen dos pocillos por área de píxel.

La Figura 12C ilustra regiones de pocillo 1200C iluminadas asimétricamente producidas por la iluminación fuera del eje de las Figuras 12A y 12B según una realización. Como se muestra en la Figura 12C, la región de pocillo 1220 está más iluminada que la región de pocillo 1230.

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor (102, 300, 400) para la lectura de nucleótidos, que comprende:

5 un dispositivo de muestreo (304), incluyendo el dispositivo de muestreo (304) una superficie de muestra (334) que tiene una matriz de áreas de píxel (306', 308', 310', 312', 314', 1106') que cada una de ellas puede contener más de un clúster durante un ciclo de lectura de nucleótidos, y un generador de imágenes de estado sólido (322) que tiene una matriz de sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106), estando cada sensor (306, 308, 310, 312, 314, 1106) configurado para generar
10 señales de píxel en cada ciclo de lectura de nucleótidos, representando cada señal de píxel la luz recogida de un área de píxel (306', 308', 310', 312', 314', 1106') correspondiente de la superficie de muestra (334); y
un procesador de señales (104, 130, 138) configurado para la conexión al dispositivo de muestreo (304) y, cuando se conecta al dispositivo de muestreo (304), configurado para recibir y procesar las
15 señales de píxel de los sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) para la lectura de nucleótidos en un ciclo de lectura de nucleótidos, y para utilizar las señales de píxel de menos sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) que un número de clústeres (1102A, 1104A, 306A-B) con lectura de nucleótidos en el ciclo de lectura de nucleótidos, **caracterizado por que** las señales de píxel de los menos sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) incluyen al menos una señal de píxel que representa luz
20 recogida simultáneamente de al menos dos clústeres (1102A, 1104A, 306A-B) en el área de píxel correspondiente (1106', 306'), y **por que** el procesador de señales (104, 130, 138) está configurado para procesar dicha al menos una señal de píxel para la lectura de nucleótidos de cada uno de los al menos dos clústeres (1102A, 1104A, 306A-B).

25 2. El biosensor (102, 300, 400) de la reivindicación 1, que comprende un pocillo (406, 1212) en la superficie de muestra (334), en donde un área de píxel (1106', 306') está configurada para recibir luz del pocillo (406, 1212) en la superficie de muestra (334) y el pocillo (406, 1212) está configurado para contener más de un clúster (306A-B, 1212A-B) durante el ciclo de lectura de nucleótidos, preferiblemente en donde un clúster (306A, 1102A, 1202A) comprende una pluralidad de fragmentos de ácido desoxirribonucleico, abreviado ADN, monocatenario, que tienen una secuencia de ácido nucleico idéntica.

3. Un sistema (100) para la lectura de nucleótidos, que comprende:

35 un biosensor (102, 300, 400) según la reivindicación 1 o 2;
un receptáculo (112) configurado para contener el biosensor (102, 300, 400) durante una secuencia de acontecimientos de muestreo, en donde la matriz de sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) está configurada para generar una señal de píxel en un acontecimiento de muestreo, estando la matriz de sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) configurada para generar una
40 pluralidad de secuencias de señales de píxel, teniendo la matriz de sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) un número N de sensores activos, estando los sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) dispuestos en la matriz con respecto a la superficie de muestra (334) para generar señales de píxel respectivas durante la secuencia de acontecimientos de muestreo a partir del número N de áreas de píxel (306', 308', 310', 312', 314', 1106') correspondientes de la superficie de muestra (334) para producir una pluralidad de secuencias de señales de píxel; el sistema para la lectura de nucleótidos
45 comprende además:

un puerto de comunicación (120) configurado para emitir la pluralidad de secuencias de señales de píxel,
50 en donde el procesador de señales (104, 130, 138) está acoplado al puerto de comunicación (120) y configurado para recibir y procesar la pluralidad de secuencias de señales de píxel para clasificar los resultados de la secuencia de acontecimientos de muestreo en clústeres en una pluralidad de clústeres (1102A, 1104A, 306A-B), incluyendo el uso de la pluralidad de secuencias de señales de píxel para clasificar los resultados de la secuencia de acontecimientos de muestreo en un número N + M de clústeres en la
55 pluralidad de clústeres a partir del número N de sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106), activos, donde M es un número entero positivo.

4. El sistema de la reivindicación 3, en donde los resultados de la secuencia de acontecimientos de muestreo corresponden a bases de nucleótidos (702, 704) en los clústeres.

60 5. El sistema de la reivindicación 3, en donde las secuencias de señales de píxel en la pluralidad de secuencias de señales de píxel incluyen un conjunto de muestras de señal para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto al menos una señal de píxel de cada una de las dos fases de iluminación (706, 708) sucesivas;

- preferiblemente en donde el procesador de señales (104, 130, 138) incluye lógica configurada para clasificar resultados para dos clústeres (1102A, 1104A, 306A-B) a partir de las secuencias de señales de píxel de un único sensor en la matriz de sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106); más preferiblemente en donde la lógica para clasificar resultados para dos clústeres (1102A, 1104A, 306A-B) incluye mapear una primera señal de píxel del conjunto de muestras de señal para un acontecimiento de muestreo de un sensor (306, 1106) particular en al menos cuatro contenedores (701), y mapear una segunda señal de píxel del conjunto de muestras de señal para el acontecimiento de muestreo en al menos cuatro contenedores (701), y combinar lógicamente el mapeo de la primera y segunda señal de píxel (figuras 7A-B) para clasificar los resultados para dos clústeres.
6. El sistema de la reivindicación 3, en donde los sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) en la matriz de sensores (306, 308, 310, 312, 314, 1106) comprenden detectores de luz.
 7. El sistema de la reivindicación 3, en donde las secuencias de señales de píxel en la pluralidad de secuencias de señales de píxel incluyen un conjunto de muestras de señal para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto al menos una señal de píxel de cada una de las dos fases de iluminación (706, 708) sucesivas, y en donde la primera fase de iluminación (706) induce la iluminación desde un clúster dado que indica las bases de nucleótidos A y T y la segunda fase de iluminación (708) induce la iluminación desde un clúster dado que indica las bases de nucleótidos C y G, y dichos resultados de clasificación comprenden la lectura de una de las bases de nucleótidos A, C, T o G.
 8. El sistema de la reivindicación 3, en donde la superficie de muestra (334) contiene clústeres (1102A, 1104A, 306A-B) que están distribuidos irregularmente sobre las áreas de píxel (1106', 306'), y el procesador de señales (104, 130, 138) está configurado para ejecutar un análisis de secuencia temporal y espacial de la pluralidad de secuencias de señales de píxel para detectar patrones de iluminación correspondientes a clústeres (1102A, 1104A, 306A-B) individuales en la superficie de muestra (334), y para clasificar los resultados de los acontecimientos de muestreo para los clústeres individuales.
 9. El sistema de la reivindicación 3, en donde la superficie de muestra (334) comprende una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, incluidos dos pocillos (1102, 1104) por área de píxel (1106'), incluyendo los dos pocillos por área de píxel un pocillo dominante (1104) y un pocillo subordinado (1102), teniendo el pocillo dominante (1104) una mayor sección transversal sobre el área de píxel (1106') que el pocillo subordinado (1102).
 10. El sistema de la reivindicación 3, en donde la superficie de muestra (334) comprende una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, y los acontecimientos de muestreo incluyen al menos una fase química con un número K de fases de iluminación donde K es un número entero positivo, donde las fases de iluminación de las K fases de iluminación iluminan las áreas de píxel (1204', 1214') con diferentes ángulos de iluminación (1201, 1211), y las secuencias de señales de píxel incluyen un conjunto de muestras de señales para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto el número K de señales de píxel para la al menos una fases química de los acontecimientos de muestreo.
 11. El sistema de la reivindicación 3, en donde la superficie de muestra (334) comprende una matriz de pocillos que cubre las áreas de píxel, y los acontecimientos de muestreo incluyen una primera fase química con un número K de fases de iluminación donde K es un número entero positivo, donde las fases de iluminación de las K fases de iluminación iluminan las áreas de píxel con diferentes ángulos de iluminación (1201, 1211), y una segunda fase química con un número J de fases de iluminación donde J es un número entero positivo, donde las fases de iluminación de las K fases de iluminación en la primera fase química y las J fases de iluminación en la segunda fase química iluminan los pocillos en el conjunto de pocillos con diferentes ángulos de iluminación (1201, 1211), y las secuencias de señales de píxel incluyen un conjunto de muestras de señales para cada acontecimiento de muestreo, incluyendo el conjunto el número K de señales de píxel para la primera fase química más el número J de señales de píxel para la segunda fase química de los acontecimientos de muestreo.
 12. Un método (800, 900) de lectura de nucleótidos, que incluye:
 - para un ciclo de lectura de nucleótidos de una ejecución de secuenciación por síntesis, SBS, detectar
 - una primera señal de píxel (706) que representa la luz recogida de una primera área de píxel (1106', 306') durante una primera fase de iluminación del ciclo de lectura de nucleótidos,
 - una segunda señal de píxel (708) que representa la luz recogida de dicha primera área de píxel (1106', 306') durante una segunda fase de iluminación del ciclo de lectura de nucleótidos;
 - en donde la primera área de píxel subyace a una pluralidad de clústeres que comparten la primera área de píxel; y usar una combinación de la primera y segunda señal de píxel para identificar bases de nucleótidos incorporadas en cada clúster de la pluralidad de clústeres (1102A, 1104A, 306A-B)

durante el ciclo de lectura de nucleótidos, **caracterizado por que** cada una de la primera y segunda señal de píxel representa luz recogida simultáneamente de al menos dos de los clústeres (1102A, 1104A, 306A-B) en la primera área de píxel (1106', 306').

5 13. El método (800, 900) de la reivindicación 12, que incluye además:

mapear la primera señal de píxel en al menos cuatro contenedores (701) y mapear la segunda señal de píxel en al menos cuatro contenedores (701), y
10 combinar el mapeo de la primera y segunda señal de píxel para identificar las bases de nucleótidos incorporadas;
incluyendo preferiblemente además, la aplicación del método (800, 900) para identificar las bases de nucleótidos incorporadas en la pluralidad de clústeres (306A-B, 1102A, 1104A) en una pluralidad de áreas de píxel (306', 1106') durante el ciclo de lectura de nucleótidos.

15 14. El método (800, 900) de la reivindicación 12, que incluye además:

ajustar el primer y segundo conjunto de valores de intensidad, generados durante la primera y segunda fase de iluminación respectivamente y capturados en un sensor asociado a la primera área de píxel, a un conjunto de distribuciones (500A, 500B) utilizando un procesador de señales (104, 130, 138) y, basándose en el ajuste, clasificar el área de píxel como si tuviese más de un clúster; y para un ciclo de lectura de nucleótidos sucesivo,
20 detectar el primer y segundo conjunto de valores de intensidad para un grupo de clústeres en el área de píxel utilizando el procesador de señales (104, 130, 138), y
25 seleccionar una distribución (612-648) para el grupo de clústeres, en donde la distribución (612-648) identifica una base de nucleótidos presente en cada clúster del grupo de clústeres.

15. El método (800, 900) de la reivindicación 14, en donde el ajuste comprende el uso de uno o más algoritmos, incluido un algoritmo de clusterización K-medias, un algoritmo de clusterización similar a K-medias, un algoritmo de maximización de expectativas y un algoritmo basado en histograma.
30

16. Un medio de almacenamiento no transitorio legible por ordenador que lleva impreso instrucciones de programa de ordenador para la lectura de nucleótidos que, cuando las instrucciones se ejecutan en el procesador de señales (104, 130, 138) del biosensor (102, 300, 400) de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o del sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 3-11, hacen que el procesador realice el método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-15.
35

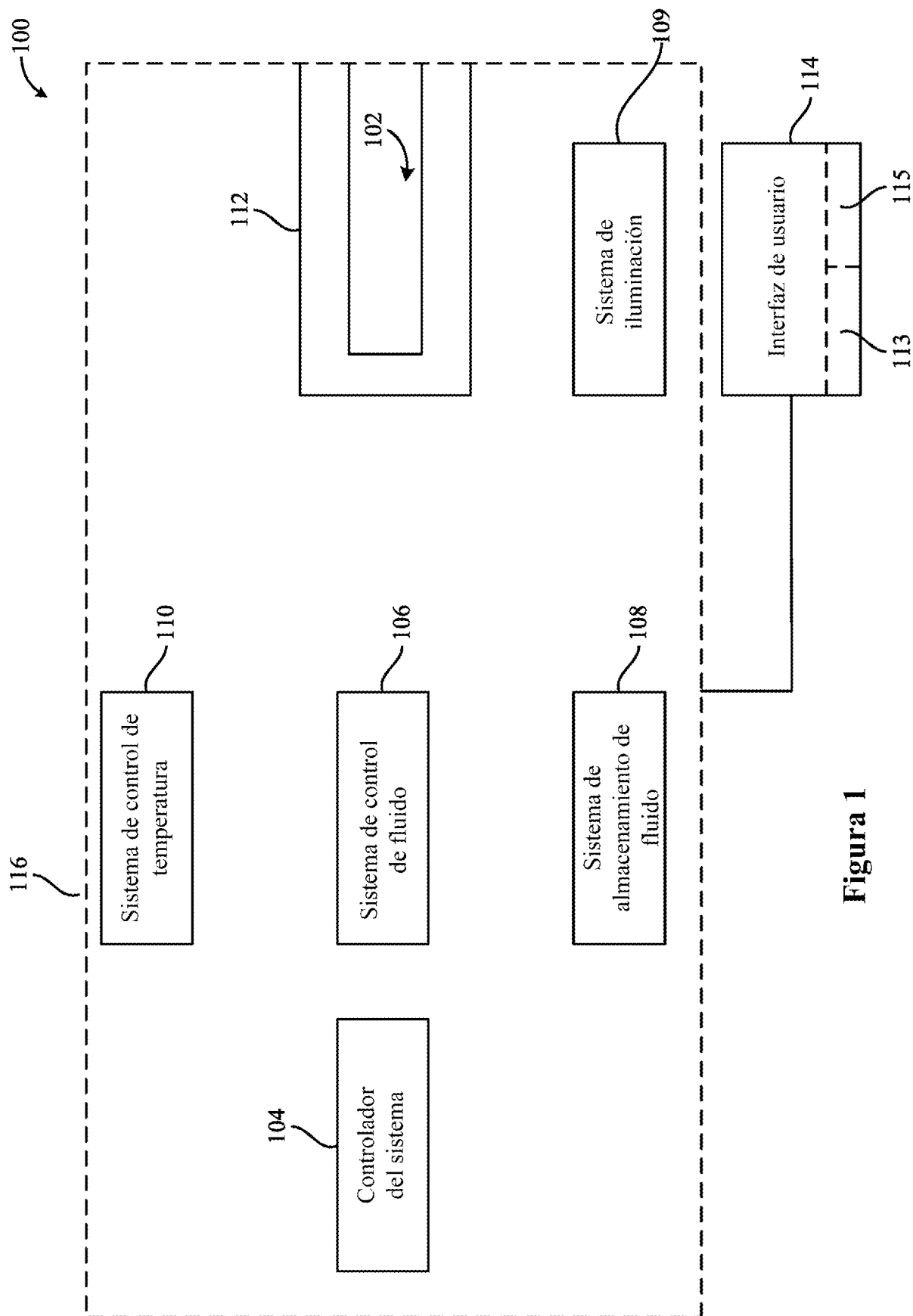


Figura 1

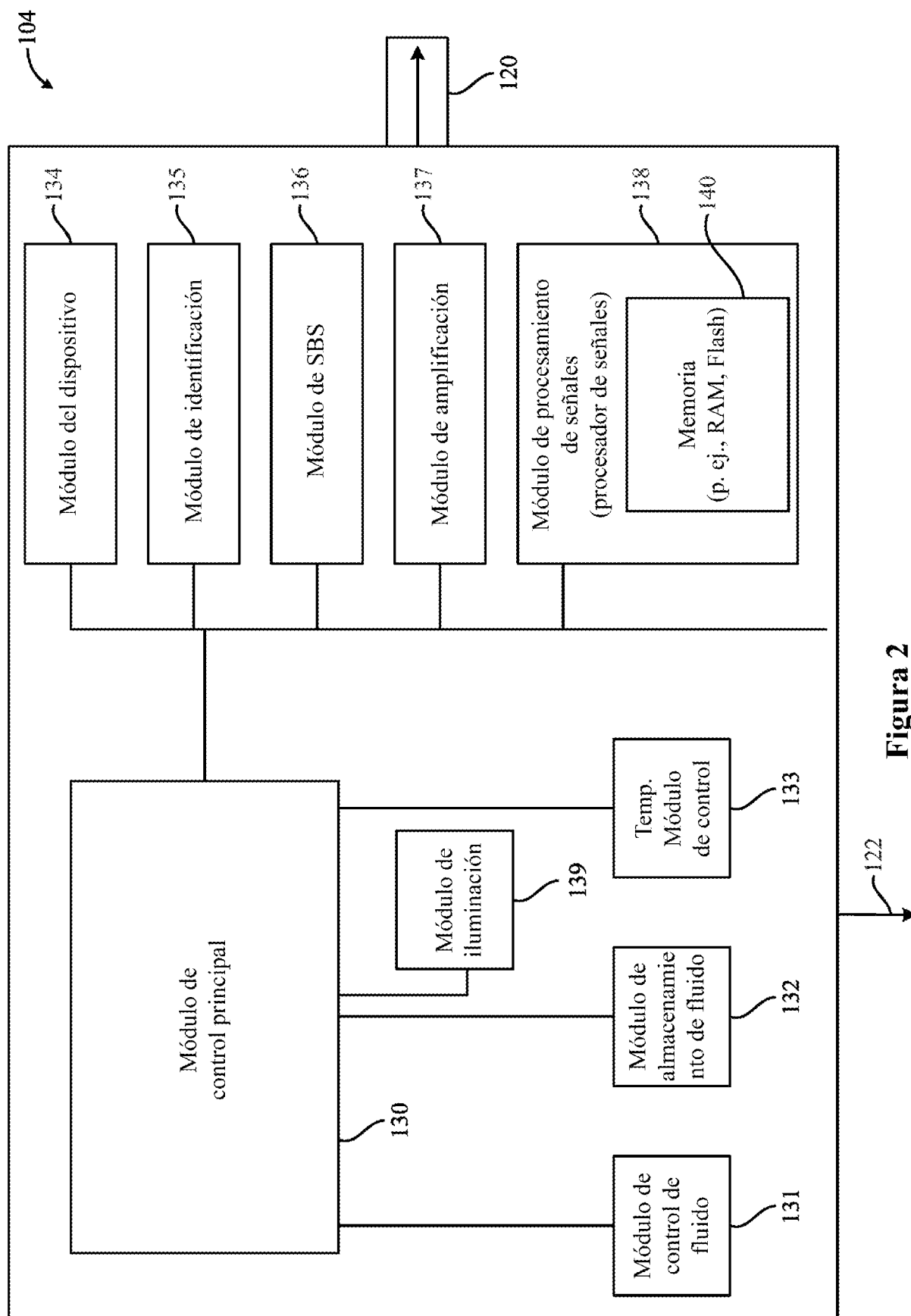


Figura 2

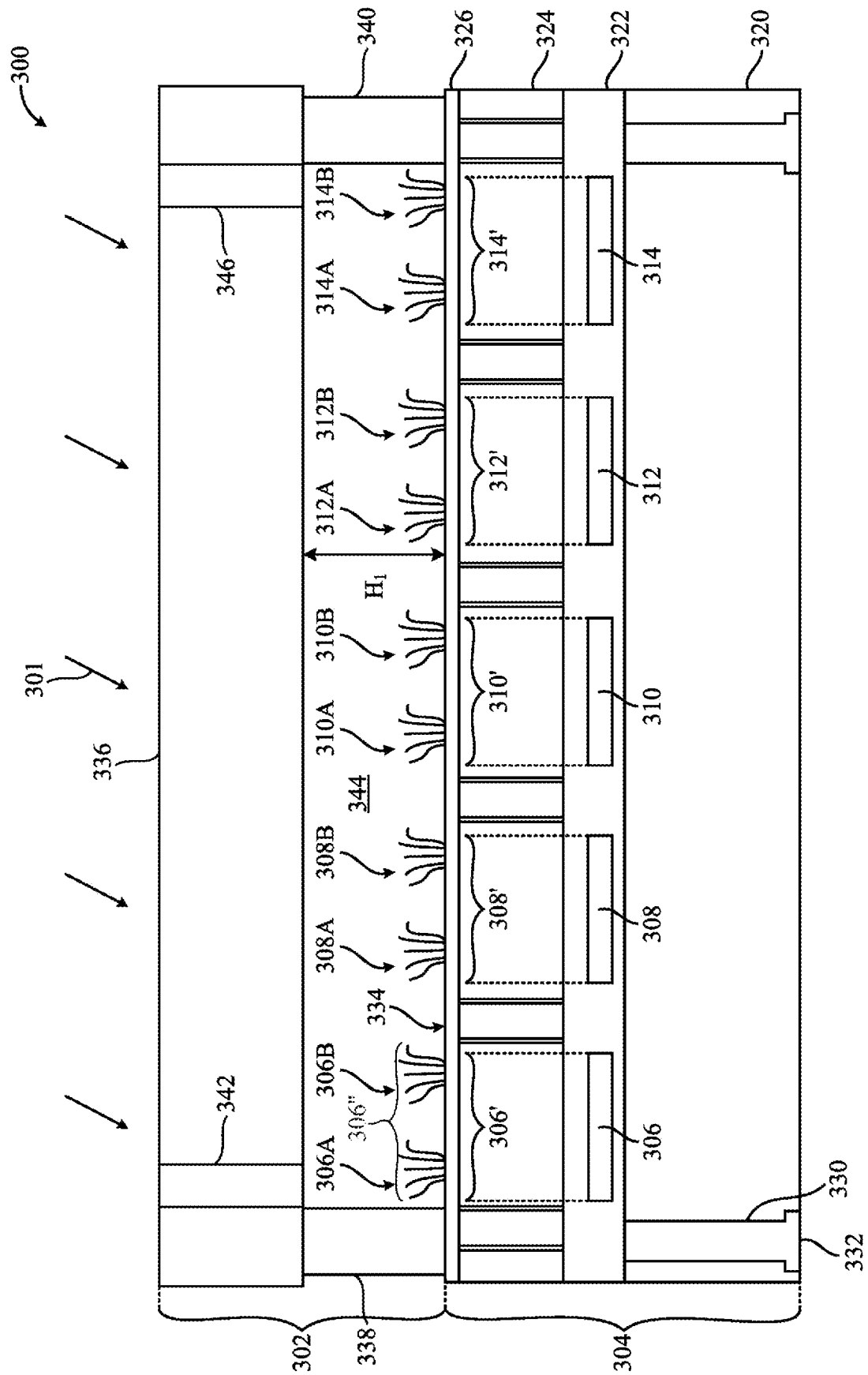


Figura 3

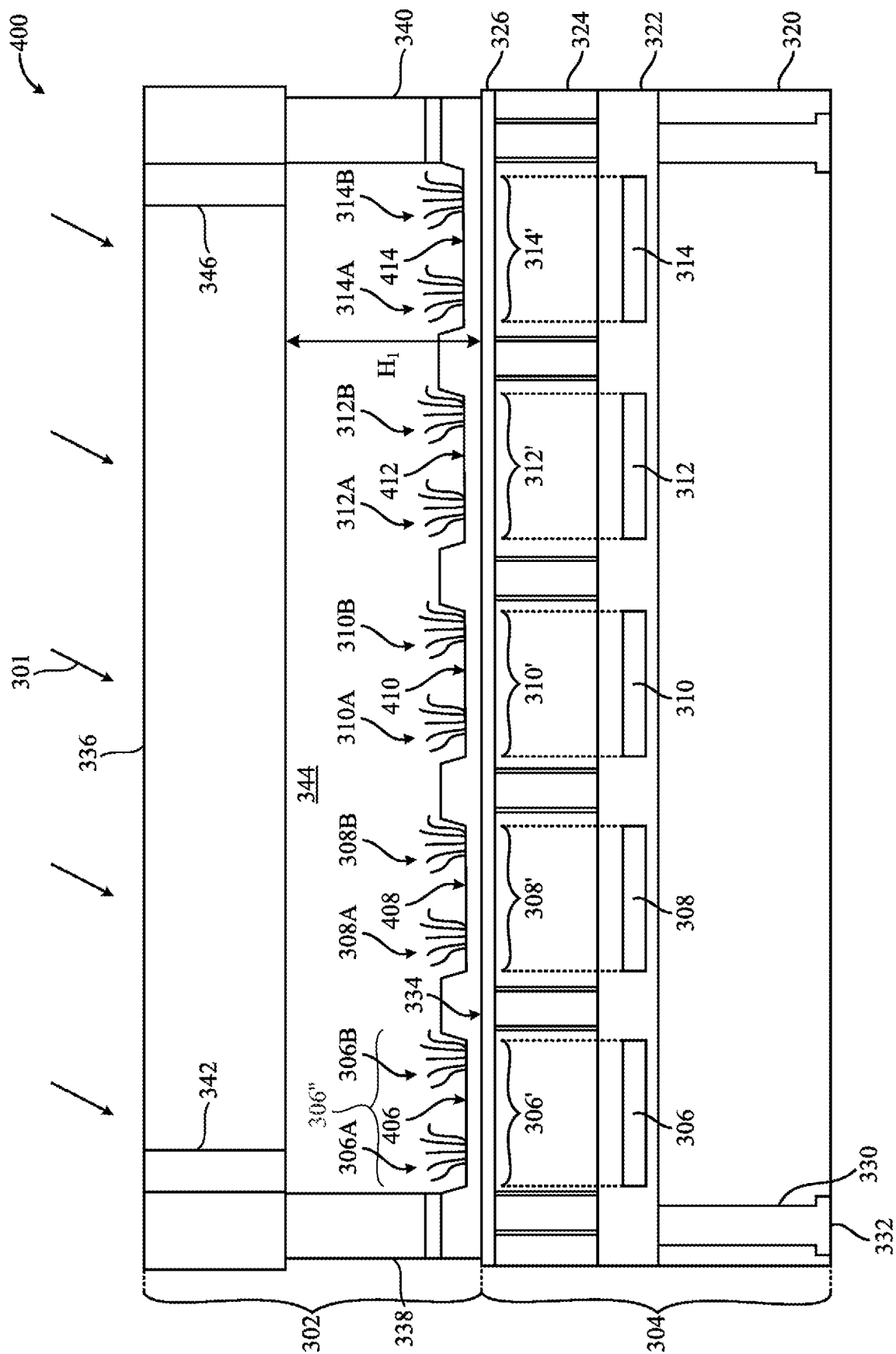


Figura 4

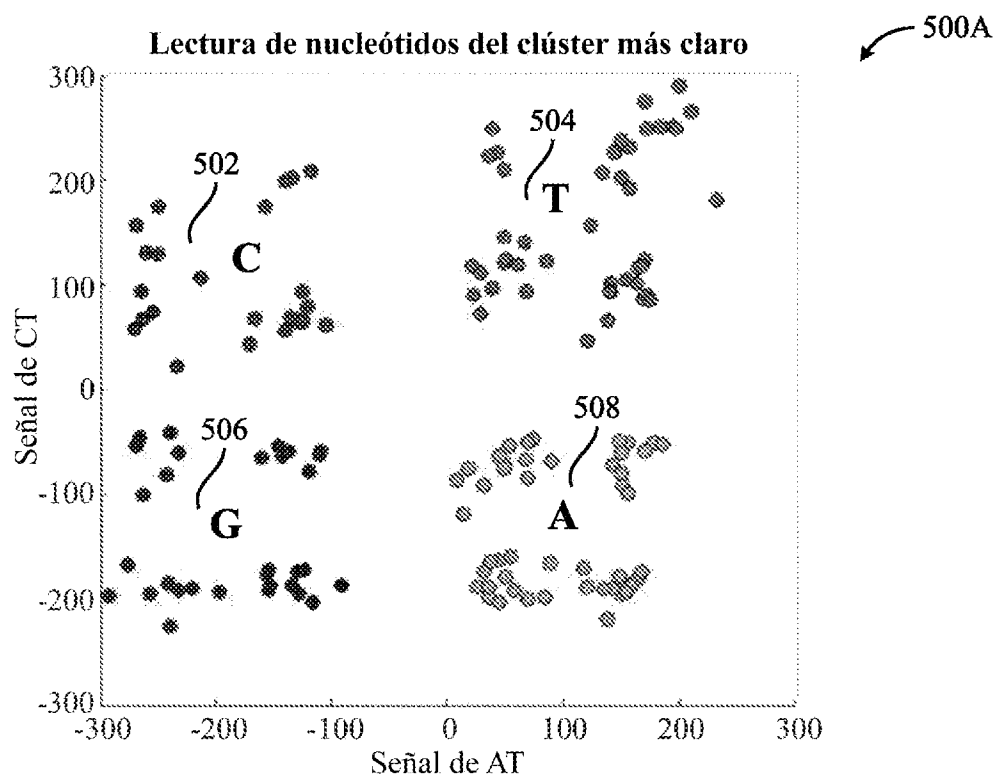


Figura 5A

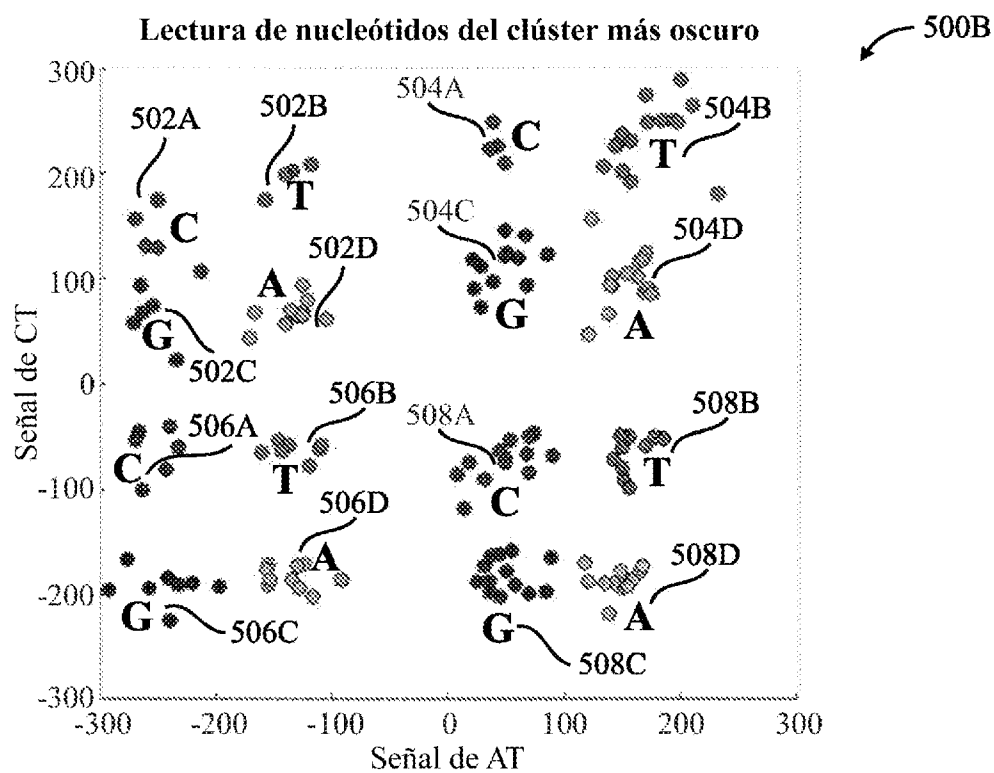
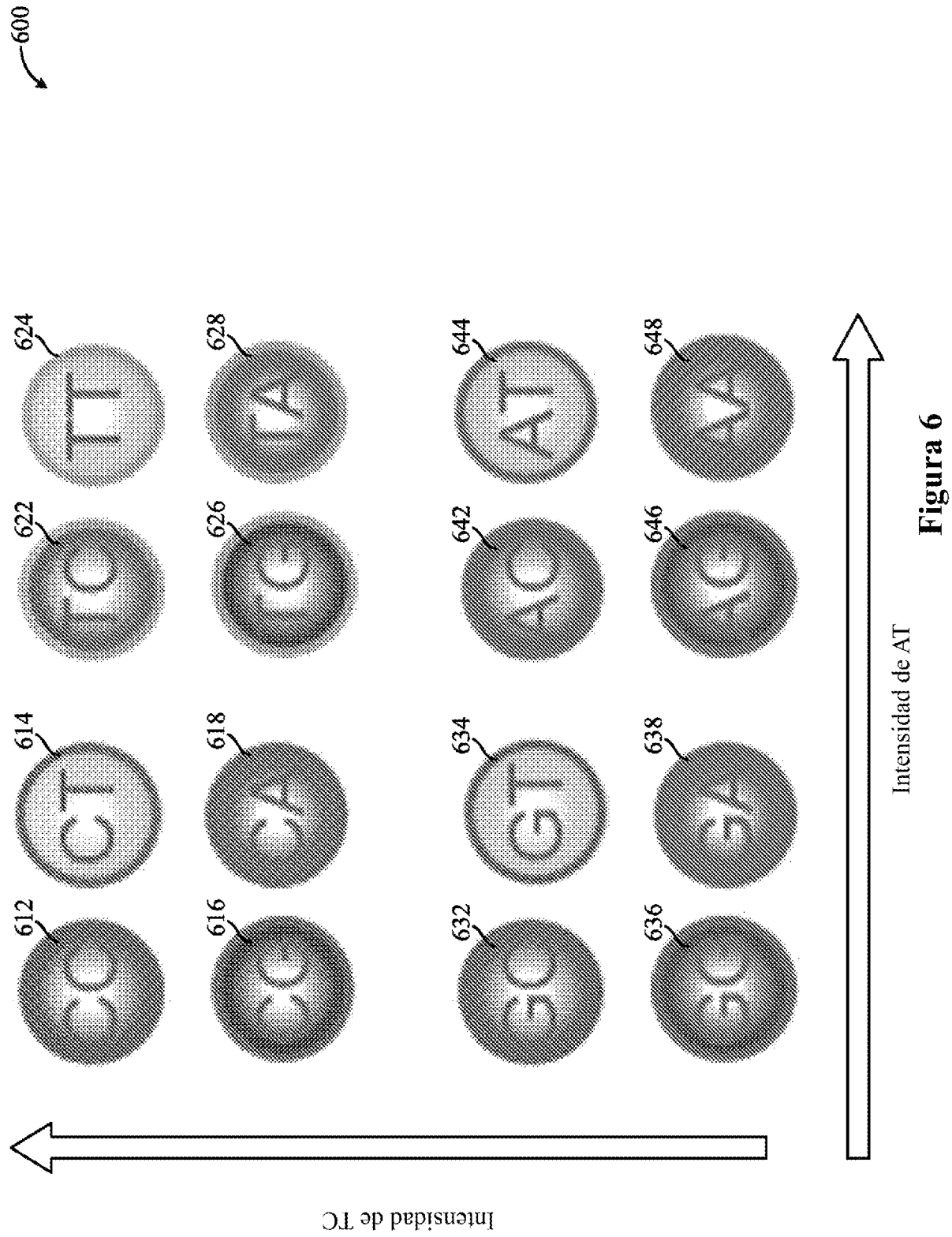


Figura 5B



Señal de AT		Señal de CT
A	1	0
C	0	1
G	0	0
T	1	1

700A

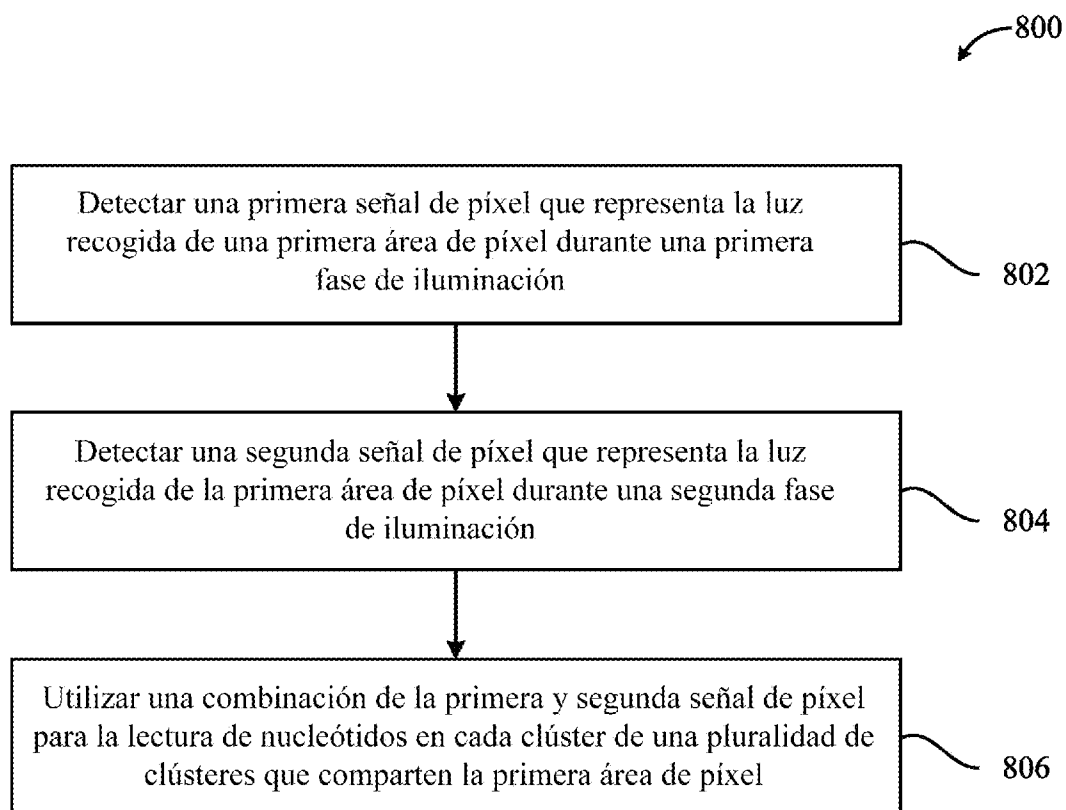
Figura 7A

Relación de intensidad de clúster más claro a más oscuro - 0,7:0,3

700B

Contenedores 701	Clúster más claro 702	Clúster más oscuro 704	Señal de AT 706	Señal de TC 710 708	Partes de la señal de AT 706B		Partes de la señal de CT 708B	
					Clúster más claro 706A	Clúster más oscuro	Clúster más claro 708A	Clúster más oscuro
Contenedor 1	A	A	1	0	0,7	0,3	0	0
Contenedor 2	A	C	0,7	0,3	0,7	0	0	0,3
Contenedor 3	A	G	0,7	0	0,7	0	0	0
Contenedor 4	A	T	1	0,3	0,7	0,3	0	0,3
Contenedor 5	C	A	0,3	0,7	0	0,3	0,7	0
Contenedor 6	C	C	0	1	0	0	0,7	0,3
Contenedor 7	C	G	0	0,7	0	0	0,7	0
Contenedor 7	C	T	0,3	1	0	0,3	0,7	0,3
Contenedor 9	G	A	0,3	0	0	0,3	0	0
Contenedor 10	G	C	0	0,3	0	0	0	0,3
Contenedor 11	G	G	0	0	0	0	0	0
Contenedor 12	G	T	0,3	0,3	0	0,3	0	0,3
Contenedor 13	T	A	1	0,7	0,7	0,3	0,7	0
Contenedor 14	T	C	0,7	1	0,7	0	0,7	0,3
Contenedor 15	T	G	0,7	0,7	0,7	0	0,7	0
Contenedor 16	T	T	1	1	0,7	0,3	0,7	0,3

Figura 7B

**Figura 8**

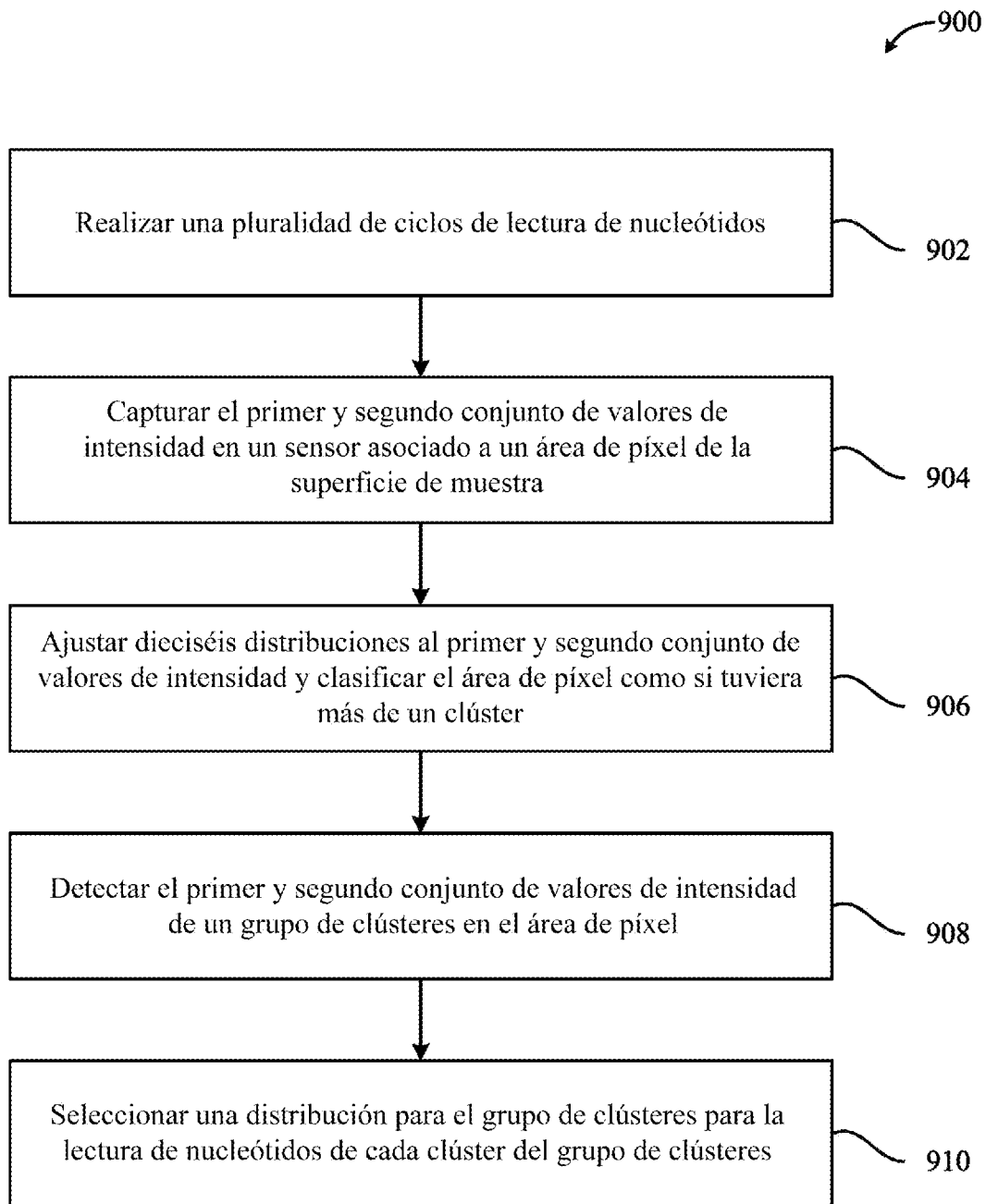


Figura 9

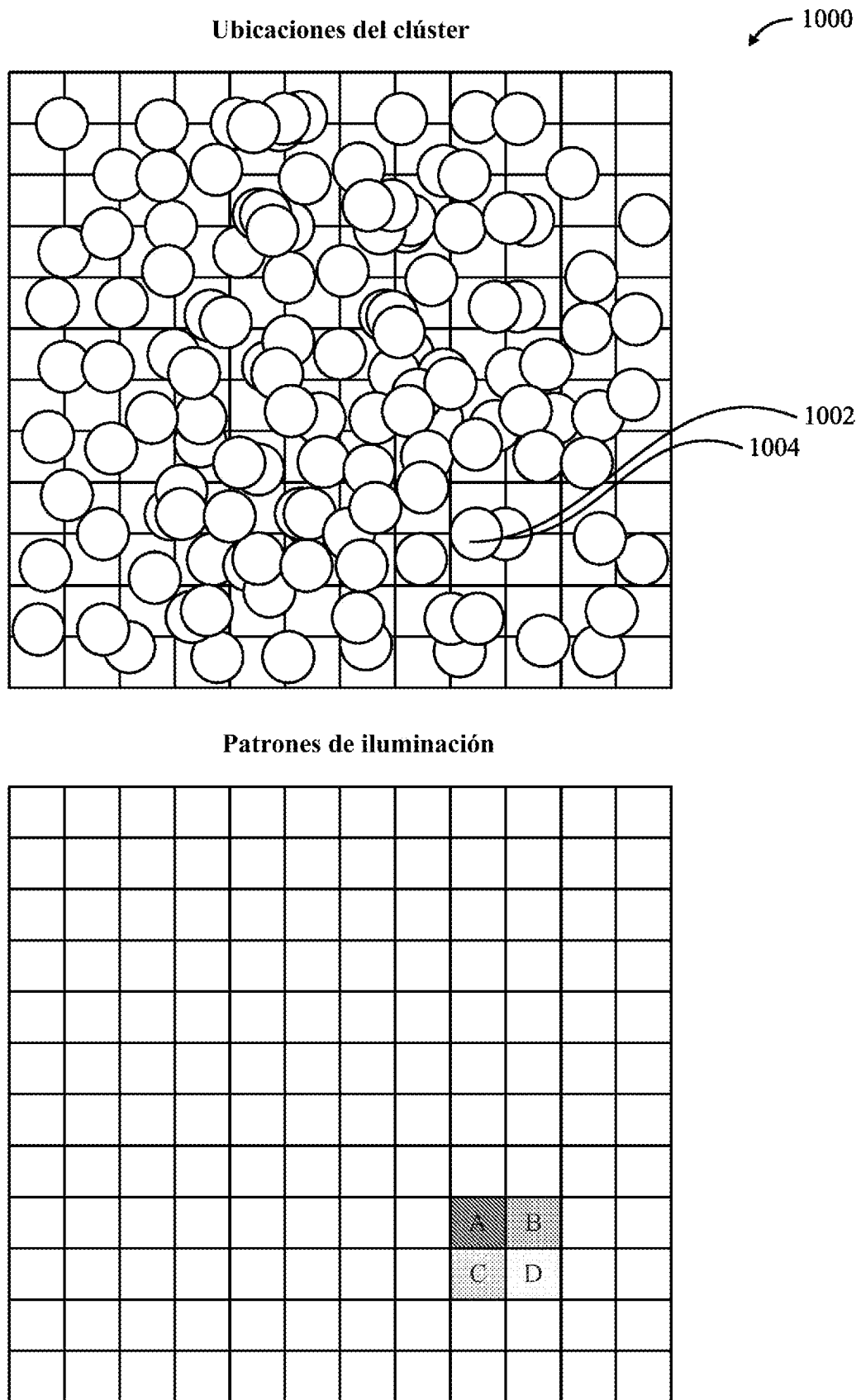


Figura 10

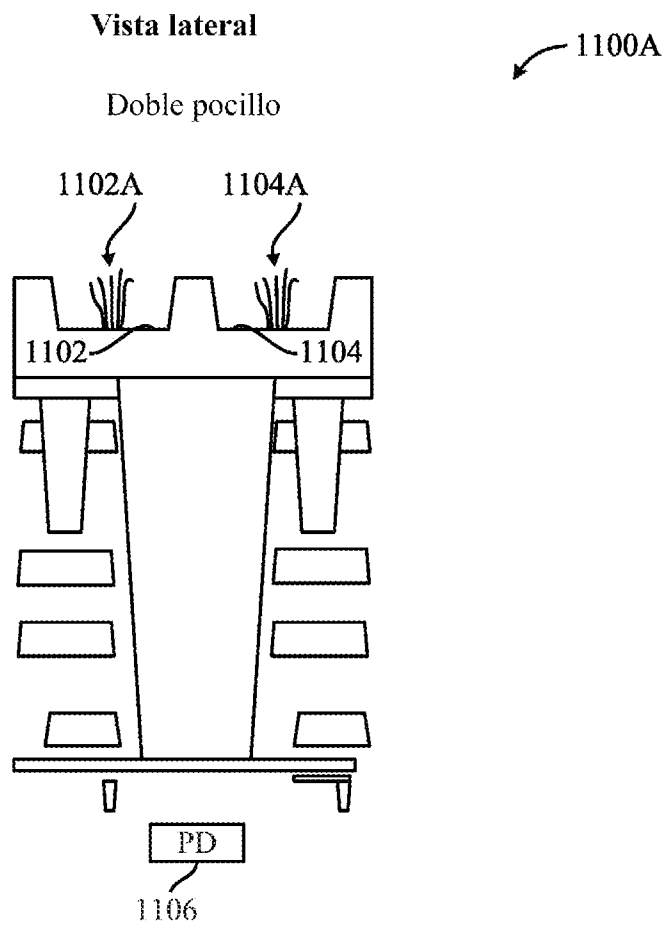


Figura 11A

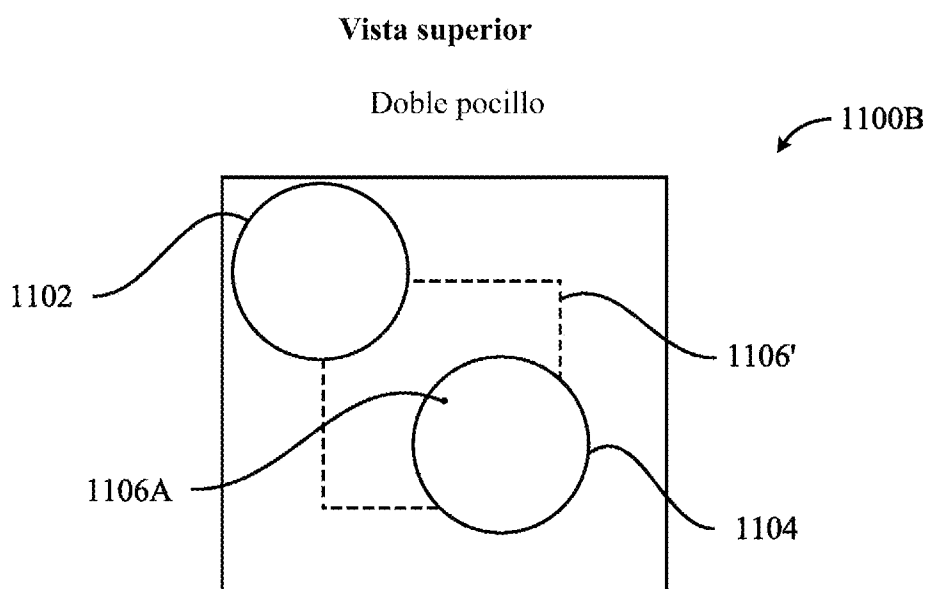
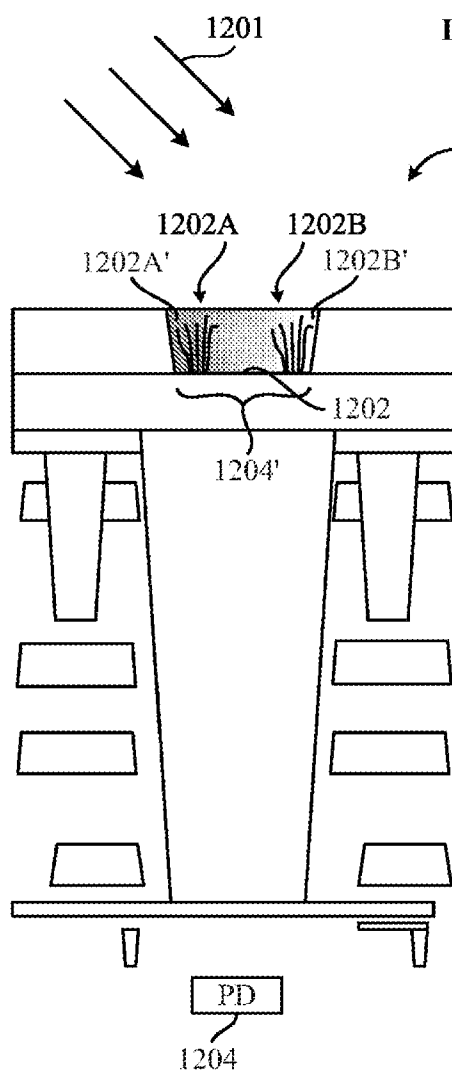


Figura 11B



Iluminación fuera del eje

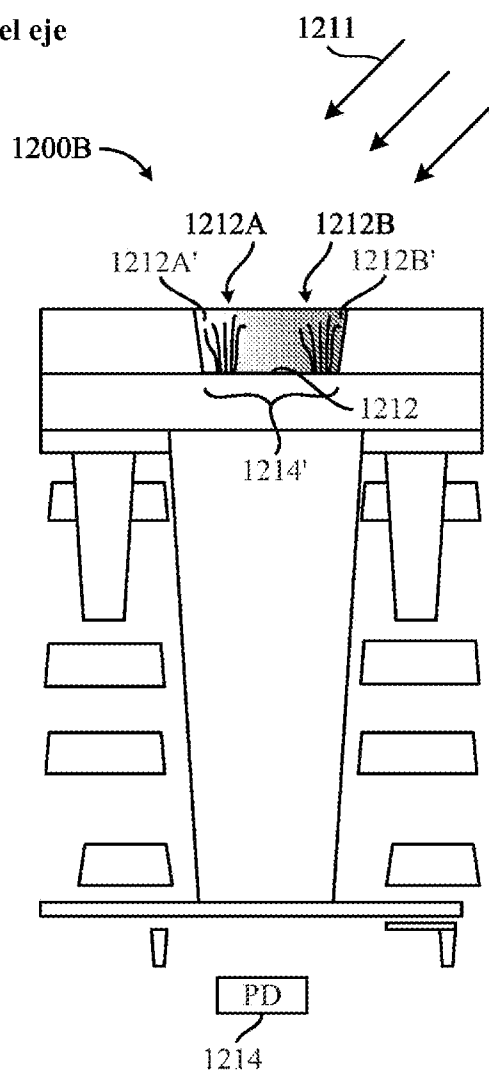


Figura 12A

Figura 12B

