

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 926 537**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 3/02 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2017 PCT/US2017/028438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017 WO17184776**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2017 E 17722236 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2022 EP 3445490**

54 Título: **Depósito de alta densidad para la producción de matrices**

30 Prioridad:

22.04.2016 US 201662326358 P

06.05.2016 US 201662333098 P

09.05.2016 US 201662333770 P

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

26.10.2022

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)

1 Becton Drive

Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

MASON, CLARK;

PETERSEN, TIMOTHY, W.;

AZERSKY, VLADIMIR y

WOLF, CHRISTOPHER, J.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 926 537 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

Depósito de alta densidad para la producción de matrices

5 ANTECEDENTES

Campo

10 La presente divulgación se refiere de manera general al campo de depósito de alta densidad para producir matrices, por ejemplo, matrices celulares o matrices de gotitas.

Descripción de la técnica relacionada

15 Se han desarrollado métodos y técnicas como la citometría de flujo para depositar células en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se han desarrollado métodos y técnicas como el depósito por gravedad de muestras de baja concentración para depositar células individuales en micropocillos con una tasa de ocupación del 15%.

20 DEUTSCH M et al, (Lab on a Chip, 2006, vol. 6(8):995-1000) describe un novedoso retenedor de células en miniatura para el análisis correlativo de alto contenido de células individuales no adherentes sin anclajes. WANGY et al. (Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, vol. 402(3):1065-72) describe atrapar células en una matriz de micropocillos estirables para el análisis de células individuales. SHOHEI Y et al, (Analytical Chemistry, 2005, vol. 77(24): 8050-6) describe una micromatriz de una sola célula para analizar la respuesta celular. TAYLOR LC et al, (Analytical Biochemistry, 2000, vol. 278(2):132-42) describe la aplicación de matrices de micropocillos ópticos de alta densidad en un sistema de biodetección de células vivas. La US2013078163A1 describe una plataforma de microfluidos para la captura, estimulación e imagen de células individuales. La EP1691196A1 describe un chip de matriz de micropocillos que tiene múltiples micropocillos en una superficie principal de un sustrato, dichos micropocillos teniendo una forma y tamaño que permiten el almacenamiento de solo una única célula orgánica en cada micropocillo, en donde los marcadores de micropocillos están presentes en la misma superficie del sustrato que las aberturas de los micropocillos. También describe un chip de matriz de micropocillos que tiene múltiples micropocillos sobre una superficie principal de un sustrato, dichos micropocillos teniendo una forma y tamaño que permiten el almacenamiento de solo una única célula orgánica en cada micropocillo, en donde las protuberancias están presentes en las aberturas de dichos micropocillos como para estrechar dichas aberturas. Y un método para fabricar el chip de matriz de micropocillos. Lindström S (Royal Institute of Technology, School of Biotechnology, AlbaNova University Center, 2009) describe dispositivos de micropocillos para análisis de células individuales; este documento se refiere, entre otras cosas, al "desarrollo de una placa de micropocillos diseñada para adaptarse a un clasificador de células de citometría de flujo estándar para la siembra controlada de células individuales en los pocillos de la placa".

40 Sin embargo, sigue habiendo una necesidad de métodos y sistemas que puedan producir matrices de micropocillos de alta densidad con altas tasas de especificidad, precisión y ocupación.

SUMARIO

45 La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

50 En particular, la invención reivindicada proporciona un método para producir una matriz celular, que comprende: proporcionar una muestra que comprende una pluralidad de células; e introducir la pluralidad de células en la muestra en micropocillos de una matriz de micropocillos para producir la matriz celular, en donde la introducción de la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos comprende depositar por citometría de flujo la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos, caracterizado porque: (a) el método comprende: (i) alinear un componente de clasificación del citómetro de flujo con la matriz de micropocillos; y (ii) introducir un reactivo que comprende una o más partículas sintéticas unidas con una pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos en uno o más de los micropocillos: (A) de la matriz de micropocillos antes de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos; o (B) de la matriz celular; y (b) la matriz de micropocillos comprende 77,5 o más micropocillos por cm^2 (500 o más micropocillos por pulgada²) y el 50% o más de los micropocillos de la matriz celular comprenden una única célula.

60 En algunas realizaciones, la matriz de micropocillos comprende 155 o más micropocillos por cm^2 (1000 o más micropocillos por pulgada²). Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un volumen de no más de 1000 nanolitros o no más de 400 nanolitros. Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un diámetro de no más de 1000 micrómetros o no más de 400 micrómetros. Por lo menos dos de los micropocillos de la matriz de micropocillos están separados entre sí por no más de 200 micrómetros o no más de 80 micrómetros.

65 El depósito por citometría de flujo de la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos comprende usar un citómetro de flujo para depositar una única célula a la vez en los micropocillos de la

matriz de micropocillos.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además introducir un reactivo en uno o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos antes de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además introducir un reactivo en uno o más de los micropocillos de la matriz celular. El reactivo comprende una o más partículas sintéticas. Introducir el reactivo comprende depositar el reactivo por citometría de flujo en los micropocillos. La una o más partículas sintéticas comprenden perlas.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden además introducir partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de segundas localizaciones deseadas. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además introducir una partícula sintética de interés en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una de la pluralidad de segundas localizaciones deseadas, en donde una de las partículas sintéticas difiere de las otras partículas sintéticas, en donde introducir las partículas sintéticas en uno o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos comprende introducir una de las partículas sintéticas en un micropocillo de la matriz de micropocillos en una segunda localización deseada. La introducción de partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos comprende depositar por citometría de flujo las partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos. La una o más partículas sintéticas comprenden perlas magnéticas unidas con códigos de barras de oligonucleótidos.

En la presente se divulgan métodos para producir matrices de gotitas. Los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de primeras gotitas en los micropocillos de una matriz de micropocillos para producir una primera matriz de gotitas, en donde la matriz de micropocillos comprende 500 o más micropocillos por pulgada², en donde el 50% o más de los micropocillos de la primera matriz de gotitas comprenden una única primera gotita.

La matriz de micropocillos puede comprender 1000 o más micropocillos por pulgada². Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos puede tener un volumen de no más de 1000 nanolitros o no más de 400 nanolitros. Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos puede tener un diámetro de no más de 1000 micrómetros o no más de 200 micrómetros.

Los métodos pueden comprender además introducir una pluralidad de segundas gotitas en los micropocillos de la primera matriz de gotitas para producir una segunda matriz de gotitas, en donde el 25% o más de los micropocillos de la segunda matriz de gotitas comprenden una única primera gotita y una única segunda gotita. Los métodos pueden comprender además introducir una pluralidad de segundas gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos antes de introducir la pluralidad de primeras gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos para producir una segunda matriz de gotitas, en donde el 25% o más de los micropocillos en la segunda matriz de gotitas comprende una única primera gotita y una única segunda gotita.

Cada una de la pluralidad de primeras gotitas y la pluralidad de segundas gotitas pueden comprender una única célula o una partícula sintética, respectivamente. La partícula sintética puede comprender una perla unida con una pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos. Cada uno de la pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos puede ser igual o diferente de por lo menos otro de la pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos. Una segunda gotita de la pluralidad de segundas gotitas puede comprender además un reactivo. Introducir la pluralidad de primeras gotitas puede comprender depositar por citometría de flujo la pluralidad de primeras gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos. Depositar por citometría de flujo la pluralidad de primeras gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender usar un citómetro de flujo para depositar una única primera gotita a la vez en los micropocillos de la matriz de micropocillos.

La invención también proporciona una matriz celular, que comprende: una matriz de micropocillos (102) que comprende 77,5 o más micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) por cm² (500 o más micropocillos por pulgada²), caracterizada porque el 50% o más de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) comprenden una única célula y una partícula sintética, en donde la partícula sintética comprende una perla unida con una pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos.

En algunas realizaciones, la matriz de micropocillos comprende 155 o más micropocillos por cm² (1000 o más micropocillos por pulgada²). Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un volumen de no más de 1000 nanolitros o no más de 400 nanolitros. Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un diámetro de no más de 1000 micrómetros o no más de 400 micrómetros. Por lo menos dos de los micropocillos de la matriz de micropocillos están separados entre sí por no más de 200 micrómetros o no más de 80 micrómetros.

En la presente se divulgan métodos para alinear una primera matriz de micropocillos de alineación para producir una matriz de micropocillos de muestra. En algunas realizaciones, los métodos comprenden: (a) determinar un primer parámetro usando un primer sensor de imagenología y un segundo parámetro usando un segundo sensor de imagenología, en donde el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología son aproximadamente ortogonales entre sí y están localizados entre un recipiente de recepción de residuos y la primera

matriz de micropocillos de alineación; (b) proporcionar una localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación en una dirección x y una dirección y; (c) depositar una primera gotita de alineación en un micropocillo de la primera matriz de micropocillos de alineación en base al primer parámetro y al segundo parámetro, en donde el primer parámetro está relacionado con la localización deseada en la dirección x, y en donde el segundo parámetro está relacionado con la localización deseada en la dirección y; (d) determinar la distancia entre la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada; (e) ajustar el primer parámetro y el segundo parámetro en base a la distancia entre la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada si la distancia es mayor que un valor de umbral predeterminado; y (f) repetir los pasos (b)-(e) hasta que la distancia entre la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada no supere el valor umbral predeterminado.

Determinar la distancia entre la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada comprende obtener imágenes de la primera matriz de micropocillos de alineación y la primera gotita de alineación usando el primer sensor de imagenología y obtener imágenes de la primera matriz de alineación y la primera gotita de alineación usando el segunda sensor de imagenología. Ajustar el primer parámetro y el segundo parámetro en base a la distancia entre la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada comprende determinar la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación en base a la imagenología de la primer matriz de micropocillos de alineación y la primera gotita de alineación por el primer sensor de imagenología y la imagenología de la primera matriz de micropocillos y la primera gotita de alineación por el segundo sensor de imagenología.

Depositar la primera gotita de alineación en el micropocillo de la primera matriz de micropocillos de alineación puede comprender: depositar la primera gotita de alineación en un dispositivo de alineación de la primera matriz de micropocillos de alineación, y donde determinar la distancia entre la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada comprende obtener imágenes del dispositivo de alineación y la primera gotita de alineación en el dispositivo de alineación usando el primer sensor de imagenología y obtener imágenes del dispositivo de alineación y la primera gotita de alineación en el dispositivo de alineación usando el segundo sensor de imagenología.

El dispositivo de alineación puede comprender una pluralidad de regiones de alineación. Dos regiones de alineación de la pluralidad de regiones de alineación pueden comprender áreas aproximadamente iguales. La pluralidad de regiones de alineación puede comprender una pluralidad de anillos concéntricos. Dos anillos concéntricos de los anillos concéntricos pueden estar separados entre sí por 0,1 mm. Dos anillos concéntricos de los anillos concéntricos pueden estar separados entre sí por 1 mm.

El primer parámetro puede estar relacionado con la carga de las gotitas. El segundo parámetro puede estar relacionado con la localización de la primera gotita de alineación en la dirección y en la primera matriz de micropocillos de alineación. El primer sensor de imagen puede ser una cámara CCD o una cámara CMOS. El segundo sensor de imagenología puede ser una cámara CMOS o una cámara CCD.

Depositar la primera gotita de alineación en el micropocillo de la primera matriz de micropocillos de alineación puede comprender depositar por citometría de flujo la primera gotita de alineación en el micropocillo de la primera matriz de micropocillos de alineación. El valor de umbral predeterminado puede correlacionarse con la distancia de la primera gotita de alineación desde un borde del recipiente de recepción de residuos.

Los métodos pueden comprender además introducir una gotita de muestra en un micropocillo de la matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro y al segundo parámetro. Los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de gotitas de muestra en micropocillos de la matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro y al segundo parámetro. La pluralidad de gotitas de muestra puede comprender células, partículas unidas con códigos de barras de oligonucleótidos o cualquier combinación de los mismos.

Los métodos pueden comprender además: introducir una segunda gotita de alineación en un micropocillo de una segunda matriz de micropocillos de alineación antes de introducir la pluralidad de gotitas de muestra en los micropocillos de la matriz de muestra; y determinar la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación usando el segundo sensor de imagenología, en donde introducir la pluralidad de gotitas de muestra en los micropocillos de la matriz de micropocillos de muestra se basa además en la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de alineación.

Proporcionar la localización deseada en la dirección x en la primera matriz de micropocillos de alineación puede comprender usar el primer sensor de imagenología para determinar la localización deseada en la dirección x en la primera matriz de micropocillos de alineación y proporcionar la localización deseada en la dirección y en la primera matriz de micropocillos de alineación comprende usar el segundo sensor de imagenología para determinar la localización deseada en la dirección y en la matriz de muestra.

También se divulgan en la presente sistemas para producir matrices celulares. Un sistema puede comprender: un componente de clasificación celular configurado para: introducir por citometría de flujo gotitas en micropocillos de una matriz de micropocillos para producir una matriz celular, en donde la matriz de micropocillos comprende 77,5 o más micropocillos por cm^2 (500 o más micropocillos por pulgada²); y un componente de control configurado para: recibir una localización deseada en una dirección x y una dirección y en la matriz de micropocillos; y determinar un primer parámetro usando un primer sensor de imagenología y un segundo parámetro usando un segundo sensor de imagenología para introducir la gotita en un micropocillo de la matriz de micropocillos, en donde el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología son aproximadamente ortogonales entre sí y están entre un recipiente de recepción de residuos y la matriz de micropocillos, y en donde la distancia entre la localización de la gotita y la localización deseada está dentro de un umbral predeterminado.

El sistema puede comprender la matriz de micropocillos, en donde la matriz de micropocillos está en una relación de recepción de gotitas con el componente de clasificación celular.

La gotita puede comprender una célula o una partícula sintética. La partícula sintética puede comprender una perla magnética. La partícula sintética puede comprender una perla unida con códigos de barras de oligonucleótidos. Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos puede tener un volumen de no más de 1000 nanolitros. Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos puede tener un diámetro de no más de 1000 micrómetros. Por lo menos dos de los micropocillos de la matriz de micropocillos pueden estar separados entre sí por no más de 200 micrómetros.

Determinar el primer parámetro y el segundo parámetro puede comprender depositar por citometría de flujo una primera gotita de alineación en un micropocillo de una primera matriz de micropocillos de alineación. El primer parámetro puede estar relacionado con la caída de carga y el segundo parámetro puede estar relacionado con la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación en la dirección y. El umbral predeterminado puede correlacionarse con la distancia de la gotita desde un borde del recipiente de recepción de residuos.

El componente de control puede configurarse además para introducir una pluralidad de células en micropocillos de la matriz de micropocillos en base al primer parámetro y al segundo parámetro. El componente de control puede configurarse además para: antes de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos, introducir una segunda gotita de alineación en un micropocillo de una segunda matriz de micropocillos de alineación; y determinar la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación, en donde introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz celular se basa además en la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación.

El componente de control puede configurarse para: recibir la localización deseada en la dirección x y la dirección y en la matriz de micropocillos; y determinar el primer parámetro usando el primer sensor de imagenología y el segundo parámetro usando el segundo sensor de imagenología para introducir la gotita en el micropocillo de la matriz de micropocillos, en donde el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología son aproximadamente ortogonales entre sí y están entre un recipiente de recepción de residuos y la matriz de micropocillos, y en donde la localización de la gotita y la localización deseada están dentro de un umbral predeterminado.

El componente de control puede configurarse para: recibir la localización deseada en la dirección x y la dirección y en la matriz de micropocillos; y determinar el primer parámetro usando el primer sensor de imagenología y el segundo parámetro usando el segundo sensor de imagenología para introducir la gotita en el micropocillo de la matriz de micropocillos, en donde el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología son aproximadamente ortogonales entre sí y están entre un recipiente de recepción de residuos y la matriz de micropocillos, y en donde la localización de la gotita y la localización deseada están dentro de un umbral predeterminado.

En la presente se divulgan sistemas y métodos para la alineación de la corriente de flujo. El sistema puede comprender: un sensor de imagenología configurado para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo en un campo de detección de un citómetro de flujo; y un procesador que comprende una memoria acoplada operativamente al procesador, en donde la memoria incluye instrucciones almacenadas en la misma para determinar una o más propiedades de la corriente de flujo y generar una señal de datos correspondiente a la una o más propiedades de la corriente de flujo, en donde el procesador está configurado para ajustar automáticamente uno o más parámetros de la corriente de flujo en respuesta a la señal de datos.

En la presente se divulgan métodos para alinear una corriente de flujo. El método puede comprender: (a) recibir un primer parámetro usado para depositar una primera gotita de alineación en una localización deseada en una primera matriz de micropocillos de alineación; (b) depositar una segunda gotita de alineación en una segunda

matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro; (c) determinar una trayectoria de la segunda gotita de alineación, desde un componente de clasificación celular hasta el segundo micropocillo de alineación, en el primer campo de detección usando un primer sensor de imagenología, en donde el primer sensor de imagenología está localizado entre el componente de clasificación celular y un recipiente de recepción de residuos; y (d) determinar una primera medición entre una primera posición de una trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección y una primera posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección.

El método puede comprender: (e) si la primera medición es mayor que un primer umbral predeterminado: ajustar el primer parámetro en base a la primera medición; y repetir los pasos (b)-(d). Recibir el primer parámetro usado para depositar la primera gotita de alineación en la primera localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación puede comprender: depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro; y determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección usando el primer sensor de imagenología.

El componente de clasificación celular puede comprender una boquilla. La boquilla puede comprender un orificio. El componente de clasificación celular puede comprender una placa deflectora.

El primer parámetro puede estar relacionado con la localización deseada en la dirección x. El primer parámetro puede estar relacionado con la carga de las gotitas.

Depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro puede comprender: depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro y un segundo parámetro. Depositar la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro puede comprender: depositar la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro y el segundo parámetro.

El segundo parámetro puede estar relacionado con la localización deseada en la dirección y. El segundo parámetro puede estar relacionado con la carga de las gotitas.

El paso (b) puede comprender: determinar una trayectoria de la primera gotita de alineación en un segundo campo de detección, usando un segundo sensor de imagenología, desde la placa deflectora hasta la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación, en donde está localizado el segundo sensor de imagenología entre el recipiente de recepción de residuos y la placa deflectora. El paso (c) puede comprender: determinar una trayectoria de la segunda gotita de alineación en el segundo campo de detección usando el segundo sensor de imagenología. El paso (d) puede comprender: determinar una segunda medición entre una segunda posición de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección y una segunda posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el segundo campo de detección. El paso (f) puede comprender: si la segunda medición es mayor que un segundo umbral predeterminado, ajustar el segundo parámetro en base a la segunda medición.

El primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí. El primer sensor de imagenología puede ser una cámara CCD o una cámara CMOS. El segundo sensor de imagenología puede ser una cámara CCD o una cámara CMOS.

Determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección puede comprender capturar una primera imagen de alineación de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección. Determinar la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección puede comprender capturar una segunda imagen de alineación de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección. Determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección puede comprender determinar un primer canal, en la primera imagen de alineación, a lo largo de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección. La primera medición puede comprender si por lo menos una parte de la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección está dentro de un primer canal correspondiente en la segunda imagen de alineación.

El primer canal puede estar representado por dos barras en la primera imagen de alineación, y en donde el primer canal correspondiente está representado por dos barras correspondientes en la segunda imagen de alineación. La primera medición puede comprender una primera distancia entre la primera posición de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección y la primera posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección.

Determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección puede comprender capturar una tercera imagen de alineación de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección. Determinar la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el segundo campo de detección puede

comprender capturar una cuarta imagen de alineación de la segunda gotita de alineación en el segundo campo de detección. Determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección puede comprender determinar un segundo canal, en la tercera imagen de alineación, a lo largo de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección. La segunda medición puede comprender si por lo menos una parte de la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección está dentro de un segundo canal correspondiente en la segunda imagen de alineación.

El segundo canal puede estar representado por dos barras en la tercera imagen de alineación, y en donde el segundo canal correspondiente está representado por dos barras correspondientes en la cuarta imagen de alineación. La segunda medición puede comprender una segunda distancia entre la segunda posición de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección y la segunda posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección.

Depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada de la primera matriz de micropocillos de alineación puede comprender depositar por citometría de flujo la primera gotita de alineación en la localización deseada de la primera matriz de micropocillos de alineación. Depositar la segunda gotita usando el primer parámetro puede comprender depositar por citometría de flujo la segunda usando el primer parámetro.

El método puede comprender: introducir una gotita de muestra en un micropocillo de la matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro. El método puede comprender: introducir una pluralidad de gotitas de muestra en una pluralidad de micropocillos de la matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro ajustado. La pluralidad de gotitas de muestra puede comprender células, partículas unidas con códigos de barras de oligonucleótidos, o cualquier combinación de los mismos.

En la presente se divulgan sistemas para producir una matriz celular. El sistema puede comprender: un componente de clasificación celular; memoria no transitoria configurada para almacenar instrucciones ejecutables; y un procesador en comunicación con el componente de clasificación celular y la memoria no transitoria, el procesador programado por las instrucciones ejecutables para: (a) recibir un primer parámetro usado para depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación; (b) hacer que el componente de clasificación celular deposite una segunda gotita de alineación en una segunda matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro; y (c) determinar una trayectoria de la segunda gotita de alineación, desde el componente de clasificación celular hasta el segundo micropocillo de alineación, en el primer campo de detección usando un primer sensor de imagenología, en donde el primer sensor de imagenología está situado entre el componente de clasificación celular y un recipiente de recepción de residuos; y (d) determinar una primera medición entre una primera posición de una trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección y una primera posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección.

El procesador puede programarse para: hacer que el componente de clasificación celular introduzca gotitas en micropocillos de una matriz de micropocillos usando el primer parámetro para producir una matriz celular, en donde la matriz de micropocillos comprende 77,5 o más micropocillos por cm^2 (500 o más micropocillos por pulgada²).

El sistema puede comprender la matriz de micropocillos, en donde la matriz de micropocillos está en una relación de recepción de gotitas con el componente de clasificación celular. La gotita puede comprender una célula o una partícula sintética. La partícula sintética puede comprender una perla magnética. La partícula sintética puede comprender una perla unida con códigos de barras de oligonucleótidos. Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos puede tener un volumen de no más de 1000 nanolitros. Cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos puede tener un diámetro de no más de 1000 micrómetros. Por lo menos dos de los micropocillos de la matriz de micropocillos pueden estar separados entre sí por no más de 200 micrómetros.

Para determinar el primer parámetro y el segundo parámetro, las instrucciones ejecutables pueden programar el procesador para depositar por citometría de flujo una primera gotita de alineación sobre un micropocillo de una primera matriz de micropocillos de alineación. El primer parámetro puede estar relacionado con la caída de carga y el segundo parámetro está relacionado con la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación en la dirección y.

El procesador puede programarse mediante instrucciones ejecutables para: introducir una pluralidad de células en micropocillos de la matriz de micropocillos en base al primer parámetro y al segundo parámetro. El procesador puede programarse para: (e) si la primera medición es mayor que un primer umbral predeterminado: ajustar el primer parámetro en base a la primera medición; y repetir los pasos (b)-(d). En algunas realizaciones, para recibir el primer parámetro usado para depositar la primera gotita de alineación en la primera localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación, el procesador de hardware es programado por las instrucciones ejecutables para: depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en el primera matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro; y determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación

en el primer campo de detección usando el primer sensor de imagenología.

El componente de clasificación celular puede comprender una boquilla. La boquilla puede comprender un orificio. El componente de clasificación celular puede comprender una placa deflectora.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es una ilustración esquemática ejemplar no limitativa de una matriz de gotitas.

10

La FIG. 2 es una ilustración esquemática no limitativa de un dispositivo de clasificación adecuado para producir matrices de gotitas de alta densidad.

Las FIGS. 3A-3B ilustran esquemáticamente un dispositivo de clasificación ejemplar no limitativo con dos cámaras ortogonales para alinear una matriz de micropocillos de alineación.

La FIG. 4A muestra una ilustración esquemática de un dispositivo de clasificación ejemplar no limitativo para la alineación de corrientes.

15

Las FIGS. 4B-4C muestran cada una, una imagen ejemplar no limitativa de una corriente desviada con dos barras que representan una trayectoria correcta.

Las FIGS. 5A-5B son diagramas de flujo que muestran flujos de trabajo ejemplares no limitativos para alinear una matriz de micropocillos, por ejemplo, una matriz de micropocillos de alineación.

20

La FIG. 6 es un diagrama de bloques ejemplar no limitativo de un sistema informático clasificador de células para controlar un dispositivo de clasificación.

Las FIGS. 7A-7B muestran la producción de matrices de gotitas de alta densidad.

La FIG. 8 muestra una fotografía ejemplar no limitativa sin corriente.

La FIG. 9 muestra una fotografía ejemplar no limitativa con una corriente en el medio (a la izquierda - idealmente debería estar en el centro).

25

La FIG. 10 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista de una configuración de dos canales.

La FIG. 11 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista (clasificación de placas) de una Unidad de Depósito de Células Automatizada (ACDU).

La FIG. 12 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista de configuración de cuatro canales.

30

La FIG. 13 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista durante la calibración - encendido del voltaje, encendido de la clasificación de prueba, los puntos con líneas verticales son corrientes desviadas que no estaban en un canal.

La FIG. 14 muestra una fotografía ejemplar no limitativa del ajuste de las corrientes en movimiento que se muestra en la FIG. 13 en el canal.

35

La FIG. 15 muestra una fotografía ejemplar no limitativa que muestra, después de que un usuario haya insertado una boquilla diferente, la corriente que se mueve hacia la derecha y las corrientes desviadas también se desplazan hacia la derecha.

La FIG. 16 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de la configuración en la FIG. 15 con el voltaje ajustado para devolver las corrientes desviadas al canal preferido.

40

Las FIGURAS. 17A-17B muestran placas de calibración ejemplares no limitativas.

Las FIGS. 18A-18C muestran una interfaz de usuario no limitativa para calibrar una placa de micropocillos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos acompañantes, que forman parte de la misma. En los dibujos, los símbolos similares normalmente identifican componentes similares, a menos que el contexto indique lo contrario. No se pretende que las realizaciones ilustrativas descritas en la descripción detallada, los dibujos y las reivindicaciones sean limitativas.

50

Los sistemas, métodos y sistemas informáticos en cuestión encuentran uso en una variedad de aplicaciones diferentes en las que es deseable automatizar los ajustes de una corriente de flujo de un citómetro de flujo para proporcionar sistemas rápidos y fiables para caracterizar y clasificar células de una muestra biológica. Las realizaciones de la presente divulgación encuentran uso cuando se desea minimizar la cantidad de dependencia de la entrada humana y los ajustes al sistema, como en investigación y pruebas de laboratorio de alto rendimiento. La presente divulgación también encuentra uso cuando es deseable proporcionar un citómetro de flujo con precisión de clasificación celular mejorada, recogida de partículas mejorada, sistemas que proporcionan alertas sobre el mal funcionamiento de los componentes (por ejemplo, boquilla de celda de flujo obstruida), consumo de energía reducido, eficiencia de carga de partículas, carga de partículas más precisa y desviación de partículas mejorada durante la clasificación celular. En realizaciones, la presente divulgación reduce la necesidad de entradas del usuario o ajuste manual durante el análisis de muestras con un citómetro de flujo. En ciertas realizaciones, los sistemas en cuestión proporcionan protocolos totalmente automatizados de manera que los ajustes a un citómetro de flujo durante el uso requieran poca o ninguna intervención humana.

60

65

La presente divulgación también encuentra uso en aplicaciones en las que pueden desearse células preparadas a partir de una muestra biológica para investigación, pruebas de laboratorio o para uso en terapia. En algunas realizaciones, los métodos y dispositivos en cuestión pueden facilitar la obtención de células individuales

preparadas a partir de una muestra biológica de tejidos o fluidos objetivo. Por ejemplo, los métodos y sistemas en cuestión facilitan la obtención de células a partir de muestras de fluidos o tejidos para su uso como espécimen de investigación o diagnóstico para enfermedades como el cáncer. De igual manera, los métodos y sistemas en cuestión facilitan la obtención de células a partir de muestras de fluidos o tejidos para su uso en terapia. Los métodos y dispositivos de la presente divulgación permiten separar y recoger células de una muestra biológica (por ejemplo, órgano, tejido, fragmento de tejido, fluido) con una eficiencia mejorada y bajo coste en comparación con los sistemas de citometría de flujo tradicionales.

Los sistemas y métodos de la presente divulgación pueden emplearse en cualquier sistema de citómetro de flujo conveniente. Los sistemas y métodos de citómetro de flujo adecuados para analizar muestras incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Ormerod (ed.), *Flow Cytometry: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press (1997); Jaroszeski et al. (eds.), *Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology* N° 91, Humana Press (1997); *Practical Flow Cytometry*, 3ª ed., Wiley-Liss (1995); Virgo, et al. (2012) *Ann Clin Biochem.* Enero;49(pt 1): 17-28; Linden, et. al., *Semin Throm Hemost.* Octubre 2004;30(5):502-11; Alison, et al. *J Pathol*, Diciembre 2010; 222(4): 33 5-344; y Herbig, et al. (2007) *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 24(3):203-255. En ciertos casos, los sistemas de citometría de flujo de interés incluyen el citómetro de flujo FACSCanto™ de BD Biosciences, FACSVantage™ de BD Biosciences, FACSort™ de BD Biosciences, FACSCount™ de BD Biosciences, FACScan™ de BD Biosciences y los sistemas FACSCalibur™ de BD Biosciences, un clasificador celular Influx™ de BD Biosciences, clasificador celular Jazz™ de BD Biosciences y clasificador celular Aria™ de BD Biosciences o similares.

En ciertas realizaciones, los sistemas en cuestión son sistemas de citómetros de flujo que incorporan uno o más componentes de los citómetros de flujo descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 3.960.449; 4.347.935; 4.667.830; 4.704.891; 4.770.992; 5.030.002; 5.040.890; 5.047.321; 5.245.318; 5.317.162; 5.464.581; 5.483.469; 5.602.039; 5.620.842; 5.627.040; 5.643.796; 5.700.692; 6.372.506; 6.809.804; 6.813.017; 6.821.740; 7.129.505; 7.201.875; 7.544.326; 8.140.300; 8.233.146; 8.753.573; 8.975.595; 9.092.034; 9.095.494 y 9.097.640 .

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Ver, por ejemplo, Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). A los efectos de la presente divulgación, a continuación se definen los siguientes términos.

Como se usa en la presente, el término "marcador" o "marcadores" puede referirse a códigos de ácido nucleico asociados con un objetivo dentro de una muestra. Un marcador puede ser, por ejemplo, un marcador de ácido nucleico. Un marcador puede ser un marcador total o parcialmente amplificable. Un marcador puede ser un marcador total o parcialmente secuenciable. Un marcador puede ser una porción de un ácido nucleico nativo que es identificable como distinto. Un marcador puede ser una secuencia conocida. Un marcador puede comprender una unión de secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, una unión de una secuencia nativa y no nativa. Como se usa en la presente, el término "marcador" puede usarse indistintamente con los términos "índice", "etiqueta" o "marcador-etiqueta". Los marcadores pueden transmitir información. Por ejemplo, en varias realizaciones, los marcadores pueden usarse para determinar la identidad de una muestra, una fuente de una muestra, una identidad de una célula, y/o un objetivo.

Como se usa en la presente, el término "soporte sólido" puede referirse a una superficie discreta sólida o semisólida a la que pueden unirse una pluralidad de oligonucleótidos, por ejemplo, códigos de barras estocásticos. Un soporte sólido puede abarcar cualquier tipo de esfera, bola, rodamiento, cilindro u otra configuración similar sólida, porosa o hueca compuesta de material plástico, cerámico, metálico o polimérico (por ejemplo, hidrogel) sobre el que puede inmovilizarse un ácido nucleico (por ejemplo, covalentemente o no covalentemente). Un soporte sólido puede comprender una partícula discreta que puede ser esférica (por ejemplo, microesferas) o tener una forma no esférica o irregular, como cúbica, cuboide, piramidal, cilíndrica, cónica, oblonga o en forma de disco, y similares. Un soporte sólido puede ser una "perla".

Como se usa en la presente, el término "código de barras estocástico" puede referirse a una secuencia de oligonucleótidos que comprende marcadores. Un código de barras estocástico puede ser una secuencia de oligonucleótidos que puede usarse para la codificación de barras estocástica. Los códigos de barras estocásticos pueden usarse para cuantificar objetivos dentro de una muestra. Los códigos de barras estocásticos pueden usarse para controlar los errores que pueden producirse después de asociar un marcador con un objetivo. Por ejemplo, puede usarse un código de barras estocástico para evaluar la amplificación o los errores de secuenciación. Un código de barras estocástico asociado con un objetivo puede denominarse código de barras estocástico-objetivo o código de barras estocástico-etiqueta-objetivo.

Como se usa en la presente, el término "sustrato" puede referirse a una superficie sólida o semisólida

continua sobre la que pueden realizarse los métodos de la divulgación. Un sustrato puede referirse a una matriz, un cartucho, un chip, un dispositivo y un portaobjetos, por ejemplo.

En la presente se divulgan métodos, composiciones y sistemas para producir matrices de alta densidad, incluyendo pero no limitadas a, matrices de gotitas, matrices de perlas y matrices celulares, así como matrices de alta densidad producidas por los métodos, composiciones y sistemas divulgados en la presente. En algunas realizaciones, la producción de matrices de alta densidad puede utilizar métodos para alinear una o más matrices de micropocillos de alineación, en donde los métodos pueden utilizar dos sensores de imagenología que son aproximadamente ortogonales entre sí.

Matriz de gotitas

En la presente se divulgan métodos para producir matrices de gotitas. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de gotitas en micropocillos de una matriz de micropocillos para producir una matriz de gotitas. En algunas realizaciones, una gotita puede comprender, o puede ser, una gota pequeña de líquido, una gotita de agua-aceite o cualquier combinación de las mismas. La gotita puede comprender, por ejemplo, una única célula, dos o más células, uno o más soportes sólidos, una o más partículas sintéticas, una o más proteínas, uno o más ácidos nucleicos, uno o más lípidos, uno o más oligosacáridos, una o más enzimas, una o más moléculas pequeñas o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la pluralidad de gotitas puede ser, o puede comprender, una pluralidad de gotas de líquido que comprenden células, una pluralidad de gotas de líquido que comprenden soportes sólidos, o una pluralidad de gotas de líquido que comprenden partículas sintéticas, o cualquier combinación de las mismas. Una o más de la pluralidad de gotitas pueden comprender, por ejemplo, un reactivo. La matriz de gotitas puede ser, por ejemplo, una matriz de gotitas, una matriz de perlas o una matriz celular. La FIG. 1 ilustra esquemáticamente una matriz de micropocillos 102 ejemplar no limitativa. La matriz de micropocillos 102 puede comprender una pluralidad de micropocillos, incluyendo los micropocillos 104a-104a d, 106a-106d y 108a-108d. La densidad de la matriz de micropocillos puede variar. En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser de 77,5 o más micropocillos por cm^2 (500 o más micropocillos por pulgada²). El 50% o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos pueden comprender una única gotita, por ejemplo, una única célula o una partícula sintética. En algunas realizaciones, el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos comprenden una única gotita, por ejemplo, una única célula o una partícula sintética. En la FIG. 1, seis pocillos, los pocillos 104a, 104d, 106b, 106c, 108e y 108d comprenden cada uno una única gotita, por ejemplo, una única célula, 110a, 110b, 110c, 110d, 110e y 110f respectivamente.

En algunas realizaciones, los métodos divulgados en la presente pueden usarse para producir una matriz celular. En algunas realizaciones, introducir la pluralidad de gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos para producir la matriz de gotitas puede comprender introducir una pluralidad de células en una muestra en los micropocillos de la matriz de micropocillos para producir una matriz celular. Una sola gotita puede comprender una sola célula, y la matriz de gotitas puede ser la matriz celular. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender proporcionar la muestra, en donde la muestra comprende la pluralidad de células. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender: proporcionar una muestra que comprende una pluralidad de células; e introducir la pluralidad de células en la muestra en micropocillos de una matriz de micropocillos para producir la matriz celular.

En algunas realizaciones, los métodos divulgados en la presente pueden usarse para producir una matriz de partículas sintéticas. En algunas realizaciones, introducir la pluralidad de gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos para producir la matriz de gotitas puede comprender introducir una pluralidad de partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos para producir una matriz de partículas sintéticas. Una sola gotita puede comprender una partícula sintética, y la matriz de gotitas puede ser la matriz de partículas sintéticas. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender: proporcionar una pluralidad de partículas sintéticas; e introducir la pluralidad de partículas sintéticas en micropocillos de una matriz de micropocillos para producir la matriz de partículas sintéticas.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de células de interés en una muestra celular en micropocillos de una matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas, por ejemplo, una primera pluralidad de micropocillos deseados. Introducir la pluralidad de células de interés en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas puede comprender clasificar por citometría de flujo las células de interés de las células que no son de interés en la muestra celular. En algunas realizaciones, cada una de las células de interés puede introducirse en un micropocillo en su localización deseada respectiva. En algunas realizaciones, las células de interés y las células que no son de interés en la muestra celular pueden clasificarse en base a marcadores de superficie celular en las células de interés y las células que no son de interés en la muestra celular.

El tipo de muestra celular puede variar. En algunas realizaciones, la muestra celular puede ser, o puede comprender, una muestra clínica, una muestra biológica, una muestra ambiental o cualquier combinación de las

mismas. Por ejemplo, la muestra celular puede incluir uno o más fluidos biológicos, tejidos y células de un paciente. Por ejemplo, la muestra celular puede ser, o puede comprender, sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido amniótico, semen, saliva, médula ósea, una muestra de biopsia o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, la muestra celular puede ser, o puede comprender, una muestra mixta de células cancerosas.

5 Como se usa en la presente, el término "células de interés" puede referirse a las células que se están estudiando. Las células de interés pueden variar. En algunas realizaciones, las células de interés pueden tener las propiedades deseadas. Por ejemplo, las células de interés pueden tener marcadores de superficie de interés o pueden tener una alta expresión de un marcador de superficie. En algunas realizaciones, las células de interés
10 pueden expresar un fenotipo maligno. En algunas realizaciones, las células de interés pueden ser, o pueden comprender, células tumorales, como células tumorales que se han desprendido del tumor a la sangre u otros fluidos corporales o a la médula ósea; células tumorales benignas; células cancerosas; células cancerosas en sangre periférica; células de cáncer de tiroides; células de cáncer de mama; células tumorales circulantes ("CTC"); células de leucemia; células madre cancerosas; células en las fases del ciclo celular deseado (G0/G1, S, G2);
15 espermatozoides con cromosomas X e Y; células madre; células madre fetales o adultas; células madre multipotentes; células de sangre; glóbulos rojos nucleados ("NRBC") en pacientes con talasemia; células fetales, como células fetales en sangre periférica materna; glóbulos rojos nucleados fetales ("FNRBC") en la circulación materna; y células caracterizadas por CD71, CD8, CD34 o CD133; o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las células de interés pueden ser, o pueden comprender, células endoteliales circulantes; células infectadas con un virus, como células infectadas por VIH, células transfectadas con un gen de interés; y subtipos aberrantes de células T o células B presentes en la sangre periférica de sujetos que padecen trastornos autoinmunes o autorreactivos; linfocitos activados; células presentadoras de antígeno como monocitos y células dendríticas; organismos patógenos o parasitarios, células que contienen parásitos intracelulares; células o microorganismos en fluidos diluidos como la orina; o cualquier combinación de los mismos.

25 Las células de interés pueden ser, o pueden comprender, líneas celulares. Los ejemplos no limitativos de líneas celulares incluyen: células Jurkat, una línea celular de leucemia T; SKBR3, una línea celular de cáncer de mama derivada de adenocarcinoma conocida por la sobreexpresión de Her2/neu; T47D, una línea celular de cáncer de mama derivada de carcinoma ductal que demuestra una expresión de Her2/neu de baja a intermedia; HeLa; o cualquier combinación de las mismas.

La abundancia de las células de interés en la muestra celular puede variar. En algunas realizaciones, las células de interés en la muestra celular pueden tener, o tener aproximadamente, el 0,0001%, 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1%, 10%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, del número total de células en la muestra celular. En algunas realizaciones, las células de interés en la muestra celular pueden ser por lo menos, o como máximo, el 0,0001%, 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,1%, 0,5%, 1% o 10% del número total de células en la muestra celular. En algunas realizaciones, la muestra celular puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, de las células de interés por mililitro de la muestra celular. En algunas realizaciones, la muestra celular tiene como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 250, 500, o 1000 de las células de interés por mililitro de la muestra celular.

El tamaño de las células de interés puede variar. En algunas realizaciones, el diámetro de las células de interés puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el diámetro de las células de interés puede ser de por lo menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 micrómetros.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una primera pluralidad de células de interés y una segunda pluralidad de células de interés en la muestra celular en micropocillos de una matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas. La pluralidad de localizaciones deseadas puede ser diferente para la primera pluralidad de células de interés y la segunda pluralidad de células de interés. Por ejemplo, una primera pluralidad de micropocillos deseados pueden ser localizaciones deseadas para la primera pluralidad de células de interés. Por ejemplo, la segunda pluralidad de micropocillos deseados pueden ser localizaciones deseadas para la segunda pluralidad de células de interés. Introducir la primera pluralidad de células de interés y la segunda pluralidad de células de interés en la muestra celular en los micropocillos de la matriz de micropocillos en la pluralidad de localizaciones deseadas puede comprender clasificar por citometría de flujo la primera pluralidad de células de interés y la segunda pluralidad de células de interés en la muestra celular. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de células de interés y la segunda pluralidad de células de interés en la muestra celular pueden clasificarse en base a los marcadores de superficie celular en la primera pluralidad de células de interés y la segunda pluralidad de células de interés en la muestra celular.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de gotitas, por ejemplo, una pluralidad de segundas gotitas, en los micropocillos de una matriz de micropocillos, por ejemplo, la primera

matriz de gotitas o la matriz celular, para producir otra matriz de gotitas, por ejemplo, una segunda matriz de gotitas. Por ejemplo, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de segundas gotitas en los micropocillos de una matriz de micropocillos antes de introducir la pluralidad de primeras gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos. Por ejemplo, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de segundas gotitas en los micropocillos de una matriz de micropocillos después de introducir la pluralidad de primeras gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, el 25% o más de los micropocillos de la matriz de gotitas pueden comprender una única primera gotita, por ejemplo, una única célula y una única segunda gotita, por ejemplo, una partícula sintética o un reactivo. En la FIG. 1, seis pocillos, los pocillos 104a, 104b, 106c, 108a, 108c y 108d comprenden cada uno una única segunda gotita, por ejemplo, una única perla sintética 110a, 110b, 110c, 110d, 110e o 110f respectivamente. Cuatro pocillos, los pocillos 104a, 106c, 108c y 108d, comprende cada uno una única primera gotita y una única segunda gotita.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir un reactivo en uno o más micropocillos de una matriz de micropocillos. Por ejemplo, los métodos pueden comprender introducir un reactivo en uno o más micropocillos de la matriz de micropocillos antes de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos. Por ejemplo, los métodos pueden comprender introducir un reactivo en uno o más micropocillos de la matriz de micropocillos después de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos. El 50% o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos pueden comprender una única célula y el reactivo. En algunas realizaciones, el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos pueden comprender una única célula y el reactivo. En algunas realizaciones, introducir el reactivo en uno o más micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender introducir el reactivo en uno o más micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas. En algunas realizaciones, el reactivo puede comprender una o más partículas sintéticas.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir partículas sintéticas en uno o más micropocillos de una matriz de micropocillos. Por ejemplo, los métodos pueden comprender introducir partículas sintéticas en uno o más micropocillos de una matriz de micropocillos antes de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos. Por ejemplo, los métodos pueden comprender introducir partículas sintéticas en uno o más micropocillos de una matriz de micropocillos después de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos. El 50% o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos pueden comprender una única célula y una partícula sintética. En algunas realizaciones, el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos pueden comprender una única célula y una partícula sintética.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de partículas sintéticas de interés, por ejemplo perlas, en una muestra de partículas sintéticas en micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas, por ejemplo, una segunda pluralidad de micropocillos deseados. En algunas realizaciones, la pluralidad de partículas sintéticas de interés se introducen en los micropocillos de la matriz de micropocillos en la pluralidad de localizaciones deseadas después de introducir una pluralidad de células de interés en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de primeras localizaciones deseadas. En algunas realizaciones, las partículas sintéticas de interés pueden comprender un reactivo. En algunas realizaciones, introducir la pluralidad de partículas sintéticas de interés en los micropocillos de la matriz de micropocillos en la pluralidad de localizaciones deseadas puede comprender clasificar por citometría de flujo las partículas sintéticas de interés de las partículas sintéticas que no son de interés en la muestra de partículas sintéticas. En algunas realizaciones, las partículas sintéticas de interés y las partículas sintéticas que no son de interés en la muestra de partículas sintéticas pueden clasificarse en base a si contienen un reactivo.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una primera pluralidad de partículas sintéticas y una segunda pluralidad de partículas sintéticas en una muestra de partículas sintéticas en micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas. La pluralidad de localizaciones deseadas para la primera pluralidad de partículas sintéticas puede ser una primera pluralidad de localizaciones deseadas. La pluralidad de localizaciones deseadas para la segunda pluralidad de partículas sintéticas puede ser una segunda pluralidad de localizaciones deseadas. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de partículas sintéticas y la segunda pluralidad de partículas sintéticas se introducen en los micropocillos de la matriz de micropocillos en la pluralidad de localizaciones deseadas después de introducir una o más pluralidades de células de interés en los micropocillos de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de partículas sintéticas puede comprender un primer reactivo. En algunas realizaciones, la segunda pluralidad de partículas sintéticas puede comprender un segundo reactivo. En algunas realizaciones, introducir la primera pluralidad de partículas sintéticas y la segunda pluralidad de partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos en la pluralidad de localizaciones deseadas puede comprender clasificar por citometría de flujo la primera pluralidad de partículas sintéticas y la segunda pluralidad de partículas sintéticas. En algunas realizaciones, la primera pluralidad de partículas sintéticas y la segunda pluralidad de partículas sintéticas en la muestra de partículas sintéticas pueden clasificarse en base al reactivo que contienen, por ejemplo, el primer reactivo y el segundo reactivo.

Las partículas sintéticas en la muestra de partículas sintéticas pueden variar. En algunas realizaciones, las

partículas sintéticas en la muestra de partículas sintéticas pueden ser idénticas. En algunas realizaciones, una de las partículas sintéticas en la muestra de partículas sintéticas puede diferir de las otras partículas sintéticas en la muestra de partículas sintéticas. Por ejemplo, el porcentaje de partículas sintéticas en la muestra de partículas sintéticas que son idénticas puede ser o ser de aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. Por ejemplo, el porcentaje de partículas sintéticas en la muestra de partículas sintéticas que son iguales puede ser por lo menos, o como máximo, del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99,9% o 100%. En algunas realizaciones, introducir partículas sintéticas en el uno o más micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender introducir las partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas, por ejemplo una pluralidad de segundas localizaciones deseadas.

Partículas sintéticas

Los métodos, composiciones y sistemas descritos en la presente pueden usarse para depositar partículas sintéticas para producir matrices de alta densidad de partículas sintéticas. En algunas realizaciones, las partículas sintéticas pueden ser, o pueden comprender, perlas, por ejemplo, perlas magnéticas o poliméricas unidas con códigos de barras de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, una partícula sintética puede ser, o puede comprender, una perla unida con una pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos. La pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos puede ser, por ejemplo, una pluralidad de códigos de barras estocásticos. Un código de barras estocástico es una secuencia de polinucleótidos que puede usarse para marcar estocásticamente (por ejemplo, código de barras, etiqueta) un objetivo. Un código de barras estocástico puede comprender uno o más marcadores. Los ejemplos de marcadores no limitativos incluyen un marcador universal, un marcador cromosómico, un marcador celular, un marcador molecular, un marcador de muestra, un marcador de placa, un marcador espacial y un marcador preespacial. La pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos en partículas sintéticas dadas puede ser igual o diferente. En algunas realizaciones, uno de la pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos difiere de por lo menos otro de la pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, la pluralidad de oligonucleótidos en partículas sintéticas dadas puede tener la misma secuencia de marcador celular. En algunas realizaciones, por lo menos dos de la pluralidad de oligonucleótidos en partículas sintéticas dadas pueden tener diferentes secuencias de marcador molecular.

Los ejemplos no limitativos de perlas incluyen perlas de sílice, perlas similares a sílice, perlas de gel de sílice, perlas de vidrio de poro controlado, perlas magnéticas, perlas Sephadex™/Sephacrose, perlas de celulosa, perlas de poliestireno o cualquier combinación de las mismas, perlas de estreptavidina, perlas de agarosa, Dynabeads®, microperlas MACS®, perlas conjugadas con anticuerpos (por ejemplo, microperlas anti-inmunoglobulina), perlas conjugadas con proteína A, perlas conjugadas con proteína G, perlas conjugadas con proteína A/G, perlas conjugadas con proteína L, perlas conjugadas con oligo(dT), perlas antibiotina, microesferas de antil fluorocromo, perlas magnéticas terminadas en carboxilo BcMag™ y cualquier combinación de las mismas.

Las perlas pueden comprender una variedad de materiales que incluyen, pero no están limitados a, materiales paramagnéticos (por ejemplo, magnesio, molibdeno, litio y tántalo), materiales superparamagnéticos (por ejemplo, nanopartículas de ferrita (Fe₃O₄; magnetita), materiales ferromagnéticos (por ejemplo, hierro, níquel, cobalto, algunas aleaciones de los mismos y algunos compuestos de metales de tierras raras), cerámica, plástico, vidrio, poliestireno, sílice, metil estireno, polímeros acrílicos, titanio, látex, sefrosa, agarosa, hidrogel, polímero, celulosa, nailon y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la perla (por ejemplo, la perla a la que se unen los marcadores estocásticos) es una perla de hidrogel. En algunas realizaciones, la perla comprende hidrogel.

En algunas realizaciones, la perla puede ser una perla polimérica, por ejemplo, una perla deformable o una perla de gel, funcionalizada con códigos de barras estocásticos (como perlas de gel de 10X Genomics (San Francisco, CA). En alguna implementación, una perla de gel puede comprender geles basados en polímeros. Pueden generarse perlas de gel, por ejemplo, encapsulando uno o más precursores poliméricos en gotitas. Tras la exposición de los precursores poliméricos a un acelerador (por ejemplo, tetrametiletilendiamina (TEMED)), puede generarse una perla de gel.

En algunas realizaciones, la perla polimérica puede disolverse, fundirse o degradarse, por ejemplo, bajo una condición deseada. La condición deseada puede incluir una condición ambiental. La condición deseada puede dar como resultado que la perla polimérica se disuelva, funda o degrade de manera controlada. Una perla de gel puede disolverse, fundirse o degradarse debido a un estímulo químico, un estímulo físico, un estímulo biológico, un estímulo térmico, un estímulo magnético, un estímulo eléctrico, un estímulo de luz o cualquier combinación de los mismos.

Los analitos y/o reactivos, como códigos de barras de oligonucleótidos, por ejemplo, pueden acoplarse/inmovilizarse en la superficie interior de una perla de gel (por ejemplo, el interior accesible a través de la difusión de un código de barras de oligonucleótidos y/o materiales usados para generar un código de barras de

oligonucleótidos) y/o la superficie exterior de una perla de gel o cualquier otra microcápsula descrita en la presente. El acoplamiento/inmovilización puede ser a través de cualquier forma de enlace químico (por ejemplo, enlace covalente, enlace iónico) o fenómenos físicos (por ejemplo, fuerzas de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, etc.). En algunos casos, el acoplamiento/inmovilización de un reactivo a una perla de gel o cualquier otra microcápsula descrita en la presente puede ser reversible, como, por ejemplo, a través de una fracción lábil (por ejemplo, a través de un reticulante químico, incluyendo los reticulantes químicos descritos en la presente). Tras aplicar un estímulo, puede escindirse la fracción lábil y puede liberarse el reactivo inmovilizado. En algunos casos, la fracción lábil es un enlace disulfuro. Por ejemplo, en el caso de que un código de barras de oligonucleótidos se inmovilice en una perla de gel a través de un enlace disulfuro, la exposición del enlace disulfuro a un agente reductor puede romper el enlace disulfuro y liberar el código de barras del oligonucleótidos de la perla. La fracción lábil puede incluirse como parte de una perla de gel o microcápsula, como parte de un conector químico que enlaza un reactivo o analito a una perla de gel o microcápsula y/o como parte de un reactivo o analito.

En algunas realizaciones, una perla de gel puede comprender una amplia variedad de diferentes polímeros, que incluyen pero no se limitan a: polímeros, polímeros sensibles al calor, polímeros fotosensibles, polímeros magnéticos, polímeros sensibles al pH, polímeros sensibles a las sales, polímeros químicamente sensibles, polielectrolitos, polisacáridos, péptidos, proteínas y/o plásticos. Los polímeros pueden incluir, pero no se limitan a, materiales como poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(sulfonato de estireno) (PSS), poli(alilamina) (PAAm), poli(ácido acrílico) (PAA), poli(etilenimina) (PEI), poli(cloruro de dialildimetilamonio) (PDADMAC), poli(pirrola) (PPy), poli(vinilpirrolidona) (PVPON), poli(vinilpiridina) (PVP), poli(ácido metacrílico) (PMAA)), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), poliestireno (PS), poli(tetrahidrofurano) (PTHF), poli(ftalaldehído) (PTHF), poli(hexilviológeno) (PHV), poli(L-lisina) (PLL), poli(L-arginina) (PARG), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).

Pueden usarse numerosos estímulos químicos para desencadenar la alteración o degradación de las perlas. Los ejemplos de estos cambios químicos pueden incluir, pero no se limitan a, cambios mediados por el pH en la pared de la perla, desintegración de la pared de la perla a través de la escisión química de los enlaces de reticulación, despolimerización desencadenada de la pared de la perla y reacciones de cambio de pared de la perla. También pueden usarse cambios de volumen para desencadenar la alteración de las perlas.

Los cambios de volumen o físicos en la microcápsula a través de varios estímulos también ofrecen muchas ventajas en el diseño de cápsulas para liberar reactivos. Los cambios de volumen o físicos se producen a una escala macroscópica, en la que la ruptura de las perlas es el resultado de fuerzas mecanofísicas inducidas por un estímulo. Estos procesos pueden incluir, pero no se limitan a, ruptura inducida por presión, fusión de la pared de la perla o cambios en la porosidad de la pared de la perla.

También pueden usarse estímulos biológicos para desencadenar la alteración o degradación de las perlas. En general, los desencadenantes biológicos se parecen a los desencadenantes químicos, pero muchos ejemplos usan biomoléculas o moléculas que se encuentran comúnmente en los sistemas vivos, como enzimas, péptidos, sacáridos, ácidos grasos, ácidos nucleicos y similares. Por ejemplo, las perlas pueden comprender polímeros con enlaces cruzados de péptidos que son sensibles a la escisión por proteasas específicas. Más específicamente, un ejemplo puede comprender una microcápsula que comprende enlaces cruzados de péptido GFLGK. Tras la adición de un activador biológico como la proteasa cathepsina B, los enlaces cruzados peptídicos de la cubierta se escinden y se libera el contenido de las perlas. En otros casos, las proteasas pueden activarse por calor. En otro ejemplo, las perlas comprenden una pared de cubierta que comprende celulosa. La adición de la enzima hidrolítica quitosano sirve como desencadenante biológico para la escisión de los enlaces celulósicos, la despolimerización de la pared de la cubierta y la liberación de su contenido interno.

También puede inducirse a las perlas para que liberen su contenido tras la aplicación de un estímulo térmico. Un cambio de temperatura puede provocar una variedad de cambios en las perlas. Un cambio en el calor puede provocar la fusión de una perla de tal manera que se desintegre la pared de la perla. En otros casos, el calor puede aumentar la presión interna de los componentes internos de la perla de tal manera que la perla se rompa o explote. En otros casos más, el calor puede transformar la perla en un estado deshidratado y encogido. El calor también puede actuar sobre polímeros sensibles al calor dentro de la pared de una perla para provocar la ruptura de la perla.

La inclusión de nanopartículas magnéticas en la pared de las perlas de las microcápsulas puede permitir la ruptura provocada de las perlas, así como guiar las perlas en una matriz. Un dispositivo de esta divulgación puede comprender perlas magnéticas para cualquier propósito. En un ejemplo, la incorporación de nanopartículas de Fe_3O_4 en perlas que contienen polielectrolitos desencadena la ruptura en presencia de un estímulo de campo magnético oscilante.

Una perla también puede alterarse o degradarse como resultado de la estimulación eléctrica. De manera similar a las partículas magnéticas descritas en la sección anterior, las perlas eléctricamente sensibles pueden permitir tanto la ruptura desencadenada de las perlas como otras funciones, como la alineación en un campo eléctrico, la conductividad eléctrica o las reacciones redox. En un ejemplo, las perlas que contienen material

eléctricamente sensible se alinean en un campo eléctrico de tal manera que puede controlarse la liberación de los reactivos internos. En otros ejemplos, los campos eléctricos pueden inducir reacciones redox dentro de la propia pared de la perla que pueden aumentar la porosidad.

5 También puede usarse un estímulo de luz para alterar las perlas. Son posibles numerosos activadores de luz y pueden incluir sistemas que usan varias moléculas como nanopartículas y cromóforos capaces de absorber fotones de rangos específicos de longitudes de onda. Por ejemplo, pueden usarse recubrimientos de óxido de metal como activadores de cápsulas. La irradiación UV de cápsulas de polielectrolito recubiertas con SiO₂ puede dar como resultado la desintegración de la pared de la perla. En otro ejemplo más, pueden incorporarse en la pared de la perla materiales fotoconmutables como grupos azobenceno. Tras la aplicación de luz UV o visible, los productos químicos como estos experimentan una isomerización reversible de cis a trans tras la absorción de fotones. En este aspecto, la incorporación de conmutadores de fotones da como resultado una pared de perlas que puede desintegrarse o volverse más porosa con la aplicación de un activador de luz.

15 Algunas realizaciones divulgadas en la presente incluyen una o más partículas (por ejemplo, perlas). Cada una de las partículas puede comprender una pluralidad de oligonucleótidos (por ejemplo, códigos de barras estocásticos). Cada uno de la pluralidad de oligonucleótidos puede comprender una secuencia de marcador molecular, una secuencia de marcador celular y una región de unión a objetivo (por ejemplo, una secuencia oligo dT, una secuencia específica de gen, un multímero aleatorio o una combinación de las mismas). La secuencia de marcador celular de cada uno de la pluralidad de oligonucleótidos puede ser la misma. Las secuencias de marcadores celulares de oligonucleótidos en diferentes partículas pueden ser diferentes de manera que puedan identificarse los oligonucleótidos en diferentes partículas. En diferentes implementaciones el número de secuencias de marcadores celulares diferentes puede ser diferente. En algunas realizaciones, el número de secuencias de marcadores celulares puede ser de, o de aproximadamente 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, o más. En algunas realizaciones, el número de secuencias de marcadores celulares puede ser por lo menos o como máximo 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 10⁶, 10⁷, 10⁸ o 10⁹. En algunas realizaciones, no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más de la pluralidad de partículas incluyen oligonucleótidos con la misma secuencia celular. En alguna realización, la pluralidad de partículas que incluyen oligonucleótidos con la misma secuencia celular puede ser como máximo del 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% o más. En algunas realizaciones, ninguna de la pluralidad de partículas tiene la misma secuencia de marcador celular.

35 La pluralidad de oligonucleótidos en cada partícula puede comprender diferentes secuencias de marcadores moleculares. En algunas realizaciones, el número de secuencias de marcadores moleculares puede ser de aproximadamente 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el número de secuencias de marcadores moleculares puede ser de por lo menos o como máximo 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 10⁶, 10⁷, 10⁸, o 10⁹. Por ejemplo, por lo menos 100 de la pluralidad de oligonucleótidos comprenden diferentes secuencias de marcadores moleculares. Como otro ejemplo, en una sola partícula, por lo menos 100, 500, 1000, 5000, 10000, 15000, 20000, 50000, un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, o más de la pluralidad de oligonucleótidos comprenden diferentes secuencias de marcadores moleculares. Algunas realizaciones proporcionan una pluralidad de partículas que comprenden códigos de barras estocásticos. En algunas realizaciones, la proporción de una aparición (o una copia o un número) de un objetivo a ser marcado y las diferentes secuencias de marcadores moleculares pueden ser por lo menos 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 o más. En algunas realizaciones, cada uno de la pluralidad de oligonucleótidos comprende además un marcador de muestra, un marcador universal o ambos. La partícula puede ser, por ejemplo, una nanopartícula o una micropartícula.

55 El tamaño de las perlas puede variar. Por ejemplo, el diámetro de la perla puede variar entre 0,1 micrómetro y 50 micrómetros. En algunas realizaciones, los diámetros de las perlas pueden tener, o tener de aproximadamente, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, los diámetros de las perlas pueden ser de por lo menos, o como máximo, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 micrómetros.

60 Los diámetros de la perla pueden relacionarse con el diámetro de los pocillos del sustrato. En algunas realizaciones, los diámetros de la perla pueden ser, o ser de aproximadamente, el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, más largos o más cortos que el diámetro del pocillo. En algunas realizaciones, los diámetros de la perla pueden ser por lo menos, o como máximo, un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% más largos o más cortos que el diámetro del pocillo. En algunas realizaciones, los pocillos del sustrato tienen un tamaño tal que uno o más de esos pocillos

65

pueden acomodar cada uno solo una perla. En algunas realizaciones, todos los pocillos tienen un tamaño tal que cada uno de los pocillos solo puede acomodar una perla. En algunas realizaciones, el porcentaje de los pocillos que tienen un tamaño tal que cada uno de esos pocillos solo puede acomodar una perla puede ser, o ser de aproximadamente, el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el porcentaje de pocillos que tienen un tamaño tal que cada uno de esos pocillos solo puede acomodar una perla puede ser de por lo menos, o como máximo, el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores.

El diámetro de las perlas puede estar relacionado con el diámetro de una célula (por ejemplo, una única célula atrapada en un pocillo del sustrato). En algunas realizaciones, los diámetros de las perlas pueden ser, o ser de aproximadamente, un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, más largos o más cortos que el diámetro de la célula. En algunas realizaciones, el diámetro de las perlas puede ser por lo menos, o como máximo, un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250% o 300%, más largo o más corto que el diámetro de la célula.

Una perla puede unirse y/o incorporarse en un sustrato. Una perla puede unirse y/o incorporarse en un gel, hidrogel, polímero y/o matriz. La posición espacial de una perla dentro de un sustrato (por ejemplo, gel, matriz, andamiaje o polímero) puede identificarse usando el marcador espacial presente en el código de barras estocástico de la perla que puede servir como dirección de localización.

Una perla puede asociarse con (por ejemplo, impregnarse con) puntos cuánticos o colorantes fluorescentes para hacerla fluorescente en un canal óptico o en múltiples canales ópticos de fluorescencia. Una perla puede asociarse con óxido de hierro u óxido de cromo para hacerla paramagnética o ferromagnética. Las perlas pueden ser identificables. Por ejemplo, puede obtenerse una imagen de una perla usando una cámara. Una perla puede tener un código detectable asociado con la perla. Por ejemplo, una perla puede comprender un código de barras estocástico. Una perla puede cambiar de tamaño, por ejemplo, debido al hinchamiento en una solución orgánica o inorgánica. Una perla puede ser hidrófoba. Una perla puede ser hidrófila. Una perla puede ser biocompatible.

Puede visualizarse un soporte sólido (por ejemplo, una perla). El soporte sólido puede comprender una etiqueta de visualización (por ejemplo, un colorante fluorescente). Un soporte sólido (por ejemplo, una perla) puede grabarse con un identificador (por ejemplo, un número). El identificador puede visualizarse a través de imágenes de las perlas.

Puede hacerse referencia a un soporte sólido como un material insoluble, semisoluble o insoluble. Puede hacerse referencia a un soporte sólido como "funcionalizado" cuando incluye un conector, un andamiaje, un bloque de construcción u otra fracción reactiva unida al mismo, mientras que un soporte sólido puede ser "no funcionalizado" cuando carece de dicha fracción reactiva unida al mismo. El soporte sólido puede emplearse libre en solución, como en un formato de pocillo de microtitulación; en un formato de flujo, como en una columna; o en una tira reactiva.

El soporte sólido puede comprender una membrana, papel, plástico, superficie recubierta, superficie plana, vidrio, portaobjetos, chip o cualquier combinación de los mismos. Un soporte sólido puede tomar la forma de resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas. Un soporte sólido puede comprender chips de sílice, partículas sintéticas, nanopartículas, placas y matrices. Los soportes sólidos pueden incluir perlas (por ejemplo, gel de sílice, vidrio de poro controlado, perlas magnéticas, Dynabeads®, resina Wang; resina Merrifield, perlas de Sephadex™/Sefarosa, perlas de celulosa, perlas de poliestireno, etc.), capilares, soportes planos como filtros de fibra de vidrio, superficies de vidrio, superficies metálicas (acero, oro, plata, aluminio, silicón y cobre), soportes de vidrio, soportes de plástico, soportes de silicio, chips, filtros, membranas, placas de micropocillos, portaobjetos o similares, materiales plásticos que incluyen placas o membranas de múltiples pocillos (por ejemplo, formados de polietileno, polipropileno, poliamida, difluoruro de polivinilideno), obleas, peines, alfileres o agujas (por ejemplo, matrices de alfileres adecuadas para síntesis o análisis combinatorios) o perlas en una matriz de hoyos o pocillos de nanolitros de superficies planas tales como obleas (por ejemplo, obleas de silicio), obleas con hoyos con o sin fondo de filtro.

En algunas realizaciones, los códigos de barras estocásticos de la divulgación pueden unirse a una matriz polimérica (por ejemplo, gel, hidrogel). La matriz polimérica puede penetrar en el espacio intracelular (por ejemplo, alrededor de los orgánulos). La matriz polimérica puede ser bombeada por todo el sistema circulatorio.

Ocupación de la matriz

El porcentaje de micropocillos de una matriz de gotitas, por ejemplo, la primera matriz de gotitas, la matriz celular o la matriz de partículas sintéticas, que comprende o consiste de una única gotita puede variar. El porcentaje puede variar, por ejemplo variando del 50% al 100%. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la

matriz de gotitas que comprende o consiste de una única gotita puede ser, o ser de aproximadamente, el 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la matriz de gotitas que comprende o consiste de una única gotita puede ser por lo menos, o como máximo, del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, o 100%. El 50% o más de los micropocillos de la matriz de gotitas comprende una única gotita, por ejemplo, una única célula.

El porcentaje de micropocillos de una matriz de gotitas, por ejemplo, la segunda matriz de gotitas, la matriz celular o la matriz de partículas sintéticas, que comprenden o consisten de una única gotita, por ejemplo, una única segunda gotita, puede variar. El porcentaje puede variar, por ejemplo, del 10% al 100%. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la matriz de gotitas que comprende o consiste de una única segunda gotita puede ser, o ser aproximadamente, un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la matriz de gotitas que comprende o consiste de una única segunda gotita puede ser por lo menos, o como máximo, del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9% o 100%. En algunas realizaciones, el 25% de los micropocillos de la matriz de gotitas puede comprender una única segunda gotita, por ejemplo, una partícula sintética.

El porcentaje de micropocillos de una matriz de gotitas, por ejemplo, la segunda matriz de gotitas, la matriz celular o la matriz de partículas sintéticas, que comprende o consiste de una única primera gotita, por ejemplo, una única célula, y una única segunda gotita que comprende, por ejemplo, una partícula sintética o un reactivo, puede variar. El porcentaje puede variar del 10% al 100%. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la matriz de gotitas que comprende o consiste de una única primera gotita y una única segunda gotita puede ser, o ser aproximadamente, del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la matriz de gotitas que comprende o consiste de una única primera gotita y una única segunda gotita puede ser por lo menos, o como máximo, del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9% o 100%. En algunas realizaciones, el 25% o más de los micropocillos de la matriz de gotitas pueden comprender una única primera gotita, por ejemplo, una única célula, y una única segunda gotita, por ejemplo, una partícula sintética o un reactivo.

30 Substrato y matriz de micropocillos

Un sustrato puede comprender una pluralidad de micropocillos, incluyendo los micropocillos 104a-d, 106a-d y 108a-d que se muestran en la FIG. 1. En algunas realizaciones, un sustrato puede ser una matriz de micropocillos 102 que comprende una pluralidad de micropocillos. En algunas realizaciones, un micropocillo, por ejemplo, el micropocillo 104a-d, 106a-d o 108a-d, puede comprender una pequeña cámara de reacción de volumen definido. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar una o más gotitas de, por ejemplo, una única célula o una partícula sintética. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar una o más células. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar solo una única célula. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar uno o más soportes sólidos, por ejemplo, partículas sintéticas como perlas. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar solo un soporte sólido. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar una única célula y un único soporte sólido.

Formas de los micropocillos

Los micropocillos de una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1, pueden fabricarse con una variedad de formas. Las geometrías de pocillo ejemplares no limitativas pueden incluir cilíndricas, cónicas, hemisféricas, rectangulares o poliédricas (por ejemplo, geometrías tridimensionales compuestas de varias caras planas, por ejemplo, columnas hexagonales, columnas octogonales, pirámides triangulares invertidas, pirámides cuadradas invertidas, pirámides pentagonales invertidas, pirámides hexagonales invertidas o pirámides truncadas invertidas). Los micropocillos pueden tener una forma que combina dos o más de estas geometrías. Por ejemplo, un micropocillo puede ser parcialmente cilíndrico, teniendo el resto la forma de un cono invertido. Un micropocillo puede incluir dos cilindros uno al lado del otro, uno de mayor diámetro (por ejemplo, que corresponde aproximadamente al diámetro de las perlas) que el otro (por ejemplo, que se corresponde aproximadamente con el diámetro de las células), que están conectados por un canal vertical (es decir, paralelo a los ejes de los cilindros) que se extiende por toda la longitud (profundidad) de los cilindros. La localización de la abertura del micropocillo puede variar. Por ejemplo, la abertura del micropocillo puede estar en la superficie superior del sustrato. Por ejemplo, la abertura del micropocillo puede estar en la superficie inferior del sustrato. La forma del extremo cerrado, por ejemplo, el fondo, del micropocillo puede variar. Por ejemplo, el extremo cerrado del micropocillo puede ser plano. Por ejemplo, el extremo cerrado del micropocillo puede tener una superficie curvada (por ejemplo, convexa o cóncava). La forma y/o el tamaño del micropocillo pueden determinarse en base a los tipos de células o soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos.

Tamaños de los micropocillos

Los micropocillos de una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se

muestra en la FIG. 1, pueden fabricarse en una variedad de tamaños. El tamaño de los micropocillos puede caracterizarse, por ejemplo, en términos del diámetro 112 y/o la profundidad de los micropocillos. Como se muestra en la FIG. 1, el diámetro 112 del micropocillo puede referirse al círculo más grande que puede inscribirse dentro de la sección transversal plana de la geometría del micropocillo. El diámetro 112 de los micropocillos puede, en algunas realizaciones, variar de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 10 veces el diámetro de las células o soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos. En algunas realizaciones, el diámetro del micropocillo 112 puede ser, o ser aproximadamente, de 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, el diámetro de las células o los soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos. En algunas realizaciones, el diámetro del micropocillo 112 puede ser por lo menos, o como máximo, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces el diámetro de las células o los soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos. En algunas realizaciones, el diámetro de los micropocillos 112 puede ser aproximadamente 2,5 veces el diámetro de las células o los soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos.

El diámetro 112 de los micropocillos puede especificarse en términos de dimensiones absolutas. El diámetro de los micropocillos puede variar de aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, el diámetro del micropocillo 112 puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el diámetro del micropocillo 112 puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, el diámetro del micropocillo 112 puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el diámetro del micropocillo 112 puede ser por lo menos o como máximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, el diámetro del micropocillo puede ser de aproximadamente 30 micrómetros.

La profundidad del micropocillo también puede variar, por ejemplo, para proporcionar un atrapamiento eficientemente de las gotitas, por ejemplo, células y soportes sólidos, o para proporcionar un intercambio eficiente de tampones de ensayo y otros reactivos contenidos dentro de los pocillos. La proporción entre el diámetro y la profundidad (es decir, la relación de aspecto) puede variarse de tal manera que una vez que una célula y/o un soporte sólido se asientan dentro de un micropocillo, no serán desplazados por el movimiento del fluido por encima del micropocillo. En algunas realizaciones, la profundidad del micropocillo puede ser menor que el diámetro de la perla. Por ejemplo, la profundidad del micropocillo puede ser, o ser de aproximadamente, el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, del diámetro del perla. Por ejemplo, la profundidad del micropocillo puede ser de por lo menos, o como máximo, el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100% del diámetro de la perla. En algunas realizaciones, las partículas sintéticas, como las perlas, pueden sobresalir fuera de los micropocillos.

Las dimensiones del micropocillo pueden variar de tal manera que el micropocillo tenga suficiente espacio para acomodar un soporte sólido y una célula de varios tamaños sin que se desprenda por el movimiento del fluido por encima del micropocillo. La profundidad de los micropocillos puede variar de aproximadamente 1 vez a aproximadamente 10 veces el diámetro de las células o soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos. En algunas realizaciones, la profundidad de los micropocillos puede ser, o ser de aproximadamente, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, el diámetro de las células o soportes sólidos que se atraparán dentro de los micropocillos. En algunas realizaciones, la profundidad de los micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, 1 vez, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces el diámetro de las células o soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos. En algunas realizaciones, la profundidad de los micropocillos puede ser de aproximadamente 2,5 veces el diámetro de las células o soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos.

La profundidad de los micropocillos puede especificarse en términos de dimensiones absolutas. Por ejemplo, la profundidad de los micropocillos puede variar de aproximadamente 1 nanómetro a aproximadamente 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la profundidad de los micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la profundidad de los micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la profundidad de los micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la profundidad de los micropocillos puede ser de

aproximadamente 30 micrómetros.

Los volúmenes de los micropocillos pueden variar, por ejemplo, variando de aproximadamente 1 picolitro a aproximadamente 1000 microlitros. En algunas realizaciones, el volumen de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, o un número o intervalo entre dos cualquiera de estos valores, picolitros. En algunas realizaciones, el volumen de micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 picolitros. En algunas realizaciones, el volumen de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, nanolitros. En algunas realizaciones, el volumen de micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nanolitros. En algunas realizaciones, el volumen de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, microlitros. En algunas realizaciones, el volumen de micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000. En algunas realizaciones, el volumen de los micropocillos puede ser de aproximadamente 1 microlitro.

Los volúmenes de los micropocillos pueden caracterizarse en términos de la variación en volumen de un micropocillo a otro. El coeficiente de variación (expresado como porcentaje) para el volumen de los micropocillos puede variar de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 100%. El coeficiente de variación para el volumen de los micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. El coeficiente de variación para el volumen de los micropocillos puede ser, como mínimo o como máximo, del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. En algunas realizaciones, el coeficiente de variación del volumen de los micropocillos puede ser de aproximadamente el 2,5%.

La relación entre el volumen de los micropocillos y el área superficial de las perlas (o el área superficial de un soporte sólido al que pueden unirse los oligonucleótidos de códigos de barras estocásticos) puede variar, por ejemplo, variar de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 1520 micrómetros. En algunas realizaciones, la relación puede ser, o ser aproximadamente, de 2,5, 5, 10, 100, 500, 750, 1000, 1520 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la relación puede ser por lo menos, o como máximo, de 2,5, 5, 10, 100, 500, 750, 1000 o 1520 micrómetros. En algunas realizaciones, la relación puede ser de aproximadamente 67,5 micrómetros.

Disposiciones de micropocillos

Los micropocillos de una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1, pueden organizarse en una matriz unidimensional, bidimensional o tridimensional. Puede lograrse una matriz tridimensional, por ejemplo, apilando una serie de dos o más matrices bidimensionales, por ejemplo, apilando dos o más sustratos que comprenden matrices de micropocillos.

El patrón y el espacio entre los micropocillos pueden variar para optimizar la eficacia de atrapar una única célula y un único soporte sólido (por ejemplo, una perla) en cada pocillo, así como para maximizar el número de pocillos por área unitaria de la matriz. Los micropocillos pueden distribuirse de acuerdo con una variedad de patrones aleatorios o no aleatorios. Por ejemplo, pueden distribuirse completamente al azar a través de la superficie del sustrato de la matriz, o pueden disponerse en una cuadrícula cuadrada, cuadrícula rectangular, cuadrícula hexagonal o similar.

La distancia de centro a centro o la separación de centro a centro entre pocillos puede variar desde aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la distancia de centro a centro entre pocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la distancia de centro a centro entre pocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la distancia de centro a centro entre pocillos puede ser de aproximadamente 4890 micrómetros.

La distancia o el espaciado 114 entre los bordes de los micropocillos pueden variar de aproximadamente 1 micrómetro a aproximadamente 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la distancia entre los bordes de los pocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la distancia entre los bordes de los pocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o

1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la distancia entre los bordes de los pocillos puede ser de aproximadamente 80 micrómetros.

Densidad de micropocillos

5 Una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1, puede comprender micropocillos a densidades variables, por ejemplo, de 75,5 micropocillos por cm^2 (500 micropocillos por pulgada²) a 1550 micropocillos por cm^2 (10000 micropocillos por pulgada²). En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 77,5, 93, 108,5, 124, 139,5, 155, 310, 465, 620, 775, 930, 1085, 1240, 1395, 1550, 3100, 4650, 6200, 7750, o un número o intervalo entre dos cualquiera de estos valores, micropocillos por cm^2 (500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, micropocillos por pulgada²). En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 77,5, 93, 108,5, 124, 139,5, 155, 310, 465, 620, 775, 930, 1085, 1240, 1395, 1550, 3100, 4650, 6200 o 7750, micropocillos por cm^2 (500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 40000, o 50000, micropocillos por pulgada²). En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, micropocillos por cm^2 . En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 micropocillos por cm^2 .

El número total de pocillos en la matriz de micropocillos puede variar en base al patrón y el espaciado de los pocillos y las dimensiones generales de la matriz. El número de micropocillos en la matriz puede variar, por ejemplo, variando de aproximadamente 96 a aproximadamente 1000000. En algunas realizaciones, el número de micropocillos en la micromatriz puede ser, o ser aproximadamente, de 96, 384, 1536, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el número de micropocillos en la micromatriz puede ser por lo menos, o como máximo, de 96, 384, 1536, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000 o 100000. En algunas realizaciones, el número de micropocillos en la matriz de micropocillos puede ser de aproximadamente 96. En algunas realizaciones, el número de micropocillos puede ser de aproximadamente 150000.

Características de la superficie de la matriz de micropocillos

35 Una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1, puede comprender características superficiales entre los micropocillos que están diseñados para ayudar a guiar las células y los soportes sólidos hacia los pocillos y/o para evitar que se asienten en las superficies entre los pocillos. Los ejemplos no limitativos de características superficiales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, características superficiales en forma de cúpula, con crestas o con picos que rodean los pocillos o se extienden a ambos lados de la superficie entre los pocillos.

Técnicas de fabricación de sustratos

45 Un micropocillo, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1, puede fabricarse usando cualquiera de una serie técnicas de fabricación. Los ejemplos no limitativos de métodos de fabricación que pueden usarse incluyen técnicas de micromecanizado a granel como fotolitografía y grabado químico húmedo, grabado con plasma o grabado profundo con iones reactivos; micromoldeo y micrograbado; micromecanizado láser; Impresión 3D u otros procesos de fabricación de escritura directa utilizando materiales curables; y técnicas similares.

Las matrices de micropocillos pueden fabricarse a partir de una variedad de materiales de sustrato. La elección del material puede depender de la elección de la técnica de fabricación y viceversa. Los ejemplos no limitativos de materiales adecuados incluyen sílice fundida, vidrio, polímeros (por ejemplo, agarosa, gelatina, hidrogeles, elastómero de polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), poliimida, polímeros de olefina cíclica (COP), copolímeros de olefina cíclica (COC), tereftalato de polietileno (PET), resinas epoxi, resinas a base de tiol-eno, metales o películas metálicas (por ejemplo, aluminio, acero inoxidable, cobre, níquel, cromo y titanio) y similares. Puede ser deseable un material hidrófilo para la fabricación de las matrices de micropocillos (por ejemplo para mejorar la humectabilidad y minimizar la unión no específica de células y otro material biológico). También pueden usarse materiales hidrófobos que pueden tratarse o recubrirse (por ejemplo, mediante tratamiento con plasma de oxígeno o el injerto de una capa superficial de óxido de polietileno) para fabricar las matrices de micropocillos. El uso de materiales hidrófilos porosos para la fabricación de la matriz de micropocillos puede ser deseable para facilitar la evacuación/ventilación capilar de las burbujas de aire atrapadas en el dispositivo. La matriz de micropocillos puede fabricarse a partir de un solo material. La matriz de micropocillos puede comprender dos o más materiales diferentes

que se han unido o unido mecánicamente.

Formas y Tamaños del Sustrato

5 Una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1, puede fabricarse usando sustratos de una variedad de formas y tamaños. Por ejemplo, la forma (o huella) del sustrato dentro del cual se fabrican los micropocillos puede ser de forma cuadrada, rectangular, circular o irregular. El tamaño de una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102, puede caracterizarse por su anchura 116, longitud 118 y profundidad.

10 La anchura 116 de la matriz de pocillos 102 puede variar, en el intervalo de 0,25 cm a 25,4 cm (0,1 pulgadas a 10 pulgadas). En algunas realizaciones, la anchura 116 de la matriz de pocillos 102 puede ser, o ser aproximadamente, de 0,25, 0,51, 0,76, 1,01, 1,27, 1,52, 1,78, 2,03, 2,29, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 pulgadas), o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la anchura 116 de la matriz de pocillos 102 puede ser por lo menos, o como máximo, de 0,25, 0,51, 0,76, 1,01, 1,27, 1,52, 1,78, 2,03, 2,29, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pulgadas). La anchura 116 de la matriz de pocillos 102 puede variar, variando de 0,2 centímetros a 20 centímetros. En algunas realizaciones, la anchura 116 de la matriz de pocillos 102 puede ser, o ser aproximadamente, de 0,2, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 centímetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la anchura 116 de la matriz de pocillos 102 puede ser por lo menos, o como máximo, de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 20 centímetros.

25 La longitud 118 de la matriz de pocillos 102 puede variar, de 0,1 pulgada a 10 pulgadas. En algunas realizaciones, la longitud 118 de la matriz de pocillos 102 puede ser, o ser aproximadamente, de 0,25, 0,51, 0,76, 1,01, 1,27, 1,52, 1,78, 2,03, 2,29, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 pulgadas), o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la longitud 118 de la matriz de pocillos 102 puede ser por lo menos, o como máximo, de 0,25, 0,51, 0,76, 1,01, 1,27, 1,52, 1,78, 2,03, 2,29, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pulgadas). La longitud 118 de la matriz de pocillos 102 puede variar, variando de 0,2 centímetros a 20 centímetros. En algunas realizaciones, la longitud 118 de la matriz de pocillos 102 puede ser, o ser aproximadamente, de 0,2, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 centímetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la longitud 118 de la matriz de pocillos 102 puede ser por lo menos, o como máximo, de 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 20 centímetros.

40 En algunas realizaciones, la huella de la matriz de micropocillos, por ejemplo definida por su anchura 116 y su longitud 118, puede ser similar a la de una placa de microtitulación. En algunas realizaciones, la huella del sustrato de matriz de micropocillos puede ser similar a la de los portaobjetos de microscopio estándar. Los ejemplos no limitativos de la huella de portaobjetos de microscopio estándar incluyen aproximadamente 75 mm de largo x 25 mm de anchura (aproximadamente 3" de largo x aproximadamente 1" de anchura) y aproximadamente 75 mm de largo x 50 mm de anchura (aproximadamente 3" de largo x 2" de anchura).

45 El espesor del sustrato dentro del cual se fabrican los micropocillos puede variar de aproximadamente 0,1 mm de espesor a aproximadamente 10 mm de espesor, o más. El espesor del sustrato de la matriz de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, de 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mm, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. El espesor del sustrato de la matriz de micropocillos puede ser por lo menos, o como máximo, de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 mm. El espesor del sustrato de la matriz de micropocillos puede ser de aproximadamente 1 mm. El espesor del sustrato de la matriz de micropocillos puede tener cualquier valor dentro de estos intervalos, por ejemplo, el espesor del sustrato de la matriz de micropocillos puede estar entre aproximadamente 0,2 mm y aproximadamente 9,5 mm.

Tratamientos superficiales de matrices de micropocillos

55 Pueden usarse una variedad de tratamientos de superficie y técnicas de modificación de superficie para modificar las propiedades de las superficies de la matriz de micropocillos. Los ejemplos pueden incluir, pero no se limitan a, tratamientos con plasma de oxígeno para hacer que las superficies de materiales hidrófobos sean más hidrófilas, el uso de técnicas de grabado húmedo o seco para suavizar o hacer rugosas las superficies de vidrio y silicio, adsorción o injerto de óxido de polietileno u otras capas de polímeros para, por ejemplo, plurónico o albúmina sérica en superficies de sustrato para hacerlas más hidrófilas y menos propensas a la adsorción no específica de biomoléculas y células, el uso de reacciones de silano para injertar grupos funcionales químicamente reactivos en superficies de silicio y vidrio que de otro modo serían inertes, etc. Pueden usarse técnicas de fotodesprotección para activar selectivamente grupos funcionales químicamente reactivos en localizaciones específicas en la estructura de la matriz, por ejemplo, puede usarse la adición o activación selectiva de grupos funcionales químicamente reactivos como aminas primarias o grupos carboxilo en las paredes internas de los micropocillos para acoplar covalentemente

sondas de oligonucleótidos, péptidos, proteínas u otras biomoléculas a las paredes de los micropocillos. La elección del tratamiento de superficie o la modificación de la superficie utilizada puede depender del tipo de propiedad de la superficie que se desea y/o del tipo de material del que está hecha la matriz de micropocillos.

5 Sellado de micropocillos

Las aberturas de los micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1, pueden sellarse, por ejemplo, durante los pasos de lisis celular para evitar la hibridación cruzada del ácido nucleico objetivo entre micropocillos adyacentes. Un micropocillo (o una matriz de micropocillos) puede sellarse o taparse usando, por ejemplo, una membrana flexible o una lámina de material sólido (es decir, una placa o platina) que se sujeta contra la superficie del sustrato de la matriz de micropocillos, o una perla adecuada, donde el diámetro de la perla es mayor que el diámetro del micropocillo.

Un sello formado usando una membrana flexible o lámina de material sólido puede comprender, por ejemplo, membranas de nanoporos inorgánicos (por ejemplo, óxidos de aluminio), membranas de diálisis, portaobjetos de vidrio, cubreobjetos, películas elastoméricas (por ejemplo, PDMS) o películas de polímero hidrófilas (por ejemplo, una película de polímero recubierta con una película fina de agarosa que se ha hidratado con tampón de lisis).

Los soportes sólidos (por ejemplo, perlas) usados para tapar los micropocillos pueden comprender cualquiera de los soportes sólidos (por ejemplo, perlas) de la divulgación. En algunas realizaciones, los soportes sólidos son perlas de dextrano reticuladas (por ejemplo, Sephadex™). El dextrano reticulado puede variar de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 80 micrómetros. En algunas realizaciones, las perlas de dextrano reticuladas usadas para cubrir pueden ser de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, las perlas de dextrano reticuladas usadas para tapar pueden tener por lo menos, o como máximo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 micrómetros. Las perlas pueden ser más grandes que los diámetros de los micropocillos. En algunas realizaciones, las perlas pueden ser, o ser aproximadamente, un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, mayores que el diámetro de los micropocillos. En algunas realizaciones, las perlas pueden ser por lo menos, o como máximo, un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99% más grandes que el diámetro de los micropocillos.

El sello o la tapa pueden permitir que el tampón entre y salga de los micropocillos, a la vez que evita que las macromoléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos) migren fuera del pocillo. En algunas realizaciones, el sello o la tapa puede evitar que una macromolécula de o de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, nucleótidos migre hacia o desde el micropocillo. En algunas realizaciones, el sello o la tapa puede evitar que una macromolécula de por lo menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos migre hacia o desde el micropocillo.

40 Manipulación de soporte sólido

Los soportes sólidos (por ejemplo, partículas o perlas sintéticas) pueden distribuirse entre un sustrato. Los soportes sólidos pueden distribuirse entre los pocillos del sustrato, retirarse de los pocillos del sustrato o transportarse de otro modo a través de un dispositivo que comprende una o más matrices de micropocillos por medio de centrifugación u otros medios no magnéticos. Un micropocillo de un sustrato puede precargarse con un soporte sólido. Un micropocillo de un sustrato puede contener o puede contener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 soportes sólidos. Un micropocillo de un sustrato puede contener por lo menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 soportes sólidos. En algunas realizaciones, un micropocillo de un sustrato puede contener un soporte sólido.

Consumibles

Las matrices de micropocillos pueden ser un componente consumible del sistema de ensayo. Las matrices de micropocillos pueden ser reutilizables. Las matrices de micropocillos pueden configurarse para su uso como un dispositivo independiente para realizar ensayos manualmente, o pueden configurarse para comprender un componente fijo o extraíble de un sistema de instrumentos que proporciona la automatización total o parcial del procedimiento de ensayo. En algunas realizaciones de los métodos divulgados, las bibliotecas basadas en perlas de códigos de barras estocásticos pueden depositarse en los pocillos de la matriz de micropocillos como parte del procedimiento de ensayo. En algunas realizaciones, las perlas pueden precargarse en los pocillos de la matriz de micropocillos y proporcionarse al usuario como parte de, por ejemplo, un kit para realizar códigos de barras estocásticos y recuento digital de objetivos de ácidos nucleicos.

65 Dos matrices de micropocillos acoplados

En algunas realizaciones, pueden proporcionarse dos matrices de micropocillos acoplados, uno precargado con perlas que se mantienen en su lugar mediante un primer imán, y el otro para su uso por el usuario al cargar células individuales. Después de la distribución de las células en la segunda matriz de micropocillos, las dos matrices pueden colocarse cara a cara y puede retirarse el primer imán mientras se usa un segundo imán para extraer las perlas de la primera matriz hacia los micropocillos correspondientes de la segunda matriz, asegurando de este modo que las perlas descansen por encima de las células en la segunda matriz de micropocillos y minimizando de este modo la pérdida por difusión de las moléculas objetivo después de la lisis celular, a la vez que se maximiza la unión eficiente de las moléculas objetivo a los códigos de barras estocásticos en la perla.

10 Depósito por citometría de flujo

Puede introducirse una pluralidad de gotitas individuales, por ejemplo, una pluralidad de primeras gotitas individuales, una pluralidad de segundas gotitas individuales, una pluralidad de células individuales, una pluralidad de partículas sintéticas en micropocillos de una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 102 que se muestra en la FIG. 1. En algunas realizaciones, la introducción de la pluralidad de gotitas puede comprender depositar por citometría de flujo la pluralidad de gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos. El depósito por citometría de flujo de la pluralidad de gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender usar un citómetro de flujo para depositar una única primera gotita a la vez en los micropocillos de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender alinear un componente de clasificación de un citómetro de flujo con la matriz de micropocillos.

Puede introducirse una pluralidad de células individuales en micropocillos de una matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, introducir la pluralidad de células individuales en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender depositar por citometría de flujo la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos. El depósito por citometría de flujo de la pluralidad de células individuales en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender el uso de un citómetro de flujo para depositar una única célula a la vez en los micropocillos de la matriz de micropocillos.

Puede introducirse una pluralidad de partículas sintéticas como perlas en micropocillos de una matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, introducir la pluralidad de partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender depositar por citometría de flujo las partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos. El depósito por citometría de flujo de la pluralidad de partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender el uso de un citómetro de flujo para depositar una partícula sintética a la vez en los micropocillos de la matriz de micropocillos.

Puede introducirse reactivo en los micropocillos de una matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, la introducción del reactivo puede comprender depositar el reactivo mediante citometría de flujo en los micropocillos. En algunas realizaciones, el reactivo comprende partículas sintéticas como perlas y el depósito por citometría de flujo del reactivo en los micropocillos puede comprender usar un citómetro de flujo para depositar una partícula sintética a la vez en los micropocillos de la matriz de micropocillos.

Citómetro de flujo

Pueden usarse citómetros de flujo para analizar y clasificar partículas en una muestra de fluido, como células en una muestra de sangre o partículas de interés en cualquier otro tipo de muestra biológica o química. Un citómetro de flujo puede incluir un depósito de muestra para recibir una muestra de fluido, como una muestra de sangre, y un depósito envolvente que contiene un fluido envolvente. El citómetro de flujo transporta las partículas (por ejemplo, las células) en la muestra de fluido como una corriente de partículas a una célula de flujo, a la vez que dirige el fluido envolvente a la célula de flujo.

Dentro de la célula de flujo, puede formarse una envoltura de líquido alrededor de la corriente de la célula para impartir una velocidad sustancialmente uniforme sobre la corriente de la célula. La célula de flujo puede enfocar hidrodinámicamente las células dentro de la corriente para pasar a través del centro de un rayo láser en una célula de flujo. El punto en el que las células se cruzan con el rayo láser se conoce comúnmente como el punto de interrogación. Cuando una célula se mueve a través del punto de interrogación, hace que la luz del láser se disperse. La luz láser también excita los componentes en la corriente de células que tienen propiedades fluorescentes, como los marcadores fluorescentes que se añadieron a la muestra de fluido y se adhirieron a ciertas células de interés, o las perlas fluorescentes mezcladas en la corriente. El citómetro de flujo puede incluir un sistema de detección apropiado que incluye tubos fotomultiplicadores, fotodiodos u otros dispositivos de detección de luz, que están enfocados en el punto de intersección. El citómetro de flujo analiza la luz detectada para medir las propiedades físicas y fluorescentes de la célula. El citómetro de flujo puede clasificar adicionalmente las células en base a estas propiedades medidas. La corriente de flujo sale de la célula de flujo a través de una boquilla con un diámetro de boquilla apropiado para el sistema de fluidos y la tasa de clasificación deseados.

Para clasificar las células por un método electrostático, la célula deseada puede estar contenida dentro de

una gotita cargada eléctricamente. Para producir gotitas, puede hacerse vibrar rápidamente la célula de flujo mediante un dispositivo acústico, como un elemento piezoeléctrico. El volumen de una gotita puede estimarse por las propiedades hidrodinámicas de la corriente de flujo y las dimensiones de la boquilla. Para cargar la gotita, la célula de flujo puede incluir un elemento de carga cuyo potencial eléctrico puede cambiarse rápidamente. Debido a que la corriente de la célula sale de la célula de flujo en una dirección vertical sustancialmente hacia abajo, las gotitas también se propagan en esa dirección después de que se forman. Las gotitas, tanto si están cargadas como si no, pueden recogerse en un recipiente de recogida de muestras que esté apropiadamente dirigido para recoger una o más corrientes de flujo generadas por las placas deflectoras. Por consiguiente, las gotitas y las células contenidas en las mismas pueden recogerse en recipientes de recogida apropiadas en sentido descendente de las placas.

Al usar citómetros de flujo, la corriente de flujo y los recipientes de recogida pueden alinearse manualmente. Los parámetros fluidicos, como el caudal y la composición del fluido envolvente, pueden corresponderse con un diámetro de boquilla apropiado.

La FIG. 2 es una ilustración esquemática no limitativa de un dispositivo de clasificación 200, por ejemplo, un citómetro de flujo, adecuado para producir matrices de gotitas de alta densidad, incluyendo matrices celulares de alta densidad y matrices de partículas sintéticas de alta densidad. El dispositivo de clasificación ilustrado en la FIG. 2, al que se hace referencia como sistema de clasificación de corriente en el aire, puede clasificar células y partículas sintéticas. Se muestran las células 202a, 202b y 202c en una corriente de muestra 204. La corriente de muestra 204, después de combinarse con un fluido envolvente 206, puede formar una corriente de muestra combinada 204' que puede pasar a través de un orificio 208 de una boquilla 210. La corriente de muestra combinada 204', al salir de la boquilla 210, puede formar un chorro 212.

El dispositivo de clasificación 200 puede incluir un controlador de flujo 214 configurado para monitorizar y ajustar las presiones y los caudales de la corriente de muestra 204 y el fluido envolvente 206. El controlador de flujo 212 puede configurarse para ajustar una o más características de la boquilla 208 como el tamaño del orificio 206.

Un rayo láser 216 generado por un láser 218 puede iluminar las células en la corriente de muestra combinada 204'. Cuando el rayo láser 216 generado por el láser 218 se cruza con la corriente de muestra combinada 204', el rayo láser 216 puede ser dispersado, por ejemplo, por las células presentes en la corriente de muestra 204. Por ejemplo, cuando el rayo láser 214 se cruza con la célula 202c, la célula 202c puede dispersar el rayo láser 216. Una primera parte de la luz láser dispersada, conocida como luz dispersada directa 220a, puede propagarse en la dirección del rayo láser 216 antes de cruzar la corriente de muestra 204. Una segunda parte de la luz láser dispersada, conocida como luz dispersada lateralmente 220b, puede propagarse en una dirección que forma un ángulo con la dirección del rayo láser 216. La luz dispersada puede ser detectada por una o más estaciones de detección, por ejemplo, una estación de detección 222, para generar múltiples señales. La estación de detección 222 puede comprender dos sensores de imagenología 224a y 224b. El sensor de imagenología 224a puede detectar la luz dispersada directa 220a, y el sensor de imagenología 222b puede detectar la luz dispersada lateralmente 220b. En algunas realizaciones, los sensores de imagenología 224a y 224b pueden alojarse en estaciones de detección separadas.

Un analizador de detección 226 puede procesar y analizar las múltiples señales detectadas por la estación de detección 222, por ejemplo, los sensores de imagenología 224a y 224b, para generar un punto de datos de eventos de muestra, por ejemplo, un punto de datos de eventos de muestra de múltiples parámetros. Un punto de datos de evento de muestra puede incluir información como intensidades fluorescentes máximas, intensidades fluorescentes medias y cambios en las intensidades fluorescentes.

El analizador de detección 226 puede configurarse para generar diferentes puntos de datos de eventos de muestra en respuesta a la misma luz dispersada directa 220a y luz dispersada lateralmente 220b. Por ejemplo, puede ajustarse la cadencia de detección, la resolución de detección o el área de detección. Ajustando la detección a un esquema menos riguroso, la velocidad a la que puede operar la estación de detección 222 puede incrementarse debido a la complejidad reducida del procesamiento de información realizado. Esto puede reducir ventajosamente los recursos de energía consumidos durante la clasificación de muestras.

En base a los valores de los puntos de datos de eventos de muestra, después de que las gotitas salen de la boquilla 210, puede configurarse un controlador de desviación 228 para determinar si las gotitas en el chorro 212 deben cargarse y el alcance de las cargas. Por ejemplo, las gotitas en el chorro 212 pueden estar cargadas positivamente, cargadas negativamente o no cargadas. Algunas gotitas pueden incluir una célula de la muestra como se muestra en la gotita 230, mientras que otras gotitas pueden no incluir una célula de la muestra como se muestra en la gotita 232.

Las gotitas pueden pasar a través de un campo de desviación 234 controlado por el controlador de desviación 228. El campo de desviación 234 puede incluir dos placas deflectoras cargadas opuestamente 236a y 236b. Las placas deflectoras 236a y 236b pueden configurarse para dirigir las gotitas cargadas en el chorro 212 a

5 sus respectivos recipientes de recogida 238a, 238b o 238c. Como se muestra, el recipiente de recogida 23ab puede recoger gotitas cargadas negativamente porque la placa deflectora cargada positivamente 236a puede atraer gotitas cargadas negativamente. De manera similar, el recipiente de recogida 238c puede recoger gotitas cargadas positivamente porque la placa deflectora cargada negativamente 236b puede atraer gotitas cargadas positivamente. Cada recipiente de recogida puede ser una placa de micropocillos o un micropocillo de una placa de microtitulación.

10 El controlador de desviación 228 puede configurarse para controlar la fuerza del campo de desviación 234 creado por las placas deflectoras 236a y 236b. El analizador de detección 214 puede configurarse para proporcionar información al controlador de desviación 236a para ajustar el campo de desviación 234 en base al comportamiento de la muestra. Por ejemplo, la fuerza del campo de desviación 234 puede ajustarse de manera que una o ambas placas deflectoras 236a y 236b tengan niveles de atracción más altos o más bajos. La fuerza puede calibrarse con precisión para atraer solo aquellas partículas de interés para aumentar la pureza. La fuerza puede aumentarse para aumentar el rendimiento.

15 En algunas realizaciones, el sistema de flujo 200 puede identificar todas las células de interés en base a las características de los puntos de datos de eventos de muestra generados por la estación de detección 222 en respuesta a la luz dispersada directa 220a y la luz dispersada lateralmente 220b. En base a las características de los puntos de datos de eventos de muestra, el sistema de flujo 200 puede hacer que las gotitas en el chorro 212 se carguen o no cuando las células de interés salen de la boquilla 210 como gotitas. El sistema de flujo 200 puede hacer que las gotitas con las células de interés tengan la misma carga. Esto permite la recogida de las células de interés en el mismo recipiente de recogida, incluidos los mismos o diferentes micropocillos de una placa de micropocillos.

20 El controlador de flujo 214, el analizador de detección 226, el controlador de desviación 228 y otros elementos del sistema de flujo 200 pueden configurarse para coordinar sus operaciones entre sí. Por ejemplo, los caudales de la corriente de muestra 204 y el fluido envolvente 206 pueden ajustarse accionando la boquilla 210 a la vez que se ajusta el campo de desviación 234. El ajuste de los caudales también puede requerir el ajuste de la estación de detección 222 para asegurar que se generan los puntos de datos de eventos de la muestra para el nuevo caudal.

30 Introducción de gotitas en las localizaciones deseadas

35 Usando los métodos, composiciones y sistemas descritos en la presente, pueden introducirse una o más gotitas en los micropocillos de una matriz de micropocillos en una o más localizaciones deseadas, por ejemplo, para producir una matriz de gotitas. En algunas realizaciones, la introducción de una pluralidad de gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender introducir la pluralidad de gotitas en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas. La pluralidad de gotitas puede ser, o puede comprender, por ejemplo, una pluralidad de gotitas, una pluralidad de células, una pluralidad de soportes sólidos o una pluralidad de partículas sintéticas. En algunas realizaciones, introducir la pluralidad de células de la muestra en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender introducir la pluralidad de células de la muestra en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas, por ejemplo, una pluralidad de primeras localizaciones deseadas. En algunas realizaciones, introducir la pluralidad de partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos puede comprender introducir la pluralidad de partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de localizaciones deseadas, por ejemplo, una pluralidad de segundas localizaciones deseadas.

40 La pluralidad de localizaciones deseadas puede variar. En algunas realizaciones, una localización deseada puede ser un micropocillo de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, una localización deseada puede estar dentro de un micropocillo de la matriz de micropocillos, por ejemplo, en el centro del micropocillo. En algunas realizaciones, una localización deseada puede estar cerca del centro de un micropocillo de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, una localización deseada puede estar en un borde de un micropocillo de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, una localización deseada puede estar cerca de un borde de un micropocillo de la matriz de micropocillos.

50 Alineación de una matriz de micropocillos

Sistemas de alineación

60 En la presente se divulgan métodos para alinear matrices de micropocillos de alineación, por ejemplo, una primera matriz de micropocillos de alineación, para producir matrices de micropocillos de muestra, por ejemplo, una matriz celular y una matriz de partículas sintéticas. Las FIGS. 3A-B ilustran esquemáticamente un dispositivo de clasificación 300 ejemplar no limitativo con varios sensores de imagenología, por ejemplo, dos sensores de imagenología de alineación ortogonal 302a y 302b, para alinear una matriz de micropocillos de alineación 338a. En algunas realizaciones, el número de sensores de imagenología puede variar. Por ejemplo, la cantidad de sensores de imagenología puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o un

número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el número de sensores de imagenología puede variar. Por ejemplo, la cantidad de sensores de imagenología puede ser por lo menos o como máximo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100.

5 La FIG. 3A muestra una vista lateral del dispositivo de clasificación 300 ejemplar no limitativo. La FIG. 3B muestra una vista superior del dispositivo de clasificación 300 ejemplar no limitativo desde un plano 340 en una dirección 342 en la FIG. 3. La matriz de micropocillos de alineación 338a puede comprender una pluralidad de micropocillos, por ejemplo los micropocillos 340a-d, y puede colocarse en una etapa 350 (también denominada plataforma de soporte) del dispositivo de clasificación 300.

10 En algunas realizaciones, el dispositivo de clasificación 300 incluye una o más plataformas de soporte 350, según se desee, como dos o más, como tres o más, como cuatro o más e incluyendo cinco o más plataformas de soporte. Por ejemplo, el número de plataformas de soporte puede variar de 1 a 10 plataformas de soporte, como de 2 a 7 plataformas de soporte e incluyendo de 3 a 5 plataformas de soporte. En ciertas realizaciones, los sistemas de interés incluyen una plataforma de soporte. En otras realizaciones, los sistemas incluyen dos plataformas de soporte. En un ejemplo, los sistemas en cuestión incluyen una plataforma de soporte que tiene un recipiente para recoger gotitas de la corriente de flujo. En otro ejemplo, los sistemas en cuestión incluyen una plataforma de soporte que tiene un láser montado. En otro ejemplo más, el sistema en cuestión incluye una primera etapa de soporte que tiene un láser montado y una segunda plataforma de soporte que tiene un recipiente para recoger gotitas de la corriente de flujo.

15 En algunas realizaciones, las plataformas de soporte son móviles. Por ejemplo, en un ejemplo, la plataforma de soporte puede moverse para ajustar la posición de los recipientes de recogida en la plataforma de soporte para que estén alineados con la corriente de flujo. En otro ejemplo, la plataforma de soporte puede moverse para ajustar la posición de un láser. En algunas realizaciones, la plataforma de soporte se mueve en dos dimensiones, como en un plano X-Y ortogonal al eje de la corriente de flujo. En otros casos, la estructura de soporte se mueve en tres dimensiones. Cuando la plataforma de soporte está configurada para moverse, la plataforma de soporte puede moverse de manera continua o en intervalos discretos. En algunas realizaciones, la plataforma de soporte se mueve en un movimiento continuo. En otras realizaciones, la plataforma de soporte se mueve en intervalos discretos, como por ejemplo en incrementos de 0,01 micras o mayores, como 0,05 micras o más, como 0,5 micras o más, como 1 micra o más, como 10 micras o más, como 100 micras o más, como 500 micras o más, como 1 mm o más, como 5 mm o más, como como 10 mm o más e incluyendo incrementos de 25 mm o más.

20 Puede emplearse cualquier protocolo de desplazamiento para mover las estructuras de soporte, como mover las plataformas de soporte con una plataforma de traslación accionada por motor, un montaje de traslación de tornillo de avance, un dispositivo de traslación con engranajes, como los que emplean un motor paso a paso, un servomotor, un motor eléctrico sin escobillas, un motor de CC con escobillas, un motor de accionamiento de micropasos, un motor paso a paso de alta resolución, entre otros tipos de motores.

25 Los sistemas en algunas realizaciones pueden incluir una o más plataformas de soporte acopladas operativamente a los procesadores. Las plataformas de soporte adecuadas pueden ser cualquier dispositivo de montaje conveniente configurado para mantener en su lugar uno o más componentes de los sistemas en cuestión, como un sustrato plano, dispositivos de montaje contorneados, estructuras de soporte cilíndricas o tubulares, soportes de láser o LED, entre otros tipos de estructuras de soporte. En algunas realizaciones, la plataforma de soporte es un montaje para un dispositivo de iluminación, como un láser o un LED. En otras realizaciones, los sistemas incluyen una estructura de soporte para sostener uno o más recipientes para recoger partículas de la corriente de flujo. Por ejemplo, la plataforma de soporte puede estar configurada para mantener en su sitio recipientes que incluyen, pero no se limitan a, tubos de ensayo, tubos cónicos, recipientes de múltiples compartimentos como placas de microtitulación (por ejemplo, placas de 96 pocillos), tubos de centrifuga, tubos de cultivo, microtubos, tapones, cubetas, frascos, recipientes poliméricos rectilíneos, entre otros tipos de recipientes.

30 El dispositivo de clasificación 300, similar al dispositivo de clasificación 200 ilustrado en la FIG. 2, puede configurarse para clasificar y depositar células y partículas sintéticas, por ejemplo, partículas sintéticas de alineación 202a, 202b y 202c en una corriente de alineación 204. La corriente de alineación 204, después de combinarse con un fluido envolvente 206, puede generar una corriente de alineación combinada 204' que puede pasar a través de un orificio 208 de una boquilla 210. La corriente de alineación combinada 204', tras salir de la boquilla 210, puede formar un chorro 212. Un controlador de flujo 214 del dispositivo de clasificación 300 puede configurarse para monitorizar y ajustar las presiones y los caudales de la corriente de alineación 204 y el fluido envolvente 206 y para ajustar una o más características de la boquilla 208, como el tamaño del orificio 206.

35 Un rayo láser 216 generado por un láser 218 puede ser dispersado por las partículas sintéticas de alineación, por ejemplo, la partícula sintética de alineación 202c, en la corriente de alineación combinada 204'. Después de ser dispersado por las partículas sintéticas de alineación, el rayo láser 216 puede producir una luz dispersada directa 220a y una luz dispersada lateralmente 220b, propagándose en la dirección del rayo láser 216 y en una dirección en ángulo con la dirección del rayo láser 216 respectivamente.

El dispositivo de clasificación puede comprender una estación de detección 222 para detectar la luz dispersada directa 220a, por ejemplo, mediante un sensor de imagenología 222a y la luz dispersada lateralmente 220b, por ejemplo, mediante un sensor de imagenología 222b. Un analizador de detección 226 puede procesar y analizar las múltiples señales detectadas por los sensores de imagenología 222a y 222b para generar un punto de datos de eventos de muestra, por ejemplo, un punto de datos de eventos de muestra de múltiples parámetros.

En base a los valores de los puntos de datos de eventos de muestra, después de que las gotitas salen de la boquilla 210, puede configurarse un controlador de desviación 228 para determinar si las gotitas en el chorro 212 deben tener carga positiva, negativa o ninguna. Algunas gotitas pueden incluir partículas sintéticas de alineación de la muestra de alineación, como se muestra en las gotitas de alineación 230a-230d, mientras que otras gotitas pueden no incluir ninguna partícula sintética de alineación de la muestra de alineación, como se muestra en las gotitas de no alineación 232a-232d.

Las gotitas pueden pasar a través de un campo de desviación 234 controlado por el controlador de desviación 228. El campo de desviación 234 puede incluir dos placas deflectoras cargadas opuestamente 236a y 236b. Las placas deflectoras 236a y 236b pueden configurarse para dirigir las gotitas de alineación cargadas negativamente 230a-230d en el chorro 212 de tal manera que la matriz de micropocillos de alineación 238a pueda recoger las gotitas de alineación cargadas negativamente 230a-230d que incluyen partículas sintéticas. Como las gotitas que no son de alineación 232a-232d en el chorro 212 no contienen partículas sintéticas de alineación, no están cargadas y no son dirigidas por las placas deflectoras 236a y 236b. Así, las gotitas que no son de alineación 232a-232d se recogen en un recipiente de recepción de residuos 238b.

Las funciones de los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden variar. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede determinar las localizaciones de las gotitas de alineación en la matriz de micropocillos de alineación 338a en la dirección x. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede determinar las localizaciones de las gotitas de alineación en la matriz de micropocillos de alineación 338a en la dirección y. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede determinar las localizaciones de las gotitas de alineación en la matriz de micropocillos de alineación 338a tanto en la dirección x como en la dirección y. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302b puede determinar las localizaciones de las gotitas de alineación en la matriz de micropocillos de alineación 338a en la dirección y. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede determinar las localizaciones de las gotitas de alineación en la matriz de micropocillos de alineación 338a en la dirección x. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede determinar las localizaciones de las gotitas de alineación en la matriz de micropocillos de alineación 338a tanto en la dirección x como en la dirección y.

El posicionamiento de los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b puede variar. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede localizarse entre el campo de desviación 234 y la plataforma 350. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede localizarse entre el recipiente de recepción de residuos 238a y la plataforma 350. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede localizarse entre el recipiente de recepción de residuos 238a y la matriz de micropocillos de alineación 338a. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede localizarse entre el recipiente de recepción de residuos 238a y el campo de desviación 234. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede localizarse entre el recipiente de recepción de residuos 238a y las placas deflectoras 236a y 236b.

El posicionamiento de los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b entre sí puede variar. En algunas realizaciones, los sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden estar en el mismo plano, por ejemplo, un plano x-y. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede estar por encima del sensor de imagenología de alineación 302b, por ejemplo, el sensor de imagenología de alineación 302a puede estar en un primer plano x-y y el sensor de imagenología de alineación 302b puede estar en un segundo plano x-y, en donde el primer plano x-y está más alejado de la plataforma 350 más cercana al campo de desviación 234. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología de alineación 302a puede estar por debajo del sensor de imagenología de alineación 302b. En algunas realizaciones, el posicionamiento vertical, por ejemplo, la dirección z, de los sensores de imagenología de alineación 302a y 302b puede superponerse. En algunas realizaciones, el posicionamiento horizontal, por ejemplo la dirección x y la dirección y, de los sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden superponerse.

La orientación relativa de los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b puede variar. En algunas realizaciones, los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí. Por ejemplo, los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden ser ortogonales entre sí. Por ejemplo, los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden estar a 90° entre sí. Por ejemplo, los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden estar a $90^\circ \pm \delta^\circ$ entre sí. El δ puede variar. Por ejemplo, el δ puede ser, o ser aproximadamente, $0,00001^\circ$, $0,0001^\circ$, $0,001^\circ$, $0,01^\circ$, $0,1^\circ$, 1° , 2° ,

3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. Por ejemplo, el δ puede ser como mínimo o como máximo 0,00001°, 0,0001°, 0,001°, 0,01°, 0,1°, 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 8°, 9° o 10°.

5 En algunas realizaciones, los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b pueden estar en ángulo entre sí. Por ejemplo, el ángulo entre los dos sensores de imagenología de alineación 302a y 302b puede ser, o ser aproximadamente, 0°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°, 110°, 120°, 130°, 140°, 150°, 160°, 170°, 180°, 190°, 200°, 220°, 230°, 240°, 250°, 260°, 270°, 280°, 290°, 300°, 310°, 320°, 330°, 340°, 350°, 360°, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. Por ejemplo, el ángulo puede ser como mínimo o como máximo 0°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 100°, 110°, 120°, 130°, 140°, 150°, 160°, 170°, 180°, 190°, 200°, 220°, 230°, 240°, 250°, 260°, 270°, 280°, 290°, 300°, 310°, 320°, 330°, 340°, 350° o 360°.

Sistema de alineación de corrientes

15 En la presente se divulgan sistemas y métodos de clasificación automática de células. Los aspectos de los sistemas incluyen un ajustador de corriente automatizado basado en imágenes. El ajustador de corriente automatizado basado en imágenes proporciona la configuración automática de las corrientes desviadas de un dispositivo de clasificación (por ejemplo, un clasificador de células) para minimizar o eliminar las tareas del usuario después de una calibración inicial (por ejemplo, que puede tener lugar en el fábrica).

20 En algunas realizaciones, el sistema comprende: un componente de clasificación celular (que puede incluir una boquilla, un orificio, una placa deflectora o cualquier combinación de los mismos). El sistema puede comprender una memoria no transitoria configurada para almacenar instrucciones ejecutables; y un procesador en comunicación con el componente de clasificación celular y la memoria no transitoria, el procesador programado por las instrucciones ejecutables para: (a) recibir un primer parámetro usado para depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación; (b) hacer que el componente de clasificación celular deposite una segunda gotita de alineación en una segunda matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro; y (c) determinar una trayectoria de la segunda gotita de alineación, desde el componente de clasificación celular hasta el segundo micropocillo de alineación, en el primer campo de detección usando un primer sensor de imagenología, en donde el primer sensor de imagenología está localizado entre el componente de clasificación celular y un recipiente de recepción de residuos; y (d) determinar una primera medición entre una primera posición de una trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección y una primera posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección. En algunas realizaciones, el procesador está programado para: hacer que el componente de clasificación celular introduzca gotitas en los micropocillos de una matriz de micropocillos usando el primer parámetro para producir una matriz celular.

35 La FIG. 4A muestra una ilustración esquemática de un dispositivo de clasificación 400 ejemplar no limitativo para la alineación de la corriente. En algunas realizaciones, una cámara (por ejemplo, una cámara 302a o 302b) toma una imagen de una corriente desviada 402 en una trayectoria correcta 404 y luego crea una versión modificada 406 con una pluralidad de barras paralelas 408 o líneas (por ejemplo, las dos barras paralelas mostradas en la FIG. 4B) o barras no paralelas 408' o líneas (por ejemplo, las dos barras no paralelas mostradas en la FIG. 4B). Las dos barras paralelas 408 pueden representar un canal 410 por donde debe desplazarse una corriente de fluido 402 para obtener clasificaciones precisas (por ejemplo, para obtener una partícula apropiadamente desviada 230c hacia el tubo correcto o la placa de pocillos 338a). Si la corriente 402 no está posicionada apropiadamente (por ejemplo, la corriente 402 no está en el canal 410 representado por las dos barras paralelas 408 o barras no paralelas 408', el instrumento puede variar uno o más parámetros, por ejemplo, modulando, como aumentando o disminuyendo el voltaje, en las placas deflectoras para mover las corrientes hacia la trayectoria correcta 404. La corriente 402 puede iluminarse para su detección usando cualquier protocolo conveniente, por ejemplo, empleando un láser que brilla de izquierda a derecha para iluminar las corrientes y se mueve dentro y fuera de la imagen para encontrar la mejor intercepción.

50 En algunas realizaciones, cada canal 410 puede calibrarse en una posición deseada (por ejemplo, una posición de tubo o micropocillo). Un par de barras 408 (por ejemplo, barras paralelas) pueden corresponder a una trayectoria de una corriente de fluido 404 que cae en la posición deseada. Durante la calibración, puede realizarse una clasificación de prueba para determinar el canal 410 y la posición del par de líneas 408.

Voltaje de la placa deflectora

60 Como se ilustra en la presente, los sistemas pueden incluir uno o más procesadores (por ejemplo, el procesador 602 que se muestra en la FIG. 6) acoplados operativamente a los sensores de imagenología donde los procesadores están configurados para ajustar automáticamente una o más corrientes de flujo, por ejemplo, como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el procesador puede configurarse para ajustar el voltaje de carga de caída en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunas realizaciones, el voltaje de carga de caída se incrementa, como en 0,01 V o más, como en 0,05 V o más, como en 0,1 V o más, como en 0,5 V o más, como en 1

V o más, como en 5V o más, como en 10V o más, como en 15V o más, como en 25V o más, como en 50V o más e incluyendo el aumento del voltaje de carga de caída en 75V o más. Por ejemplo, el voltaje de carga de caída puede aumentarse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo el aumento del voltaje de carga de caída en un 90% o más. En otros casos, el voltaje de carga de caída se reduce, como en 0,01 V o más, como en 0,05 V o más, como en 0,1 V o más, como en 0,5 V o más, como en 1 V o más, como en 5V o más, como en 10V o más, como en 15V o más, como en 25V o más, como en 50V o más e incluyendo la reducción del voltaje de carga de caída en 75V o más. Por ejemplo, el voltaje de carga de caída puede reducirse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo la reducción del voltaje de carga de caída en un 90% o más.

En otras realizaciones más, el procesador puede configurarse para ajustar el voltaje de la placa deflectora en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunas realizaciones, se aumenta el voltaje de la placa deflectora, como en 5 V o más, como en 10 V o más, como en 50 V o más, como en 100 V o más, como en 250 V o más, como en 500 V o más, como en 1000 V o más e incluyendo el aumento del voltaje de carga de caída en 2000 V o más. Por ejemplo, el voltaje de la placa deflectora puede aumentarse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo el aumento del voltaje de la placa deflectora en un 90% o más. En otros casos, se reduce el voltaje de carga de caída, por ejemplo, en 0,5 V o más, como en 5 V o más, como en 10 V o más, como en 50 V o más, como en 100 V o más, como en 250 V o más, como en 500 V o más, como en 1000 V o más e incluyendo la reducción del voltaje de la placa deflectora en 2000 V o más. Por ejemplo, el voltaje de la placa deflectora puede reducirse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo la reducción del voltaje de la placa deflectora en un 90% o más.

En otras realizaciones más, el procesador puede configurarse para ajustar la frecuencia de activación de caída en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunas realizaciones, se aumenta la frecuencia de activación de caída, como, en 0,01 Hz o más, como en 0,05 Hz o más, como en 0,1 Hz o más, como en 0,25 Hz o más, como en 0,5 Hz o más, como en 1 Hz o más, como en 2,5 Hz o más, como en 5 Hz o más, como en 10 Hz o más e incluyendo en 25 Hz o más. Por ejemplo, la frecuencia de accionamiento de caída puede aumentarse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo el aumento de la frecuencia de accionamiento de caída en un 90% o más. En otros casos, la frecuencia de accionamiento de caída se reduce, como en 0,01 Hz o más, como en 0,05 Hz o más, como en 0,1 Hz o más, como en 0,25 Hz o más, como en 0,5 Hz o más, como en 1 Hz o más, como en 2,5 Hz o más, como en 5 Hz o más, como en 10 Hz o más e incluso en 25 Hz o más. Por ejemplo, la frecuencia de accionamiento de caída puede reducirse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo la reducción de la frecuencia de caída en un 90% o más. En otras realizaciones más, el procesador puede configurarse para ajustar el retardo de caída en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunas realizaciones, se aumenta el retraso de caída, como en 0,01 microsegundos o más, como en 0,05 microsegundos o más, como en 0,1 microsegundos o más, como en 0,3 microsegundos o más, como en 0,5 microsegundos o más, como en 1 microsegundo o más, como en 2,5 microsegundos o más, como en 5 microsegundos o más, como en 7,5 microsegundos o más e incluyendo el aumento del retardo de caída en 10 microsegundos o más. Por ejemplo, el retraso de caída puede aumentarse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más, incluyendo el aumento del retraso de caída en un 90% o más. En otros casos, se reduce la frecuencia de caída, como en 0,01 microsegundos o más, como en 0,05 microsegundos o más, como en 0,1 microsegundos o más, como en 0,3 microsegundos o más, como en 0,5 microsegundos o más, como en 1 microsegundo o más, como en 2,5 microsegundos o más, como en 5 microsegundos o más, como en 7,5 microsegundos o más e incluyendo la reducción del retardo de caída en 10 microsegundos o más. Por ejemplo, el retraso de caída puede reducirse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo la reducción del retraso de caída en un 90% o más.

En otras realizaciones más, el procesador puede configurarse para ajustar la amplitud de caída en respuesta a una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo determinadas en base a las imágenes capturadas. En algunas realizaciones, se aumenta la amplitud de caída, como en 0,01 voltios o más, como en 0,025 voltios o más, como en 0,05 voltios o más, como en 0,1 voltios o más, como en 0,25 voltios o más, como en 0,5 voltios o más e incluyendo el aumento de la amplitud de caída en 1 voltio o más. Por ejemplo, la amplitud de caída puede aumentarse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo el aumento de la amplitud de caída en un 90% o más. En otros casos, se reduce la amplitud de caída, como en 0,01 voltios o más, como en 0,025 voltios o más, como en 0,05 voltios o más, como en 0,075 voltios o más, como en 0,1 voltios o más, como en 0,25 voltios o más e incluyendo la reducción de la amplitud de caída en 1 voltio o más. Por ejemplo, la

amplitud de caída puede reducirse en un 1% o más, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 15% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más, como en un 75% o más e incluyendo la reducción de la amplitud de caída en un 90% o más.

5 En algunas realizaciones, el procesador está acoplado operativamente a un sensor de imagenología que captura imágenes de una corriente de flujo de citómetro de flujo en un campo de detección y genera una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo en base a las imágenes capturadas. Cuando la corriente de flujo es una corriente continua, en algunas realizaciones el procesador está configurado para tomar las imágenes capturadas y generar una señal de datos correspondiente a la anchura de la corriente de flujo. En campos de detección en los que la corriente de flujo está compuesta por gotitas discretas, en algunas realizaciones el procesador está configurado para generar una señal de datos correspondiente al diámetro de la gotita.

Método de alineación de la matriz de micropocillos

15 En la presente se divulgan métodos para alinear matrices de micropocillos de alineación, por ejemplo, una primera matriz de micropocillos de alineación, para producir matrices de micropocillos de muestra. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender: (a) determinar un primer parámetro usando un primer sensor de imagenología y un segundo parámetro usando un segundo sensor de imagenología (b) proporcionar una localización deseada en una matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, una primera matriz de alineación, en una dirección x y una dirección y; (c) depositar una gotita de alineación, por ejemplo una primera gotita de alineación, en un micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación en base al primer parámetro y al segundo parámetro; (d) determinar la distancia entre la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada; (e) ajustar el primer parámetro y el segundo parámetro en base a la distancia entre la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada si la distancia es mayor que un valor de umbral predeterminado; y (f) repetir los pasos (b)-(e) hasta que la distancia entre la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada no supere el valor umbral predeterminado. En algunas realizaciones, el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí. En algunas realizaciones, el primer y el segundo sensores de imagenología pueden estar localizados entre un recipiente de recepción de residuos y la matriz de micropocillos de alineación. En algunas realizaciones, depositar la gotita de alineación en el micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación puede comprender mover una plataforma, por ejemplo, la plataforma 350, mantener la matriz de micropocillos, por ejemplo, en una posición de la plataforma deseada en base a la localización deseada.

35 La FIG. 5A es un diagrama de flujo que muestra un flujo de trabajo 500a ejemplar no limitativo para alinear una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos de alineación 338a, colocada en una plataforma de un dispositivo de clasificación, por ejemplo, la plataforma 350 del dispositivo de clasificación 300. En algunas realizaciones, la alineación el controlador 418 puede realizar el flujo de trabajo 500a. Después de que el flujo de trabajo 500a comienza en 505a, puede determinarse un primer parámetro usando un primer sensor de imagenología, por ejemplo, el sensor de imagenología 302a, en 510a. Puede determinarse un segundo parámetro usando un segundo sensor de imagenología, por ejemplo, el sensor de imagenología 302b, en 515a. En algunas realizaciones, el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí. En algunas realizaciones, el primer y el segundo sensor de imagenología pueden estar localizados entre un recipiente de recepción de residuos, por ejemplo el recipiente de recepción de residuos 238a, y la matriz de micropocillos de alineación.

50 En 520a, puede proporcionarse en una dirección x y una dirección y una localización deseada en una matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, el micropocillo 340a de la matriz de micropocillos de alineación 338a. En algunas realizaciones, proporcionar la localización deseada en la dirección x en la matriz de micropocillos de alineación puede comprender usar el primer sensor de imagenología para determinar la localización deseada en la dirección x en la matriz de micropocillos de alineación y proporcionar la localización deseada en la dirección y en la matriz de micropocillos de alineación puede comprender usar el segundo sensor de imagenología para determinar la localización deseada en la dirección y en la matriz de muestras.

55 En base al primer parámetro y al segundo parámetro, en 525a puede indicarse al dispositivo de clasificación 300 que deposite una gotita de alineación, por ejemplo, la gotita de alineación 230d, en un micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, el micropocillo 340a. En algunas realizaciones, el controlador de alineación 418 puede indicar al dispositivo de clasificación 300 que deposite la gotita de alineación comunicándose con uno o más del controlador de flujo 214, el analizador de detección 226 y el controlador de desviación 228. En algunas realizaciones, depositar la gotita de alineación en el micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación puede comprender mover una plataforma, por ejemplo, la plataforma 350, manteniendo la matriz de micropocillos, por ejemplo, en una posición deseada de la plataforma en base a la localización deseada.

65 En 530a, puede determinarse la distancia d entre la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada. En algunas realizaciones, el controlador de alineación 418

puede determinar la distancia d en base a las imágenes de la gotita de alineación capturadas por el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología. En 535a, si la distancia d es mayor que un umbral, por ejemplo un umbral predeterminado, el primer parámetro y el segundo parámetro se ajustan en base a la distancia d .

5 El umbral puede variar. En algunas realizaciones, el umbral puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 nanómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el umbral puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nanómetros. En algunas realizaciones, el umbral puede ser, o ser aproximadamente, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el umbral puede ser por lo menos, o como máximo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, el umbral puede ser, o ser aproximadamente, del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, del diámetro del micropocillo. En algunas realizaciones, el umbral puede ser por lo menos, o como máximo, del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9% o 100% del diámetro del micropocillo. En algunas realizaciones, el umbral puede ser, o ser aproximadamente, del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, de la distancia o el espacio entre los bordes de los micropocillos. En algunas realizaciones, el umbral puede ser por lo menos, o como máximo, del 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, de la distancia o el espacio entre los bordes de los micropocillos.

25 En algunas realizaciones, depositar la primera gotita de alineación en el micropocillo de la primera matriz de micropocillos de alineación comprende: depositar la primera gotita de alineación en un dispositivo de alineación de la primera matriz de micropocillos de alineación, y en donde determinar la distancia entre la localización de la primera gotita de alineación en la primera matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada comprende obtener imágenes del dispositivo de alineación y la primera gotita de alineación en el dispositivo de alineación usando el primer sensor de imagenología y obtener imágenes del dispositivo de alineación y la primera gotita de alineación en el dispositivo de alineación usando el segundo sensor de imagenología.

En algunas realizaciones, el dispositivo de alineación comprende una pluralidad de regiones de alineación. Dos regiones de alineación de la pluralidad de regiones de alineación pueden comprender áreas aproximadamente iguales. La pluralidad de regiones de alineación puede comprender una pluralidad de anillos concéntricos. Dos anillos concéntricos de los anillos concéntricos pueden estar separados entre sí por o aproximadamente por 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 mm, o un número o intervalo entre dos cualquiera de estos valores. Dos anillos concéntricos de los anillos concéntricos pueden estar separados entre sí por al menos o como máximo 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 mm, o más o menos.

40 Los pasos 520a, 525a y 530a pueden repetirse hasta que la distancia d no sea mayor que un umbral. Por ejemplo, en 520a, puede proporcionarse una localización deseada actualizada, por ejemplo, el micropocillo 340b. En base al primer parámetro ajustado y el segundo parámetro ajustado y/o la nueva localización deseada, en 525a puede instruirse al dispositivo de clasificación 300 que deposite otra gotita de alineación, por ejemplo, la gotita de alineación 230c, en un micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, el micropocillo 340b. En algunas realizaciones, todas las gotitas de alineación pueden depositarse en diferentes micropocillos de la matriz de micropocillos de alineación. En algunas realizaciones, algunas o todas las gotitas de alineación pueden depositarse en diferentes micropocillos de la matriz de micropocillos. En 530a, puede determinarse la distancia d entre la localización de la gotita de alineación depositada más recientemente en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada actualizada. Si la distancia d no es mayor que un umbral, el flujo de trabajo 500a finaliza en 545a.

55 El primer parámetro y el segundo parámetro pueden estar relacionados con uno o más de la localización deseada en la dirección x y la localización deseada en la dirección y . En algunas realizaciones, el primer parámetro puede estar relacionado con la localización deseada en la dirección x , y el segundo parámetro puede estar relacionado con la localización deseada en la dirección y .

60 La distancia entre la localización de una gotita de alineación en el micropocillo de alineación y su localización deseada puede determinarse usando varios métodos. En algunas realizaciones, determinar la distancia entre la localización de una gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada puede comprender obtener imágenes de la matriz de micropocillos de alineación y la gotita de alineación usando el primer sensor de imagenología. En algunas realizaciones, determinar la distancia entre la localización de una gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada puede comprender obtener imágenes de la matriz de micropocillos de alineación y la gotita de alineación usando el segundo sensor de imagenología.

El primer parámetro y el segundo parámetro pueden estar relacionados con una serie de características. En algunas realizaciones, el primer parámetro puede estar relacionado con la caída de carga. En algunas realizaciones, el primer parámetro puede estar relacionado con la dirección x. En algunas realizaciones, el primer parámetro puede estar relacionado con la dirección y. En algunas realizaciones, el primer parámetro puede estar relacionado con la dirección x y la dirección y. En algunas realizaciones, el segundo parámetro puede estar relacionado con la caída de carga. En algunas realizaciones, el segundo parámetro puede estar relacionado con la dirección x. En algunas realizaciones, el segundo parámetro puede estar relacionado con la dirección y. En algunas realizaciones, el primer parámetro puede estar relacionado con la dirección x y la dirección y.

El primer parámetro y el segundo parámetro pueden ajustarse usando una serie de métodos. En algunas realizaciones, ajustar el primer parámetro en base a la distancia entre la localización de una gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada puede comprender determinar la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación mediante la obtención de imágenes de la matriz de micropocillos de alineación y la gotita de alineación mediante el primer sensor de imagenología. En algunas realizaciones, ajustar el primer parámetro en base a la distancia entre la localización de una gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada puede comprender determinar la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación mediante la obtención de imágenes de la matriz de micropocillos de alineación y la gotita de alineación mediante el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, ajustar el segundo parámetro en base a la distancia entre la localización de una gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada puede comprender determinar la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación obteniendo imágenes de la matriz de micropocillos de alineación y la gotita de alineación mediante el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, ajustar el segundo parámetro en base a la distancia entre la localización de una gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación y la localización deseada puede comprender determinar la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación obteniendo imágenes de la matriz de micropocillos de alineación y la gotita de alineación usando el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología.

Las gotitas de alineación pueden depositarse en uno o más micropocillos de las matrices de micropocillos de alineación usando una serie de métodos. En algunas realizaciones, depositar una gotita de alineación en un micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación puede comprender depositar por citometría de flujo la gotita de alineación en el micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación.

El umbral, por ejemplo el umbral predeterminado, puede correlacionarse con una serie de parámetros. En algunas realizaciones, el valor umbral puede correlacionarse con la distancia de una gotita de alineación desde un borde del recipiente de recepción de residuos. En algunas realizaciones, el valor umbral puede correlacionarse con la distancia de una gotita de alineación desde uno o más bordes del recipiente de recepción de residuos.

En la presente se divulgan métodos para alinear matrices de micropocillos de alineación, por ejemplo, una primera matriz de micropocillos de alineación, para producir matrices de micropocillos de muestra. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender: (a) determinar una pareja de parámetros $n^{\text{ésima}}$ (parámetro x_n ; parámetro y_n), en donde el parámetro x_n se determina usando un primer sensor de imagenología y el parámetro y_n se determina usando un segundo sensor de imagenología; (a) proporcionar una localización deseada $n^{\text{ésima}}$ ($x_{\text{deseada},n}$; $y_{\text{deseada},n}$), en donde la $x_{\text{deseada},n}$ está en una dirección x en una matriz de pocillos de alineación y la $y_{\text{deseada},n}$ está en una dirección en la matriz de pocillos de alineación; (c) depositar una gotita de alineación $n^{\text{ésima}}$ en un micropocillo $n^{\text{ésimo}}$ de la matriz de micropocillos de alineación en base a la pareja de parámetros $n^{\text{ésima}}$ (parámetro x_n ; parámetro y_n), en donde el parámetro x_n está relacionado con la x_{deseada} y el parámetro y_n está relacionado con la y_{deseada} ; (d) determinar la distancia entre la localización de la $n^{\text{ésima}}$ gotita de alineación (x_n ; y_n) en la matriz de pocillos de alineación y la localización deseada ($x_{\text{deseada},n}$; $y_{\text{deseada},n}$) usando el primer sensor de imagenología para la x_n y el segundo sensor de imagenología para la y_n ; (e) determinar una pareja de parámetros $(n+1)^{\text{ésima}}$ (parámetro x_{n+1} ; parámetro y_{n+1}) para una gotita de alineación $(n+1)^{\text{ésima}}$ en base a la distancia entre la localización de la gotita de alineación $n^{\text{ésima}}$ (x_n ; y_n) en la matriz de pocillos de alineación y la localización deseada ($x_{\text{deseada},n}$; $y_{\text{deseada},n}$) si la distancia es mayor que un umbral predeterminado (x_{umbral} ; y_{umbral}); y (f) repetir los pasos (b)-(e) hasta que la distancia entre la localización de la gotita de alineación $m^{\text{ésima}}$ (x_m ; y_m) en la matriz de pocillos de alineación y la localización deseada ($x_{\text{deseada},m}$; $y_{\text{deseada},m}$) está dentro del umbral predeterminado (x_{umbral} ; y_{umbral}). En algunas realizaciones, el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí y pueden estar localizados entre un recipiente de recepción de residuos y la matriz de pocillos de alineación. En algunas realizaciones, depositar la $n^{\text{ésima}}$ gotita de alineación en el $n^{\text{ésimo}}$ micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación puede comprender mover una plataforma que sostiene la matriz de micropocillos de alineación a, por ejemplo, una $n^{\text{ésima}}$ localización de plataforma deseada ($x_{\text{plataforma deseada},n}$; $y_{\text{plataforma deseada},n}$) en base a la $n^{\text{ésima}}$ localización deseada ($x_{\text{deseada},n}$; $y_{\text{deseada},n}$).

El umbral predeterminado puede variar. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800,

900, 1000 nanómetros, o un número o intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener por lo menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nanómetros. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener por lo menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener, o tener aproximadamente, un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, del diámetro del micropocillo. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener por lo menos, o como máximo, un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9% o 100% del diámetro del micropocillo. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener, o tener aproximadamente, un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, de la distancia o el espaciado entre los bordes de los micropocillos. En algunas realizaciones, la x_{umbral} o la y_{umbral} puede tener por lo menos, o como máximo, un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9% o 100% de la distancia o el espacio entre los bordes de los micropocillos.

La FIG. 5B es un diagrama de flujo que muestra un flujo de trabajo 500b ejemplar no limitativo para alinear una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos de alineación 338a, colocada en una plataforma de un dispositivo de clasificación, por ejemplo, la plataforma 350 del dispositivo de clasificación 300. En algunas realizaciones, el controlador de alineación 418 puede realizar el flujo de trabajo 500b. Después de que el flujo de trabajo 500b comience en 505b, en 520b puede proporcionarse una localización deseada $n^{\text{ésima}}$ ($x_{deseada,n}$; $y_{deseada,n}$) en una matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, el micropocillo 340a de la matriz de micropocillos de alineación 338a, en una dirección x y una dirección y. En algunas realizaciones, proporcionar la $n^{\text{ésima}}$ localización deseada ($x_{deseada,n}$; $y_{deseada,n}$) en la dirección x en la matriz de micropocillos de alineación puede comprender usar el primer sensor de imagenología para determinar la $x_{deseada}$, y proporcionar la $n^{\text{ésima}}$ localización deseada ($x_{deseada}$; $y_{deseada}$) en la dirección y en la matriz de pocillos de alineación comprende usar el segundo sensor de imagenología para determinar la $y_{deseada,n}$.

En el paso 522b, puede determinarse la $n^{\text{ésima}}$ pareja de parámetros (parámetro $_{x,n}$; parámetro $_{y,n}$) usando un primer sensor de imagenología, por ejemplo, el sensor de imagenología 302a y un segundo sensor de imagenología, por ejemplo, el sensor de imagenología 302b. En algunas realizaciones, el parámetro $_{x,n}$ puede ser determinado por el primer sensor de imagenología y no por el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, el parámetro $_{x,n}$ puede ser determinado por el segundo sensor de imagenología y no por el primer sensor de imagenología. En algunas realizaciones, el parámetro $_{x,n}$ puede ser determinado por el primer sensor de imagenología y por el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, el parámetro $_{y,n}$ puede ser determinada por el primer sensor de imagenología y no por el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, el parámetro $_{y,n}$ puede ser determinado por el segundo sensor de imagenología y no por el primer sensor de imagenología. En algunas realizaciones, el parámetro $_{y,n}$ puede ser determinado por el primer sensor de imagenología y por el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí. En algunas realizaciones, el primer y el segundo sensor de imagenología pueden estar localizados entre un recipiente de recepción de residuos, por ejemplo, el recipiente de recepción de residuos 238a, y la matriz de micropocillos de alineación.

En base a la pareja de parámetros $n^{\text{ésima}}$ (parámetro $_{x,n}$; parámetro $_{y,n}$), en 525b puede instruirse al dispositivo de clasificación 300 que deposite una $n^{\text{ésima}}$ gotita de alineación, por ejemplo, la gotita de alineación 230d, en un micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, el micropocillo 340a. En algunas realizaciones, el controlador de alineación 418 puede instruir al dispositivo de clasificación 300 que deposite la gotita de alineación comunicándose con uno o más del controlador de flujo 214, el analizador de detección 226 y el controlador de desviación 228. En algunas realizaciones, depositar la $n^{\text{ésima}}$ alineación gotita en el $n^{\text{ésimo}}$ micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación puede comprender mover una plataforma que sostiene la matriz de micropocillos de alineación a, por ejemplo, una $n^{\text{ésima}}$ localización de la plataforma deseada ($x_{plataforma\ deseada,n}$; $y_{plataforma\ deseada,n}$) en base a la $n^{\text{ésima}}$ localización deseada ($x_{deseada,n}$; $y_{deseada,n}$).

En 530b, puede determinarse la $n^{\text{ésima}}$ distancia d entre la localización de la $n^{\text{ésima}}$ gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación (x_n ; y_n) y la localización deseada ($x_{deseada,n}$; $y_{deseada,n}$). En algunas realizaciones, el controlador de alineación 418 puede determinar la distancia d en base a las imágenes de la gotita de alineación capturadas por el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología.

En 535b, si la $n^{\text{ésima}}$ distancia d es mayor que un umbral, por ejemplo un umbral predeterminado, pueden repetirse los pasos 520b, 522b, 525b y 530b hasta que la $n^{\text{ésima}}$ distancia d no sea mayor que un umbral. Por ejemplo, en el paso 520b, puede proporcionarse una localización deseada $n+1^{\text{ésima}}$ ($x_{deseada,n+1}$; $y_{deseada,n+1}$), por ejemplo, el micropocillo 340b. En 522b, puede determinarse una pareja de parámetros $n+1^{\text{ésima}}$ (parámetro $_{x,n+1}$; parámetro $_{y,n+1}$) usando un primer sensor de imagenología y un segundo sensor de imagenología.

El umbral puede variar. En algunas realizaciones, el umbral puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 nanómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el umbral puede tener por lo menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nanómetros. En algunas realizaciones, el umbral puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el umbral puede tener por lo menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, el umbral puede tener, o tener aproximadamente, el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, del diámetro del micropocillo. En algunas realizaciones, el umbral puede tener por lo menos, o como máximo, el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9% o 100% del diámetro del micropocillo. En algunas realizaciones, el umbral puede tener, o tener aproximadamente, un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores, de la distancia o el espacio entre los bordes de la micropocillos. En algunas realizaciones, el umbral puede tener por lo menos, o como máximo, un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 99,9%, 100%, de la distancia o el espacio entre los bordes de la micropocillos.

En base a la pareja de parámetros $n+1^{\text{ésima}}$ (parámetro $_{x,n+1}$; parámetro $_{y,n+1}$) y/o la $n+1^{\text{ésima}}$ localización deseada ($X_{\text{deseada},n+1}$; $Y_{\text{deseada},n+1}$), en 525b, puede instruirse al dispositivo de clasificación 300 que deposite una gotita de alineación $n+1^{\text{ésima}}$, por ejemplo, la gotita de alineación 230c, en un micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, el micropocillo 340b. En 530b, puede determinarse la distancia $n+1^{\text{ésima}}$ entre la localización de la $n+1^{\text{ésima}}$ gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación (x_{n+1} ; y_{n+1}) y la localización deseada ($X_{\text{deseada},n+1}$; $Y_{\text{deseada},n+1}$). Si la $n+1^{\text{ésima}}$ distancia d no es mayor que un umbral, el flujo de trabajo 500b finaliza en 545b.

En algunas realizaciones, depositar la $n^{\text{ésima}}$ gotita de alineación puede comprender depositar por citometría de flujo la $n^{\text{ésima}}$ gotita de alineación en el micropocillo de la matriz de micropocillos de alineación.

Método de alineación de corriente

Los aspectos de la divulgación también incluyen métodos para ajustar una corriente de flujo 402 de un citómetro de flujo. Los métodos de acuerdo con ciertas realizaciones incluyen capturar una o más imágenes 406 de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; determinar una o más propiedades de la corriente de flujo 402 en el campo de detección, generar una señal de datos correspondiente a la una o más propiedades de la corriente de flujo 402 y ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. Los métodos también incluyen ajustar automáticamente uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a las señales de datos derivadas de las imágenes capturadas, como el ajuste de la localización de la corriente. Los métodos en cuestión pueden ser completamente automatizados, de tal manera que los ajustes se hagan en respuesta a señales de datos correspondientes a uno o más parámetros de la corriente de flujo con poca, si la hay, intervención humana o introducción manual por parte del usuario.

En algunas realizaciones, el método comprende: (a) recibir un primer parámetro usado para depositar una primera gotita de alineación en una localización deseada en una primera matriz de micropocillos de alineación; (b) depositar una segunda gotita de alineación en una segunda matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro; (c) determinar una trayectoria de la segunda gotita de alineación, desde un componente de clasificación celular hasta el segundo micropocillo de alineación, en el primer campo de detección usando un primer sensor de imagenología, en donde el primer sensor de imagenología está localizado entre el componente de clasificación celular y un recipiente de recepción de residuos; y (d) determinar una primera medición entre una primera posición de una trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección y una primera posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección.

En algunas realizaciones, el método comprende: (e) si la primera medición es mayor que un primer umbral predeterminado: ajustar el primer parámetro en base a la primera medición; y repetir los pasos (b)-(d). En algunas realizaciones, en donde recibir el primer parámetro usado para depositar la primera gotita de alineación en la primera localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación comprende: depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro; y determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección usando el primer sensor de imagenología.

En algunas realizaciones, el primer parámetro puede estar relacionado con la localización deseada en la dirección x . El primer parámetro puede estar relacionado con la carga de las gotitas. En algunas realizaciones, el

segundo parámetro puede estar relacionado con la localización deseada en la dirección y. El segundo parámetro puede estar relacionado con la carga de las gotitas.

5 En algunas realizaciones, depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro comprende: depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro y un segundo parámetro. Depositar la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro puede comprender: depositar la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación usando el primer parámetro y el segundo parámetro.

10 En algunas realizaciones, el paso (b) puede comprender: determinar una trayectoria de la primera gotita de alineación en un segundo campo de detección, usando un segundo sensor de imagenología, desde la placa deflectora hasta la localización deseada en la primera matriz de micropocillos de alineación, en donde el segundo sensor de imagenología está localizado entre el recipiente de recepción de residuos y la placa deflectora. El paso (c) puede comprender: determinar una trayectoria de la segunda gotita de alineación en el segundo campo de detección usando el segundo sensor de imagenología. El paso (d) puede comprender: determinar una segunda medición entre una segunda posición de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección y una segunda posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el segundo campo de detección. El paso (f) puede comprender: si la segunda medición es mayor que un segundo umbral predeterminado, ajustar el segundo parámetro en base a la segunda medición. En algunas realizaciones, el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología son aproximadamente ortogonales entre sí.

15 En algunas realizaciones, determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección puede comprender capturar una primera imagen de alineación de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección. Determinar la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección puede comprender capturar una segunda imagen de alineación de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección. Determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección puede comprender determinar un primer canal, en la primera imagen de alineación, a lo largo de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección. La primera medición puede comprender si por lo menos una parte de la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección está dentro de un primer canal correspondiente en la segunda imagen de alineación.

20 En algunas realizaciones, el primer canal puede estar representado por dos barras en la primera imagen de alineación, y en donde el primer canal correspondiente está representado por dos barras correspondientes en la segunda imagen de alineación. La primera medición puede comprender una primera distancia entre la primera posición de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el primer campo de detección y la primera posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección.

25 En algunas realizaciones, determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección puede comprender capturar una tercera imagen de alineación de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección. Determinar la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el segundo campo de detección puede comprender capturar una cuarta imagen de alineación de la segunda gotita de alineación en el segundo campo de detección. Determinar la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección puede comprender determinar un segundo canal, en la tercera imagen de alineación, a lo largo de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección. La segunda medición puede comprender si por lo menos una parte de la trayectoria de la segunda gotita de alineación en el primer campo de detección está dentro de un segundo canal correspondiente en la segunda imagen de alineación.

30 En algunas realizaciones, el segundo canal puede estar representado por dos barras en la tercera imagen de alineación, y en donde el segundo canal correspondiente está representado por dos barras correspondientes en la cuarta imagen de alineación. La segunda medición puede comprender una segunda distancia entre la segunda posición de la trayectoria de la primera gotita de alineación en el segundo campo de detección y la segunda posición correspondiente de la trayectoria de la segunda gotita en el primer campo de detección.

35 En algunas realizaciones, depositar la primera gotita de alineación en la localización deseada de la primera matriz de micropocillos de alineación puede comprender depositar por citometría de flujo la primera gotita de alineación en la localización deseada de la primera matriz de micropocillos de alineación. Depositar la segunda gotita usando el primer parámetro puede comprender depositar por citometría de flujo la segunda usando el primer parámetro.

40 En algunas realizaciones, el método puede comprender: introducir una gotita de muestra en un micropocillo de la matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro. El método puede comprender: introducir una pluralidad de gotitas de muestra en una pluralidad de micropocillos de la matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro ajustado. La pluralidad de gotitas de muestra puede comprender células, partículas unidas con códigos de barras de oligonucleótidos o cualquier combinación de los mismos.

La clasificación de placas se refiere a generar gotitas de muestra en cualquier dispositivo de salida que pueda contener más de un destino para las gotitas. Las gotitas pueden tener un tamaño submilimétrico y depositarse con precisión en múltiples destinos. La superficie de destino puede ser una superficie bidimensional de varias dimensiones que varían desde portaobjetos pequeños hasta capacidades de 384 pocillos.

La colocación de las gotitas requiere una alta precisión y, por lo tanto, los motores de la plataforma de salida del clasificador pueden calibrarse en ambas direcciones x-y para compensar varias tolerancias mecánicas. Esta calibración es tediosa, lleva mucho tiempo y requiere pasos repetidos para obtener la precisión lo suficientemente alta como para usar el dispositivo.

La calibración típica consiste de varias iteraciones de depositar una gotita sobre la superficie y observar dónde 'aterriza'. Luego, el usuario establece las compensaciones necesarias en milímetros en ambas direcciones x e y en el instrumento y repite el proceso. Este es un proceso de prueba y error que típicamente requiere varias iteraciones hasta que la gotita se deposita en el centro de la localización deseada.

En lugar de simplemente adivinar el desplazamiento x/y necesario para alinear el dispositivo de salida, puede idearse una técnica mucho más rápida. Usando un dispositivo de destino calibrado para la salida y una aplicación de software que puede realizar el cálculo x/y, la calibración puede reducirse con una iteración.

Sistema informático

En realizaciones, los procesadores incluyen memoria que tiene una pluralidad de instrucciones para realizar los pasos de los métodos en cuestión (como se describe en la presente), como iluminar una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección con una fuente de luz, capturar una o más imágenes de la corriente de flujo, generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo en base a las imágenes capturadas, y ajustar los parámetros de la corriente de flujo en respuesta a la señal de datos. Los sistemas en cuestión pueden incluir tanto componentes de hardware como de software, donde los componentes de hardware pueden adoptar la forma de una o más plataformas, por ejemplo, en forma de servidores, de tal manera que los elementos funcionales, es decir, aquellos elementos del sistema que llevan a cabo funciones específicas tareas (como la gestión de entrada y salida de información, procesamiento de información, etc.) del sistema puedan llevarse a cabo mediante la ejecución de aplicaciones de software en y a través de la una o más plataformas informáticas representadas del sistema.

La FIG. 6 es un diagrama de bloques ejemplar no limitativo de un sistema informático clasificador de células 600 para controlar un dispositivo de clasificación, por ejemplo, el dispositivo de clasificación 300. Como se ilustra, el sistema informático 600 puede incluir un procesador 602 que está en comunicación eléctrica con una memoria 604, un almacenamiento 66, una interfaz de comunicaciones 608 y una interfaz de visualización 610. La memoria 604 puede almacenar instrucciones para configurar el procesador 602 para realizar las funciones del sistema informático 600 cuando el sistema informático 600 está encendido. Por ejemplo, las instrucciones almacenadas en la memoria 604 pueden configurar el procesador 602 para que realice las funciones del controlador de flujo 214, el analizador de detección 226 y el controlador de desviación 228. Cuando el sistema informático 600 está apagado, el almacenamiento 606 puede almacenar las instrucciones para configurar el procesador 602 para que realice las funciones del sistema informático 600.

En algunas realizaciones, el procesador 602 incluye una memoria que tiene instrucciones almacenadas en la misma para realizar los pasos de los métodos en cuestión, que incluyen iluminar una corriente de flujo de citómetro de flujo en un campo de detección con una fuente de luz, capturar una o más imágenes de la corriente de flujo, generar una señal de datos correspondiente a una o más propiedades de la corriente de flujo en base a las imágenes capturadas, y ajustar los parámetros de la corriente de flujo en respuesta a la señal de datos.

La interfaz de comunicaciones 608 puede facilitar las comunicaciones entre el 600 y otros dispositivos conectados al sistema informático, por ejemplo, el dispositivo de clasificación 300. La interfaz de visualización 610. La interfaz de visualización 610, junto con una interfaz de usuario 612, puede facilitar las interacciones entre el dispositivo de clasificación 300 y sus usuarios, por ejemplo, mostrando información referente a la clasificación de muestras y la configuración del dispositivo a los usuarios.

El sistema informático 600 puede incluir una interfaz de cámara 614 y una interfaz de plataforma 416 en comunicación eléctrica con el procesador 602. La interfaz de cámara 614 puede recibir imágenes capturadas por los sensores de imagenología de alineación 302a y 302b. En base a las imágenes capturadas por los sensores de imagenología de alineación 302a y 302b, un controlador de alineación 418 del sistema informático puede 600 alinear una matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos de alineación 338a, moviendo la plataforma 350 que puede estar en comunicación con la interfaz de plataforma 416.

Los aspectos de la presente divulgación incluyen además sistemas controlados por ordenador para oiponer

5 en práctica los métodos en cuestión, donde los sistemas incluyen además uno o más ordenadores para la automatización completa o la automatización parcial de un sistema para poner en práctica los métodos descritos en la presente. En algunas realizaciones, los sistemas incluyen un ordenador que tiene un medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa informático almacenado en el mismo, donde el programa informático cuando se carga en el ordenador incluye instrucciones para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; algoritmo para determinar la posición espacial de la corriente de flujo en el campo de detección; algoritmo para generar una señal de datos correspondiente a la posición espacial de la corriente de flujo; e instrucciones para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. En ciertos casos, los sistemas incluyen un ordenador que tiene un medio de almacenamiento legible por ordenador con un programa de ordenador almacenado en el mismo, donde el programa de ordenador, cuando se carga en el ordenador, incluye instrucciones para capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; algoritmo para determinar las dimensiones físicas de la corriente de flujo en el campo de detección; algoritmo para generar una señal de datos correspondiente a las dimensiones físicas de la corriente de flujo; e instrucciones para ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos.

10 En realizaciones, el sistema incluye un módulo de entrada, un módulo de procesamiento y un módulo de salida. Los módulos de procesamiento de interés pueden incluir uno o más procesadores que están configurados y automatizados para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, los módulos de procesamiento pueden incluir dos o más procesadores que están configurados y automatizados para ajustar uno o más parámetros de un citómetro de flujo como se ha descrito anteriormente, como tres o más procesadores, como cuatro o más procesadores e incluyendo cinco o más procesadores.

15 En algunas realizaciones, los sistemas en cuestión pueden incluir un módulo de entrada tal que los parámetros o la información sobre la muestra fluidica, la presión del fluido envolvente, la presión hidrostática, la carga de la corriente de flujo, el voltaje de deflexión, el valor de corrección de carga, el retraso de caída, la frecuencia de activación de caída, la amplitud de caída y la fase de carga, el orificio de la boquilla de la célula de flujo, la posición de las plataformas de soporte, los sensores de imagenología, las fuentes de luz, los protocolos de ajuste óptico, los amplificadores, así como las propiedades, la resolución y la sensibilidad de los sensores de imagenología pueden introducirse antes de poner en práctica los métodos en cuestión.

20 Como se describe aquí, cada procesador puede incluir una memoria que tiene una pluralidad de instrucciones para realizar los pasos de los métodos en cuestión, como capturar una o más imágenes de una corriente de flujo del citómetro de flujo en un campo de detección; determinar una o más propiedades de la corriente de flujo en el campo de detección; generar una señal de datos correspondiente a la una o más propiedades de la corriente de flujo; y ajustar uno o más parámetros del citómetro de flujo en respuesta a la señal de datos. Después de que el procesador haya realizado uno o más de los pasos de los métodos en cuestión, el procesador puede automatizarse para realizar ajustes en los parámetros del citómetro de flujo, como los ajustes descritos anteriormente.

25 Los sistemas en cuestión pueden incluir componentes tanto de hardware como de software, donde los componentes de hardware pueden adoptar la forma de una o más plataformas, por ejemplo, en forma de servidores, de modo que los elementos funcionales, es decir, aquellos elementos del sistema que llevan a cabo tareas específicas (como la gestión de entrada y salida de información, el procesamiento de información, etc.) del sistema pueden llevarse a cabo mediante la ejecución de aplicaciones de software en y a través de una o más plataformas informáticas representadas del sistema.

30 Los sistemas pueden incluir una pantalla y un dispositivo de entrada del operador. Los dispositivos de entrada del operador pueden ser, por ejemplo, un teclado, un ratón o similares. El módulo de procesamiento incluye un procesador que tiene acceso a una memoria que tiene instrucciones almacenadas en la misma para realizar los pasos de los métodos en cuestión. El módulo de procesamiento puede incluir un sistema operativo, un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI), una memoria de sistema, dispositivos de almacenamiento de memoria y controladores de entrada-salida, memoria caché, una unidad de respaldo de datos y muchos otros dispositivos. El procesador puede ser un procesador disponible comercialmente o puede ser uno de los otros procesadores que están o estarán disponibles. El procesador ejecuta el sistema operativo y las interfaces del sistema operativo con el firmware y el hardware de una manera bien conocida, y facilita al procesador la coordinación y ejecución de las funciones de varios programas informáticos que pueden estar escritos en una variedad de lenguajes de programación, como Java, Perl, C++, otros lenguajes de alto o bajo nivel, así como combinaciones de los mismos, como se conoce en la técnica. El sistema operativo, típicamente en cooperación con el procesador, coordina y ejecuta funciones de los otros componentes del ordenador. El sistema operativo también proporciona programación, control de entrada-salida, gestión de archivos y datos, gestión de memoria y control de comunicaciones y servicios relacionados, todo de acuerdo con técnicas conocidas.

35 La memoria del sistema puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos de almacenamiento de memoria conocidos o futuros. Los ejemplos incluyen cualquier memoria de acceso aleatorio (RAM) comúnmente

5 disponible, un medio magnético como un disco duro residente o una cinta, un medio óptico como un disco compacto de lectura y escritura, dispositivos de memoria flash u otro dispositivo de almacenamiento de memoria. El dispositivo de almacenamiento de memoria puede ser cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos o futuros, incluyendo una unidad de disco compacto, una unidad de cinta, una unidad de disco duro extraíble o una unidad de disquete. Dichos tipos de dispositivos de almacenamiento de memoria típicamente leen y/o escriben en un medio de almacenamiento de programas (no mostrado) como, respectivamente, un disco compacto, una cinta magnética, un disco duro extraíble o un disquete flexible. Cualquiera de estos medios de almacenamiento de programas, u otros actualmente en uso o que puedan desarrollarse más adelante, pueden considerarse un producto de programa informático. Como se apreciará, estos medios de almacenamiento de programas típicamente almacenan un programa de software informático y/o datos. Los programas de software informático, también denominados lógica de control informático, típicamente se almacenan en la memoria del sistema y/o en el dispositivo de almacenamiento de programas usado junto con el dispositivo de almacenamiento de memoria.

15 En algunas realizaciones, se describe un producto de programa informático que comprende un medio utilizable por ordenador que tiene una lógica de control (programa de software informático, incluyendo código de programa) almacenado en el mismo. La lógica de control, cuando es ejecuta por el procesador del ordenador, hace que el procesador realice las funciones descritas en la presente. En otras realizaciones, algunas funciones se implementan principalmente en hardware usando, por ejemplo, una máquina de estado de hardware. La implementación de la máquina de estado de hardware para realizar las funciones descritas en la presente será evidente para los expertos en las técnicas relevantes.

25 La memoria puede ser cualquier dispositivo adecuado en el que el procesador pueda almacenar y recuperar datos, como dispositivos de almacenamiento magnéticos, ópticos o de estado sólido (incluyendo discos magnéticos u ópticos, cintas o RAM, o cualquier otro dispositivo adecuado, ya sea fijo o portátil). El procesador puede incluir un microprocesador digital de propósito general adecuadamente programado a partir de un medio legible por ordenador que lleva el código de programa necesario. La programación puede proporcionarse de forma remota al procesador a través de un canal de comunicaciones, o puede guardarse previamente en un producto de programa informático, como una memoria o algún otro medio de almacenamiento portátil o fijo legible por ordenador usando cualquiera de esos dispositivos en conexión con la memoria. Por ejemplo, un disco magnético u óptico puede llevar la programación y puede ser leído por un escritor/lector de disco. Los sistemas de las realizaciones divulgadas en la presente también incluyen programación, por ejemplo, en forma de productos de programas informáticos, algoritmos para su uso en la puesta en práctica de los métodos descritos anteriormente. La programación de acuerdo con la presente divulgación puede grabarse en medios legibles por ordenador, por ejemplo, cualquier medio que pueda ser leído y accedido directamente por una ordenador. Tales medios incluyen, pero no se limitan a: medios de almacenamiento magnético, como disquetes, medios de almacenamiento en discos duros y cintas magnéticas; medios de almacenamiento óptico como CD-ROM; medios de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM; unidad flash portátil; e híbridos de estas categorías como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos.

40 El procesador también puede tener acceso a un canal de comunicaciones para comunicarse con un usuario en una localización remota. Por localización remota se entiende que el usuario no está directamente en contacto con el sistema y transmite información de entrada a un administrador de entrada desde un dispositivo externo, como un ordenador conectado a una red de área amplia ("WAN"), red telefónica, red satelital, o cualquier otro canal de comunicaciones adecuado, incluyendo un teléfono móvil (es decir, un teléfono inteligente).

45 En algunas realizaciones, los sistemas de acuerdo con la presente divulgación pueden configurarse para incluir una interfaz de comunicaciones. En algunas realizaciones, la interfaz de comunicaciones incluye un receptor y/o transmisor para comunicarse con una red y/u otro dispositivo. La interfaz de comunicaciones puede configurarse para comunicación por cable o inalámbrica, incluyendo pero no limitadas a, comunicación por radiofrecuencia (RF) (por ejemplo, identificación por radiofrecuencia (RFID), protocolos de comunicación Zigbee, WiFi, infrarrojos, bus serie universal inalámbrico (USB), banda ultraancha (UWB), protocolos de comunicación Bluetooth® y comunicación celular, como acceso múltiple por división de código (CDMA) o sistema global para comunicaciones móviles (GSM).

55 En una realización, la interfaz de comunicaciones está configurada para incluir uno o más puertos de comunicación, por ejemplo, puertos físicos o interfaces como un puerto USB, un puerto RS-232 o cualquier otro puerto de conexión eléctrica adecuado para permitir la comunicación de datos entre los sistemas en cuestión y otros dispositivos externos como un terminal de ordenador (por ejemplo, en el consultorio de un médico o en un entorno hospitalario) que está configurado para una comunicación de datos complementaria similar.

60 En una realización, la interfaz de comunicaciones está configurada para comunicación por infrarrojos, comunicación por Bluetooth® o cualquier otro protocolo de comunicaciones inalámbrico adecuado para permitir que los sistemas en cuestión se comuniquen con otros dispositivos como terminales y/o redes informáticas, teléfonos móviles habilitados para comunicación, asistentes digitales personales, o cualquier otro dispositivo de comunicación que el usuario pueda usar en conjunto.

65

En una realización, la interfaz de comunicaciones está configurada para proporcionar una conexión para la transferencia de datos usando el Protocolo de Internet (IP) a través de una red de telefonía celular, servicio de mensajes cortos (SMS), conexión inalámbrica a un ordenador personal (PC) en una red de área local (LAN) que está conectado a Internet, o una conexión WiFi a Internet en un punto de acceso WiFi.

En una realización, los sistemas en cuestión están configurados para comunicarse de manera inalámbrica con un dispositivo servidor a través de la interfaz de comunicaciones, por ejemplo, usando un estándar común como 802.11 o el protocolo Bluetooth® RF, o un protocolo de infrarrojos IrDA. El dispositivo de servidor puede ser otro dispositivo portátil, como un teléfono inteligente, un asistente digital personal (PDA) o un ordenador portátil; o un dispositivo más grande, como un ordenador de escritorio, un dispositivo, etc. En algunas realizaciones, el dispositivo servidor tiene una pantalla, como una pantalla de cristal líquido (LCD), así como un dispositivo de entrada, como botones, un teclado, un ratón o pantalla táctil.

En algunas realizaciones, la interfaz de comunicaciones está configurada para comunicar automática o semiautomáticamente los datos almacenados en los sistemas en cuestión, por ejemplo, en una unidad de almacenamiento de datos opcional, con una red o dispositivo de servidor usando uno o más de los protocolos y/o mecanismos de comunicación descritos anteriormente.

Los controladores de salida pueden incluir controladores para cualquiera de una variedad de dispositivos de visualización conocidos para presentar información a un usuario, ya sea un humano o una máquina, ya sea local o remoto. Si uno de los dispositivos de visualización proporciona información visual, esta información típicamente puede organizarse lógicamente y/o físicamente como una matriz de elementos de imagen. Un controlador de interfaz gráfica de usuario (GUI) puede incluir cualquiera de una variedad de programas de software conocidos o futuros para proporcionar interfaces gráficas de entrada y salida entre el sistema y un usuario, y para procesar las entradas del usuario. Los elementos funcionales del ordenador pueden comunicarse entre sí a través del bus del sistema. Algunas de estas comunicaciones pueden lograrse en realizaciones alternativas usando la red u otros tipos de comunicaciones remotas. El administrador de salida también puede proporcionar información generada por el módulo de procesamiento a un usuario en una localización remota, por ejemplo, a través de Internet, red telefónica o satelital, de acuerdo con técnicas conocidas. La presentación de datos por parte del administrador de salida puede implementarse de acuerdo con una variedad de técnicas conocidas. Como algunos ejemplos, los datos pueden incluir documentos SQL, HTML o XML, correo electrónico u otros archivos, o datos en otras formas. Los datos pueden incluir direcciones URL de Internet para que un usuario pueda recuperar documentos de SQL, HTML, XML u otros documentos o datos de fuentes remotas. La una o más plataformas presentes en los sistemas en cuestión pueden ser cualquier tipo de plataforma informática conocida o un tipo que se desarrollará en el futuro, aunque típicamente serán de una clase de ordenador denominada comúnmente como servidores. Sin embargo, también pueden ser un ordenador central, una estación de trabajo u otro tipo de ordenador. Pueden conectarse a través de cualquier tipo de cableado conocido o futuro u otro sistema de comunicaciones, incluyendo sistemas inalámbricos, ya sea en red o de otro modo. Pueden estar localizados en el mismo lugar o pueden estar separados físicamente. Pueden emplearse varios sistemas operativos en cualquiera de las plataformas informáticas, dependiendo posiblemente del tipo y/o marca de la plataforma informática elegida. Los sistemas operativos apropiados incluyen Windows NT[®], Windows XP, Windows 7, Windows 8, iOS, Sun Solaris, Linux, OS/400, Compaq Tru64 Unix, SGI IRIX, Siemens Reliant Unix y otros.

Sensores de imagenología

Los sensores de imagenología pueden ser cualquier dispositivo adecuado capaz de capturar y convertir una imagen óptica en una señal de datos electrónicos. Los sensores de imagenología ejemplares no limitativos incluyen dispositivos acoplados por carga, dispositivos acoplados por carga semiconductores (CCD), sensores de píxeles activos (APS), sensores de imagen semiconductores de óxido metálico complementarios (CMOS) y sensores de imagen semiconductores de óxido metálico tipo N (NMOS). En algunas realizaciones, un sensor de imagenología puede ser una cámara CCD. La cámara CCD puede ser una cámara CCD multiplicadora de electrones (EMCCD) o una cámara CCD intensificada (ICCD). En algunas realizaciones, el sensor de imagenología puede ser una cámara CMOS.

Los sistemas incluyen uno o más sensores de imagenología configurados para capturar imágenes de una corriente de flujo en un campo de detección. El sensor de imagenología puede ser cualquier dispositivo adecuado capaz de capturar y convertir una imagen óptica en una señal de datos electrónicos, incluyendo pero no limitados a, dispositivos de carga acoplada, dispositivos semiconductores de carga acoplada (CCD), sensores de píxeles activos (APS), sensores de imágenes semiconductores de óxido metálico complementarios (CMOS) o sensores de imagen de semiconductores de óxido metálico de tipo N (NMOS). En algunas realizaciones, el sensor de imagenología es una cámara CCD. Por ejemplo, la cámara puede ser una cámara CCD multiplicadora de electrones (EMCCD) o una cámara CCD intensificada (ICCD). En otras realizaciones, el sensor de imagenología es una cámara de tipo CMOS.

Dependiendo del número de campos de detección que se interroguen y los parámetros del citómetro de flujo de interés, puede variar el número de sensores de imagenología en los sistemas en cuestión, según se desee.

Por ejemplo, los sistemas en cuestión pueden incluir un sensor de imagenología o más, como dos sensores de imagenología o más, como tres sensores de imagenología o más, como cuatro sensores de imagenología o más, como cinco sensores de imagenología o más e incluyendo diez sensores de imagenología o más. En ciertas realizaciones, los sistemas incluyen un sensor de imagenología. En otras realizaciones, los sistemas incluyen dos sensores de imagenología. Cuando los sistemas incluyen más de un sensor de imagenología, cada sensor de imagenología puede estar orientado con respecto al otro (como se hace referencia en un plano X-Y) en un ángulo que varía de 10° a 90°, como de 15° a 85°, como de 20° a 80°, como de 25° a 75° e incluyendo de 30° a 60°. En ciertas realizaciones, cada sensor de imagenología está orientado ortogonalmente (como se hace referencia en un plano X-Y) entre sí. Por ejemplo, cuando los sistemas en cuestión incluyen dos sensores de imagenología, el primer sensor de imagenología está orientado ortogonalmente (como se hace referencia en un plano X-Y) con el segundo sensor de imagenología.

Cuando los sistemas en cuestión incluyen más de un sensor de imagenología, cada sensor de imagenología puede ser el mismo o una combinación de sensores. Por ejemplo, cuando los sistemas en cuestión incluyen dos sensores de imagenología, en algunas realizaciones el primer sensor de imagenología es un dispositivo de tipo CCD y el segundo sensor de imagenología es un dispositivo de tipo CMOS. En otras realizaciones, tanto el primer como el segundo sensores de imagenología son dispositivos de tipo CCD. En otras realizaciones más, tanto el primer como el segundo sensores de imagenología son dispositivos de tipo CMOS.

En algunas realizaciones, los sensores de imagenología son estacionarios, manteniendo una única posición dentro del citómetro de flujo. En otras realizaciones, los sensores de imagenología pueden configurarse para moverse a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo. Por ejemplo, el sensor de imagenología puede configurarse para moverse en sentido ascendente y en sentido descendente junto con la corriente de flujo capturando imágenes en una pluralidad de campos de detección. Por ejemplo, los sistemas pueden incluir un sensor de imagenología que está adaptado para capturar imágenes en dos o más campos de detección diferentes a lo largo de la corriente de flujo, como 3 o más campos de detección, como 4 o más campos de detección e incluyendo 5 o más campos de detección. Cuando el sensor de imagenología está configurado para moverse a lo largo de la corriente de flujo, el sensor de imagenología puede moverse a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo de manera continua o en intervalos discretos. En algunas realizaciones, el sensor de imagenología se desplaza de manera continua. En otras realizaciones, el sensor de imagenología puede desplazarse a lo largo de la trayectoria de la corriente de flujo en intervalos discretos, como por ejemplo en incrementos de 1 mm o más, como incrementos de 2 mm o más e incluyendo incrementos de 5 mm o más.

Cuando el sensor de imagenología está configurado para capturar imágenes en diferentes posiciones a lo largo de una trayectoria de la corriente de flujo, el sensor de imagenología puede configurarse para capturar imágenes de manera continua o en intervalos discretos. En algunas realizaciones, los sensores de imagenología de interés están configurados para capturar imágenes de manera continua. En otros casos, los sensores de imagen están configurados para tomar mediciones en intervalos discretos, como capturar una imagen de la corriente de flujo cada 0,001 milisegundos, cada 0,01 milisegundos, cada 0,1 milisegundos, cada 1 milisegundo, cada 10 milisegundos, cada 100 milisegundos e incluyendo cada 1000 milisegundos, o algún otro intervalo.

En algunas realizaciones, el sensor de imagenología está configurado para capturar una o más imágenes de la corriente de flujo en cada campo de detección. Por ejemplo, el sensor de imagenología puede configurarse para capturar 2 o más imágenes de la corriente de flujo en cada campo de detección, como 3 o más imágenes, como 4 o más imágenes, como 5 o más imágenes, como 10 o más imágenes, como 15 o más imágenes e incluyendo 25 o más imágenes. Cuando se captura una pluralidad de imágenes en un campo de detección, el procesador (como se divulga en la presente) puede incluir un algoritmo de procesamiento de imágenes digitales para unir la pluralidad de imágenes.

Dependiendo de la tasa de flujo y la resolución de imagen deseada, el sensor de imagenología puede tener un tiempo de exposición de 100 ms o menos cuando lee el sensor completo, como 75 ms o menos, como 50 ms o menos, como 25 ms o menos, como 10 ms o menos, como 5 ms o menos, como 1 ms o menos, como 0,1 ms o menos, como 0,01 ms o menos, como 0,001 ms o menos, como 0,0001 ms o menos, como como 0,00001 ms o menos e incluyendo un tiempo de exposición de 0,000001 ms o menos. Por ejemplo, el tiempo de exposición del sensor de imagenología en un campo de detección que captura imágenes de la corriente de flujo en el orificio de la boquilla de la célula de flujo puede tener un tiempo de exposición que varía de 0,0001 ms a 10 ms, como de 0,001 ms a 5 ms, como de 0,01 ms a 2 ms e incluyendo de 0,1 ms a 1 ms. El tiempo de exposición de los sensores de imagenología en un campo de detección que captura imágenes de la corriente de flujo del citómetro de flujo en sentido descendente del orificio de la boquilla puede tener un tiempo de exposición que varía de 0,0001 ms a 10 ms, como de 0,001 ms a 5 ms, como de 0,01 ms a 2 ms e incluyendo de 0,1 ms a 1 ms.

En ciertas realizaciones, los sensores de imagenología en los sistemas en cuestión pueden tener 1 M de píxeles activos o más, como 1,5 M o más, por ejemplo, 2 M o más, 2,5 M o más, o 3 M o más. En ciertos aspectos, un píxel corresponde a una dimensión física real de aproximadamente 0,3 μm . Dependiendo del campo de detección, en algunas realizaciones, los sensores de imagenología tienen un área de sensor de 150 mm² o más,

5 como de aproximadamente 150 mm² a aproximadamente 175 mm², de aproximadamente 175 mm² a aproximadamente 200 mm², de 200 mm² a aproximadamente 225 mm², de aproximadamente 225 mm² a aproximadamente 250 mm², de aproximadamente 250 mm² a aproximadamente 300 mm², de aproximadamente 300 mm² a aproximadamente 400 mm², de aproximadamente 400 mm² a aproximadamente 500 mm², de aproximadamente 500 mm² a aproximadamente 750 mm², de aproximadamente 750 mm² a aproximadamente 1000 mm², o de aproximadamente 1000 mm² o más.

10 El sensor de imagenología puede colocarse a cualquier distancia adecuada de la corriente de flujo del citómetro de flujo siempre que el campo de detección sea capaz de capturar una imagen de la corriente de flujo. Por ejemplo, el sensor de imagenología puede colocarse a 0,01 mm o más de la corriente de flujo, como 0,05 mm o más, como 0,1 mm o más, como 0,5 mm o más, como 1 mm o más, como 2,5 mm o más, como 5 mm o más, como 10 mm o más, como 15 mm o más, como 25 mm o más e incluyendo 50 mm o más de la corriente de flujo del citómetro de flujo.

15 En algunas realizaciones, el sensor de imagenología se coloca en ángulo con respecto al eje de la corriente de flujo. Por ejemplo, el sensor de imagenología puede colocarse en un ángulo con respecto al eje de la corriente de flujo que varía de 10° a 90°, como de 15° a 85°, como de 20° a 80°, como de 25° a 75° e incluyendo de 30° a 60°. En ciertas realizaciones, el sensor de imagenología se coloca en un ángulo de 90° con respecto al eje de la corriente de flujo.

20 En algunas realizaciones, el sensor de imagenología también incluye un protocolo de ajuste óptico. Por "ajuste óptico" se entiende que la captura de imágenes del campo de detección por el sensor de imagenología puede cambiarse según se desee, para aumentar o disminuir las dimensiones capturadas o para mejorar la resolución óptica de la imagen. En algunas realizaciones, el ajuste óptico es un protocolo de aumento configurado para aumentar el tamaño del campo de detección capturado por el sensor de imagenología, como un 5% o más, como un 10% o más, como un 25% o más, como un 50% o más e incluyendo aumentar el campo de detección del sensor de imagenología en un 75% o más. En otros casos, el ajuste óptico es un protocolo de reducción de aumentos configurado para disminuir el tamaño del campo de detección capturado por el sensor de imagenología, por ejemplo, en un 5% o más, como un 10% o más, como un 25% o más, como un 50% o más e incluyendo la reducción de la anchura del haz en forma de hendidura en un 75% o más. En ciertas realizaciones, el ajuste óptico es un protocolo de resolución mejorada configurado para mejorar la resolución de las imágenes capturadas, como en un 5% o más, como en un 10% o más, como en un 25% o más, como en un 50% o más e incluyendo la mejora de la resolución de las imágenes capturadas en un 75% o más. La captura de imágenes del campo de detección por el sensor de imagenología puede ajustarse con cualquier protocolo de ajuste óptico conveniente, incluyendo pero no limitados a, lentes, espejos, filtros y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el sensor de imagenología incluye una lente de enfoque. La lente de enfoque, por ejemplo, puede ser una lente de disminución de aumentos. En otras realizaciones, la lente de enfoque es una lente de aumento.

40 Los sensores de imagenología de la presente divulgación también pueden incluir uno o más separadores de longitud de onda. El término "separador de longitud de onda" se usa en la presente en su sentido convencional para referirse a un protocolo óptico para separar la luz policromática en sus longitudes de onda componentes para la detección. La separación de longitudes de onda, de acuerdo con ciertas realizaciones, puede incluir pasar o bloquear selectivamente longitudes de onda específicas o intervalos de longitud de onda de la luz policromática. Para separar las longitudes de onda de la luz, la luz transmitida puede pasar a través de cualquier protocolo conveniente de separación de longitudes de onda, incluyendo pero no limitados a, vidrio coloreado, filtros de paso de banda, filtros de interferencia, espejos dicróicos, rejillas de difracción, monocromadores y combinaciones de los mismos, entre otros protocolos de separación de longitudes de onda. Dependiendo del campo de detección, la fuente de luz y la corriente de flujo que se estén visualizando, los sistemas pueden incluir uno o más separadores de longitud de onda, como dos o más, como tres o más, como cuatro o más, como cinco o más e incluyendo 10 o más separadores de longitud de onda. En un ejemplo, los sensores de imagenología incluyen un filtro de paso de banda. En otro ejemplo, los sensores de imagenología incluyen dos o más filtros de paso de banda. En otro ejemplo, los sensores de imagenología incluyen dos o más filtros de paso de banda y una rejilla de difracción. En otro ejemplo más, los sensores de imagenología incluyen una pluralidad de filtros de paso de banda y un monocromador. En ciertas realizaciones, los sensores de imagenología incluyen una pluralidad de filtros de paso de banda y rejillas de difracción configurados en una configuración de rueda de filtros. Cuando los sensores de imagenología incluyen dos o más separadores de longitud de onda, los separadores de longitud de onda pueden utilizarse individualmente o en serie para separar la luz policromática en las longitudes de onda componentes. En algunas realizaciones, los separadores de longitud de onda están dispuestos en serie. En otras realizaciones, los separadores de longitud de onda están dispuestos individualmente de tal manera que se realizan una o más mediciones usando cada uno de los separadores de longitud de onda.

65 En algunas realizaciones, los sistemas incluyen uno o más filtros ópticos, como uno o más filtros de paso de banda. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los filtros ópticos de interés son filtros de paso de banda que tienen anchuras de banda mínimas que varían de 2 nm a 100 nm, como de 3 nm a 95 nm, como de 5 nm a 95 nm, como de 10 nm a 90 nm, como de 12 nm a 85 nm, como de 15 nm a 80 nm e incluyendo filtros de paso de

banda que tienen anchuras de banda mínimas que varía desde 20 nm a 50 nm. En otros casos, los filtros ópticos son filtros de paso largo, como por ejemplo filtros de paso largo que atenúan longitudes de onda de luz de 1600 nm o menos, como 1550 nm o menos, como 1500 nm o menos, como 1450 nm o menos, como como 1400 nm o menos, como 1350 nm o menos, como 1300 nm o menos, como 1000 nm o menos, como 950 nm o menos, como 900 nm o menos, como 850 nm o menos, como 800 nm o menos, como 750 nm o menos, como 700 nm o menos, como 650 nm o menos, como 600 nm o menos, como 550 nm o menos, como como 500 nm o menos e incluyendo un filtro de paso largo que atenúa longitudes de onda de luz de 450 nm o menos. En otros casos más, los filtros ópticos son filtros de paso corto, como por ejemplo filtros de paso corto que atenúan longitudes de onda de luz de 200 nm o más, como 250 nm o más, como 300 nm o más, como 350 nm o más, como 400 nm o más, como 450 nm o más, como 500 nm o más, como 550 nm o más e incluyendo filtros de paso corto que atenúan longitudes de onda de luz de 600 nm o más.

En otras realizaciones, el separador de longitud de onda es una rejilla de difracción. Las rejillas de difracción pueden incluir, pero no se limitan a, rejillas de difracción de transmisión, dispersivas o reflectantes. Los espaciamientos adecuados de la rejilla de difracción pueden variar dependiendo de la configuración de la fuente de luz, el campo de detección y el sensor de imagenología y otros protocolos de ajuste óptico presentes (por ejemplo, lentes de enfoque), que varían de 0,01 μm a 10 μm , como de 0,025 μm a 7,5 μm , como de 0,5 μm a 5 μm , como de 0,75 μm a 4 μm , como de 1 μm a 3,5 μm e incluyendo de 1,5 μm a 3,5 μm .

En algunas realizaciones, cada sensor de imagenología está acoplado operativamente con una o más fuentes de luz para iluminar la corriente de flujo en el campo de detección. En algunas realizaciones, la fuente de luz es una fuente de luz de banda ancha, que emite luz que tiene una amplia gama de longitudes de onda, como por ejemplo, que abarca 50 nm o más, como 100 nm o más, como 150 nm o más, como 200 nm o más, como 250 nm o más, como 300 nm o más, como 350 nm o más, como 400 nm o más e incluyendo 500 nm o más. Por ejemplo, una fuente de luz de banda ancha adecuada emite luz que tiene longitudes de onda de 200 nm a 1500 nm. Otro ejemplo de fuente de luz de banda ancha adecuada incluye una fuente de luz que emite luz con longitudes de onda de 400 nm a 1000 nm. Puede emplearse cualquier protocolo de fuente de luz de banda ancha conveniente, como una lámpara halógena, lámpara de arco de deuterio, lámpara de arco de xenón, fuente de luz de banda ancha acoplada con fibra estabilizada, LED de banda ancha con espectro continuo, diodo emisor superluminiscente, diodo emisor de luz semiconductor, fuente de luz blanca LED de amplio espectro, fuente de luz blanca integrada multi-LED, entre otros fuentes de luz de banda ancha o cualquier combinación de las mismas.

En otras realizaciones, la fuente de luz es una fuente de luz de banda estrecha que emite una longitud de onda particular o un intervalo estrecho de longitudes de onda. En algunas realizaciones, las fuentes de luz de banda estrecha emiten luz que tiene un intervalo estrecho de longitudes de onda, como por ejemplo, 50 nm o menos, como 40 nm o menos, como 30 nm o menos, como 25 nm o menos, como como 20 nm o menos, como 15 nm o menos, como 10 nm o menos, como 5 nm o menos, como 2 nm o menos e incluyendo fuentes de luz que emiten una longitud de onda de luz específica (es decir, luz monocromática). Puede emplearse cualquier protocolo de fuente de luz de banda estrecha conveniente, como un LED de longitud de onda estrecha, un diodo láser o una fuente de luz de banda ancha acoplada a uno o más filtros de paso de banda ópticos, rejillas de difracción, monocromadores o cualquier combinación de los mismos.

Los sistemas en cuestión pueden incluir una o más fuentes de luz, según se desee, como dos o más fuentes de luz, como tres o más fuentes de luz, como cuatro o más fuentes de luz, como cinco o más fuentes de luz e incluyendo diez o más fuentes de luz. La fuente de luz puede incluir una combinación de tipos de fuentes de luz, por ejemplo, cuando se emplean dos fuentes de luz, una primera fuente de luz puede ser una fuente de luz blanca de banda ancha (por ejemplo, LED de luz blanca de banda ancha) y la segunda fuente de luz puede ser una fuente de luz de infrarrojo cercano de banda ancha (por ejemplo, LED de IR cercano de banda ancha). En otros casos, cuando se emplean dos fuentes de luz, una primera fuente de luz puede ser una fuente de luz blanca de banda ancha (por ejemplo, un LED de luz blanca de banda ancha) y la segunda fuente de luz puede ser una fuente de luz de espectro estrecho (por ejemplo, una luz visible de banda estrecha o LED infrarrojo cercano). En otros casos más, la fuente de luz es una pluralidad de fuentes de luz de banda estrecha, cada una de las cuales emite longitudes de onda específicas, como una matriz de dos o más LED, como una matriz de tres o más LED, como una matriz de cinco o más LED, incluyendo una matriz de diez o más LED.

En algunas realizaciones, las fuentes de luz emiten luz que tiene longitudes de onda que varían de 200 nm a 1500 nm, como de 250 nm a 1250 nm, como de 300 nm a 1000 nm, como de 350 nm a 900 nm e incluyendo de 400 nm a 800 nm. Por ejemplo, la fuente de luz puede incluir una fuente de luz de banda ancha que emita luz con longitudes de onda de 200 nm a 900 nm. En otros casos, la fuente de luz incluye una pluralidad de fuentes de luz de banda estrecha que emiten longitudes de onda que varían de 200 nm a 900 nm. Por ejemplo, la fuente de luz puede ser una pluralidad de LED de banda estrecha (1 nm - 25 nm), cada uno de los cuales emite luz de manera independiente con un intervalo de longitudes de onda entre 200 nm y 900 nm. En algunas realizaciones, la fuente de luz de banda estrecha es una o más lámparas de banda estrecha que emiten luz en el intervalo de 200 nm a 900 nm, como una lámpara de cadmio de banda estrecha, lámpara de cesio, lámpara de helio, lámpara de mercurio, lámpara de mercurio-cadmio, lámpara de potasio, lámpara de sodio, lámpara de neón, lámpara de zinc o cualquier

combinación de las mismas

En ciertas realizaciones, la fuente de luz es una fuente de luz estroboscópica en la que la corriente de flujo se ilumina con destellos de luz periódicos. Dependiendo de la fuente de luz (por ejemplo, lámpara de destello, láser pulsado), la frecuencia de la luz estroboscópica puede variar y puede ser de 0,01 kHz o mayor, como 0,05 kHz o mayor, como 0,1 kHz o mayor, como 0,5 kHz o mayor, como 1 kHz o mayor, como 2,5 kHz o mayor, como 5 kHz o mayor, como 10 kHz o mayor, como 25 kHz o mayor, como 50 kHz o mayor e incluyendo 100 kHz o mayor. En estas realizaciones, la luz estroboscópica puede acoplarse operativamente a un procesador que tiene un generador de frecuencia que regula la frecuencia estroboscópica. En algunas realizaciones, el generador de frecuencia está acoplado al generador de impulso de gotitas de tal manera que la luz estroboscópica se sincroniza con la generación de gotitas. En otros casos, el generador de frecuencia de la luz estroboscópica está acoplado operativamente a uno o más sensores ópticos de tal manera que la frecuencia de la luz estroboscópica se sincroniza con la frecuencia de captura de imágenes. En ciertos casos, las fuentes de luz estroboscópica y los controladores de frecuencia adecuados incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 5.700.692 y 6.372.506. Las fuentes de luz estroboscópica y pulsada también se describen en Sorenson, et al. Citometría, vol. 14, N° 2, páginas 115-22 (1993); Wheeles, et al. Histochemistry and Cytochemistry, vol. 24, N° 1, páginas 265-268 (1976).

Ejemplo de introducción

Después de alinear una matriz de micropocillos de alineación, las gotitas de muestra pueden introducirse en una matriz de micropocillos, por ejemplo, una matriz de micropocillos de muestra. En algunas realizaciones, pueden introducirse una pluralidad de gotitas de muestra en una matriz de micropocillos de muestra. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una gotita de muestra en un micropocillo de una matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro y el segundo parámetro. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de gotitas de muestra en micropocillos de la matriz de micropocillos de muestra en base al primer parámetro y el segundo parámetro. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una pluralidad de gotitas de muestra en micropocillos de la matriz de micropocillos de muestra en base a los parámetros (parámetro_{x,m}; parámetro_{y,m}) de la m^{ésima} gotita de alineación para producir la matriz de micropocillos de muestra. El contenido de las gotitas de muestra puede variar. En algunas realizaciones, las gotitas de muestra pueden comprender células, partículas sintéticas y cualquier combinación de las mismas.

Tipos de células

Los tipos de células que pueden depositarse mediante los métodos, composiciones y sistemas divulgados en la presente para producir matrices de alta densidad pueden variar. En algunas realizaciones, las células son células bacterianas, que pueden ser células de bacterias grampositivas o gramnegativas. Los ejemplos de bacterias que se pueden analizar utilizando los métodos, dispositivos y sistemas divulgados incluyen, pero no se limitan a, *Actinomeduræ*, *Actinomyces israelii*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epiderm*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae* y similares. Las bacterias gramnegativas incluyen pero no se limitan a, *Afpia felis*, *Bacteriodes*, *Bartonella bacilliformis*, *Bortadella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia recurrentis*, *Brucella*, *Calymmatobacterium granulomatis*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Gardnerella vaginalis*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus influenzae*, *Heliobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Neisseria meningitidis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Providencia sturti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y similares. Otras bacterias pueden incluir *Myobacterium avium*, *Myobacterium leprae*, *Myobacterium tuberculosis*, *Bartonella henseiae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia tsutsugamushi*, *Rickettsia typhi*, *Ureaplasma urealyticum*, *Diplococcus pneumoniae*, *Ehrlichia chafensis*, *Enterococcus faecium*, *Meningococci* y similares.

En algunas realizaciones, las células son hongos. Los ejemplos no limitativos de hongos que pueden analizarse usando los métodos, dispositivos y sistemas divulgados incluyen, pero no se limitan a, *Aspergilli*, *Candidae*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococci* y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, las células son protozoos u otros parásitos. Los ejemplos de parásitos a analizar usando los métodos, dispositivos y sistemas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, *Balantidium coli*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayatanensis*, *Encephalitozoa*, *Entamoeba histolytica*, *Enterocytozoon bienuesi*, *Giardia lamblia*, *Leishmaniae*, *Plasmodii*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosomae*, ameba trapezoidal, gusanos (por ejemplo, helmintos), particularmente gusanos parásitos que incluyen, pero no se limitan a, *Nematoda* (ascárides, por ejemplo, tricocéfalos, anquilostomas, oxiuros, ascáridos, filaridas y similares), *Cestoda* (por ejemplo, tenias).

5 Como se usa en la presente, el término "célula" puede referirse a una o más células. En algunas realizaciones, las células son células normales, por ejemplo, células humanas en diferentes etapas de desarrollo, o células humanas de diferentes órganos o tipos de tejidos (por ejemplo, glóbulos blancos, glóbulos rojos, plaquetas, células epiteliales, células endoteliales, neuronas, células gliales, fibroblastos, células del músculo esquelético, células del músculo liso, gametos o células del corazón, pulmones, cerebro, hígado, riñón, bazo, páncreas, timo, vejiga, estómago, colon, intestino delgado). En algunas realizaciones, las células pueden ser células madre humanas no diferenciadas o células madre humanas que se han inducido para que se diferencien. En algunas realizaciones, las células pueden ser células humanas fetales, por ejemplo, células humanas fetales obtenidas de una madre embarazada del feto. En algunas realizaciones, las células pueden ser células raras. Una célula rara puede ser, por ejemplo, una célula tumoral circulante (CTC), célula epitelial circulante, célula endotelial circulante, célula endometrial circulante, célula madre circulante, célula madre, célula madre indiferenciada, célula madre cancerosa, célula de médula ósea, célula progenitora, célula espumosa, célula mesenquimatosas, trofoblasto, célula del sistema inmunitario (huésped o injerto), fragmento celular, orgánulo celular (por ejemplo, mitocondrias o núcleos), célula infectada por patógenos y similares.

10 En algunas realizaciones, las células son células no humanas, por ejemplo, otros tipos de células de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, cerdo, perro, vaca o caballo). En algunas realizaciones, las células son otros tipos de células de animales o vegetales. En otras realizaciones, las células pueden ser cualquier célula procarionota o eucariota.

15 En algunas realizaciones, se obtiene una primera muestra celular de una persona que no padece una enfermedad o afección, y se obtiene una segunda muestra celular de una persona que padece la enfermedad o afección. En algunas realizaciones, las personas son diferentes. En algunas realizaciones, las personas son las mismas pero las muestras celulares se toman en diferentes momentos. En algunas realizaciones, las personas son pacientes y las muestras celulares son muestras de pacientes. La enfermedad o afección puede ser un cáncer, una infección bacteriana, una infección viral, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad fúngica, una enfermedad parasitaria, un trastorno genético o cualquier combinación de los mismos.

20 En algunas realizaciones, las células adecuadas para su uso en los métodos actualmente divulgados pueden variar en tamaño desde aproximadamente 2 micrómetros hasta aproximadamente 100 micrómetros de diámetro. En algunas realizaciones, las células pueden tener diámetros de aproximadamente 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualquiera de estos valores. En algunas realizaciones, las células pueden tener diámetros de por lo menos, o como máximo, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 micrómetros. En algunas realizaciones, las células tienen diámetros de aproximadamente 10 micrómetros.

25 En algunas realizaciones, las células se clasifican antes de asociar una célula con una perla. Por ejemplo, las células pueden clasificarse mediante clasificación celular activada por fluorescencia o clasificación celular activada magnéticamente, o más generalmente mediante citometría de flujo. Las células pueden filtrarse por tamaño. En algunas realizaciones, un retenido contiene las células que se van a asociar con la perla. En algunas realizaciones, el flujo contiene las células que se van a asociar con la perla.

30 Una muestra puede referirse a una pluralidad de células. La muestra puede referirse a una monocapa de células. La muestra puede referirse a una sección delgada (por ejemplo, sección delgada de tejido). La muestra puede referirse a una colección sólida o semisólida de células que pueden colocarse en una dimensión en una matriz.

50 Realineamiento

Después de alinear una matriz de micropocillos de alineación y antes de introducir gotitas de muestra en una matriz de micropocillos, por ejemplo, una matriz de micropocillos de muestra, los métodos pueden comprender introducir gotitas de alineación adicionales en una matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, la segunda matriz de micropocillos de alineación. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender introducir una gotita de alineación, por ejemplo, una segunda gotita de alineación, en un micropocillo de una matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, una segunda matriz de micropocillos de alineación, antes de introducir una o más gotitas de muestra en los micropocillos de la matriz de muestra.

55 En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender determinar la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación, usando el primer sensor de imagenología. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender determinar la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación usando el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender determinar la localización de la gotita de alineación en la matriz de micropocillos de alineación usando el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología. En algunas realizaciones, la

introducción de las gotitas de muestra en los micropocillos de la matriz de micropocillos de muestra puede basarse además en la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de alineación.

Sistemas

5

En la presente se divulgan sistemas para producir matrices, por ejemplo, una matriz celular, una matriz de partículas sintéticas o una matriz de reactivos. En algunas realizaciones, los sistemas pueden comprender: un componente de clasificación celular configurado para: introducir gotitas mediante citometría de flujo en micropocillos de una matriz de micropocillos para producir una matriz celular. En algunas realizaciones, la matriz de micropocillos puede comprender 77,5 o más micropocillos por cm^2 (500 o más micropocillos por pulgada²). En algunas realizaciones, determinar el primer parámetro y el segundo parámetro puede comprender depositar por citometría de flujo una gotita de alineación, por ejemplo, una primera gotita de alineación, en un micropocillo de una matriz de micropocillos de alineación, por ejemplo, una primera matriz de micropocillos de alineación. En algunas realizaciones, el sistema puede comprender la matriz de micropocillos, en donde la matriz de micropocillos puede estar en una relación de recepción de gotitas con el componente de clasificación celular.

10

15

20

25

En algunas realizaciones, los sistemas pueden comprender un componente de control, por ejemplo, el controlador de alineación 418 configurado para: recibir una localización deseada en una dirección x y una dirección y en la matriz de micropocillos; y determinar un primer parámetro usando un primer sensor de imagenología y un segundo parámetro usando un segundo sensor de imagenología para introducir la gotita en un micropocillo de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí. En algunas realizaciones, uno o ambos del primer sensor de imagenología y del segundo sensor de imagenología, pueden estar entre un recipiente de recepción de residuos y la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, la distancia entre la localización de la gotita y la localización deseada puede estar dentro de un umbral, por ejemplo, un umbral predeterminado.

30

En algunas realizaciones, el componente de control puede configurarse además para introducir una pluralidad de células y/o partículas sintéticas en micropocillos de la matriz de micropocillos en base al primer parámetro y al segundo parámetro.

35

En algunas realizaciones, el componente de control puede configurarse además para: antes de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos, introducir una segunda gotita de alineación en un micropocillo de una segunda matriz de micropocillos de alineación; y determinar la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación, en donde introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz celular puede basarse además en la localización de la segunda gotita de alineación en la segunda matriz de micropocillos de alineación.

40

En algunas realizaciones, el sistema puede comprender un procesador, por ejemplo, el procesador 602 que se muestra en la FIG. 6, en donde el procesador puede comprender una memoria, por ejemplo, la memoria 604, acoplada operativamente al procesador, en donde la memoria puede incluir instrucciones almacenadas en la misma. En algunas realizaciones, el procesador puede configurarse para: recibir la localización deseada en la dirección x y la dirección y en la matriz de micropocillos; y determinar el primer parámetro usando el primer sensor de imagenología y el segundo parámetro usando el segundo sensor de imagenología para introducir la gotita en el micropocillo de la matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí. En algunas realizaciones, uno o ambos del primer sensor de imagenología y del segundo sensor de imagenología, pueden estar entre un recipiente de recepción de residuos, por ejemplo, el recipiente de recepción de residuos 338b, y la matriz de micropocillos, por ejemplo, la matriz de micropocillos 338a. En algunas realizaciones, la localización de la gotita y la localización deseada pueden estar dentro de un umbral, por ejemplo, un umbral predeterminado.

50

55

En algunas realizaciones, el sistema puede comprender un procesador, en donde el procesador puede comprender una memoria acoplada operativamente al procesador, en donde la memoria puede incluir instrucciones almacenadas en la misma, en donde las instrucciones, cuando son ejecutadas por el procesador, pueden configurar el procesador para: recibir la localización deseada en la dirección x y la dirección y en la matriz de micropocillos; y determinar el primer parámetro usando el primer sensor de imagenología y el segundo parámetro usando el segundo sensor de imagenología para introducir la gotita en el micropocillo de la matriz de micropocillos, en donde el primer sensor de imagenología y el segundo sensor de imagenología pueden ser aproximadamente ortogonales entre sí y pueden estar entre un recipiente de recepción de residuos y la matriz de micropocillos, y en donde la localización de la gotita y la localización deseada pueden estar dentro de un umbral predeterminado.

60

EJEMPLOS

Algunos aspectos de las realizaciones analizadas anteriormente se divulgan con mayor detalle en los siguientes ejemplos, que de ninguna manera se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación.

65

Ejemplo 1Matriz de micropocillos de alta densidad

5 Este ejemplo demuestra la producción de una matriz de gotitas de alta densidad.

10 Usando un clasificador de células FACSJazz™ de BD (Franklin Lakes, NJ) modificado, se depositaron 4000 células individuales en un portaobjetos de micropocillos de 2,54 cm (1 pulgada) por 7,62 cm (3 pulgadas) como se muestra en las FIGS. 7A-7B. Los micropocillos en el portaobjetos de micropocillos tenían diámetros de 400 micrómetros. Los micropocillos en el portaobjetos de micropocillos tenían una distancia de centro a centro de 480 micrómetros, o una distancia de borde a borde de 80 micrómetros. La ocupación de los micropocillos en el portaobjetos de micropocillos se ajustó a aproximadamente el 50%.

15 En conjunto, estos datos indican que pueden crearse matrices de gotitas de alta densidad usando un citómetro de flujo.

Ejemplo 2Alineación de una matriz de micropocillos

20 Este ejemplo describe la alineación de una matriz de micropocillos para que las muestras puedan recogerse en el centro de cada micropocillo de una matriz de micropocillos.

25 Se proporciona un citómetro de flujo con una plataforma. La plataforma puede contener una matriz de micropocillos. La plataforma puede moverse en una dirección x y en una dirección y. El eje x y el eje y están alineados de manera independiente. Se escribe un script en un lenguaje de programación como Python. El script incluye pasos para alinear primero una primera matriz de micropocillos en la planta de fabricación y posteriormente alinear una segunda matriz de micropocillos en el sitio del cliente.

30 El eje x está en la dirección de desviación de las gotitas cargadas negativamente creadas por el citómetro de flujo. La desviación está provocada por un campo de desviación creado por las placas deflectoras del citómetro de flujo. Se define el borde del colector de corriente principal, también conocido como drenaje o recipiente de recepción de residuos. Una cámara de deflexión posterior toma imágenes de la corriente desviada a medida que se aleja de la corriente principal aumentando la carga de caída, hasta que la corriente desviada pasa el borde del drenaje por una distancia como un umbral predeterminado. Esta posición se guarda en un archivo como la coordenada x del flujo desviado dorado para su uso posterior en el sitio del cliente.

35 El micropocillo A1 en la matriz de micropocillos se alinea de tal manera que la corriente desviada se recoja en el centro del micropocillo A1. Este proceso se repite para diferentes tipos de matrices de micropocillos y la coordenada x de la plataforma se guarda para cada tipo de matriz de micropocillos como una coordenada x de la plataforma. En el sitio del cliente, cada vez que se inicia una clasificación, la corriente desviada se envía a la coordenada x de corriente desviada dorada guardada, y la plataforma se envía a la coordenada x de plataforma guardada para depositar muestras en el centro de cada micropocillo de una matriz de micropocillos.

45 El eje y es perpendicular a la dirección de desviación. Para la alineación en la dirección y, una cámara lateral guarda una imagen de la corriente y se guarda la coordenada y de la corriente. En la planta de fabricación, para cada tipo de matriz de micropocillos, la estructura se mueve hasta que las gotitas de alineación se recogen en el centro del micropocillo A1 de una matriz de micropocillos en la dirección y la coordenada y de la plataforma se guarda como la coordenada y de la plataforma del micropocillo A1 para cada tipo de matriz de micropocillos. En el sitio del usuario, cada vez que comienza una clasificación, la cámara lateral mide la posición de la corriente desviada en el eje y y se calcula el desplazamiento desde la coordenada y de la plataforma guardada, por ejemplo, en micrometros. Este valor se usa para mover la plataforma desde la coordenada y de la plataforma guardada originalmente del micropocillo A1 para recoger muestras en el centro de cada micropocillo de una matriz de micropocillos en la dirección y. Por tanto, el proceso de alineación compensa cualquier desplazamiento de la corriente, incluido el reemplazo de la boquilla, alineando la matriz de micropocillos al comienzo de cada clasificación en el sitio del usuario.

Ejemplo 3Alineación de la corriente de fluido

60 Este ejemplo demuestra cómo alinear las corrientes de fluido para que las muestras puedan recogerse en el centro de cada micropocillo de una matriz de micropocillos.

65 En las siguientes figuras, cada canal se calibró a un tubo (cada pareja de barras paralelas corresponde a

una corriente de fluido que cae en un tubo). La FIG. 8 muestra una fotografía ejemplar no limitativa sin una corriente. La FIG. 9 muestra una fotografía ejemplar no limitativa con una corriente en el medio (a la izquierda - idealmente debería estar en el centro). La corriente del medio correspondía a una corriente no desviada (por ejemplo, una corriente que se recogería en el recipiente de residuos). La FIG. 10 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista de una configuración de dos canales. Los dos canales correspondían a dos corrientes que se estaban recogiendo. La FIG. 11 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista (clasificación de placas) de una Unidad de Depósito de Células Automatizada (ACDU). La FIG. 12 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista de configuración de cuatro canales.

La FIG. 13 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de una vista durante la calibración. Después de establecer un voltaje de desviación, se realizó una clasificación de prueba. Los puntos con líneas verticales son corrientes desviadas que no estaban en un canal. La FIG. 14 muestra una fotografía ejemplar no limitativa del ajuste de las corrientes en movimiento que se muestran en la FIG. 13 en el canal. La FIG. 15 muestra una fotografía ejemplar no limitativa que muestra que después de que un usuario insertase una boquilla diferente, la corriente se movió hacia la derecha y las corrientes desviadas también se desplazaron hacia la derecha. La FIG. 16 muestra una fotografía ejemplar no limitativa de la disposición en la FIG. 15 con el voltaje de desviación ajustado para devolver las corrientes desviadas al canal preferido.

En conjunto, los datos indican que pueden alinearse múltiples canales a múltiples canales ajustando los parámetros de las corrientes.

Ejemplo 4

Calibración de una corriente de clasificación de citómetros para colocar con precisión las gotitas en los destinos de las placas de recogida

Este ejemplo describe la calibración de una corriente de clasificación de citómetro usando una placa de recogida para que las gotitas de las muestras puedan colocarse con precisión, por ejemplo, en micropocillos de placas de micropocillos.

Puede crearse un dispositivo de alineación (por ejemplo, una plantilla mecanizada de alta precisión) con una meta objetivo. Puede tener el mismo tamaño que los dispositivos de placa que normalmente caben en el instrumento. El objetivo tiene marcas de un milímetro hasta diez milímetros. Las FIGS. 17A-17B muestran la placa de calibración. Cuando esta se carga en el instrumento y se mueve a la localización de calibración, está lista para que el clasificador deposite una única gotita. El lugar donde se deposita la gotita puede ser inspeccionado por el usuario. Luego, esta localización se introduce en el software gráficamente.

La interfaz de software ayuda al usuario calculando automáticamente una calibración de desviación x/y . Después de depositar una gotita, el usuario puede localizar dónde se deposita la gotita. Luego, el usuario introduce la localización en el gráfico usando un puntero.

Las FIGS. 18A-18C muestran una interfaz de usuario no limitativa para calibrar una placa de micropocillos. La FIG. 18A ilustra que el software muestra una representación del objetivo de calibración. El círculo verde en el centro es el desplazamiento. Para cambiar el desplazamiento, el usuario hace clic en el círculo verde y lo arrastra a la localización en la que el usuario vio el depósito. La FIG. 18B muestra que el usuario ha movido el círculo a la localización donde se depositó la gotita. En este punto, el usuario hace clic en el botón "Mover a la localización de calibración". Esto calculará el desplazamiento requerido para que los motores paso a paso alineen la gotita en el centro. Después de hacer clic en el botón, el círculo de desplazamiento vuelve al centro, lo que indica que este es el nuevo. La FIG. 18C muestra que el cargador de placas está calibrado.

Los expertos en la técnica entenderán que, en general, se pretende que los términos usados en la presente, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, los cuerpos de las reivindicaciones adjuntas), se entiendan generalmente como términos "abiertos" (por ejemplo, el término "que incluye" debe interpretarse como "que incluye pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene por lo menos", el término "incluye" se debe interpretar como "incluye pero no se limita a", etc.). Los expertos en la técnica comprenderán además que si se pretende un número específico de una enumeración de reivindicación introducida, dicha intención se recitará explícitamente en la reivindicación y, en ausencia de dicha recitación, dicha intención no estará presente. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases introductorias "por lo menos uno" y "uno o más" para introducir recitaciones de reivindicaciones. Sin embargo, el uso de tales frases no debe interpretarse en el sentido de que la introducción de una recitación de reivindicación mediante los artículos indefinidos "un" o "uno" limita cualquier reivindicación particular que contenga dicha recitación de reivindicación introducida a las realizaciones que contengan solo una recitación de este tipo, incluso cuando la misma reivindicación incluye las frases introductorias "uno o más" o "por lo menos uno" y artículos indefinidos como "un" o "uno" (por ejemplo, debe interpretarse que "un" y/o "uno" significan "por lo menos uno" o "uno o más"); lo mismo se aplica al uso de artículos definidos usados para introducir

5 recitaciones de reivindicaciones. Además, incluso si se enumera explícitamente un número específico de una
recitación de reivindicación introducida, los expertos en la técnica reconocerán que debe interpretarse que tal
recitación significa por lo menos el número recitado (por ejemplo, la sola recitación de "dos recitaciones", sin otros
modificadores, significa por lo menos dos recitaciones, o dos o más recitaciones). Además, en aquellos casos en los
que se usa que una convención análoga a "por lo menos uno de A, B y C, etc.", en general, se pretende que dicha
construcción en el sentido en el que alguien con experiencia en la técnica entendería la convención (por ejemplo, "un
sistema que tiene por lo menos uno de A, B y C" incluiría, pero no se limitará a, sistemas que tengan A solo, B solo,
C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). En aquellos casos en los que se usa una
10 convención análoga a "por lo menos uno de A, B o C, etc.", en general, se pretende tal construcción en el sentido en
el que alguien con experiencia en la técnica entendería la convención (por ejemplo, "un sistema que tiene por lo
menos uno de A, B o C" incluirá pero no se limitará a sistemas que tengan A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C
juntos, B y C juntos y/o A, B y C juntos, etc.). Los expertos en la técnica comprenderán además que debe
entenderse que prácticamente cualquier palabra y/o frase disyuntiva que presente dos o más términos alternativos,
15 ya sea en la descripción, las reivindicaciones o los dibujos, contempla las posibilidades de incluir uno de los
términos, cualquiera de los términos, o ambos términos. Por ejemplo, se entenderá que la frase "A o B" incluye las
posibilidades de "A" o "B" o "A y B".

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una matriz celular, que comprende:

5 proporcionar una muestra que comprende una pluralidad de células; y
 introducir la pluralidad de células en la muestra en micropocillos de una matriz de micropocillos para producir la
 matriz celular, en donde introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos
 comprende depositar por citometría de flujo la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de
 micropocillos,
 10 **caracterizado porque:**

(a) el método comprende:

15 (i) alinear un componente de clasificación del citómetro de flujo con la matriz de micropocillos; y
 (ii) introducir un reactivo que comprende una o más partículas sintéticas unidas con una pluralidad de
 códigos de barras de oligonucleótidos en uno o más de los micropocillos: (A) de la matriz de micropocillos
 antes de introducir la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de micropocillos; o (B) de la
 matriz celular; y

20 (b) la matriz de micropocillos comprende 77,5 o más micropocillos por cm^2 (500 o más micropocillos por
 pulgada²) y el 50% o más de los micropocillos de la matriz celular comprenden una única célula.

2. El método de la reivindicación 1, en el que introducir la pluralidad de células de la muestra en los micropocillos de
 la matriz de micropocillos comprende introducir la pluralidad de células de la muestra en los micropocillos de la
 25 matriz de micropocillos en una pluralidad de primeras localizaciones deseadas, por ejemplo, en donde introducir la
 pluralidad de células en la muestra en los micropocillos de la matriz de micropocillos en la pluralidad de primeras
 localizaciones deseadas comprende introducir una célula de interés de la pluralidad de células en una de la
 pluralidad de primeras localizaciones deseadas; y opcionalmente en donde el método comprende además introducir
 una segunda pluralidad de células de interés en micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de
 30 segundas localizaciones deseadas.

3. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde:

35 (a) la matriz de micropocillos comprende 155 o más micropocillos por cm^2 (1000 o más micropocillos por
 pulgada²);

(b) cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un volumen de no más de 1000 nanolitros,
 por ejemplo en donde cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un volumen de no más de
 400 nanolitros;

40 (c) cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un diámetro de no más de 1000 micrómetros,
 por ejemplo en donde cada uno de los micropocillos de la matriz de micropocillos tiene un diámetro de no más de
 400 micrómetros; y/o

(d) por lo menos dos de los micropocillos de la matriz de micropocillos están separados entre sí por no más de
 200 micrómetros, por ejemplo en donde por lo menos dos de los micropocillos de la matriz de micropocillos están
 separados entre sí por no más de 80 micrómetros; o

45 (e) los micropocillos de la matriz de micropocillos tienen una distancia de centro a centro que varía de 1
 micrómetro a 1000 micrómetros.

4. El método de cualquier reivindicación anterior:

50 (a) en donde depositar por citometría de flujo la pluralidad de células en los micropocillos de la matriz de
 micropocillos comprende usar un citómetro de flujo para depositar una única célula a la vez en los micropocillos
 de la matriz de micropocillos; y/o

(b) en donde introducir comprende además clasificar por citometría de flujo las células de interés de las células
 que no son de interés en la muestra.

55 5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde introducir el reactivo comprende depositar el reactivo por
 citometría de flujo en los micropocillos.

60 6. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que una o más partículas sintéticas comprenden perlas.

7. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que los micropocillos que comprenden una única célula
 comprenden además una partícula sintética.

65 8. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además introducir:

- (a) una o más partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una pluralidad de segundas localizaciones deseadas; o
- (b) una partícula sintética de interés en los micropocillos de la matriz de micropocillos en una de una pluralidad de segundas localizaciones deseadas.

5 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que introducir una o más partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos comprende depositar por citometría de flujo una o más partículas sintéticas en los micropocillos de la matriz de micropocillos o la matriz celular.

10 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una o más partículas sintéticas comprenden perlas magnéticas unidas con códigos de barras de oligonucleótidos.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que introducir una o más partículas sintéticas comprende:

- (a) usar un citómetro de flujo para depositar una única partícula sintética a la vez en los micropocillos de la matriz de micropocillos; y/o
- (b) clasificar por citometría de flujo las partículas sintéticas de interés de las partículas sintéticas que no son de interés en una muestra de partículas sintéticas.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la una o más partículas sintéticas comprenden una primera pluralidad de partículas sintéticas que comprenden un primer reactivo y una segunda pluralidad de partículas sintéticas que comprenden un segundo reactivo.

13. Una matriz celular, que comprende:
una matriz de micropocillos (102) que comprende 77,5 o más micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) por cm² (500 o más micropocillos por pulgada²), **caracterizado porque** el 50% o más de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) comprenden una única célula y una partícula sintética, en donde la partícula sintética comprende una perla unida con una pluralidad de códigos de barras de oligonucleótidos.

14. La matriz celular de la reivindicación 13, en donde:

- (a) la matriz de micropocillos (102) comprende 155 o más micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) por cm² (1000 o más micropocillos por pulgada²);
- (b) cada uno de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) tiene un volumen de no más de 1000 nanolitros, por ejemplo en donde cada uno de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) tiene un volumen de no más de 400 nanolitros;
- (c) cada uno de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) tiene un diámetro (112) de no más de 1000 micrómetros, por ejemplo en donde cada uno de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) tiene un diámetro (112) de no más de 400 micrómetros;
- (d) por lo menos dos de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) están separados entre sí (114) por no más de 200 micrómetros, por ejemplo en donde por lo menos dos de los micropocillos (104a-d, 105a-d, 106a-d) de la matriz de micropocillos (102) están separados entre sí (114) por no más de 80 micrómetros.

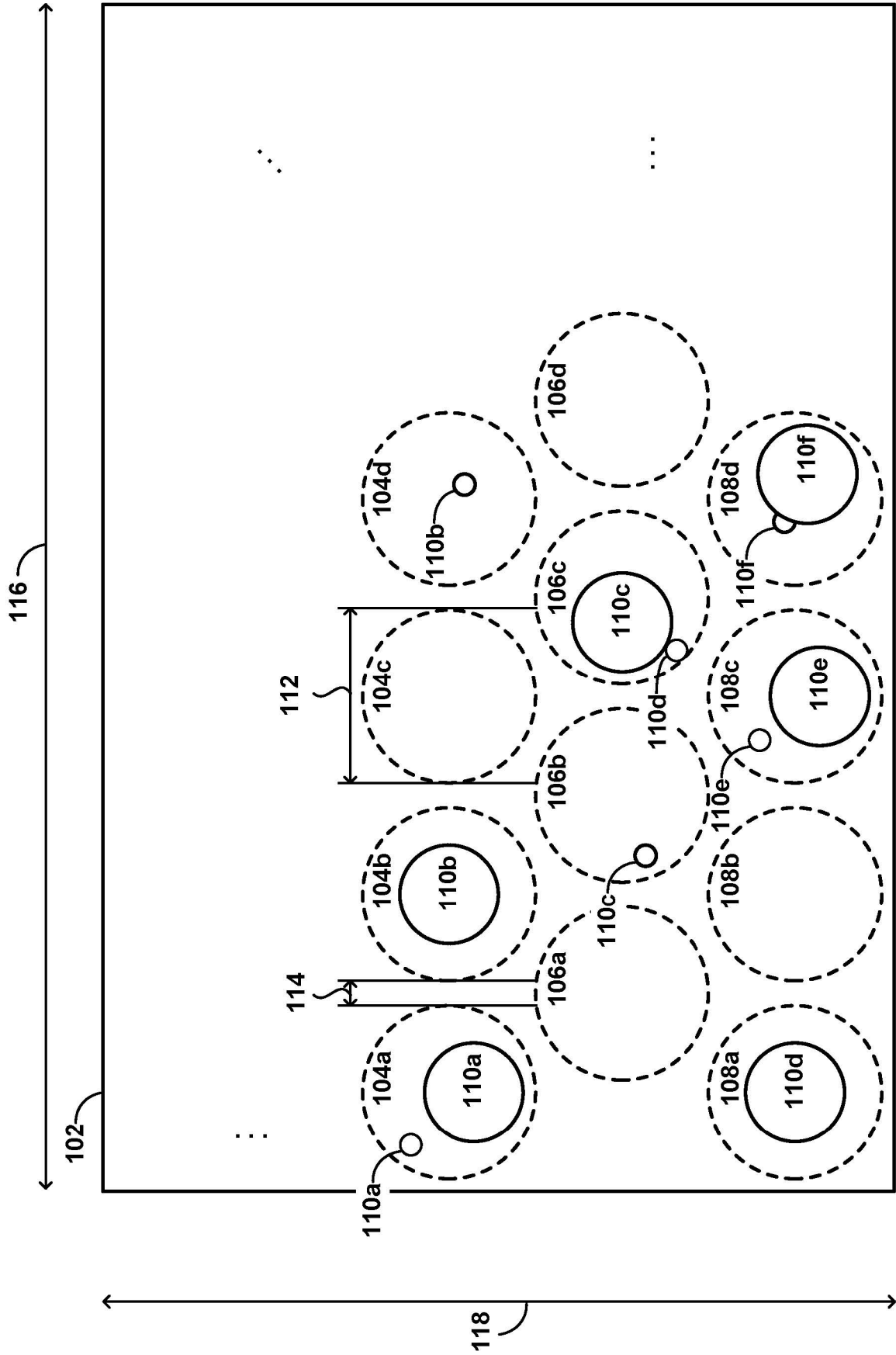


FIG. 1

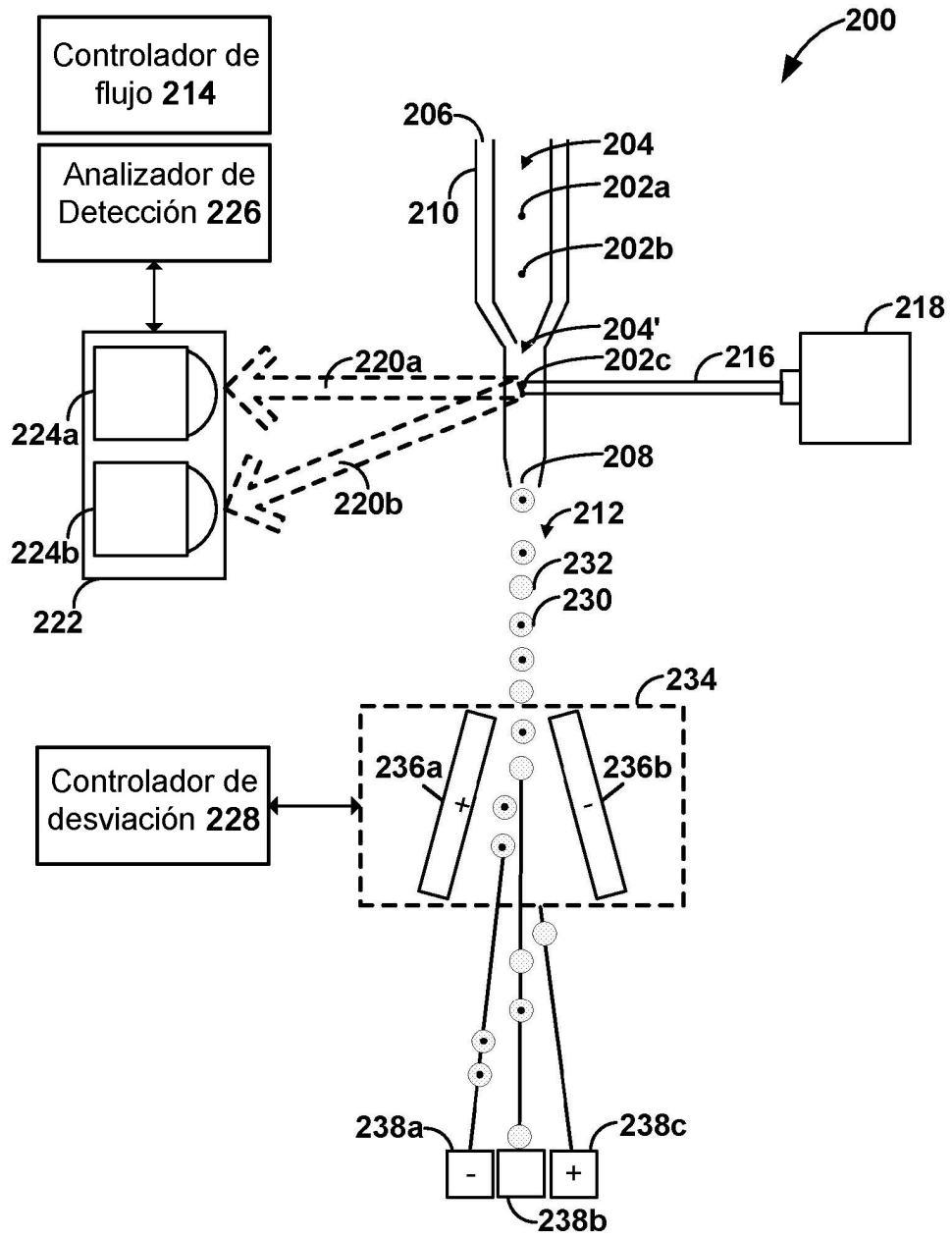


FIG. 2

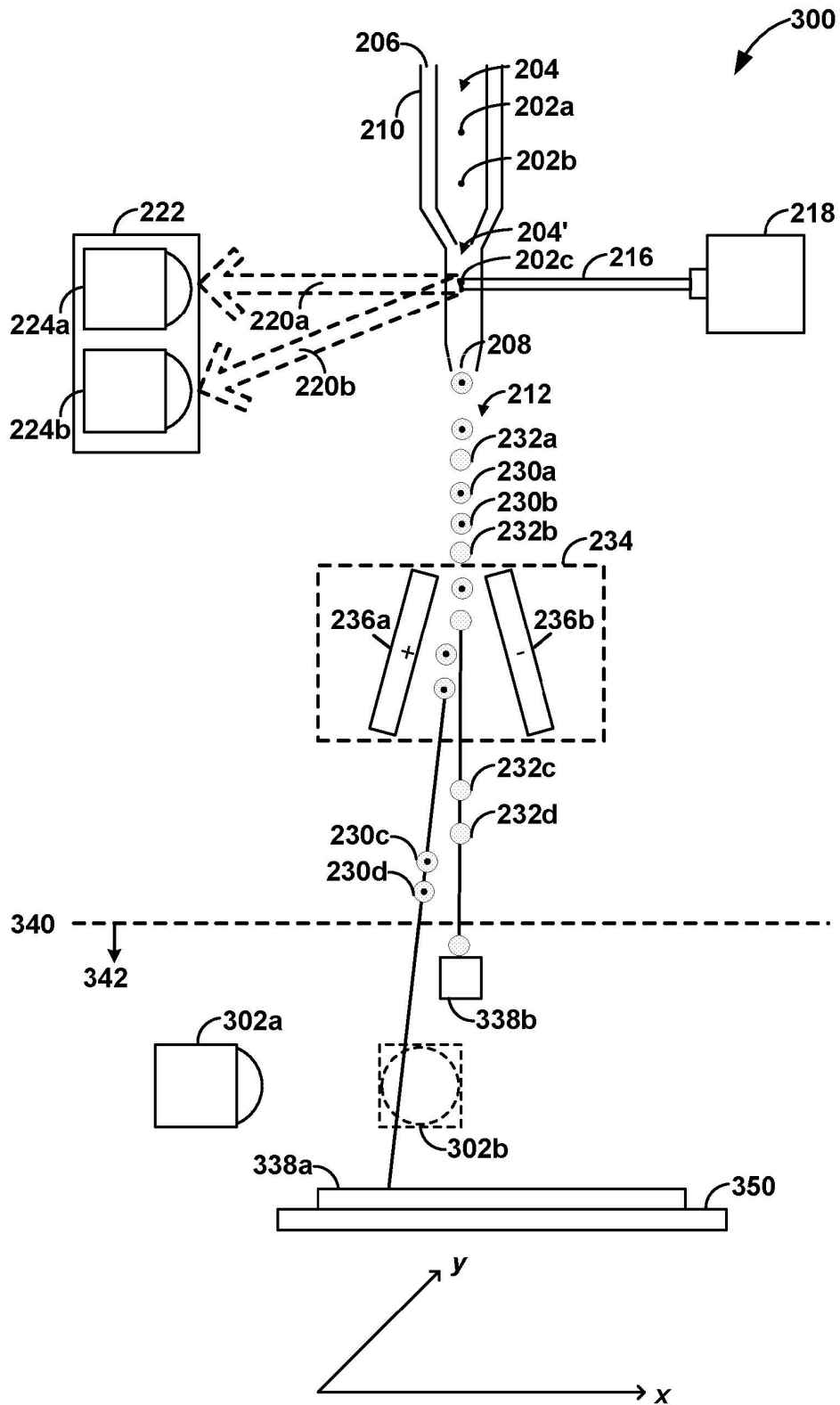


FIG. 3A

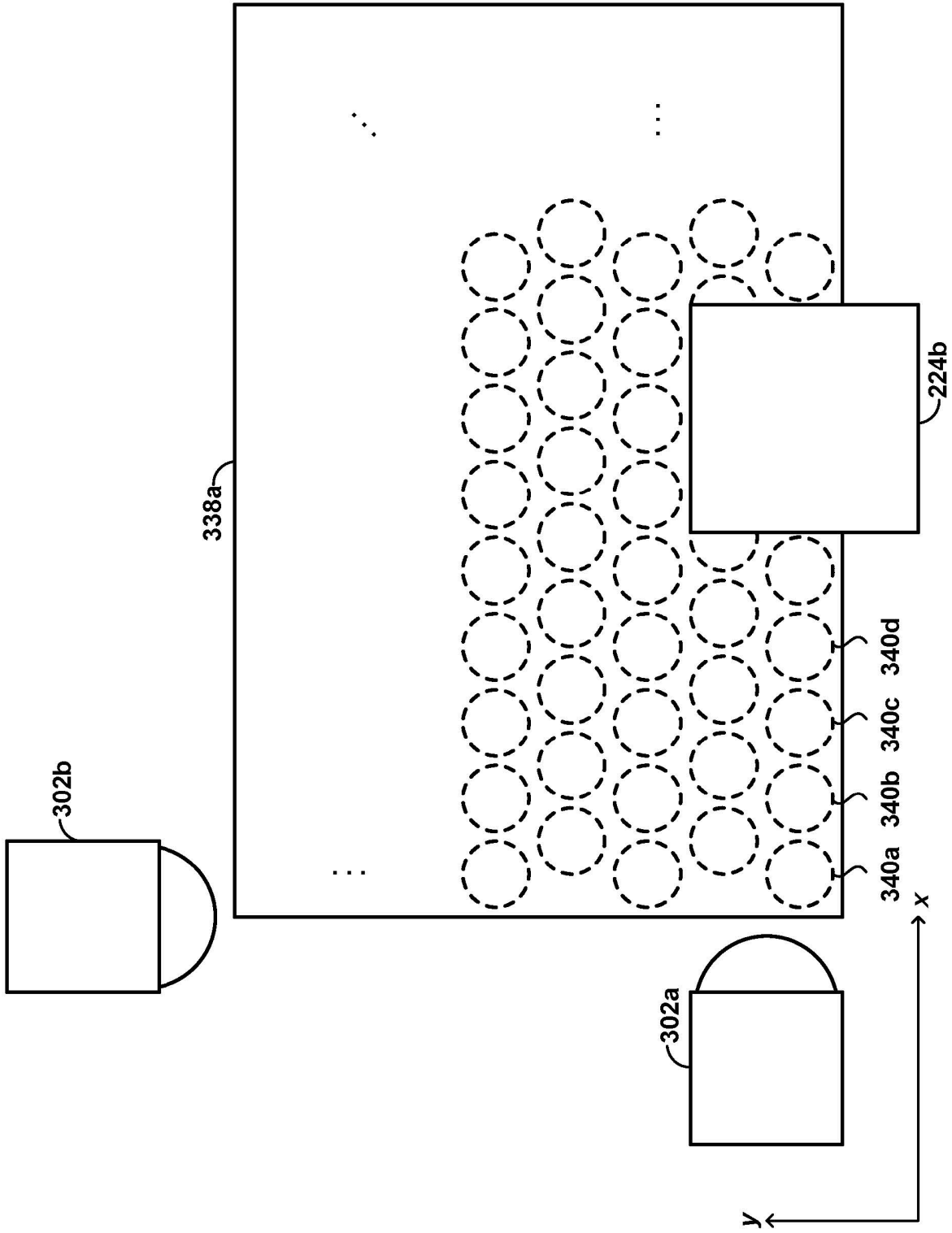


FIG. 3B

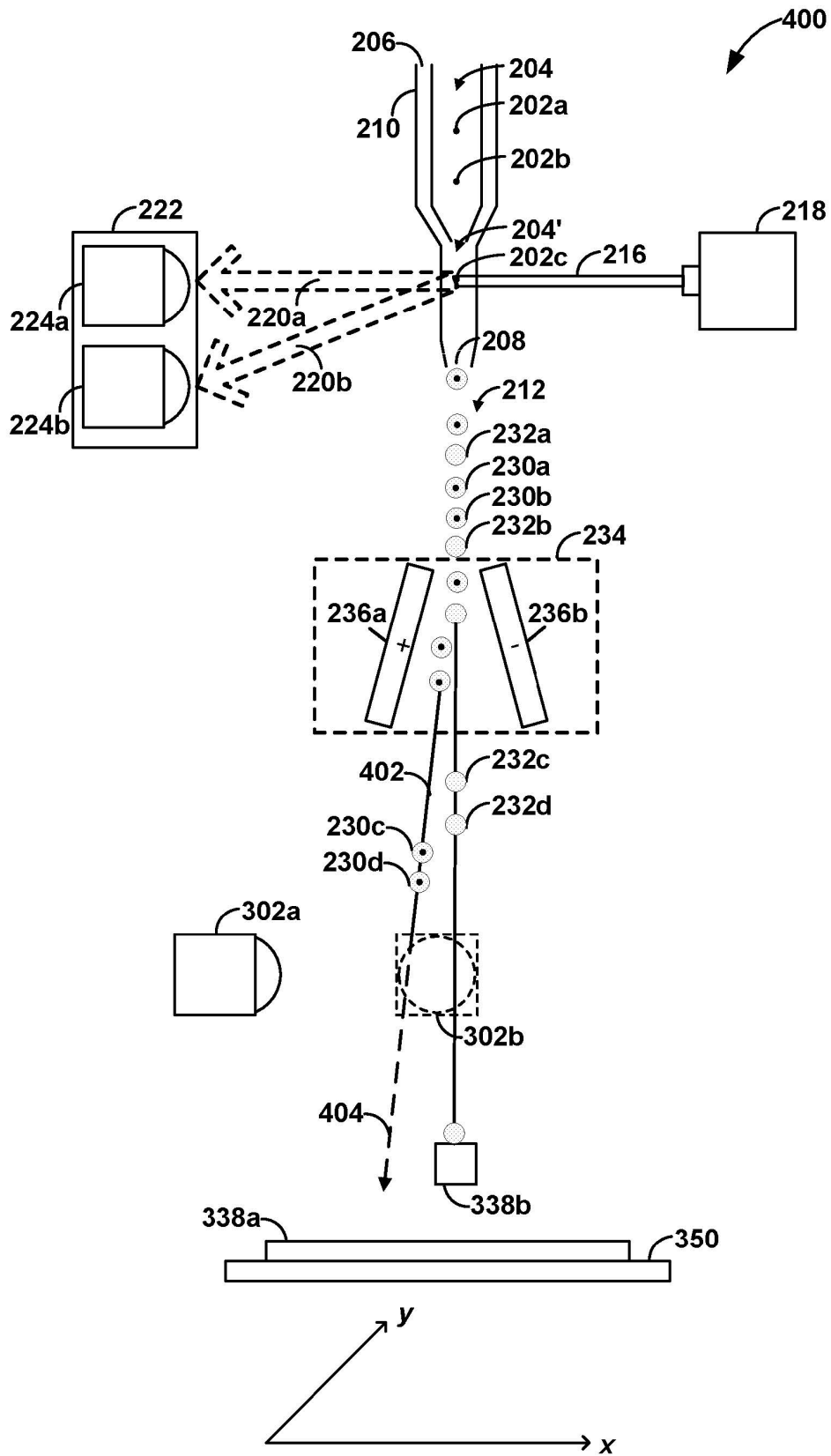


FIG. 4A

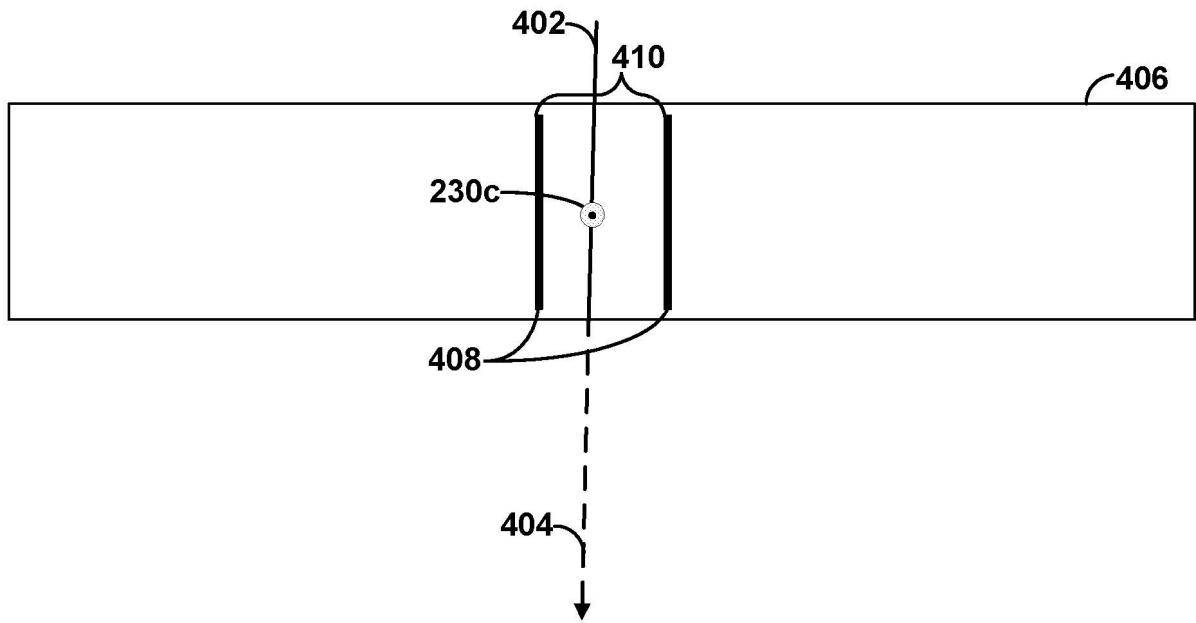


FIG. 4B

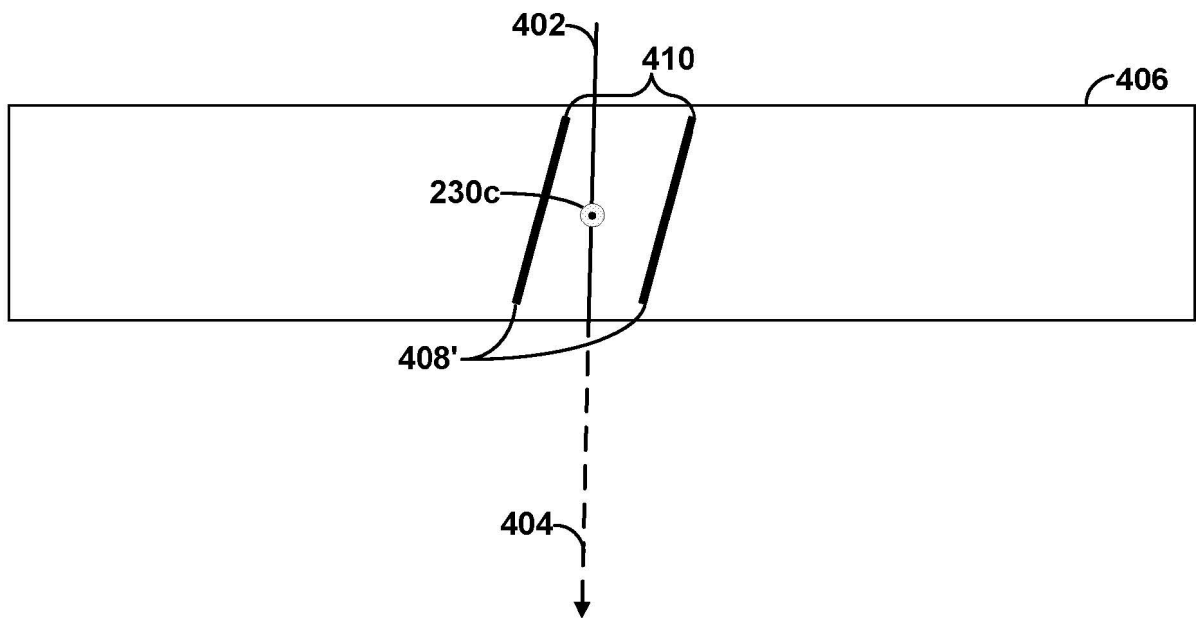


FIG. 4C

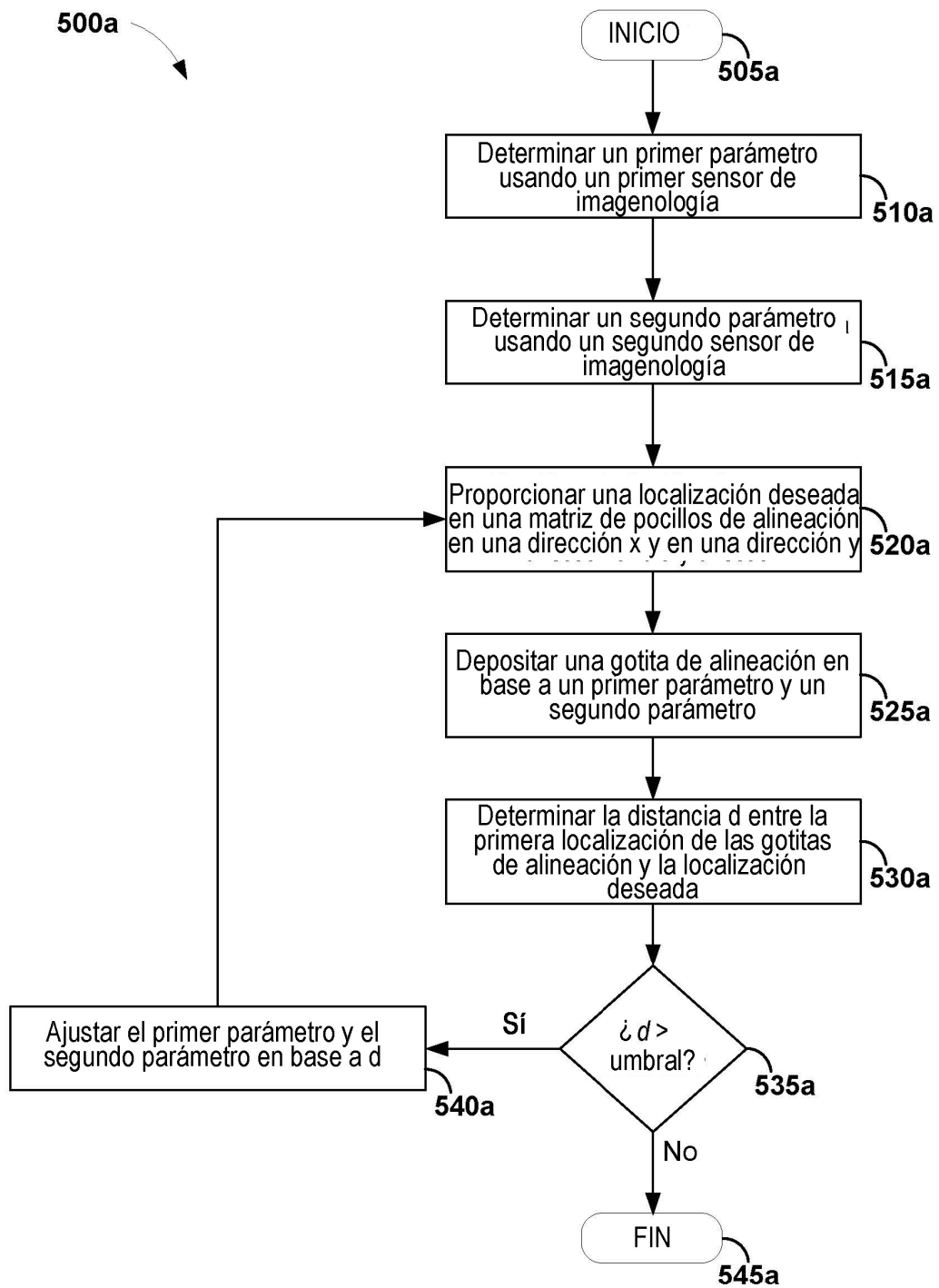


FIG. 5A

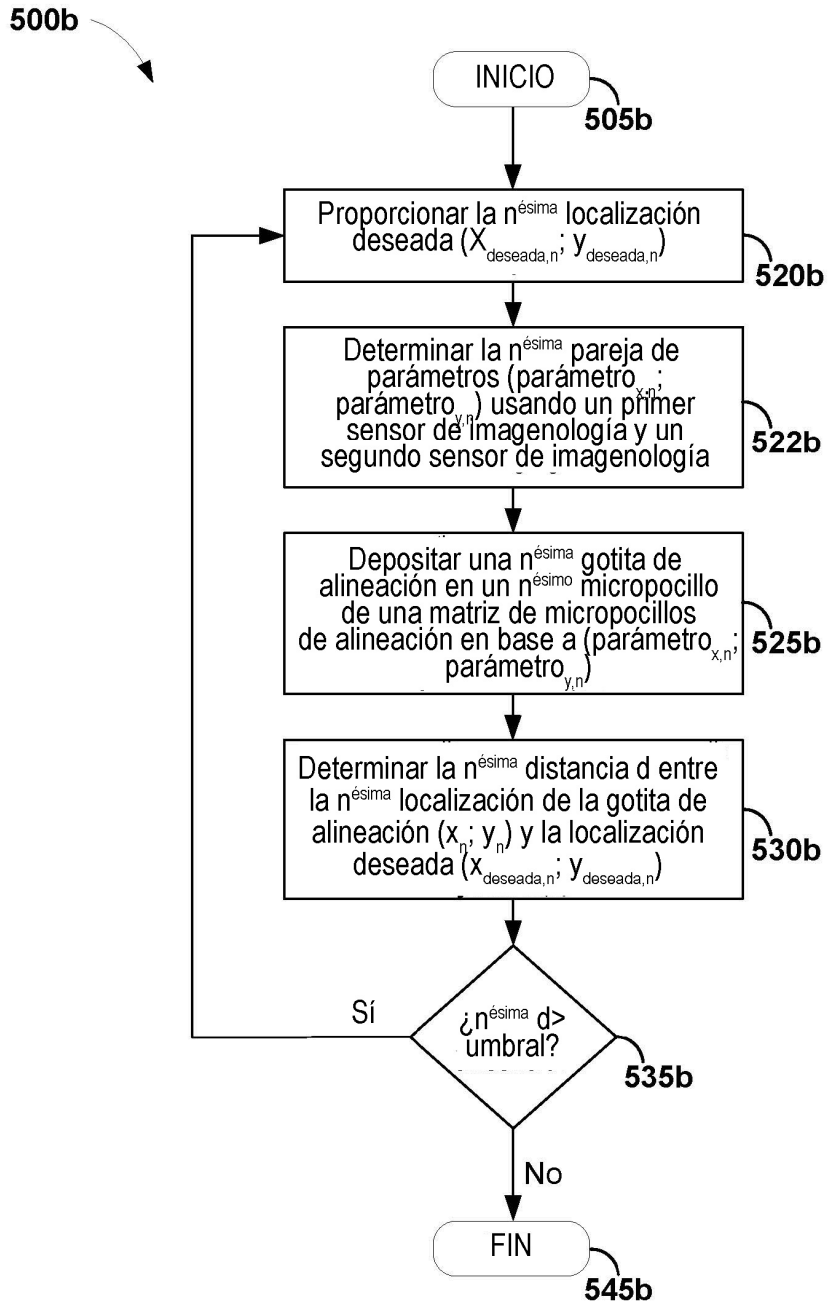


FIG. 5B

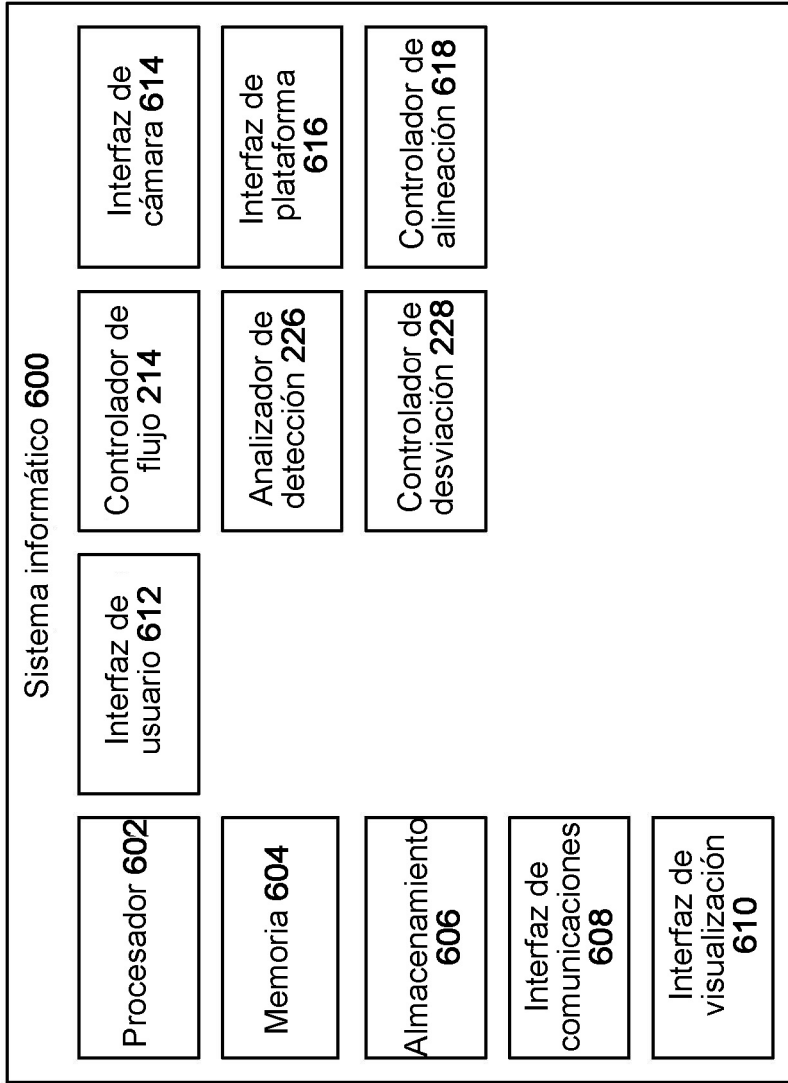


FIG. 6

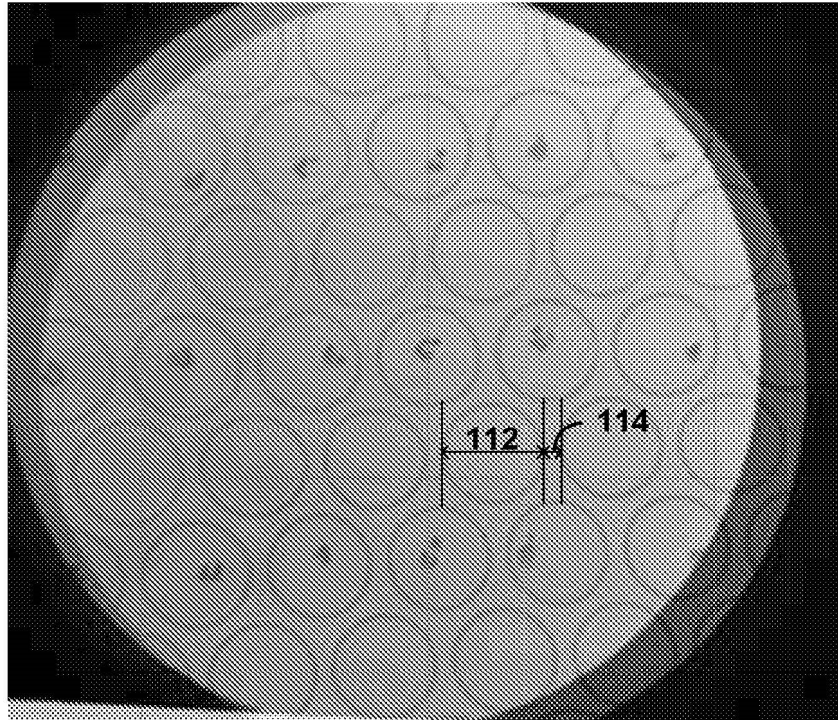


FIG. 7A

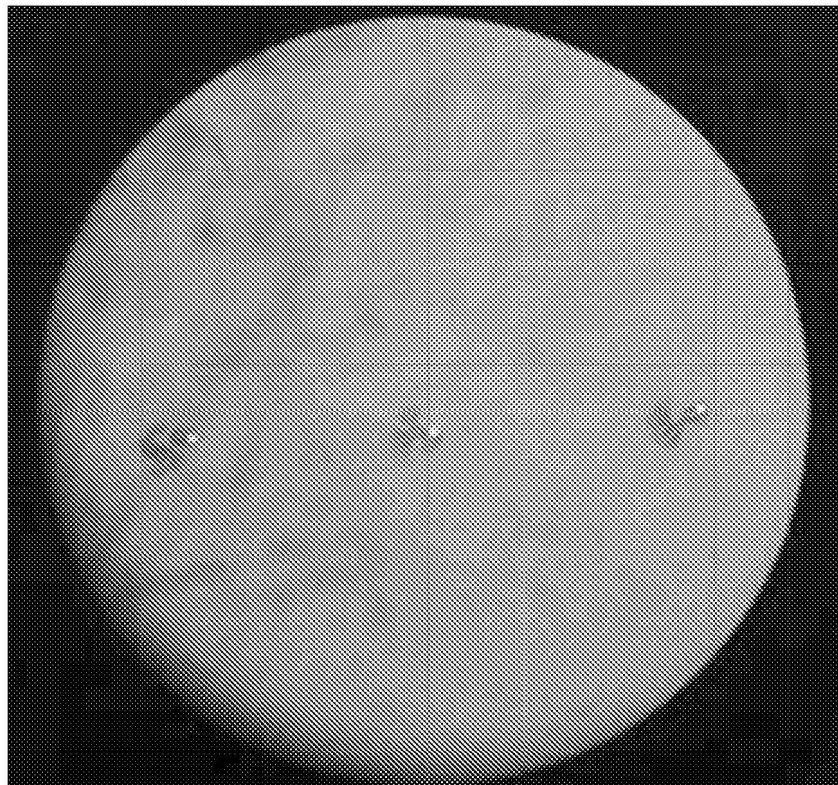


FIG. 7B

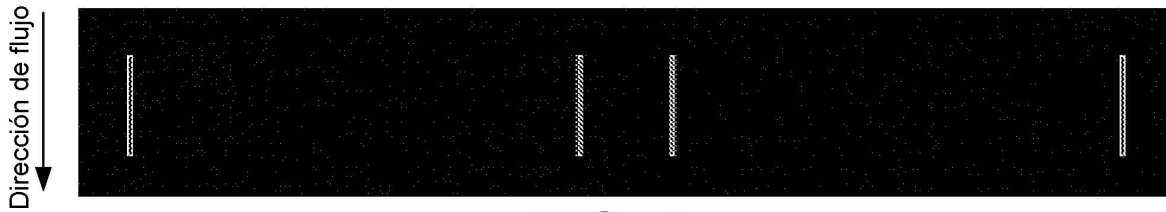


FIG. 8

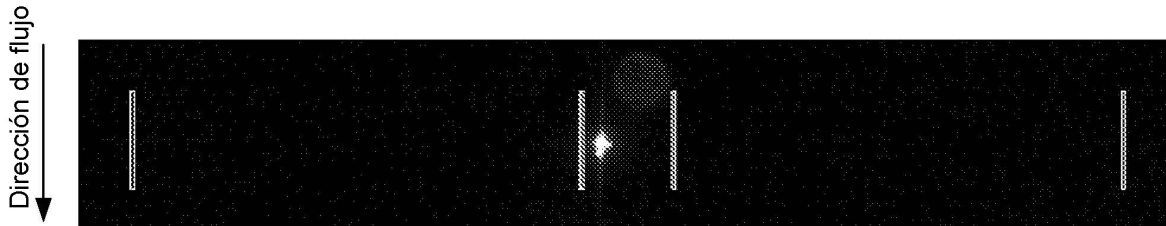


FIG. 9

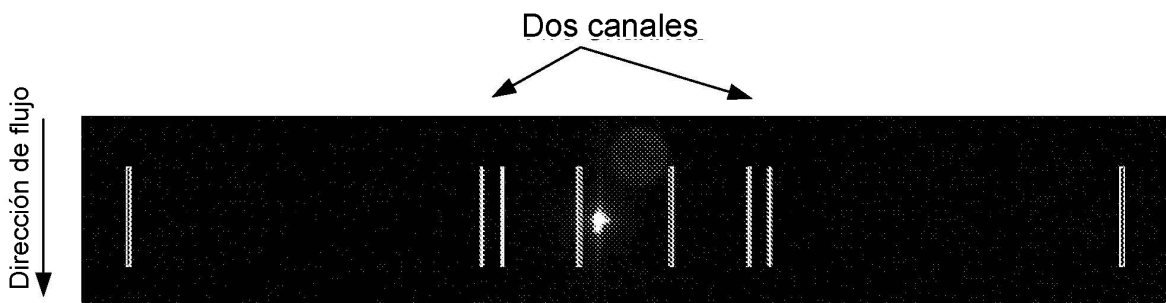


FIG. 10

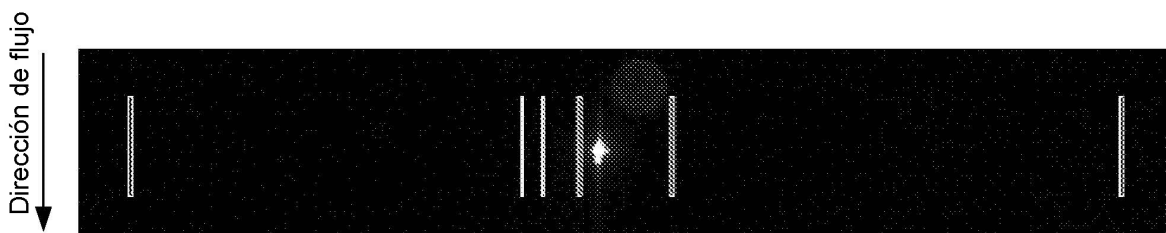


FIG. 11

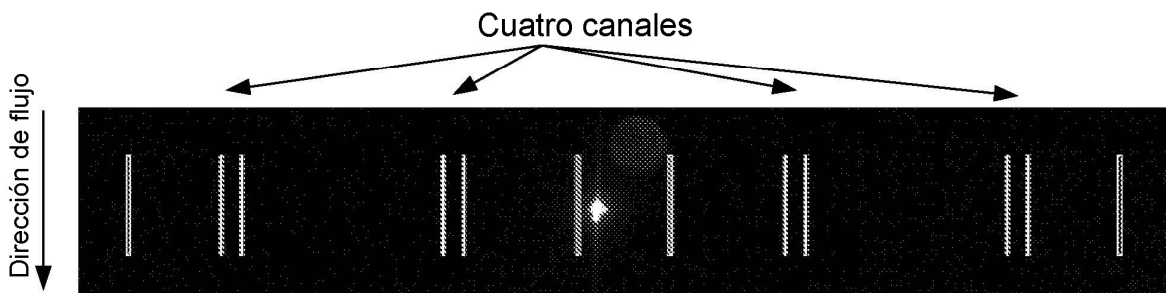


FIG. 12

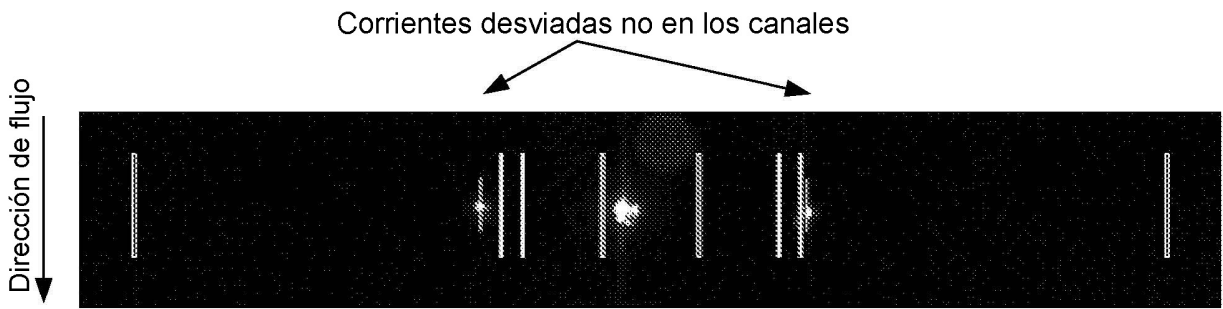


FIG. 13

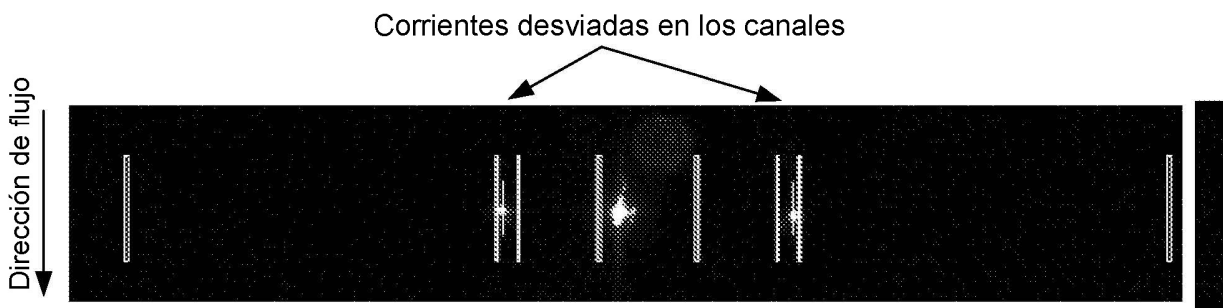


FIG. 14

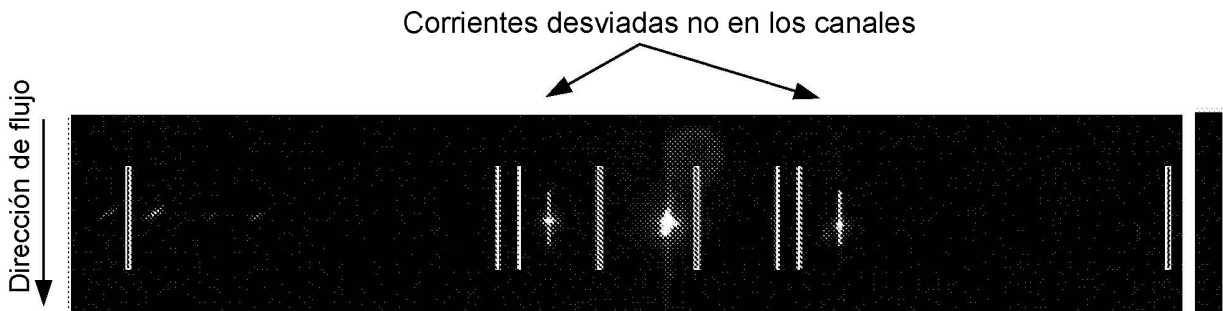


FIG. 15

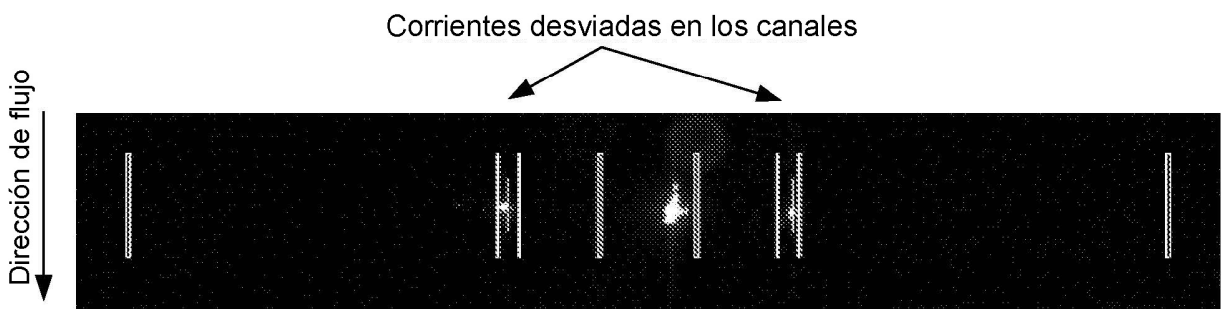


FIG. 16

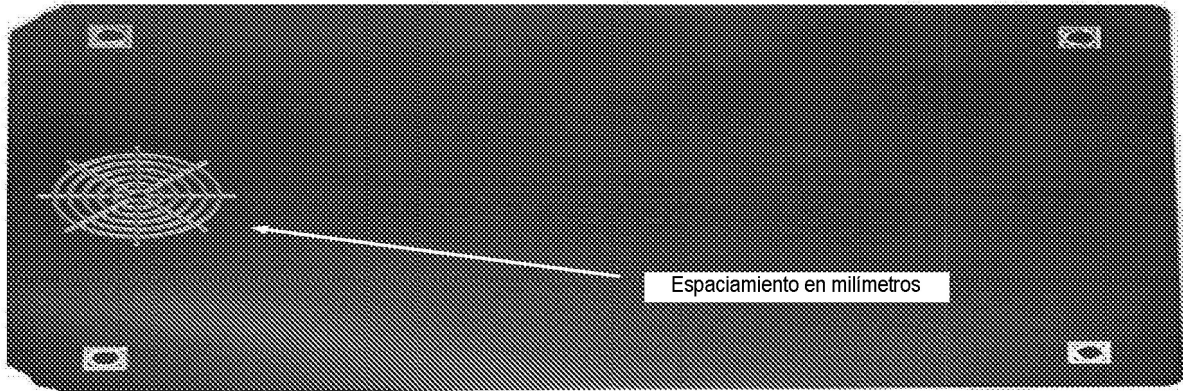


FIG. 17A

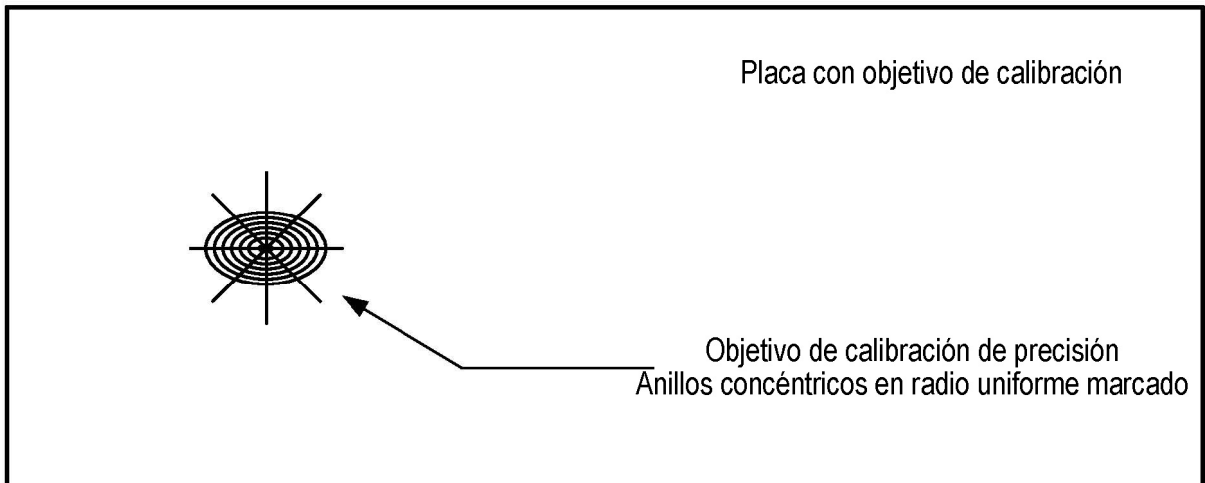
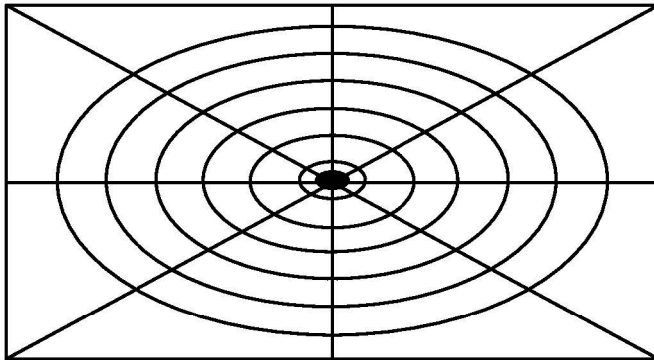
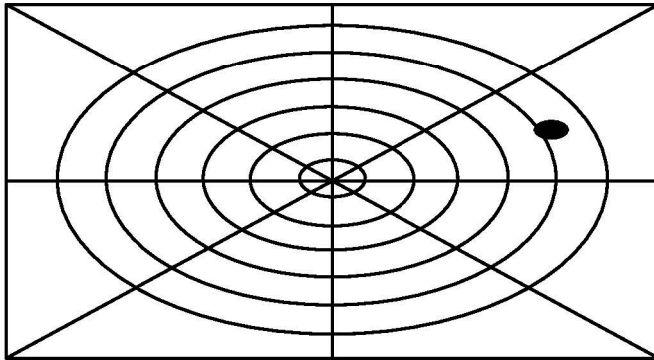


FIG. 17B



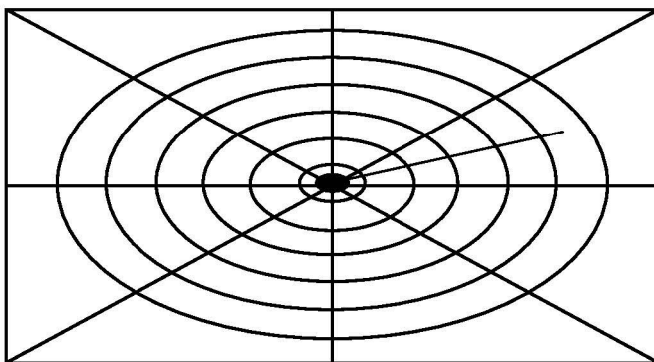
- Mover a localización de calibración
- Probar la calibración
- Verificar la alineación

FIG. 18A



- Mover a localización de calibración
- Probar la calibración
- Verificar la alineación

FIG. 18B



- Mover a localización de calibración
- Probar la calibración
- Verificar la alineación

FIG. 18C