

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 039**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2016 PCT/US2016/061119**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17083375**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2016 E 16805610 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2021 EP 3374083**

54 Título: **Generación inercial de gotitas y encapsulación de partículas**

30 Prioridad:

10.11.2015 US 201562253605 P

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

11.11.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AMINI, HAMED;
JAMSHIDI, ARASH;
KHURANA, TARUN KUMAR;
MASHAYEKHI, FOAD y
WU, YIR-SHYUAN**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 876 039 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

Generación inercial de gotitas y encapsulación de partículas

5 La invención se refiere a los campos de los microfluidos y la encapsulación de partículas tales como perlas, fragmentos de ácido nucleico y células en gotitas para realizar reacciones biológicas y químicas.

10 Pueden usarse dispositivos de microfluidos para mover fluidos a través de canales estrechos para realizar ciertas reacciones de diagnóstico u otras reacciones. Estos dispositivos pueden incluir entradas para recibir uno o más fluidos y salidas para transferir fluidos a dispositivos o sistemas externos.

A partir del documento US 2015/298091 A1 se conoce un procedimiento para generar gotitas de líquido que contienen dos o más tipos de partículas, comprendiendo el procedimiento:

15 enfocar un fluido de perlas que tiene perlas con códigos de barras suspendidas en el mismo en una primera corriente ordenada de perlas dentro de un primer microcanal;
enfocar un fluido de células que tiene células suspendidas en el mismo en una segunda corriente ordenada de células dentro de un segundo microcanal; y
20 fusionar la primera corriente ordenada con la segunda corriente ordenada para formar una pluralidad de gotitas que tienen una célula y una perla dentro de cada gotita.

25 Se hace referencia adicional a LINAS MAZUTIS ET AL.: " Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluids, NATURE PROTOCOLS, vol. 8, No. 5, 4 de abril de 2013, páginas 870-891, que divulga un procedimiento para crear gotitas que contienen una perla y una célula, haciendo fluir una suspensión de perlas a través de un primer canal, una suspensión de células a través de un segundo canal, reuniendo las suspensiones en una unión de enfoque y agregando un tercer fluido inmiscible para crear las gotitas.

30 En vista de esto, el objetivo de la invención es dar a conocer un procedimiento mejorado para generar partículas líquidas.

Este objetivo se resuelve mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1. Otros desarrollos de la invención están sujetos a las reivindicaciones dependientes.

35 En un aspecto, la invención presenta procedimientos para generar gotitas de líquido que contienen dos o más tipos de partículas. Los procedimientos incluyen enfocar un fluido de perlas que tiene perlas suspendidas en el mismo en una primera corriente ordenada de perlas dentro de un primer microcanal; enfocar un fluido de células que tiene células suspendidas en el mismo en una segunda corriente ordenada de células dentro de un segundo microcanal; y fusionar la primera corriente ordenada con la segunda corriente ordenada para formar una pluralidad de gotitas que tienen un número predeterminado de células y perlas dentro de cada gotita. En un ejemplo, el primer microcanal
40 tiene una dimensión de sección transversal mínima D y las perlas tienen una dimensión de sección transversal que es al menos aproximadamente 0,1D. Las células tienen una dimensión de sección transversal que es al menos aproximadamente 0,1D. La fusión de la primera corriente ordenada y la segunda corriente ordenada incluye el contacto con un tercer fluido inmiscible en el primer fluido y el segundo fluido. Enfocar las perlas incluye pasar las perlas a través de una primera porción de enfoque inercial del primer microcanal. El enfoque de las células incluye el
45 paso de las células a través de una segunda porción de enfoque inercial del segundo microcanal. El enfoque inercial de las perlas comprende pasar las perlas a través de una primera porción de enfoque inercial del primer microcanal. El enfoque inercial de las células comprende pasar las células a través de una segunda porción de enfoque inercial del segundo microcanal.

50 En algunos de estos procedimientos, las perlas incluyen fragmentos de nucleótidos. Los fragmentos de nucleótidos incluyen una región de etiqueta o código de barras, una región de índice y una región de captura. La etiqueta o región de código de barras de cada fragmento de nucleótidos puede tener al menos aproximadamente seis nucleótidos de longitud. La región índice de cada fragmento de nucleótidos puede tener una longitud de al menos aproximadamente cuatro nucleótidos. La región de captura incluye nucleótidos poli-T y puede tener al menos
55 aproximadamente diez nucleótidos de longitud.

En algunos de estos procedimientos, el número predeterminado de células es uno y el número predeterminado de perlas es uno. El número de Reynolds (Re) de cada una de las perlas es al menos aproximadamente 1, con el

$$Re = \frac{\rho U_m H}{\mu}$$

60 número de Reynolds de una perla definido como ρ es la densidad del fluido de perlas, U_m es la velocidad máxima de flujo del fluido de perlas, H es el diámetro hidráulico del fluido de perlas y μ es la viscosidad dinámica del fluido de perlas. El número de Reynolds de cada una de las células es al menos

$$Re = \frac{\rho U_m H}{\mu}$$

aproximadamente 1, con el número de Reynolds de una célula definido como ρ es la

densidad del fluido de células, U_m es la velocidad máxima de flujo del fluido de células, H es el diámetro hidráulico del fluido de células y μ es la viscosidad dinámica del fluido de células.

5 En algunos de estos procedimientos, la proporción de la pluralidad de gotitas que contienen k_1 perlas y k_2 células es mayor que $(\lambda_1^{k_1} \exp(-\lambda_1)/(k_1!)) / (\lambda_2^{k_2} \exp(-\lambda_2)/(k_2!))$, en la que λ_1 es el número promedio de perlas por gotita y λ_2 es el número promedio de células por gotita. El caudal de la primera corriente ordenada es de al menos aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 10 a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 40 a 70 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 45 a 65 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 50 a 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 60 $\mu\text{l}/\text{min}$. El caudal de la segunda corriente ordenada es de al menos aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 10 a 100 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 40 a 70 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 45 a 65 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 50 a 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, o de aproximadamente 60 $\mu\text{l}/\text{min}$.

15 En algunas realizaciones, uno o más canales de partículas pueden tener una región curva para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo. En algunas realizaciones, uno o todos los canales para una primera partícula de tipo A (tal como perlas) pueden tener una región curva para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo. En algunas realizaciones, uno o todos los canales para una segunda partícula de tipo B (tal como las células) pueden tener una región curvada para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo. Las regiones curvadas pueden estar curvadas simétricamente. En algunas realizaciones, las regiones curvadas pueden curvarse asimétricamente, tal como en forma de S, sinusoidal o sigmoidea, o curvarse continuamente en forma de espiral. En algunas realizaciones, las regiones curvas de algunos o todos los canales son sinusoidales. En algunas realizaciones, las regiones curvadas de algunos o de todos los canales tienen forma de espiral. En algunas realizaciones, los canales de perlas, o los canales de células, o ambos canales de perlas y células, comprenden regiones en forma de espiral. En algunas realizaciones, los canales de perlas, o los canales de células, o tanto los canales de perlas como de células, comprenden regiones sinusoidales. En algunas realizaciones, los canales de perlas comprenden regiones en espiral y los canales de células comprenden regiones sinusoidales.

20 En algunas realizaciones, el canal 104 de perlas puede tener una región de expansión/contracción que permite el ajuste de la separación entre las perlas dentro del canal. En algunas realizaciones, uno o ambos canales 108, 110 de células pueden tener una región de expansión/contracción que permite el ajuste de la separación entre células dentro del canal.

35 Opcionalmente, el primer microcanal de enfoque inercial incluye una pared lateral que tiene una forma irregular (por ejemplo, una discontinuidad en la naturaleza lineal de la pared lateral). Opcionalmente, el segundo microcanal de enfoque inercial incluye una pared lateral que tiene una forma irregular. Opcionalmente, la forma irregular incluye una primera irregularidad que sobresale de una superficie basal alejada de un eje longitudinal del microcanal de enfoque inercial con la forma irregular. En algunos casos, la irregularidad estrecha el microcanal con respecto al eje longitudinal y en otros casos la irregularidad expande el microcanal con respecto al eje longitudinal. Opcionalmente, cada forma irregular se selecciona independientemente del grupo que consiste en trapezoidal, triangular, redondeada y rectangular. En algunas realizaciones, el grupo incluye además formas elípticas o asimétricas. En algunas realizaciones, el microcanal incluye una pluralidad de formas irregulares a lo largo de una porción del microcanal. Las formas irregulares pueden tener la misma forma o formas diferentes.

40 En algunas realizaciones, uno o ambos del primer microcanal de enfoque inercial y el segundo microcanal de enfoque inercial tienen una región de expansión/contracción que tiene una pared lateral, en la que la pared lateral tiene una superficie escalonada. En algunas realizaciones, al menos uno del primer microcanal de enfoque inercial y el segundo microcanal de enfoque inercial tiene una región de expansión/contracción que tiene una pared lateral, en la que la pared lateral tiene una superficie curva. En algunas realizaciones, al menos uno del primer microcanal de enfoque inercial y el segundo microcanal de enfoque inercial tiene una región curva que tiene un número de Dean de hasta aproximadamente 30. En algunas realizaciones, uno del primer microcanal de enfoque inercial y el segundo microcanal de enfoque inercial tiene una pared lateral con una superficie escalonada. En otras realizaciones, ambos microcanales de enfoque inercial tienen paredes laterales con superficies escalonadas.

55 La Figura 1 es una vista en perspectiva de una realización de un sistema para la separación, ordenamiento y enfoque de células y perlas dentro de microcanales antes de la generación de gotitas.

Las Figuras 2A-D son dibujos esquemáticos que muestran el enfoque de perlas a través de canales de perlas de diferentes tamaños. La Figura 2A muestra perlas que fluyen a través de un canal cuadrado. La Figura 2B muestra perlas que fluyen a través de un canal rectangular que tiene una dimensión de sección transversal o un caudal que permite que dos perlas fluyan una junto a la otra. La Figura 2C muestra perlas que fluyen a través de un canal rectangular que tiene una dimensión de sección transversal o caudal que enfoca las perlas para que las perlas fluyan en una sola línea de flujo dentro del canal de perlas debido a la presencia de flujos conjuntos con y sin de perlas. La Figura 2D es una vista esquemática desde arriba de un canal de perlas de enfoque inercial que tiene una configuración de flujo simultáneo de doble entrada.

65 La Figura 3 es una vista en perspectiva de una realización alternativa de un sistema que usa canales curvos para la separación, ordenamiento y enfoque de células y perlas dentro de microcanales.

Las Figuras 4A-B son dibujos esquemáticos de realizaciones de canales de flujo configurados para proporcionar un procedimiento de ordenamiento inercial. La Figura 4A es un dibujo esquemático del procesamiento de ordenamiento inercial con un canal curvo asimétrico.

La Figura 4B es un dibujo esquemático que muestra el uso de una región de expansión/contracción dentro de los canales de flujo para ajustar la separación entre las perlas ordenadas dentro del canal.

Las Figuras 5A-F muestran diferentes realizaciones de configuraciones de microcanales para ordenar y enfocar células y perlas dentro de microcanales.

La Figura 6 ilustra una configuración de microcanal que permite la formación de alta eficiencia de gotitas de una sola célula/de una sola perla.

La Figura 7 ilustra una configuración de microcanal que permite la formación de alta eficiencia de gotitas de una sola célula/una sola perla usando un sistema de flujo simultáneo de doble entrada para las células.

La Figura 8 ilustra el uso de una realización del sistema para secuenciación de una sola célula.

La Figura 9 es una imagen de un dispositivo de acuerdo con realizaciones que muestra el enfoque de perlas de 30 μm de diámetro con las cuatro posiciones de enfoque en un canal cuadrado dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas.

La Figura 10 es una imagen de un dispositivo de acuerdo con realizaciones que muestran el enfoque y el ordenamiento de perlas de poliestireno de 40 μm de diámetro en un microcanal recto rectangular antes de la formación de gotitas.

La Figura 11 es una imagen de un dispositivo de acuerdo con realizaciones que muestran el enfoque y el ordenamiento de perlas de PMMA de 30 a 40 μm en un microcanal recto rectangular antes de la formación de gotitas.

Las Figuras 12A-12B muestran el enfoque y el orden de perlas de gel de sefarosa de 30 a 40 μm en un microcanal rectangular recto antes de la formación de las gotitas. La Figura 12A muestra la imagen tomada del instrumento.

La Figura 12B representa la misma imagen que la Figura 12A, excepto que el nivel de contraste se ha ajustado para permitir una visualización más fácil de las perlas de gel de sefarosa.

Las Figuras 13A-13B muestran el enfoque y el ordenamiento de perlas de gel de sefarosa de 30 a 40 μm en un microcanal rectangular en espiral antes de la formación de las gotitas. La Figura 13A muestra la imagen tomada del instrumento. La Figura 13B representa la misma imagen que la Figura 13A, excepto que el nivel de contraste se ha ajustado para permitir una visualización más fácil de las perlas de gel de sefarosa.

Las Figuras 14A-14B representan dos realizaciones de sistemas que comprenden canales en espiral. La Figura 14A muestra un sistema con dos canales en espiral adyacentes y un canal que comprende una curva sinusoidal. La Figura 14B muestra un sistema con dos canales en espiral en extremos opuestos del sistema, rodeando dos canales concéntricos que comprenden regiones sinusoidales.

Las Figuras 15A-15B representan la configuración de un sistema de microfluidos con respecto al ancho de los canales después de la convergencia de dos canales de entrada. La Figura 15A muestra dos canales de células que se alimentan en un canal de perlas (ancho b) y que dan como resultado un solo canal de ancho m. Luego convergen dos canales de entrada de aceite, produciendo un solo canal con un ancho d. La Figura 15B muestra una variación de la configuración mostrada en la Figura 15A en la que los anchos m y d del canal se incrementan con relación al ancho b del canal.

La Figura 16 representa una realización de un sistema de microfluidos en el que las estructuras o constricciones intracanal que pueden desagrupar un grupo de perlas agrupadas para producir perlas ordenadas.

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a los dibujos adjuntos, que forman parte de la misma. En los dibujos, los símbolos similares identifican típicamente componentes similares, a menos que el contexto indique lo contrario. Las realizaciones ilustrativas descritas en la descripción detallada, dibujos y reivindicaciones no pretenden ser limitantes. Se pueden utilizar otras realizaciones y se pueden realizar otros cambios, sin apartarse del espíritu o alcance del tema presentado en este documento. Se entenderá fácilmente que los aspectos de la presente divulgación, como se describe en general en este documento y se ilustra en las figuras, se pueden disponer, sustituir, combinar, separar y diseñar en una amplia variedad de configuraciones diferentes, todas las cuales se contemplan explícitamente en el presente documento.

Las realizaciones se refieren a los campos de microfluidos e incluyen dispositivos y procedimientos para encapsular partículas, tales como perlas, fragmentos de ácido nucleico y células en gotitas. Varias realizaciones descritas a continuación usan flujo laminar de un fluido, tal como un aceite, a través de canales de microfluidos para dar como resultado el autoordenamiento continuo y preciso de las partículas suspendidas dentro del fluido. Como se analiza a continuación, las realizaciones incluyen dispositivos de microfluidos que tienen una variedad de geometrías de canal específicas que se pueden configurar para aprovechar los flujos del líquido autoordenado para crear corrientes continuas de partículas ordenadas restringidas en tres dimensiones espaciales. Las partículas se ordenan lateralmente dentro del plano y-z (o plano de sección transversal) de un canal de fluido y también pueden ordenarse longitudinalmente a lo largo de la dirección del flujo de fluido (es decir, la dirección x). Puede producirse una dimensión adicional de ordenamiento rotacional para las piezas de forma asimétrica.

Una realización incluye procedimientos y dispositivos que realizan reacciones dentro de las gotitas que fluyen en un dispositivo de microcanal. Por ejemplo, en una realización se diseña un dispositivo de microcanal para mezclar una sola célula con una sola perla en una gotita. Cada perla aplicada al dispositivo de microcanal lleva uno o más fragmentos de nucleótidos, y cada fragmento de nucleótido comprende una etiqueta de ADN única. La etiqueta de

ADN puede ser un código de barras u otra secuencia de ADN que tenga la misma secuencia de nucleótidos en todos los fragmentos unidos a una sola perla. La etiqueta de ADN puede ser alternativamente una secuencia de índice que tiene una secuencia de nucleótidos diferente para cada fragmento en una sola perla. La etiqueta también puede incluir una región de captura que se puede usar para capturar la etiqueta mediante hibridación con otras secuencias de ADN. Por ejemplo, la región de captura puede comprender una cola poli-T en algunas realizaciones. En esta construcción, cada perla está etiquetada de forma única en comparación con todas las demás perlas que se utilizan en el dispositivo. Por lo tanto, cuando una sola célula y una sola perla se encapsulan en una gotita y se exponen al tampón de lisis (por ejemplo, el tampón de lisis está presente en la gotita cuando se produce la encapsulación, o se agrega a la gotita después de la encapsulación), la célula es lisada, y cada ARNm poliadenilado en la célula se une a la cola poli-T de la región de captura en la perla con la que está encapsulado. Si la perla se somete luego a una reacción de ADNc usando transcriptasa inversa y el cebador apropiado, se forman cadenas de ADNc que tienen las secuencias de ARNm originales junto con la etiqueta única de la perla que se encapsuló con la célula. Esto da como resultado que todo el ARNm de una sola célula se marque con una secuencia de etiqueta única de la perla. Este procedimiento permite que las reacciones de secuenciación posteriores se lleven a cabo en masa, con muestras de ADNc de muchas células que se secuencian, pero cada una tiene una etiqueta única para poder clasificarlas entre sí. El índice se utiliza para corregir errores de amplificación y evitar el recuento múltiple de una sola molécula. Al final de un experimento, la expresión de ARNm de células individuales se puede determinar secuenciando el ADNc y determinando qué población de ARNm estaba presente en cada célula y el nivel de expresión de ese ARNm.

En una realización, el dispositivo de microcanal está configurado para separar, ordenar y enfocar corrientes de perlas a posiciones de enfoque dentro de un campo de flujo de canal que dan como resultado la creación de gotitas, cada una con un número predeterminado de perlas y células. El enfoque puede basarse, al menos en parte, en fuerzas de elevación inerciales. En los canales cuadrados, esto puede conducir, por ejemplo, a cuatro corrientes de partículas enfocadas espaciadas a la misma distancia del centro de cada una de las cuatro caras cuadradas. Para geometrías rectangulares, esta simetría cuádruple puede reducirse a una simetría doble, con corrientes de partículas separadas de cada una de las dos caras opuestas del canal.

En algunas realizaciones, un sistema de flujo simultáneo de doble entrada sirve para crear una primera corriente de partículas A concentrada y ordenada y una segunda corriente de partículas B enfocada y ordenada, en el que las partículas A y B son de diferentes tipos. En algunas realizaciones, el sistema sirve para crear una única corriente de perlas enfocada y una única corriente de células enfocada (por ejemplo, las partículas A son perlas y las partículas B son células). En algunas realizaciones, las dos corrientes de partículas se fusionan en el sistema para crear una única corriente que comprende las partículas A y B, tales como perlas y células. La corriente de partículas fusionadas se pone en contacto con un aceite u otro fluido inmiscible para crear una gotita que contiene los dos tipos de partículas. Así, en algunas realizaciones, se introduce una tercera corriente de fluido que sirve para encapsular los dos tipos de partículas. En algunas realizaciones, la tercera corriente de fluido comprende un fluido portador que es inmiscible o parcialmente inmiscible con la primera y la segunda corriente de fluidos y/o la primera/segunda corriente de fluido combinada.

Las realizaciones incluyen dispositivos de microcanales que encapsulan un número seleccionado de partículas A y B en una gotita. Por ejemplo, el dispositivo puede configurarse para encapsular no más de una partícula A y no más de una partícula B en una sola gotita, o hasta una partícula A y una partícula B en una sola gotita, o una partícula A y una B partícula en una sola gotita. También se contemplan configuraciones de menos, o más, partículas A y menos, o más, partículas B en una sola gotita, que incluyen pero no se limitan a dos partículas A y una partícula B, o una partícula A y dos partículas B.

Las realizaciones también se refieren a dispositivos de microcanales que colocan un número seleccionado de perlas y células en una gotita. Por ejemplo, el dispositivo puede configurarse para encapsular no más de una perla y no más de una célula en una sola gotita, o hasta una perla y una célula en una sola gotita, o una perla y una célula en una sola gotita. También se contemplan configuraciones de menos o más perlas y menos o más células en una sola gotita, que incluyen pero no se limitan a dos perlas y una célula, o una perla y dos células. En una realización, el dispositivo puede configurarse para encapsular una perla y una célula dentro de una sola gotita. También se contemplan otras configuraciones de menos o más perlas y células por gotita, que incluyen, entre otras, dos perlas y una célula, o una perla y dos células, o una perla y una pluralidad de células, o una pluralidad de perlas y una célula. Este procedimiento generalmente se realiza fusionando una corriente de fluido que contiene perlas con una corriente de fluido que contiene células. La corriente combinada de perlas y células se pone en contacto con un aceite u otro fluido inmiscible para crear una gotita que contiene las perlas y las células.

Estas configuraciones producen concentraciones extremadamente altas de gotitas individuales con perlas y tienen un λ cercano a 1, en la que λ es el promedio de la distribución de Poisson de perlas que se encapsulan en gotitas, pero evitan tener gotitas con ocupación de perlas múltiples, creando así una distribución de Poisson no dispersada, por ejemplo, una distribución de Poisson con una distribución promedio de λ pero una varianza de ϕ que es menor que λ , idealmente con ϕ acercándose a 0. Esta alta concentración de gotitas con ocupación de una sola perla permite sistemas que requieren tales gotitas (tal como un sistema de alto rendimiento de una sola célula) para mejorar el rendimiento entre 10 y 20 veces en sistemas en los que no se utilizan corrientes ordenadas con una tasa

de error reducida (por ejemplo, un número reducido de gotitas con un número no deseado de perlas o células). De manera similar, la eficiencia de captura de las células se puede mejorar en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, las realizaciones que emplean el enfoque, tal como el enfoque inercial, como se describe a continuación, tanto para perlas como para células, pueden superar ambas distribuciones de Poisson, una para perlas y otra para células, en las estadísticas de Poisson dobles, logrando así una mejora de más de 100 veces en el rendimiento. Las realizaciones se pueden hacer funcionar de forma continua y a altos caudales volumétricos con salidas en cascada y aún así producir gotitas que tienen el número deseado de perlas y células por gotita.

Los sistemas y procedimientos pueden relacionarse con la tecnología de microfluidos inerciales para un control de microescala preciso y de alto rendimiento del movimiento de células y partículas. Estos sistemas y procedimientos pueden ser adecuados para aplicaciones en cualquier tipo de análisis de secuencia de ácido nucleico, incluyendo secuenciación de ADN de lectura larga, secuenciación de extremos emparejados y secuenciación de células individuales. La generación de gotitas, cada una con, por ejemplo, una perla y una célula, permite el análisis continuo y la secuenciación de células individuales.

Aunque hay muchas configuraciones posibles en un sistema para el autoordenamiento de partículas, tales como células y perlas, dentro de canales de microfluidos y encapsulación de partículas, en la Figura 1 se ilustra una realización de dicho sistema 100 de microfluidos. Como se muestra, el sistema 100 de microfluidos generalmente incluye tres entradas: una entrada 102 de perlas que se conecta a un canal 104 de perlas, una entrada 106 de células que se conecta a dos canales 108, 110 de células en los dos lados del canal 104 de perlas, y una entrada 112 de aceite que se conecta a dos canales 114, 116 de aceite que son los canales más externos del sistema 100 y están próximos a los canales 108, 110 de células y separados lateralmente del canal 104 de perlas. El sistema 100 de microfluidos generalmente tiene una salida 118 del sistema. El sistema 100 de microfluidos se puede proporcionar en un chip 120 microfabricado con los diversos canales formados en el chip 120.

La entrada 102 de perlas está configurada para introducir perlas 122 suspendidas en un fluido 124 de perlas en el sistema 100 de microfluidos. Las perlas 122 pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. El canal 104 de perlas formado en el chip 120 puede tener numerosas configuraciones que se describirán en detalle a continuación. En general, el canal 104 de perlas puede tener una geometría específica diseñada para separar, ordenar y enfocar las perlas 122 en posiciones laterales predeterminadas en el canal al entrar en una unión 126 de generación de gotitas. Estas ubicaciones laterales corresponden a velocidades de flujo similares en el perfil de velocidad del fluido 124 de perlas de manera que, una vez enfocadas, las perlas 122 se mueven a velocidades más o menos similares y mantengan su separación y generalmente no se crucen entre sí. El canal 104 de perlas puede ser recto como se muestra. Los canales de perlas utilizados en los sistemas de microfluidos pueden tener varias geometrías y secciones transversales, como se detalla a continuación, para enfocar perlas de un tamaño predeterminado suspendidas dentro de un fluido. Por ejemplo, el canal 104 de perlas puede tener una sección transversal cuadrada.

En general, el tamaño del canal 104 de perlas está relacionado con el tamaño de las perlas 122 destinadas a ser utilizadas dentro del canal. Por ejemplo, como se menciona a continuación, se utilizaron con éxito canales de perlas de 80-125 μm de diámetro para separar, ordenar y enfocar perlas que tenían un tamaño de 30-50 μm . Cuanto más cercano estaba el tamaño del canal al tamaño de la perla, más rápida y eficiente era la separación, el enfoque y el ordenamiento.

Los canales 108, 110 de células tienen regiones 109, 111 serpentinas largas respectivamente. Los canales 114, 116 de aceite también tienen regiones 115, 117 serpentinas largas respectivamente. Estas regiones serpentinas largas actúan como resistencias de fluidos para asegurar una distribución equitativa del flujo de fluido en ambas ramas del canal correspondiente.

En algunas realizaciones, el canal 104 de perlas puede tener una región curva para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo. En algunas realizaciones, uno o ambos canales 108, 110 de célula pueden tener una región curvada para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo. Las regiones curvadas pueden estar curvadas simétricamente. En algunas realizaciones, las regiones curvadas pueden estar curvadas asimétricamente, tal como en forma de S, sinusoidal o sigmoidea. En algunas realizaciones, el canal 104 de perlas puede tener una región de expansión/contracción que permite el ajuste de la separación entre las perlas dentro del canal. En algunas realizaciones, uno o ambos canales 108, 110 de célula pueden tener una región de expansión/contracción que permite el ajuste de la separación entre células dentro del canal.

Como se muestra en la Figura 1, la entrada 106 de células está configurada para introducir células 130 suspendidas en un fluido 132 de células en el sistema 100 de microfluidos a través de los canales 108, 109 de células. La entrada 112 de aceite está configurada para introducir el aceite 134 de generación de gotitas a la unión 126 de generación de gotitas a través de los canales 114, 116 de aceite. Los dos flujos laterales de aceite 134 de generación de gotitas extraen gotitas de la corriente del fluido 124 acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiples frecuencias, con las que las perlas alcanzan la unión 126 de generación de gotitas. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite 134 de generación de gotitas extraen gotitas de la corriente del fluido 132 acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiples secuencias, con las que las células alcanzan la unión 126 de generación de gotitas. En la

salida 118 del dispositivo, las gotitas salen del dispositivo 100 de microfluidos de una manera ordenada con cada gotita que encapsula generalmente una perla y/o una célula en el diseño particular ilustrado en la Figura 1.

5 El chip 120 también puede incluir una sección recta de canal en una región de salida para el análisis de partículas enfocadas, recolección de partículas enfocadas y/o para recombinar líneas de corriente.

Enfoque inercial

10 Los canales de perlas usados en los sistemas de microfluidos pueden tener varias geometrías y secciones transversales para enfocar perlas de un tamaño predeterminado suspendidas dentro de un fluido. La Figura 2A-Figura 2D muestran el autoensamblaje dinámico de perlas en un flujo de número finito de Reynolds. Todas las vistas son desde arriba del canal 204 de perlas, de modo que se pueden visualizar las diferencias de posición a lo largo del ancho de la sección transversal del canal. La migración inercial enfoca las perlas en posiciones de equilibrio transversal. Las perlas migran a posiciones de equilibrio definidas, por ejemplo, cuatro en un canal cuadrado (Figura 2A) y dos en un canal rectangular (Figura 2B). En una realización ilustrada en la Figura 2A, se proporciona un canal recto que tiene una sección transversal cuadrada con una relación de aspecto de sustancialmente 1 a 1. Las perlas de un tamaño predeterminado que fluyen dentro de dicha geometría de canal se separarán, ordenarán y enfocarán en cuatro posiciones de enfoque mostradas en la vista en sección transversal de la Figura 2A. Estas cuatro posiciones de enfoque corresponden a cuatro puntos de equilibrio, o mínimos potenciales, a una distancia de cada 15 20 cara de las paredes de los cuatro canales.

25 Diseñando un canal con una relación de aspecto (definida en el presente documento como la relación del lado más largo al lado más corto de la sección transversal) mayor que 1, el número de posiciones de enfoque puede reducirse con éxito de cuatro a dos. En una realización, la relación de aspecto puede ser mayor de aproximadamente 1,2, aunque también se contemplan otras relaciones de aspecto de aproximadamente 1,1; 1,3; 1,4; 1,5 o más. En una realización que se muestra en la Figura 2B, se proporciona un canal de perlas recto que tiene una sección transversal rectangular con una relación de aspecto de sustancialmente 2 a 1. Las perlas de un tamaño predeterminado que fluyen dentro de dicha geometría del canal se pueden separar, ordenar y enfocar en dos 30 posiciones de enfoque correspondientes a dos puntos de equilibrio o mínimos potenciales a lo largo de las paredes laterales más anchas a lo largo del ancho del canal. En algunas realizaciones, el lado más ancho del canal puede ser paralelo a la dirección y o z, lo que conduce al enfoque de la perla en la parte superior e inferior o en la izquierda y la derecha del canal, respectivamente. A través del procedimiento de enfoque lateral de perlas, las perlas interactúan entre sí y también se ordenan longitudinalmente. Las perlas pueden estar enfocadas lateralmente (en un plano y-z) y/o ordenadas longitudinalmente (en una dirección x). Las interacciones entre perlas crean una fuerza repulsiva entre los pares de perlas que las espacia a lo largo del canal, lo que lleva a la creación de enrejados de perlas. 35

40 Para obtener una posición de enfoque única mostrada en la Figura 2C, puede usarse un sistema 200 de flujo simultáneo de entrada doble con un canal 204 de perlas de enfoque inercial rectangular con un lado más ancho en la dirección z (que conduce a un enfoque de izquierda y derecha en la vista de sección transversal) como se muestra en la Figura 2D. Mediante el uso de dos entradas 202, 203 de perlas conectadas al canal 204 de perlas e inyectando perlas en el fluido 124 de perlas en solo un lado del canal, con la otra corriente que solo contiene fluido (y sin perlas), la posición de enfoque se puede reducir aún más hasta 1. Esto conduce a un ordenamiento más eficiente de las perlas a lo largo del canal. Se descubrió que el flujo simultáneo con el fluido sin perlas confina las perlas en un lado de un microcanal, lo que da como resultado una única línea de perlas con un espacio regular y repetible. Se puede usar un concepto similar para enfocar células y otros tipos de partículas. 45

50 La Figura 2D es una vista esquemática de un sistema dinámico de perlas autoensamblado que incluye un canal de perlas de dos entradas. Las perlas distribuidas aleatoriamente se autoensamblan mediante fuerzas de elevación inerciales e interacciones hidrodinámicas perla-perla. El sistema 200 de flujo simultáneo de doble entrada reduce los grados de libertad al enfocar las perlas 222 en una única corriente alineada sustancialmente axialmente en una posición 228 de enfoque (Figura 2D). Sin procesar, las perlas 222 en un fluido 224 de perlas fluye a través de la entrada 202 de perlas "inferior". Un fluido 225 libre de perlas fluye a través de la entrada 203 de perlas "superior". Como resultado, el fluido 225 libre de perlas fluye a través de la mitad "superior" del canal 204 de perlas y las perlas 222 están confinadas a la mitad "inferior" del canal 204 de perlas de modo que las perlas 222 se alinean en la posición 228 de enfoque único. Este estado de equilibrio se convierte en un sistema unidimensional en el que la separación entre perlas es una variable dependiente que depende, por ejemplo, de parámetros geométricos, de flujo y de fluido. 55

60 En general, "enfocar" se refiere a una reducción en el área de una sección transversal de un canal a través del cual pasa un flujo de perlas. En algunas realizaciones, las perlas se pueden localizar dentro de un área que tiene un ancho de, como máximo, 1,01, 1,05, 2, 3, 4 o 5 veces el ancho de las perlas. La localización puede ocurrir en cualquier lugar dentro del canal, incluso dentro de una porción sin obstrucciones del canal. Por ejemplo, la localización puede ocurrir en una porción del canal que tiene menos del 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1% o 65 0,1% de reducción en el área de la sección transversal. En ciertas realizaciones, la localización puede ocurrir en un canal que tiene un área de sección transversal sustancialmente constante.

El enfoque inercial dentro de microcanales se ha descrito en Di Carlo et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 18892-97 (2007), que se incorpora en el presente documento como referencia. Brevemente, los sistemas de autoensamblaje, en general, requieren múltiples interacciones que incluyen retroalimentación positiva y negativa, que para los sistemas de perlas se realizan como fuerzas atractivas y repulsivas. Estelas viscosas inversas, que son inducidas por el confinamiento, repelen las perlas vecinas hasta el infinito, mientras que la inercia del fluido en forma de fuerzas de elevación actúan para mantener las perlas a distancias finitas. Este mecanismo de autoensamblaje dinámico de perlas a escala micrométrica en un flujo de canal de número finito de Reynolds proporciona parámetros para controlar el autoensamblaje de la corriente de perlas y permite un control de perlas expandido en sistemas de microcanales. Dicho control es útil para aplicaciones tales como el filtrado espacial de paso bajo en el espacio de perlas. Los dispositivos de microfluidos se pueden diseñar y operar para controlar las interacciones perla-perla y perla-pared con el fin de manipular la separación entre perlas y reducir el desenfoque.

Aunque una suposición de flujo de Stokes (por ejemplo, $Re = 0$) es ampliamente aceptada al analizar los efectos inerciales en sistemas de microfluidos, los números de Reynolds en los canales microfluidicos alcanzan a menudo ~ 1 e incluso ~ 100 en algunos casos extremos. El número de Reynolds, Re , está determinado por

$$Re = \frac{\rho U_m H}{\mu},$$

en la que ρ es la densidad del fluido, U_m es la velocidad máxima de flujo, H es el diámetro hidráulico y μ es la viscosidad dinámica del fluido. Se han observado muchos efectos de inercia en dispositivos de microfluidos con tales números de Reynolds. Un ejemplo es la migración inercial de perlas en canales cuadrados y rectangulares. Las perlas distribuidas aleatoriamente migran a través de las líneas de corriente debido a las fuerzas de sustentación inercial, que es una combinación de levantamiento de gradiente de cizallamiento que empuja las perlas hacia las paredes y levantamiento por efecto de la pared que empuja las perlas hacia el centro de un canal. Estas fuerzas de elevación inercial enfocan perlas a cuatro (Figura 2A) o dos (Figura 2B) "puntos de equilibrio transversal" dinámicos que están determinados por la simetría del canal. El sistema es un sistema de no equilibrio que constantemente disipa energía y el punto de equilibrio transversal es en el que las fuerzas de elevación inerciales se vuelven cero en la sección transversal del canal. Como se usa en el presente documento, "posición de enfoque" se refiere a estos puntos de equilibrio transversal.

Mientras se desplazan por el canal, las perlas se enfocan lateralmente (dirección y y dirección z) por fuerzas de elevación inerciales y simultáneamente se autoensamblan longitudinalmente (dirección x) mediante interacciones perla-perla. El enfoque se produce a lo largo del ancho y la altura de un microcanal y el ensamblaje se produce a lo largo del eje longitudinal del microcanal. En el estado organizado final, el sistema de perlas tiene dos grados de libertad: separación entre perlas y posición de enfoque. La separación entre perlas está determinado por los parámetros de flujo y fluido (U_m , ρ , μ) y parámetros geométricos (diámetro de la perla (a), ancho del canal (w) y altura (h)). Estos parámetros forman un número de Reynolds de perla

$$R_p = Re \left(\frac{a}{H}\right)^2,$$

basado en la velocidad de cizallamiento a la escala de las perlas, y la separación entre perlas disminuye al aumentar R_p .

Cuando las perlas se alinean en una posición de enfoque, existe una separación entre perlas predeterminado para cualquier conjunto dado de parámetros geométricos y de flujo. Sin embargo, con más de una posición de enfoque, aparecen diferentes espacios entre canales y espacio de corriente único. La separación entre perlas no muestra una fuerte dependencia de la relación de aspecto del canal. La selección de una posición de enfoque para las perlas es intrínsecamente un evento aleatorio, que crea diversos patrones en la estructura organizada. Sin embargo, los grados de libertad adicionales en forma de posiciones de enfoque adicionales hacen que el flujo de perlas resultante sea más complicado.

Geometría del canal

La geometría del canal de las perlas puede tener varias geometrías en contraste con la geometría del canal recto como se muestra en la Figura 1. La Figura 3 ilustra otra realización de un sistema 300 de microfluidos con un canal 304 de perlas curvo. Como se muestra, el sistema 300 de microfluidos generalmente incluye tres entradas: una entrada 302 de perlas que se conecta al canal 304 de perlas, una entrada 306 de célula que se conecta a dos canales 308, 310 de células en los dos lados del canal 304 de perlas, y una entrada 312 de aceite que se conecta a dos canales 314, 316 de aceite que son los canales más externos del sistema 300 y están al lado de los canales 308, 310 de célula lejos del canal 304 de perlas. El sistema 300 de microfluidos generalmente tiene una salida 318 del sistema. El sistema 300 de microfluidos se puede proporcionar en un chip 320 microfabricado con los diversos canales formados en el chip 320.

La entrada 304 de perlas está configurada para introducir perlas 322 suspendidas en un fluido 324 de perlas en el sistema 300 de microfluidos. Las perlas 322 pueden ser de cualquier densidad compuestas de varios materiales. El canal 304 de perlas formado en el chip 320 puede tener numerosas configuraciones que se describirán en detalle a continuación. En general, el canal 304 de perlas puede tener una geometría específica diseñada para separar, ordenar y enfocar las perlas 322 a posiciones laterales predeterminadas en el canal al entrar en la unión 326 de generación de gotitas. Estas ubicaciones laterales corresponden a velocidades de flujo similares en el perfil de velocidad del fluido 324 de perlas de manera que, una vez enfocadas, las perlas 322 se mueven a velocidades similares y mantienen su separación y generalmente no se cruzan entre sí. El canal 304 de perlas puede estar curvado como se muestra. Se pueden usar canales curvos para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo.

Los canales 308, 310 de células tienen regiones 309, 311 serpentina respectivamente. Los canales 314, 316 de aceite también tienen regiones 315, 317 serpentina respectivamente.

En una realización, pueden proporcionarse canales curvados simétricamente, asimétricamente o continuamente, tales como canales de perlas en forma de S, sinusoidales o sigmoidales que tienen una sección transversal rectangular. Las perlas de un tamaño predeterminado que fluyen dentro de dicha geometría de canal se enfocarán generalmente en dos posiciones de enfoque correspondientes a uno o dos puntos de equilibrio o mínimos potenciales a una distancia de las caras laterales izquierda y derecha del canal. La relación de aspecto de un canal sigmoidal puede ser sustancialmente de 1 a 1 y/o puede variar a lo largo de su longitud. Por ejemplo, la relación de aspecto de un canal sigmoidal puede variar a lo largo del canal entre 1 a 1 y 2 a 1 dependiendo de la configuración elegida.

En otra realización, como se muestra en la Figura 4A, el canal 404 de perlas tiene una región 438 curvada. Mientras que los canales curvados asimétricamente pueden tener varias formas y configuraciones según sea necesario para una aplicación particular, en una realización un canal de perlas asimétrico generalmente puede tener la forma de una onda que tiene giros grandes y pequeños, en los que un radio de curvatura puede cambiar después de cada punto de inflexión de la onda. Cada giro grande y pequeño puede tener un ancho específico del canal asociado con el giro. Los canales curvados asimétricamente permiten tanto el ordenamiento longitudinal como el enfoque lateral.

En una realización, una mitad de una longitud de onda de la onda del canal puede tener una curva grande, mientras que la mitad de una longitud de onda de la onda del canal puede tener una curva pequeña. Estas curvas se pueden repetir tantas veces como sea necesario, variando después de cada punto de inflexión, para proporcionar una longitud de canal específica con una curva asimétrica. El canal 404 de perlas curvado asimétricamente también puede tener una sección transversal rectangular con una relación de aspecto que puede variar según sea necesario sobre la longitud del canal dependiendo de la naturaleza de la asimetría en las curvas. En una realización, la relación de aspecto puede variar entre 1 a 1 y 2 a 1. En este caso, se crea una única corriente enfocada de perlas correspondiente a un único punto de equilibrio o mínimo potencial dentro del canal 404.

En otras realizaciones, pueden proporcionarse canales de perlas curvados asimétricos, por ejemplo, un canal en forma de espiral expansible, que tiene una sección transversal rectangular con una relación de aspecto sustancialmente de 2 a 1. Esta relación de aspecto puede variar. En este caso, las perlas se enfocan en una sola línea de corriente a una distancia de una pared interior del canal correspondiente a un único punto de equilibrio o mínimo potencial dentro del canal. En las Figuras 14A y 14B se muestran ejemplos de sistemas que incluyen canales en espiral. En algunas realizaciones, la porción en espiral del canal tiene un diámetro exterior de 2 a 10 mm, o aproximadamente 3 a 7 mm, o aproximadamente 5 mm, o aproximadamente 10 mm.

En algunas realizaciones, un solo chip puede tener canales de perlas con diferentes geometrías de canal. La Figura 4B muestra otra realización con el canal 405 de perlas que tiene un diámetro variable. Una región 440 de expansión/contracción después de una región de enfoque de perlas (más adelante, no mostrada) permite el ajuste de la separación entre perlas dentro del canal. Por ejemplo, la región 440 de expansión/contracción después de la región de enfoque de perlas (más adelante, no mostrada) puede usarse para aumentar la separación entre las perlas 422A-D dentro del canal (Figura 4B). Alternativamente, se puede usar una región de expansión/contracción después de la región de enfoque de las perlas para disminuir la separación entre las perlas dentro del canal. En algunas realizaciones, las dimensiones del canal pueden disminuir a lo largo del chip para facilitar el filtrado de la muestra, o por otras razones específicas de una aplicación, como crear resistencia fluidica. Las dimensiones del canal pueden ser mayores en el área de entrada o en el área de salida para permitir que las bifurcaciones o sistemas de válvulas se coloquen dentro de los canales, o para permitir que múltiples líneas de corriente se separen y se dirijan a diferentes ubicaciones para su análisis o recolección. De manera similar, las secciones transversales de varios canales también se pueden cambiar según sea necesario dentro de un solo chip para manipular líneas de corriente de perlas enfocadas para aplicaciones particulares. En general, cualquier combinación de geometrías de canal, secciones transversales de canal y dimensiones de canal se puede incluir en un solo chip según sea necesario para clasificar, separar, ordenar y enfocar perlas de un tamaño predeterminado o perlas de múltiples tamaños predeterminados. Por ejemplo, se pueden usar diferentes geometrías de canal y caudales para las corrientes de fluido de perlas y fluido de células para asegurar el enfoque y el ordenamiento deseados en cada corriente antes de la generación de gotitas.

En una realización, se forma una sección recta de canal de perlas en el chip cerca de la entrada para transportar y dividir líneas de flujo a medida que se introduce la perla en el sistema de microfluidos. La sección recta de cada canal puede pasar a cualquier número de canales curvados simétricos y/o asimétricos para enfocar perlas de un tamaño predeterminado según sea necesario.

Como se muestra en la Figura 3, el canal 304 de perlas tiene una región 305 curvada para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo. En algunas realizaciones, uno o ambos canales 308, 310 de células pueden tener una región curvada para disminuir la longitud de enfoque requerida y disminuir la huella del dispositivo como se muestra en la Figura 4A. Las regiones curvadas pueden estar curvadas simétricamente. En algunas realizaciones, las regiones curvadas pueden estar curvadas asimétricamente, tal como en forma de S, sinusoidal o sigmoidea.

En una realización, pueden proporcionarse canales curvados simétricamente, asimétricamente o continuamente, tales como canales de células en forma de S, sinusoidal o sigmoidea que tienen una sección transversal rectangular. Las células de un tamaño predeterminado que fluyen dentro de dicha geometría de canal se enfocarán generalmente en dos posiciones de enfoque correspondientes a uno o dos puntos de equilibrio o mínimos potenciales a una distancia de las caras laterales izquierda y derecha del canal. La relación de aspecto de un canal sigmoideal puede ser sustancialmente de 1 a 1 y/o puede variar a lo largo de su longitud. Por ejemplo, la relación de aspecto de un canal sigmoideal puede variar a lo largo del canal entre 1 a 1 y 2 a 1 dependiendo de la configuración elegida.

De manera similar al canal 404 de perlas en la Figura 4A que tiene una región 438 curvada, los canales 310, 308 de células cada uno pueden tener una región curvada. Si bien los canales curvados asimétricamente pueden tener varias formas y configuraciones según sea necesario para una aplicación particular, en una realización, un canal de células asimétrico generalmente puede tener la forma de una onda con giros grandes y pequeños, en la que un radio de curvatura puede cambiar después de cada punto de inflexión de la onda. Cada giro grande y pequeño puede tener un ancho específico del canal asociado con el giro. Los canales curvados asimétricamente permiten tanto el ordenamiento longitudinal como el enfoque lateral.

En una realización, la mitad de la longitud de onda de la onda del canal puede tener una curva grande, mientras que la mitad de la longitud de onda de la onda del canal puede tener una curva pequeña. Estas curvas se pueden repetir tantas veces como sea necesario, variando después de cada punto de inflexión, para proporcionar una longitud de canal específica con una curva asimétrica. El canal de células curvado asimétricamente también puede tener una sección transversal rectangular con una relación de aspecto que puede variar según sea necesario a lo largo de la longitud del canal dependiendo de la naturaleza de la asimetría en las curvas. En una realización, la relación de aspecto puede variar entre 1 a 1 y 2 a 1. En este caso, se crea una única corriente de células enfocada correspondiente a un único punto de equilibrio o mínimo potencial dentro del canal.

En otras realizaciones, se pueden proporcionar canales de célula curvados asimétricos, en particular un canal expansible en forma de espiral, que tienen una sección transversal rectangular con una relación de aspecto de sustancialmente 2 a 1. Esta relación de aspecto puede variar. En este caso, las células se enfocan en una sola línea de corriente a una distancia de una pared interior del canal correspondiente a un único punto de equilibrio o mínimo potencial dentro del canal. En las Figuras 14A y 14B se muestran ejemplos de sistemas que incluyen canales en espiral. En algunas realizaciones, la porción en espiral del canal tiene un diámetro exterior de 2 a 10 mm, o aproximadamente 3 a 7 mm, o aproximadamente 5 mm, o aproximadamente 10 mm.

Los dispositivos de microfluidos como se describen en este documento pueden fabricarse usando cualquier tecnología adecuada conocida por un experto en la técnica. Por ejemplo, tales dispositivos y sistemas se pueden fabricar usando moldes maestros combinados con técnicas de litografía blanda. Como otro ejemplo, los dispositivos de microfluidos o ciertos componentes de los dispositivos de microfluidos pueden fabricarse utilizando tecnologías de impresión tridimensional.

En algunas realizaciones, los canales son de forma rectangular. Los canales de forma rectangular se pueden formar en una variedad de geometrías descritas en este documento, tales como canales rectos y curvos. La relación de aspecto de la altura al ancho del canal puede seleccionarse para optimizar el orden de las partículas. En algunas realizaciones, la relación de aspecto del canal rectangular es 7:1, o 5:1, o 4:1, o 3:1 o 2:1. En algunas realizaciones, la altura del canal puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 200 μm .

En algunas realizaciones, un solo chip puede tener canales de células con diferentes geometrías de canal. De manera similar con el canal 405 de perlas en la Figura 4B que tiene un diámetro variable, uno o ambos canales 308, 310 de células pueden tener un diámetro variable. Una región de expansión/contracción después de una región de enfoque de células permite el ajuste de la separación entre las células dentro del canal. Por ejemplo, la región de expansión/contracción después de la región de enfoque de las células se puede usar para aumentar la separación entre las células dentro del canal (Figura 4B). Alternativamente, se puede usar una región de expansión/contracción después de la región de enfoque de células para disminuir la separación entre las células dentro del canal. En

5 algunas realizaciones, las dimensiones del canal pueden disminuir a lo largo del chip para facilitar el filtrado de la muestra, o por otras razones específicas de una aplicación, tal como crear resistencia al fluido. Las dimensiones del canal pueden ser mayores en el área de entrada o en el área de salida para permitir que las bifurcaciones o sistemas de válvulas se coloquen dentro de los canales, o para permitir que múltiples líneas de corriente se separen y se dirijan a diferentes ubicaciones para su análisis o recolección. De manera similar, las secciones transversales de varios canales también se pueden cambiar según sea necesario dentro de un solo chip para manipular líneas de corriente de células enfocadas para aplicaciones particulares. En general, cualquier combinación de geometrías de canal, secciones transversales de canal y dimensiones de canal se puede incluir en un solo chip según sea necesario para clasificar, separar, ordenar y enfocar células de un tamaño predeterminado o células de múltiples tamaños predeterminados. Por ejemplo, se pueden usar diferentes geometrías de canal y velocidades de flujo para las corrientes de flujo de células y fluido de células para asegurar el enfoque y el ordenamiento deseados en cada corriente antes de la generación de gotitas.

15 En una realización, se forma una sección recta del canal celular en el chip cerca de la entrada para transportar y dividir las líneas de flujo a medida que la célula se introduce en el sistema de microfluidos. La sección recta de cada canal puede pasar a cualquier número de canales curvados simétricos y/o asimétricos para enfocar células de un tamaño predeterminado según sea necesario.

20 En algunas realizaciones, el canal 304 de perlas puede tener una región de expansión/contracción como se muestra en la Figura 4B que permite el ajuste de la separación entre las perlas dentro del canal. En algunas realizaciones, uno o ambos de los canales 308, 310 de células pueden tener una región de expansión/contracción que permite el ajuste de la separación entre las perlas dentro del canal.

25 Como se muestra en la Figura 3, la entrada 306 de la célula está configurada para introducir células suspendidas en un fluido de células en el sistema 300 de microfluidos. La entrada 312 de aceite está configurada para introducir aceite de generación de gotitas en la unión 326 de generación de gotitas a través de los canales 314, 316 de aceite. Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido 324 acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiples frecuencias, con que las perlas alcanzan la unión 326 de generación de gotitas. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente del fluido acuoso de células con la misma frecuencia que las células alcanzan la unión 326 de generación de gotitas. En la salida 318, del dispositivo las gotitas salen del dispositivo 300 de microfluidos de una manera ordenada y cada gotita encapsula generalmente una perla y/o una célula en el diseño particular ilustrado en la Figura 3. En algunas realizaciones, cada gotita encapsula generalmente un número predeterminado de perlas mayor o igual a cero y un número predeterminado de células mayor o igual a cero. Por ejemplo, cada gotita puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 perlas, y cada gotita puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 células. En algunas realizaciones, la distribución estadística de perlas es menos que óptima, por ejemplo, menos de 1 perla por gotita. En algunas realizaciones, la distribución estadística de células es menos que óptima, por ejemplo, menos de 1 célula por gotita.

40 El chip 320 también puede incluir una sección recta de canal en una región de salida para el análisis de partículas enfocadas, recolección de partículas enfocadas y/o para recombinar líneas de corriente.

45 Como apreciarán los expertos en la técnica, se puede incluir cualquier número de curvas o secciones rectas según sea necesario dentro del chip para uno o más de los canales 304 de perlas, canales 308, 310 de células. Secciones curvas adicionales de canales pueden servir como "rampas de salida" para corrientes de perlas enfocadas para facilitar una separación adicional basada en marcadores o etiquetas asociados con las perlas. Se pueden incluir bifurcaciones o divisiones de canal en cualquier posición dentro de los canales para facilitar aún más la manipulación de perlas enfocadas según sea necesario para diversas aplicaciones.

50 Las relaciones de aspecto de todos los canales descritos anteriormente y en este documento, incluidos rectos, simétricos y asimétricos, pueden variar según sea necesario de una aplicación a otra y/o tantas veces como sea necesario en el curso de un canal. En las realizaciones ilustradas en las Figuras 1-4, las relaciones de aspecto se muestran como 1 a 1 y 1 a 2; sin embargo, un experto en la materia reconocerá que se podría emplear una variedad de relaciones de aspecto. Además, la elección de ancho a alto como estándar para determinar la relación de aspecto es algo arbitraria en el sentido de que la relación de aspecto puede tomarse como la relación entre una primera dimensión de canal de sección transversal y una segunda dimensión de canal de sección transversal, y para canales rectangulares, esto sería ancho a alto o alto a ancho. A modo de ejemplo adicional, la relación de aspecto del canal de la Figura 2B podría expresarse como 2 a 1 o 1 a 2.

60 También se pueden incluir otras secciones transversales de canal en cada una de las geometrías indicadas anteriormente. Las secciones transversales del canal pueden incluir, pero no se limitan a, circular, triangular, romboidal y hemisférica. Pueden enfocarse perlas de un tamaño predeterminado en cada una de estas secciones transversales ejemplares, y las posiciones de enfoque dependerán de la geometría del canal. Por ejemplo, en un canal recto que tiene una sección transversal circular o hemisférica, se puede formar un anillo o arco de perlas enfocadas dentro del canal. En un canal recto que tiene una sección transversal triangular o de diamante, las perlas pueden enfocarse en corrientes correspondientes a posiciones de enfoque a una distancia de las caras planas de

cada pared en la geometría. Como se incluyen canales curvados simétricos y asimétricos que tienen cada uno las secciones ejemplares transversales indicadas anteriormente, las corrientes de enfoque y las posiciones de enfoque pueden corresponder generalmente a las descritas anteriormente con respecto a los canales que tienen una sección transversal rectangular.

5 En general, existen ciertos parámetros dentro de los canales de microfluidos rectos, simétricos y asimétricos que conducen a condiciones óptimas de ordenamiento y enfoque para las perlas suspendidas dentro de una muestra. Estos parámetros pueden incluir, por ejemplo, geometrías de canal, tamaño de perlas con respecto a geometrías de canales, propiedades del flujo de fluido a través de canales de microfluidos y fuerzas asociadas con perlas que fluyen dentro de canales de microfluidos en condiciones de flujo laminar. Las fuerzas que actúan sobre las perlas pueden denominarse fuerzas de inercia, sin embargo, es posible que otras fuerzas contribuyan a los comportamientos de enfoque y ordenamiento. Las fuerzas de inercia ejemplares pueden incluir, pero no se limitan a, gradientes de cizallamiento de elevación por inercia hacia abajo y lejos de las paredes del canal, arrastre de Dean (arrastre viscoso), arrastre de presión del flujo de Dean y fuerzas centrífugas que actúan sobre perlas individuales.

15 Múltiples canales de perlas en un chip

Se puede formar cualquier número de canales de perlas de microfluidos en el chip de diversas formas. En una realización ejemplar, se forma un solo canal de perlas en el chip para enfocar perlas en el mismo. En otras realizaciones ejemplares, se puede formar una pluralidad de canales de perlas en el chip en varias configuraciones de redes para enfocar perlas. Por ejemplo, se pueden formar 2, 4, 6, 8, 10, 12 y más canales en el chip. También se puede incluir cualquier número de capas dentro de un chip microfabricado del sistema, teniendo cada capa múltiples canales de perlas formados en el mismo.

25 Múltiples canales de célula en un chip

Se puede formar cualquier número de canales de células de microfluidos en el chip de diversas formas. En una realización ejemplar, se forma un único canal celular en el chip para enfocar perlas en el mismo. En otras realizaciones ejemplares, se puede formar una pluralidad de canales de células en el chip en varias configuraciones de redes para enfocar células. Por ejemplo, se pueden formar 2, 4, 6, 8, 10, 12 y más canales en el chip. También se puede incluir cualquier número de capas dentro de un chip microfabricado del sistema, teniendo cada capa múltiples canales de células formados en el mismo.

35 Longitud del canal de perlas

La interacción entre los diferentes parámetros, incluido el tamaño de los canales, el tamaño de las perlas, el caudal y las propiedades del fluido, afectan la longitud requerida para el enfoque de las perlas. Esta interacción en un canal está determinada por la siguiente fórmula:

$$L_f = \frac{\pi \mu h^2}{\rho U_m a^2 f_L}$$

45 en la que L_f es la longitud requerida para el enfoque de perlas; μ es la viscosidad dinámica del fluido; h es el tamaño del canal de perlas (o el diámetro hidráulico, u otra dimensión crítica del canal); ρ es la densidad del fluido; U_m es la velocidad de flujo máxima; a es el diámetro de la perla; y f_L es un factor, que está en el intervalo de 0,02-0,05 para la mayoría de los casos. Otros factores que afectan la longitud del canal de perlas incluyen características de pared, geometrías de pared, revestimientos de pared, tipos de fluidos, tipos y concentraciones de componentes en fluidos distintos de las perlas, formas de perlas, recubrimiento de las perlas y peso de las perlas.

50 La Tabla 1 muestra ejemplos de las longitudes para la separación de perlas, el enfoque y el ordenamiento de perlas de 30-50 μm que son relevantes para experimentos de células individuales de alto rendimiento en un líquido acuoso con propiedades cercanas a las del agua. El número de posiciones de enfoque depende de la configuración de la entrada (entrada única frente a entrada doble) y sus caudales relativos. El primer número de esa columna corresponde al caso estándar de tener una sola entrada.

55 **Tabla 1.** Longitudes necesarias para el ordenamiento de perlas para perlas de 30-50 μm .

Dimensión del canal (μm)	Relación de aspecto	# de posiciones de enfoque	50 $\mu\text{l/min}$		60 $\mu\text{l/min}$	
			Perla de 30 μm	Perla de 50 μm	Perla de 30 μm	Perla de 50 μm
125 x 125	1	4 o 3 o 1	1,4 - 3,6 cm	0,5 - 1,3 cm	1,2 - 3 cm	0,4 - 1,1 cm
125 x 100	1,25	2 o 1	0,7 - 1,8 cm	0,2 - 0,7 cm	0,6 - 1,5 cm	0,2 - 0,6 cm
125 x 80	1,56	2 o 1	0,3 - 1 cm	0,1 - 0,3 cm	0,3 - 0,8 cm	0,1 - 0,3 cm

En una realización mostrada en la Figura 5A, un sistema 500A de microfluidos tiene un canal de perlas recto que tiene una dimensión de 125 x 125 μm . El sistema 500A de microfluidos incluye tres entradas: una entrada 502A de perlas que se conecta a un solo canal 504A de perlas, una entrada 506A de células que se conecta a dos canales 508A, 510A de células en los dos lados del canal 504A de perlas y una entrada 512A de aceite que se conecta a dos canales 514A, 516A de aceite que son los canales más externos del sistema 500A y están próximos a los canales 508A, 510A de células alejados del canal 504A de perlas. El sistema 500A de microfluidos generalmente tiene una salida 518A del sistema.

La entrada 502A de perlas está configurada para introducir perlas suspendidas en un fluido de perlas en el sistema 500A de microfluidos. Las perlas pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. La entrada 502A de perlas puede tener filtros 542A de perlas que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan el canal 504A de perlas. La separación entre los filtros 542A de perlas deben ser al menos 2-3 veces el tamaño de las perlas para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 542A de perlas sin el riesgo de obstruir el canal 504A de perlas. Por ejemplo, la separación entre los filtros 542A de perlas pueden ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las perlas.

La entrada 506A de células está configurada para introducir células suspendidas en un fluido de células en el sistema 500A de microfluidos. La entrada 506A de células puede tener filtros 544A de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 508A, 510A de células. La separación entre los filtros 544A de células deben ser al menos 2-3 veces el tamaño de las células para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 544A de células sin riesgo de obstruir los canales 508A, 510A de células. Por ejemplo, la separación entre los filtros 544A de célula puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~5-10 veces el tamaño de las células.

La entrada 512A de aceite está configurada para introducir aceite de generación de gotitas en la unión 526A de generación de gotitas a través de los canales 514A, 516A de aceite. La entrada 512A de aceite puede tener filtros 546A de células que evitan que partículas no deseadas, tales como polvo, entren y obstruyan los canales 514A, 516A de aceite. La separación entre los filtros 546A de aceite depende de las características del aceite usado, tales como la viscosidad, de manera que el aceite puede fluir a través de los filtros 546A de aceite sin el riesgo de obstruir los canales 514A, 516A de aceite. Por ejemplo, la separación entre los filtros 546A de aceite puede ser de 300 μm .

Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido 524A acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 526A de generación de gotitas debido al enfoque inercial. De forma similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 526A de generación de gotitas debido al enfoque inercial. En la salida 518A del dispositivo, las gotitas salen del dispositivo 500 de microfluidos de una forma ordenada, encapsulando cada gotita generalmente una perla y/o una célula en general. El diseño y las concentraciones de entrada se pueden ajustar de manera que no todas las gotitas tengan una sola perla o célula si es necesario. Por ejemplo, cada gotita puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 perlas, y cada gotita puede tener 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, aproximadamente 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 células. En algunas realizaciones, la distribución estadística de perlas es menos que óptima, por ejemplo, menos de 1 perla por gotita. En algunas realizaciones, la distribución estadística de células es menos que óptima, es decir, menos de 1 célula por gotita.

En una realización como se muestra en la Figura 5B, un sistema 500B de microfluidos tiene un canal de perlas recto que tiene una dimensión de 125 x 125 μm . El sistema 500B de microfluidos incluye cuatro entradas: dos entradas 502B, 503B de perlas que se conectan a un canal 504B de perlas (ambas entradas tienen solución de perlas, pero solo una de ellas contiene perlas mientras que la otra no contiene perlas), una entrada 506B de células que se conecta a dos canales 508B, 510B de células en los dos lados del canal 504B de perlas, y una entrada 512B de aceite que se conecta a dos canales 514B, 516B de aceite que son los canales más externos del sistema 500B y están al lado de los canales 508B, 510B de células lejos del canal 504B de perlas. El diseño de flujo simultáneo de doble entrada da como resultado un ordenamiento eficiente de las perlas. Los dos canales 508B, 510B de células en este sistema de flujo simultáneo de doble entrada son más largos en comparación con los dos canales 508A, 510A de células que se muestran en la Figura 5A, aunque ambos sistemas de microfluidos tienen la misma dimensión del canal de perlas de 125 x 125 μm . Los dos canales 514B, 516B de aceite en este sistema de flujo simultáneo de doble entrada son más largos en comparación con los dos canales 514A, 516A de aceite que se muestran en la Figura 5A, aunque ambos sistemas de microfluidos tienen la misma dimensión del canal de perlas de 125 x 125 μm . El sistema 500B de microfluidos generalmente tiene una salida 518B del sistema.

La entrada 502B de perlas está configurada para introducir perlas suspendidas en un fluido de perlas en el sistema 500B de microfluidos. Las perlas pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. La entrada 503B de perlas está configurada para introducir fluido que no contiene perlas. Las entradas 502B, 503B de perlas pueden tener filtros 542B, 543B de perlas respectivamente que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 504B de perlas. La separación entre los filtros 542B, 543B de perlas debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las perlas para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 542B, 543B de perlas sin el riesgo de obstruir el canal 504B de perlas. Por ejemplo, la separación entre los filtros 542B, 543B de perlas puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las perlas.

Este sistema 500B de flujo simultáneo de doble entrada conduce a un ordenamiento más eficaz de las perlas a lo largo del canal. El flujo simultáneo con fluido sin perlas confina las perlas en un lado de un microcanal, lo que da como resultado una única línea de perlas con un espacio regular. La entrada 506B de células está configurada para introducir células suspendidas en un fluido de células en el sistema 500B de microfluidos. La entrada 506B de células puede tener filtros 544B de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 508B, 510B de células. La separación entre los filtros 544B de células debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las células para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 544B de células sin el riesgo de obstruir los canales 508B, 510B de células. Por ejemplo, la separación entre los filtros 544B de células puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5 -10 veces el tamaño de las células.

La entrada 512B de aceite está configurada para introducir aceite de generación de gotitas en la unión 526B de generación de gotitas a través de los canales 514B, 516B de aceite. La entrada 512B de aceite puede tener filtros 546B de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 514B, 516B de aceite. La separación entre los filtros 546B de aceite depende de las características del aceite usado, tales como la viscosidad, por lo que el aceite puede fluir a través de los filtros 546B de aceite sin el riesgo de obstruir los canales 514B, 516B de aceite. Por ejemplo, la separación entre los filtros 546B de aceite puede ser de 300 μm .

Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido 524B acuoso de perlas a la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 526B de generación de gotitas debido al enfoque inercial. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente del fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 526B de generación de gotitas debido al enfoque inercial. En la salida 518B del dispositivo, se encontró que las gotitas salían del dispositivo 500 de microfluidos de una manera ordenada con cada gotita encapsulando generalmente una perla y/o una célula en general.

Con un caudal de fluido de perlas de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ y 125 x 125 μm , la separación de perlas de 30 y 50 μm requirió 1,4-3,6 cm y 0,5-1,3 cm respectivamente. Con un caudal de fluido de perlas de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, la separación de perlas de 30 y 50 μm requirió 1,2-3 cm y 0,4-1,1 cm respectivamente. La longitud del canal se puede ajustar para cualquier solución de perlas diferente para adaptarse al cambio en la longitud de enfoque debido a cambios en la densidad o viscosidad del fluido.

En una realización como se muestra en la Figura 5C, un sistema 500C de microfluidos tiene un canal de perlas recto que tiene una dimensión de 125 x 100 μm . El sistema 500C de microfluidos incluye tres entradas: una entrada 502C de perlas que se conecta a un canal 504C de perlas, una entrada 506C de células que se conecta a dos canales 508C, 510C de células en los dos lados del canal 504C de perlas y una entrada 512C de aceite que se conecta a dos canales 514C, 516C de aceite que son los canales más externos del sistema 500C y están al lado de los canales 508C, 510C de células lejos del canal 504C de perlas. El sistema 500C de microfluidos generalmente tiene una salida 518C del sistema.

La entrada 504C de perlas está configurada para introducir perlas suspendidas en un fluido de perlas en el sistema 500C de microfluidos. Las perlas pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. La entrada 502C de perlas puede tener filtros 542C de perlas que evitan que partículas no deseadas, tales como polvo, entren y obstruyan el canal 504C de perlas. La separación entre los filtros 542C de perlas debería ser al menos 2-3 veces el tamaño de las perlas para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 542C de perlas sin el riesgo de obstruir el canal 504C de perlas. Por ejemplo, la separación entre los filtros 542C de perlas puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5 -10 veces el tamaño de las perlas.

La entrada 506C de células está configurada para introducir células suspendidas en un fluido de células en el sistema 500C de microfluidos. La entrada 506C de células puede tener filtros 544C de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 508C, 510C de células. La separación entre los filtros 544C de células debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las células para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 544C de células sin el riesgo de obstruir los canales 508C, 510C de células. Por ejemplo, la separación entre los filtros 544C de células puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5 -10 veces el tamaño de las células.

La entrada 512C de aceite está configurada para introducir aceite de generación de gotitas en la unión 526C de generación de gotitas a través de los canales 514C, 516C de aceite. La entrada 512C de aceite puede tener filtros 546C de células que evitan que partículas no deseadas, tales como polvo, entren y obstruyan los canales 514C, 516C de aceite. La separación entre los filtros 546C de aceite depende de las características del aceite usado, tales como la viscosidad, por lo que el aceite puede fluir a través de los filtros 546C de aceite sin el riesgo de obstruir los canales 514C, 516C de aceite. Por ejemplo, la separación entre los filtros 546C de aceite puede ser de 300 μm .

Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido 524C acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 526C de generación de gotitas debido al enfoque inercial. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 526C de generación de gotitas debido al enfoque

inercial. En la salida 518C del dispositivo, las gotitas salen del dispositivo 500C de microfluidos de una manera ordenada, encapsulando cada gotita generalmente una perla y/o una célula en general.

En una realización como se muestra en la Figura 5D, un sistema 500D de microfluidos tiene un canal de perlas recto que tiene una dimensión de 125 x 100 μm . El sistema 500D de microfluidos incluye cuatro entradas: dos entradas 502D, 503D de perlas que se conectan a un canal 504D de perlas, una entrada 506D de células que se conecta a dos canales 508D, 510D de células en los dos lados del canal 504D de perlas y una entrada 512D de aceite que se conecta a dos canales 514D, 516D de aceite que son los canales más externos del sistema 500D y están próximos a los canales 508D, 510D de células lejos del canal 504D de perlas. El diseño de flujo simultáneo de doble entrada da como resultado un ordenamiento eficiente de las perlas. Los dos canales 508D, 510D de células en este sistema de flujo simultáneo de doble entrada son más largos en comparación con los dos canales 508C, 510C de células que se muestran en la Figura 5A aunque ambos sistemas de microfluidos tienen la misma dimensión de canal de perlas de 125 x 100 μm . Los dos canales 514D, 516D de aceite en este sistema de flujo simultáneo de doble entrada son más largos en comparación con los dos canales 514C, 516C de aceite que se muestran en la Figura 5C, aunque ambos sistemas de microfluidos tienen la misma dimensión del canal de perlas de 125 x 100 μm . El sistema 500D de microfluidos generalmente tiene una salida 518D del sistema.

La entrada 502D de perlas está configurada para introducir perlas suspendidas en un fluido de perlas en el sistema 500D de microfluidos. Las perlas pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. La entrada 503D de perlas está configurada para introducir fluido que no contiene perlas. Las entradas 502D, 503D de perlas pueden tener filtros 542D, 543D, de perlas respectivamente, que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 504D de perlas. La separación entre los filtros 542D, 543D de perlas debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las perlas para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 542D, 543D de perlas sin el riesgo de obstruir el canal 504D de perlas. Por ejemplo, la separación entre los filtros 542D, 543D de perlas puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las perlas.

Este sistema 500D de flujo simultáneo de doble entrada conduce a un ordenamiento más eficaz de las perlas a lo largo del canal. El flujo simultáneo con fluido sin perlas confina las perlas en un lado de un microcanal, lo que da como resultado una única línea de perlas con una separación regular. La entrada 506D de células está configurada para introducir células suspendidas en un fluido de células en el sistema 500D de microfluidos. La entrada 506D de células puede tener filtros 544D de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 508D, 510D de células. La separación entre los filtros 544D de células debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las células para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 544D de células sin el riesgo de obstruir los canales 508D, 510D de células. Por ejemplo, la separación entre los filtros 544D de células puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las células.

La entrada 512D de aceite está configurada para introducir aceite de generación de gotitas en la unión 526D de generación de gotitas a través de los canales 514D, 516D de aceite. La entrada 512D de aceite puede tener filtros 546D de células que evitan que partículas no deseadas como el polvo entren y obstruyan los canales 514D, 516D de aceite. La separación entre los filtros 546D de aceite depende de las características del aceite utilizado, tales como la viscosidad, por lo que el aceite puede fluir a través de los filtros 546D de aceite sin el riesgo de obstruir los canales 514D, 516D de aceite. Por ejemplo, la separación entre los filtros 546A de aceite puede ser de 300 μm .

Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente del fluido 524D acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 526D de generación de gotitas debido al enfoque inercial. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 526D de generación de gotitas debido al enfoque inercial. En la salida 518D del dispositivo, las gotitas salen del dispositivo 500D de microfluidos de una manera ordenada y cada gotita encapsula una perla y/o una célula en general.

Con un caudal de fluido de perlas de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una dimensión de canal de 125 x 100 μm , la separación de perlas de 30 y 50 μm requiere 0,7-1,8 cm y 0,2-0,7 cm respectivamente. Con un caudal de fluido de perlas de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, la separación de perlas de 30 y 50 μm requiere 0,6-1,5 cm y 0,2-0,6 cm respectivamente.

En una realización como se muestra en la Figura 5E, un sistema 500E de microfluidos tiene un canal de perlas recto que tiene una dimensión de 125 x 100 μm . El sistema 500E de microfluidos incluye tres entradas: una entrada 502E de perlas que se conecta a un canal 504E de perlas, una entrada 506E de células que se conecta a dos canales 508E, 510E de células en los dos lados del canal 504E de perlas y una entrada 512E de aceite que se conecta a dos canales 514E, 516E de aceite que son los canales más externos del sistema 500E y están próximos a los canales 508E, 510E de células lejos del canal 504E de perlas. El sistema 500E de microfluidos generalmente tiene una salida 518E del sistema.

La entrada 504E de perlas está configurada para introducir perlas suspendidas en un fluido de perlas en el sistema 500E de microfluidos. Las perlas pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. La entrada 502E de perlas puede tener filtros 542E de perlas que evitan que partículas no deseadas, tales como polvo, entren y obstruyan el canal 504E de perlas. La separación entre los filtros 542E de perlas debe ser al menos 2-3 veces el

tamaño de las perlas para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 542E de perlas sin el riesgo de obstruir el canal 504E de perlas. Por ejemplo, la separación entre los filtros 542E de perlas puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las perlas.

5 La entrada 506E de células está configurada para introducir células suspendidas en un fluido de células en el sistema 500E de microfluidos. La entrada 506E de células puede tener filtros 544E de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 508E, 510E de células. La separación entre los filtros 544E de células debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las células para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 544E de células sin el riesgo de obstruir los canales 508E, 510E de células. Por ejemplo, la separación entre los filtros 544E de células puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las células.

15 La entrada 512E de aceite está configurada para introducir aceite de generación de gotitas en la unión 526E de generación de gotitas a través de los canales 514E, 516E de aceite. La entrada 512E de aceite puede tener filtros 546E de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 514E, 516E de aceite. La separación entre los filtros 546E de aceite depende de las características del aceite utilizado, tales como la viscosidad, por lo que el aceite puede fluir a través de los filtros 546E de aceite sin el riesgo de obstruir los canales 514F, 516F de aceite. Por ejemplo, la separación entre los filtros 546E de aceite puede ser de 300 μm .

20 Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido 524E acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 526E de generación de gotitas debido al enfoque inercial. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 526E de generación de gotitas debido al enfoque inercial. En la salida 518E del dispositivo, las gotitas salen del dispositivo 500E de microfluidos de una manera ordenada, encapsulando generalmente en cada gotita una perla y/o una célula en general.

30 En una realización como se muestra en la Figura 5F, un sistema 500F de microfluidos tiene un canal de perlas recto que tiene una dimensión de 125 x 100 μm . El sistema 500F de microfluidos incluye cuatro entradas: dos entradas 502F, 503F de perlas que se conectan a un canal 504F de perlas, una entrada 506F de células que se conecta a dos canales 508F, 510F de células en los dos lados del canal 504F de perlas y una entrada 512F de aceite que se conecta a dos canales 514F, 516F de aceite que son los canales más externos del sistema 500F y están próximos a los canales 508F, 510F de células alejados del canal 504F de perlas. El diseño de flujo simultáneo de doble entrada da como resultado un ordenamiento eficiente de las perlas. Los dos canales 508F, 510F de células en este sistema de flujo simultáneo de doble entrada son más largos en comparación con los dos canales 508E, 510E de células que se muestran en la Figura 5E, aunque ambos sistemas de microfluidos tienen la misma dimensión de canal de perlas de 125 x 80 μm . Los dos canales 514F, 516F de aceite en este sistema de flujo simultáneo de doble entrada son más largos en comparación con los dos canales 514E, 516E de aceite que se muestran en la Figura 5E, aunque ambos sistemas de microfluidos tienen la misma dimensión del canal de perlas de 125 x 80 μm . El sistema 500F de microfluidos generalmente tiene una salida 518F del sistema.

40 La entrada 502F de perlas está configurada para introducir perlas suspendidas en un fluido de perlas en el sistema 500F de microfluidos. Las perlas pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. La entrada 503F de perlas está configurada para introducir fluido que no contiene perlas. Las entradas 502F, 503F de perlas pueden tener filtros 542F, 543F de perlas, respectivamente, que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 504F de perlas. La separación entre los filtros 542F, 543F de perlas debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las perlas para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 542F, 543F de perlas sin el riesgo de obstruir el canal 504F de perlas. Por ejemplo, la separación entre los filtros 542F, 543F de perlas puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las perlas.

50 Este sistema 500F de flujo simultáneo de doble entrada conduce a un ordenamiento más eficiente de las perlas a lo largo del canal. El flujo simultáneo con fluido sin perlas confina las perlas en un lado de un microcanal, lo que da como resultado una única línea de perlas con una separación regular. La entrada 506F de células está configurada para introducir células suspendidas en un fluido de células en el sistema 500F de microfluidos. La entrada 506F de células puede tener filtros 544F de células que evitan que partículas no deseadas tales como polvo entren y obstruyan los canales 508F, 510F de células. La separación entre los filtros 544F de células debe ser al menos 2-3 veces el tamaño de las células para que todas las perlas puedan fluir a través de los filtros 544F de células sin el riesgo de obstruir los canales 508F, 510F de células. Por ejemplo, la separación entre los filtros 544F de células puede ser de 300 μm , por ejemplo, ~ 5-10 veces el tamaño de las células.

60 La entrada 512F de aceite está configurada para introducir aceite de generación de gotitas a la unión 526F de generación de gotitas a través de los canales 514F, 516F de aceite. La entrada 512F de aceite puede tener filtros 546F de células que evitan que partículas no deseadas, tales como polvo, entren y obstruyan los canales 514F, 516F de aceite. La separación entre los filtros 546F de aceite depende de las características del aceite utilizado, tales como la viscosidad, por lo que el aceite puede fluir a través de los filtros 546F de aceite sin el riesgo de obstruir los canales 514F, 516F de aceite. Por ejemplo, la separación entre los filtros 546F de aceite puede ser de 300 μm .

65

Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido 524F acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 526F de generación de gotitas debido al enfoque inercial. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 526F de generación de gotitas debido al enfoque inercial. En la salida 518F del dispositivo, las gotitas salen del dispositivo 500F de microfluidos de una manera ordenada, encapsulando en cada gotita una perla y/o una célula en general.

Con un caudal de fluido de perlas de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ y una dimensión de canal de 125 x 80 μm , la separación de perlas de 30 y 50 μm requirió 0,7-1,8 cm y 0,2-0,7 cm respectivamente. Con un caudal de fluido de perlas de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$, la separación de perlas de 30 y 50 μm requiere 0,6-1,5 cm y 0,2-0,6 cm respectivamente.

Longitud del canal celular

La interacción entre diferentes parámetros, incluido el tamaño del canal, el tamaño de la célula, el caudal y las propiedades del fluido, afectan la longitud requerida para el enfoque de la célula. Esta interacción en un canal está determinada por la siguiente fórmula:

$$L_f = \frac{\pi \mu h^2}{\rho U_m a^2 f_L}$$

en la que L_f es la longitud requerida para el enfoque de la célula; μ es la viscosidad dinámica del fluido; h es el tamaño del canal de la célula (o el diámetro hidráulico u otra dimensión crítica del canal); ρ es la densidad del fluido; U_m es la velocidad máxima de flujo; a es el diámetro de la célula; y f_L es un factor en el intervalo de 0,02-0,05 para la mayoría de los casos. Otros factores que afectan la longitud del canal de la célula incluyen características de la pared, geometrías de la pared, recubrimientos de la pared, tipos de fluidos, tipos y concentraciones de componentes en fluidos distintos de las células, forma de la célula, recubrimiento de la superficie de la célula y estado de la célula.

Relaciones de perla a volumen

En otro aspecto del sistema, una relación de perla a volumen se puede manipular o ajustar opcionalmente para la conservación de la masa dentro de los canales. En general, la separación, el ordenamiento y el enfoque de la perla depende, en parte, de la separación entre la perla dentro de los canales, así como de la relación entre el tamaño de la perla y el tamaño hidrodinámico del canal. Varias geometrías de canal descritas en el presente documento pueden requerir que se enfoque una relación predeterminada entre la perla y el volumen de la perla con el fin de lograr una separación requerida entre la perla y así mantener el orden y el enfoque de esa perla. En particular, la relación de perla a volumen de una perla suspendida dentro de un fluido se puede calcular y ajustar según sea necesario para lograr el enfoque dentro de ciertas geometrías de canal. En general, se puede determinar una relación máxima de perla a volumen para un tamaño de perla y una geometría de canal específicos usando la fórmula, asumiendo un canal rectangular y posiciones de enfoque no superpuestas:

$$\text{Fracción de volumen máx} = \frac{N \pi a^2}{6 h w}$$

en la que N es el número de posiciones de enfoque en un canal, a es el diámetro de la perla enfocada, h es la altura del canal y w es el ancho del canal. Por lo tanto, las perlas se pueden diluir o concentrar para alcanzar una relación predeterminada antes y/o durante la introducción de la perla en el sistema. Además, ciertos sistemas ejemplares pueden requerir que se ajuste la relación después de que se introduzca la perla en los canales.

Las relaciones de perla a volumen de una perla dentro de los canales descritos en este documento pueden tener cualquier valor suficiente para permitir el orden y el enfoque de las perlas. En general, la relación entre perla y volumen puede ser inferior al 50% aproximadamente. En otras realizaciones, las relaciones de perla a volumen pueden ser menores de aproximadamente 40%, 30%, 20%, 10%, 8% o 6%. Más particularmente, en algunas realizaciones, las relaciones de perla a volumen pueden estar en un intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 5%, y pueden estar en un intervalo de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 4%. Alternativamente, la relación puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3%. Alternativamente, la relación puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%. Como apreciarán los expertos en la técnica, no es necesario considerar o ajustar la relación de perla a volumen de perlas adicionales o extrañas dentro de la perla, además de la perla a enfocar. Como apreciarán además los expertos en la técnica, cualquier número de perlas puede no requerir ningún ajuste en la relación de perla a volumen de la perla para enfocar antes, durante y/o después de la introducción en el sistema.

En las realizaciones descritas en el presente documento se pueden usar diversas técnicas comúnmente usadas para diluir o concentrar perlas para ajustar una relación de perla a volumen. Por ejemplo, una perla se puede diluir o

concentrar en lotes antes de la introducción en el sistema de modo que la perla finalmente introducida en el sistema tenga la relación requerida antes de ser introducida a través de la entrada. En otras realizaciones, el sistema puede incluir dos o más entradas para introducir la perla simultáneamente con un diluyente o concentrado para efectuar la dilución o concentración. De esta manera, la relación de perla a volumen se puede ajustar dentro del sistema, ya sea que el ajuste se produzca dentro de una cámara antes de que la perla y el diluyente o el concentrado entren en los canales o si el ajuste se produzca mediante la mezcla de la perla y el diluyente o concentrado dentro de los canales. En otra realización, el diluyente o concentrado se puede introducir en una porción central, bifurcación o rama de un canal según lo requieran diversas aplicaciones después de que la perla no ajustada haya viajado dentro del canal una cierta distancia. Una persona experta en la técnica apreciará las variaciones posibles para ajustar la relación de perla a volumen de una perla dentro de las realizaciones descritas en este documento.

Relaciones de célula a volumen

En otro aspecto del sistema, una relación de célula a volumen se puede manipular o ajustar opcionalmente para la conservación de la masa dentro de los canales. En general, la separación, el ordenamiento y el enfoque de las células depende, en parte, de la separación entre células dentro de los canales, así como de la relación entre el tamaño de la célula y el tamaño hidrodinámico del canal. Varias geometrías de canal descritas en el presente documento pueden requerir que se enfoque una relación de célula a volumen predeterminada de la célula para lograr una separación requerida entre células y así mantener el orden y el enfoque de esa célula. En particular, la relación de célula a volumen de una célula suspendida dentro de un fluido se puede calcular y ajustar según sea necesario para lograr el enfoque dentro de ciertas geometrías de canal. En general, se puede determinar una relación máxima de célula a volumen para un tamaño de célula específica y geometría de canal usando la fórmula, asumiendo un canal rectangular y posiciones de enfoque no superpuestas:

$$\text{Fracción de volumen máx} = \frac{N \pi a^2}{6 h w}$$

en la que N es el número de posiciones de enfoque en un canal, a es el diámetro de la célula enfocada, h es la altura del canal y w es el ancho del canal. Por lo tanto, las células se pueden diluir o concentrar para alcanzar una relación predeterminada antes y/o durante la introducción de la célula en el sistema. Además, ciertos sistemas ejemplares pueden requerir que se ajuste la relación después de que la célula se introduzca en los canales.

Las relaciones de célula a volumen de una célula dentro de los canales descritos en este documento pueden tener cualquier valor suficiente para permitir el orden y el enfoque de las células. En general, la relación de célula a volumen puede ser inferior a aproximadamente el 50%. En otras realizaciones, las relaciones de célula a volumen pueden ser inferiores a aproximadamente 40%, 30%, 20%, 10%, 8% o 6%. Más particularmente, en algunas realizaciones, las relaciones de célula a volumen pueden estar en un intervalo de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 5%, y pueden estar en un intervalo de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 4%. Alternativamente, la relación puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 3%. Alternativamente, la relación puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2%. Como apreciarán los expertos en la técnica, la relación de célula a volumen de células adicionales o extrañas dentro de la célula, además de la célula a enfocar, no necesita ser considerada o ajustada necesariamente. Como apreciarán además los expertos en la técnica, cualquier número de células puede no requerir ningún ajuste en la relación de célula a volumen de la célula a enfocar antes, durante y/o después de la introducción en el sistema.

En las realizaciones descritas en el presente documento se pueden usar diversas técnicas de uso común para diluir o concentrar células para ajustar una relación de célula a volumen. Por ejemplo, una célula se puede diluir o concentrar en lotes antes de la introducción en el sistema de modo que la célula finalmente introducida en el sistema tenga la relación requerida antes de ser introducida por la entrada. En otras realizaciones, el sistema puede incluir dos o más entradas para introducir la célula simultáneamente con un diluyente o concentrado para efectuar la dilución o concentración. De esta manera, la relación de célula a volumen se puede ajustar dentro del sistema, ya sea que el ajuste se produzca dentro de una cámara antes de que la célula y el diluyente o concentrado entren en los canales o si el ajuste se produzca mediante la mezcla de la célula y el diluyente o concentrado dentro de los canales. En otra realización, el diluyente o concentrado puede introducirse en una porción central, bifurcación o rama de un canal según lo requieran diversas aplicaciones después de que la célula no ajustada haya recorrido alguna distancia dentro del canal. Una persona experta en la técnica apreciará las variaciones posibles para ajustar la relación de célula a volumen de una célula dentro de las realizaciones descritas en este documento.

Enfoque inercial y generación de gotitas

En algunas realizaciones, el enfoque inercial de perlas puede combinarse con la generación de gotitas para producir concentraciones extremadamente altas de gotitas y una perla λ cercana a 1, pero evitando tener gotitas con ocupación de perlas múltiples. λ es el promedio de la distribución de Poisson, la probabilidad de que ocurra un

evento, tal como una gotita con una sola perla. El efecto de la distribución de Poisson sobre el análisis y clasificación de una sola célula utilizando microfluidos basados en gotitas se ha descrito en Mazutis et al., Nature Protocols 8: 870-91 (2013), que se incorpora en el presente documento como referencia. Esta alta concentración de gotitas con ocupación de una sola perla permite que los sistemas que requieren tales gotitas (tales como los sistemas de alto rendimiento de una sola célula) mejoren el rendimiento, por ejemplo, de 2 a 25 veces, o de 5 a 25 veces, o de 5 a 10 veces, o 10 a 20 veces, en comparación con otros procedimientos de encapsulación, con menor tasa de error (por ejemplo, menor proporción de gotitas con más de una perla).

En algunas realizaciones, el enfoque inercial de las células puede combinarse con la generación de gotitas para producir concentraciones extremadamente altas de gotitas y una célula λ cercana a 1, pero evitando tener gotitas con ocupación múltiple de células. λ para células es la probabilidad de que una gotita tenga solo una célula. Esta alta concentración de gotitas con ocupación de una sola célula permite que los sistemas que requieren tales gotitas (tales como los sistemas de alto rendimiento de una sola célula) mejoren el rendimiento, por ejemplo, de 2 a 25 veces, o de 5 a 25 veces, o de 5 a 10 veces, de 10 a 20 veces, en comparación con otros procedimientos de encapsulación, con menor tasa de error (por ejemplo, menor proporción de gotitas con más de una célula).

En algunas realizaciones, el enfoque, tales como el enfoque inercial, se emplea para partículas A y B, tal como perlas y células, para superar las dos distribuciones de Poisson, por ejemplo, una para perlas y otra para células, en estadísticas de Poisson doble. Este procedimiento crea un sistema con estadísticas de Poisson doble poco dispersa y una mejora adicional en el rendimiento (por ejemplo, al menos 5, 10, 25, 50 o 100 veces) sobre los sistemas no ordenados. Las realizaciones de la invención se pueden hacer funcionar de forma continua y con caudales volumétricos elevados con salidas en cascada. La invención tampoco requiere interacciones con filtros mecánicos u obstáculos y requiere muy poco mantenimiento.

En algunas realizaciones, las partículas tales como perlas, fragmentos de ácido nucleico y células pueden tener una distribución estadística distinta a Poisson, tal como distribución normal, distribución log-normal, distribución de Pareto, distribución uniforme discreta, distribución uniforme continua, distribución de Bernoulli, distribución binomial, distribución binomial negativa, distribución geométrica, distribución hipergeométrica, distribución beta-binomial, distribución categórica, distribución multinomial, distribución hipergeométrica multivariante, distribución log de Poisson, distribución exponencial, distribución gamma, distribución de Rayleigh, distribución de Rice, distribución Chi-cuadrado, distribución t de Student, distribución F, distribución Beta, distribución de Dirichlet y distribución de Wishart.

Una vez que se determinan la geometría del canal y el caudal adecuados para una perla particular (30-50 μm , por ejemplo), la concentración de perlas se puede ajustar para obtener un λ grande (aún menor que 1). Luego, se inyecta fluido de perlas en la entrada de perlas conectada al canal de perlas al caudal preestablecido (por ejemplo, 60 $\mu\text{l}/\text{min}$). Posteriormente, las células se inyectan en la conexión de entrada de células a los canales de células al caudal designado previamente (por ejemplo, 60 $\mu\text{l}/\text{min}$). Finalmente, el aceite de generación de gotitas se inyecta en la entrada de aceite conectada a los canales de aceite con el caudal adecuado (por ejemplo, 150-250 $\mu\text{l}/\text{min}$). El caudal de la tercera corriente (por ejemplo, aceite) puede ser igual o mayor que los caudales de los fluidos de perlas y células.

Se pueden usar principios similares para enfocar y ordenar células en el canal de células. Como resultado, se puede aumentar la eficiencia de captura de las células al mismo orden de magnitud que para las perlas. El resultado neto de la combinación de los dos flujos ordenados y sus eficiencias mejoradas es que ambas distribuciones de Poisson en las estadísticas de Poisson doble originales se superan para lograr una mayor mejora (por ejemplo, 50 veces o 100 veces) en el rendimiento.

La Figura 6 ilustra otra realización de un sistema 600 de microfluidos. Como se muestra, un canal 604 de perlas puede ser curvo o recto. Puede haber una o dos entradas de perlas conectadas al canal 604 de perlas. El sistema 600 de microfluidos generalmente incluye tres entradas: una entrada de perlas que se conecta a un canal 604 de perlas, una entrada de células que se conecta a dos canales 608, 610 de células en los dos lados del canal 604 de perlas, y una entrada de aceite que se conecta a dos canales 614, 616 de aceite que son los canales más externos del sistema 600 y están al lado de los canales 608, 610 de células lejos del canal 604 de perlas. El sistema 600 de microfluidos generalmente tiene una salida 618 del sistema. El sistema 600 de microfluidos se puede proporcionar en un chip microfabricado con los diversos canales formados en el chip.

Se configura una entrada de perlas para introducir perlas 622 suspendidas en un fluido 624 de perlas en el sistema 600 de microfluidos. Las perlas 622 pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. En general, el canal 604 de perlas puede tener una geometría específica diseñada para separar, ordenar y enfocar las perlas 622 en posiciones laterales predeterminadas en el canal al entrar en la unión 626 de generación de gotitas. Estas ubicaciones laterales corresponden a velocidades de flujo similares en el perfil de velocidad del fluido 624 de perlas de modo que, una vez enfocadas, las perlas 622 se mueven a velocidades similares y mantienen su separación y no se cruzan entre sí. Los canales de perlas utilizados en los sistemas de microfluidos pueden tener varias geometrías y secciones transversales para enfocar perlas de un tamaño predeterminado suspendidas dentro de un fluido. Por ejemplo, el canal 604 de perlas puede tener una sección transversal cuadrada.

La entrada de células está configurada para introducir las células 630 suspendidas en un fluido de células en el sistema 600 de microfluidos. La entrada de aceite está configurada para introducir el aceite 632 de generación de gotitas en la unión 626 de generación de gotitas a través de los canales 614, 616 de aceite. Los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente del fluido 624 acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 626 de generación de gotitas. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen las gotitas de la corriente del fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 626 de generación de gotitas. Las perlas 622 se ordenan antes de entrar en la unión 626 de generación de gotitas. Las células 630 se ordenan antes de ingresar a la unión 626 de generación de gotitas. Combinando la fuerza inercial y la generación de gotitas tanto para las perlas 622 como para las células 630, las gotitas 634 se forman con una perla y una célula cada una. Esta realización genera más gotitas de una sola partícula (por ejemplo, una célula y una perla) y menos gotitas vacías o de partículas múltiples (por ejemplo, dos perlas y una célula) de lo que hubiera sido posible a partir de la carga estocástica (Poisson).

La Figura 7 ilustra otra realización de un sistema 700 de microfluidos. Como se muestra, un canal 704 de perlas puede ser curvo o recto. Puede haber una o dos entradas de perlas conectadas al canal 704 de perlas. El sistema 700 de microfluidos generalmente incluye tres entradas: una entrada de perlas que se conecta a un canal 704 de perlas, dos entradas de células que se conectan a dos canales 708, 710 de células en los dos lados del canal 704 de perlas, y una entrada de aceite que se conecta a dos canales 714, 716 de aceite que son los canales más externos del sistema 700 y están al lado de los canales 708, 710 de células lejos del canal 704 de perlas. El sistema 700 de microfluidos generalmente tiene una salida 718 del sistema. El sistema 700 de microfluidos se puede proporcionar en un chip microfabricado con los diversos canales formados en el chip.

Una entrada de perlas está configurada para introducir perlas 722 suspendidas en un fluido 724 de perlas en el sistema 700 de microfluidos. Las perlas 722 pueden ser de cualquier densidad compuestas por varios materiales. En general, el canal 704 de perlas puede tener una geometría especificada diseñada para separar, ordenar y enfocar las perlas 722 en posiciones laterales predeterminadas en el canal al entrar en la unión 726 de generación de gotitas. Estas ubicaciones laterales corresponden a velocidades de flujo similares en el perfil de velocidad del fluido 724 de perlas de modo que, una vez enfocadas, las perlas 722 se mueven a velocidades similares y mantienen su separación y no se cruzan entre sí. Los canales de perlas utilizados en los sistemas de microfluidos pueden tener varias geometrías y secciones transversales para enfocar perlas de un tamaño predeterminado suspendidas dentro de un fluido. Por ejemplo, el canal 704 de perlas puede tener una sección transversal cuadrada.

Una entrada de células está configurada para introducir las células 730 suspendidas en un fluido de células en el sistema 700 de microfluidos a través del canal 708 de células. Otra entrada de células está configurada para introducir un fluido libre de células en el sistema 700 de microfluidos. La entrada de aceite está configurada para introducir aceite 732 de generación de gotitas en la unión 726 de generación de gotitas a través de los canales 714, 716 de aceite. Los dos flujos laterales de aceite extraen las gotitas de la corriente de fluido 724 acuoso de perlas con la misma frecuencia, o múltiplo de, las perlas que alcanzan la unión 726 de generación de gotitas. De manera similar, los dos flujos laterales de aceite extraen gotitas de la corriente de fluido acuoso de células con la misma frecuencia, o múltiplo de, las células que alcanzan la unión 726 de generación de gotitas. Las perlas 722 se ordenan antes de entrar en la unión 726 de generación de gotitas. Las células 730 se ordenan antes de entrar en la unión 726 de generación de gotitas. Combinando la fuerza inercial y la generación de gotitas tanto para las perlas 722 como para las células 730, las gotitas 734 se forman con una perla y una célula cada una. Esta realización genera más gotitas de una sola partícula (por ejemplo, una perla y una célula) y menos gotitas vacías o de múltiples partículas (por ejemplo, dos perlas y una célula) de las que hubieran sido posibles a partir de una carga estocástica (Poisson).

Ancho del canal de fluido en la convergencia del canal

Un parámetro de diseño a considerar es el ancho del canal de fluido después de que el canal de perlas y el canal de células se encuentran, y antes de la unión de formación de gotitas, por ejemplo, el ancho m en la Figura 15A. El fluido de perlas en esta región se comprime y se diluye por el fluido de células, lo que aumenta la distancia entre las perlas y reduce la tasa de ocupación de las perlas en las gotitas. Por lo tanto, el ancho m puede ajustarse para compensar este fenómeno y, a su vez, aumentar la eficacia de encapsulación de perlas en las gotitas.

Para solucionar esto, el ancho del canal m se incrementó proporcionalmente a la relación de los caudales de los fluidos de perlas y de células. En un ejemplo, el caudal del fluido de perlas fue de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ y el caudal del fluido de células fue de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. En este ejemplo, para mantener la misma distancia entre perlas después de que el fluido de perlas se combina con el fluido de células, la relación entre el ancho del canal m/b se incrementó en un 200% (ya que la relación entre el caudal total de fluidos de perlas y de células y el caudal de flujo de perlas = $60/30$). Además, el ancho del canal de fluidos, después de la unión de generación de gotitas por ejemplo, el ancho d , también fue más ancho en $\sim 200\%$ como se muestra en la Figura 15B. La relación del ancho del canal m/b puede variar desde 1 hasta tan alto como 3 dependiendo de los caudales de los fluidos de perla y células.

Modificación del canal para abordar el problema de la acumulación de perlas

Las perlas aglomeradas pueden afectar negativamente a las tasas de gotitas de una sola perla. Además, las perlas aglomeradas pueden requerir una longitud de canal más larga para lograr el ordenamiento de las perlas. Por lo tanto, en una realización, las perlas no aglomeradas se alimentan en el canal de fluido de perlas. La alimentación de perlas no aglomeradas se puede lograr mediante la introducción de estructuras o constricciones en la entrada de las perlas o al comienzo del canal de perlas para romper los grupos de perlas. Por ejemplo, en la Figura 16, las constricciones intracanal se muestran como estructuras onduladas. En este ejemplo, el ancho del canal en la constricción es mayor que el diámetro de las perla, pero menor que el doble del diámetro de las perlas.

10 Secuenciación de ácidos nucleicos

La aplicación de fuerza inercial y generación de gotitas a perlas, células y ácidos nucleicos es adecuada para aplicaciones en cualquier tipo de análisis de secuencia de ADN, incluida la secuenciación de ADN de lectura larga y la secuenciación de células individuales. La generación de gotitas, cada una con una perla y una célula, permite el análisis y secuenciación continuos de alto rendimiento de células individuales.

En una realización mostrada en la Figura 8, un dispositivo de microcanal está diseñado para generar gotitas que contienen cada una, una sola célula y una sola perla. Etapa 1, el dispositivo de microcanal está configurado para separar, ordenar y enfocar corrientes de perlas con códigos de barras a una o más posiciones de enfoque dentro de un campo de flujo del canal. Etapa 2, el dispositivo de microcanal está configurado para separar, ordenar y enfocar corrientes de células en una o más posiciones de enfoque dentro de un campo de flujo del canal. Etapa 3, el dispositivo de microcanal recibe un aceite como otra entrada. Etapa 4, al combinar la perla con código de barras ordenada, las células ordenadas y un aceite, el dispositivo de microcanal genera gotitas con estadística de Poisson doble poco dispersa, en la que cada gotita contiene una perla y una célula. En algunas realizaciones, el diseño del dispositivo de microfluidos, las concentraciones de perlas, células, otros componentes del fluido de perlas y el fluido de células, el tipo de aceite y los caudales del fluido de perlas, el fluido de células y el aceite están diseñados para que el dispositivo de microfluidos genere gotitas con cualquier número deseado de perlas y células por gotita. En algunas realizaciones, la distribución estadística de perlas es menos que óptima, por ejemplo, menos de 1 perla por gotita. En algunas realizaciones, la distribución estadística de células es menos que óptima, por ejemplo, menos de 1 célula por gotita. Esta relación es beneficiosa para las aplicaciones de secuenciación de células individuales, ya que una alta proporción de gotitas pobladas contiene una célula y una perla, y bajas proporciones de gotitas contienen una célula y ninguna perla, una perla y ninguna célula, o están vacías. Por lo tanto, se secuenciará una alta proporción de células.

Cada perla con código de barras que se muestra en la Figura 8 incluye numerosos fragmentos de nucleótidos, y cada fragmento de nucleótidos incluye una etiqueta de ADN única (por ejemplo, un código de barras, el mismo en todos los fragmentos en una sola perla), un índice (por ejemplo, un identificador molecular único, diferente para cada fragmento en una sola perla), junto con una región de captura que comprende una cola poli-T. Esta construcción hace que cada perla esté etiquetada de forma única en comparación con todas las demás perlas que se utilizan en el dispositivo. Por ejemplo, cada una de las cuatro gotitas que se muestran en la Figura 8 contiene una perla con código de barras y una célula. Cada una de las cuatro perlas con código de barras tiene una etiqueta única en comparación con las otras tres perlas con código de barras. En algunas realizaciones, la región poli-T puede estar en una región interna de un fragmento de nucleótidos en lugar de en la región de la cola del fragmento de nucleótidos.

En algunas realizaciones, el fluido de perlas contiene un tampón de lisis. Etapa 5, cuando una célula y una perla se encapsulan en una gotita y la gotita contiene tampón de lisis, la célula se lisa. Después de la lisis celular en la Etapa 6, cada ARNm poliadenilado en cada célula se une a la cola poli-T de un fragmento de nucleótidos en la perla, por ejemplo, hibridación entre el fragmento de nucleótidos en la perla y el ARNm. Debido a la región índice, cada ARNm de una célula está marcado de forma única en comparación con otras secuencias de ARNm de la célula. Y debido a la etiqueta de ADN única, cada ARNm de una célula está etiquetado de manera única en comparación con otros ARNm de otras células.

En la Etapa 7, la emulsión de gotitas se rompe, liberando perlas con fragmentos de nucleótidos hibridados y ARNm en solución. La resolución de una emulsión se puede lograr por cualquier medio adecuado, tal como por medios químicos, físicos o electrofóricos. Los medios pueden elegirse para que sean compatibles con las partículas en el sistema, o pueden elegirse para degradar uno o ambos tipos de partículas para permitir un análisis posterior, tal como la secuenciación.

En la Etapa 8, los fragmentos de nucleótidos hibridados y los ARNm se someten a transcripción inversa usando una transcriptasa inversa para generar ADNc.

En la Etapa 9, los ADNc se someten a amplificación usando los cebadores y la polimerasa apropiados. Por lo tanto, cada cadena de ADNc formada tiene una secuencia de ARNm original junto con la etiqueta de ADN única de la perla que se encapsuló con la célula y el índice único del fragmento de nucleótidos en la perla.

En la Etapa 10, los ADNc amplificados se someten a la preparación de la biblioteca, tal como la preparación de la biblioteca Nextera.

En la Etapa 11, los nucleótidos de la biblioteca están sujetos a secuenciación, tal como secuenciación de extremos emparejados. Debido a que cada ARNm de una célula está etiquetado de forma única en comparación con otros ARNm de la misma célula y ARNm de otras células, las reacciones de secuenciación de la biblioteca se pueden realizar a granel, con muestras de ADNc de muchas células que se secuencian, pero cada una etiquetada de manera única de modo que se pueden clasificar entre sí. Cada secuencia de biblioteca tiene una etiqueta de ADN o un código de barras únicos, un índice y una región de captura que comprende una región poli-T. El índice se puede utilizar para corregir errores de amplificación y evitar el recuento múltiple de una sola molécula. Después de la secuenciación, se puede determinar la población de ARNm y el nivel de expresión de las células individuales.

Un experto en la técnica reconocerá que las etapas de transcripción inversa, amplificación y secuenciación discutidas en el presente documento pueden lograrse usando procedimientos conocidos en el campo.

En algunos de estos procedimientos, las perlas incluyen fragmentos de nucleótidos. Los fragmentos de nucleótidos incluyen una región de código de barras, una región índice y una región de captura que comprende una cola de poli-T. La región del código de barras de cada fragmento de nucleótidos tiene al menos aproximadamente seis nucleótidos de longitud, o tiene aproximadamente seis a ocho nucleótidos de longitud, o aproximadamente seis nucleótidos de longitud. La región índice de cada fragmento de nucleótidos tiene al menos aproximadamente cuatro nucleótidos de longitud, o tiene aproximadamente cuatro a diez nucleótidos de longitud, o aproximadamente cuatro nucleótidos de longitud. La región de captura incluye nucleótidos poli-T y tiene al menos aproximadamente diez nucleótidos de longitud, o tiene aproximadamente diez a veinte nucleótidos de longitud, o aproximadamente diez nucleótidos de longitud.

Análisis de partículas

En otra realización, se proporciona una región de análisis en las proximidades del canal de salida para monitorizar, clasificar, contar, crear imágenes o bien analizar las corrientes de partículas localizadas y enfocadas. En una realización, un chip puede ser, o formar parte de, un sistema de enumeración de partículas. En particular, una región de análisis, en la que las partículas se han enfocado y ordenado, podría someterse a interrogación por un detector con el fin de contar las partículas. A continuación se discute una variedad de detectores, así como sistemas para marcar partículas para su detección, y estos elementos también se pueden usar para la enumeración.

Tipos de partículas

Puede introducirse cualquier número de tipos diferentes de partículas en el sistema para el enfoque de partículas y no debe limitarse a los tipos de partículas descritos en este documento. Las partículas pueden ser elaboradas o derivadas de varios materiales y pueden tener diferentes propiedades, tal como una densidad mayor igual o menor que el agua.

Las partículas suspendidas dentro de una muestra pueden tener cualquier tamaño que les permita ser ordenadas y enfocadas dentro de los canales de microfluidos descritos en este documento. Por ejemplo, las partículas pueden tener un tamaño hidrodinámico que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 100 micrómetros a aproximadamente 0,01 micrómetros. Alternativamente, las partículas pueden tener un tamaño hidrodinámico que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 20 micrómetros a aproximadamente 0,1 micrómetros. Alternativamente, las partículas pueden tener un tamaño hidrodinámico que se encuentra en el intervalo de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 1 micrómetro. Se apreciará que el tamaño de partícula sólo está limitado por la geometría del canal, y las partículas tanto más grandes como más pequeñas que los intervalos descritos anteriormente pueden ordenarse y enfocarse dentro de geometrías de canal predeterminadas que tienen condiciones de flujo laminar.

Las partículas pueden ser células o ácidos nucleicos. Las células y los ácidos nucleicos pueden derivarse de cualquier sistema biológico, tal como animal, bacterias, virus, hongos o plantas, y de cualquier fuente tal como agua, alimentos, suelo o aire.

En algunas realizaciones, una muestra sólida sirve como fuente de partículas de interés. Si se obtiene una muestra sólida, tal como una muestra de tejido o una muestra de suelo, la muestra sólida puede licuarse o solubilizarse antes de su posterior introducción en el sistema. Si se obtiene una muestra de gas, también se puede licuar o solubilizar. Por ejemplo, la muestra puede consistir en burbujas de aceite u otros tipos de líquidos tales como las partículas suspendidas en una solución acuosa.

En algunas realizaciones, una muestra puede derivarse de un animal tal como un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. Las muestras de fluido ejemplares que contienen partículas derivadas de un animal pueden incluir, pero no se limitan a, sangre entera, sangre dividida, componentes sanguíneos, sudor, lágrimas, flujo del oído, esputo, suspensión de médula ósea, linfa, orina, fluido cerebral, fluido cerebroespinal, saliva, mucosas, fluidos

vaginales, semen, ascitis, leche, secreciones de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario y fluido amniótico. En otras realizaciones, las muestras ejemplares pueden incluir fluidos que se introducen en un cuerpo humano y luego se extraen de nuevo para su análisis, incluidas todas las formas de lavado tales como lavados antisépticos, broncoalveolares, gástricos, peritoneales, cervicales, artroscópicos, ductales, nasales y de oído. Las partículas ejemplares pueden incluir cualquier partícula contenida en los fluidos indicados en este documento y pueden ser tanto rígidas como deformables. En particular, las partículas pueden incluir, pero no se limitan a, células, vivas o fijadas, tales como glóbulos rojos adultos, glóbulos rojos fetales, trofoblastos, fibroblastos fetales, glóbulos blancos, células epiteliales, células tumorales, células cancerosas, células madre hematopoyéticas, células bacterianas, células de mamíferos, protistas, células vegetales, neutrófilos, linfocitos T, células CD4+, linfocitos B, monocitos, eosinófilos, asesinos naturales, basófilos, células dendríticas, endoteliales circulantes, células T específicas de antígeno y células fúngicas. En algunas realizaciones, las partículas pueden incluir o derivarse de virus, orgánulos o liposomas.

Las partículas pueden ser elementos no celulares o no biológicos, o elementos sintéticos, que incluyen perlas, gotitas, nanopartículas o complejos moleculares. Las diferentes formas de partículas incluyen, pero no se limitan a, perlas sólidas, perlas sólidas porosas, perlas de hidrogel, emulsiones dobles o múltiples, perlas deformables o indeformables, perlas esféricas o de forma compleja. En algunas realizaciones, las partículas son perlas, tales como perlas adecuadas para aplicaciones de secuenciación de oligonucleótidos (ADN o ARN). Las perlas pueden ser perlas de polímero sintético, tales como perlas de poliestireno, sefarosa, agarosa, poliacrilamida, quitosano, gelatina y similares. Las perlas también pueden incluir perlas magnéticas. Las perlas pueden tener cualquier diámetro, tal como de 10 a 100 μm , o de 10 a 20 μm , o de 25 a 50 μm , o de 30 μm , o de 40 μm .

Las partículas se pueden suspender generalmente en cualquier suspensión, líquido y/o fluido con al menos un tipo de partícula, célula, gotita o de otro modo dispuesto en su interior. Además, el enfoque puede producir un flujo de partículas enriquecidas en una primera partícula de acuerdo con el tamaño.

En algunas realizaciones, una o más partículas, tales como células, pueden pegarse, agruparse o aglutinarse dentro de una muestra. En tal configuración, una agrupación o aglomeración de partículas se puede considerar como "una partícula" para los propósitos de los sistemas de la invención. Más particularmente, una agrupación o aglomeración de partículas puede actuar y tratarse como una sola partícula dentro de los canales de la invención descrita en este documento y, por lo tanto, puede clasificarse, ordenarse, separarse y enfocarse de la misma forma que una sola partícula.

Las partículas de muestras no biológicas pueden incluir, por ejemplo, cualquier número de diversas muestras industriales y comerciales adecuadas para separación, ordenamiento y enfoque de partículas. Las muestras industriales ejemplares que contienen partículas que se pueden introducir en el sistema pueden incluir, entre otras, emulsiones, soluciones químicas de dos fases (por ejemplo, muestras de procedimientos químicos sólido-líquido, líquido-líquido y gas-líquido), aguas residuales, partículas de bioprocesos y muestras de la industria alimentaria, tales como jugos, pulpas, semillas, etc. De manera similar, las muestras comerciales ejemplares que contienen partículas pueden incluir, entre otras, agua contaminada con bacterias/parásitos, agua con partículas como granos de café y partículas de té, cosméticos, lubricantes y pigmentos.

En algunas realizaciones, las partículas de una muestra de fluido obtenida de un animal se aplican directamente al sistema descrito en el presente documento, mientras que en otras realizaciones, la muestra se trata previamente o procesa antes de suministrarse a un sistema de la invención. Por ejemplo, un fluido extraído de un animal puede tratarse con uno o más reactivos antes de suministrarlo al sistema o puede recogerse en un recipiente que esté precargado con dicho reactivo. Reactivos ejemplares pueden incluir, pero no se limitan a, un reactivo estabilizador, un conservante, un fijador, un reactivo de lisis, un diluyente, un reactivo antiapoptótico, un reactivo anticoagulante, un reactivo antitrombótico, reactivos reguladores de propiedades magnéticas o eléctricas, un reactivo que modifica el tamaño, un reactivo tampón, un reactivo regulador de la osmolalidad, un reactivo regulador del pH y/o un agente de entrecruzamiento.

Los fluidos portadores adecuados para los canales de partículas incluyen soluciones acuosas, agua, soluciones tampón, soluciones a base de sal y mezclas de las mismas. Cuando las partículas son células, el fluido portador de células es compatible con las células, tal como un tampón acuoso, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. Cuando las partículas son perlas, el fluido portador puede ser agua o una solución acuosa que comprende además opcionalmente un agente químico que proporciona la cantidad deseada de expansión de la perla de polímero. En otras realizaciones, el fluido de perlas comprende un tampón de lisis celular.

Los aceites adecuados incluyen aceites orgánicos, tales como aceite de oliva o aceite vegetal, o aceites minerales, o aceites de silicón (tales como derivados de octametiltrisiloxano), o aceites perfluorados (tales como Fluorinert FC-40) o ácidos hidrocarbonados de cadena larga, tales como ácido oleico o falato de dioctilo. Los aceites usados en la tercera corriente también pueden comprender estabilizadores o tensioactivos.

Los caudales para la primera y segunda corrientes de partículas pueden ser iguales o diferentes. Los caudales pueden estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 75 $\mu\text{l}/\text{min}$, o aproximadamente 10 a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$, o

aproximadamente 10 a 35 $\mu\text{l}/\text{min}$, o aproximadamente 40 a 75 $\mu\text{l}/\text{min}$, o aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 75 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas realizaciones, el caudal de la corriente de perlas es más alto que el caudal de la corriente de células.

Los fluidos de partículas se pueden introducir en el sistema con una concentración de partículas particular. Por ejemplo, las partículas pueden estar presentes en los fluidos de partículas en una concentración de 100 a 3500 por μl , o de 100 a 750 por μl , o de 100 a 600 por μl , o de 100 a 300 por μl , o de 500 a 3000 por μl , o 1000 a 3000 por μl . En algunas realizaciones, las partículas son células, que están presentes en el fluido de células a una concentración de 100 a 750 por μl , o de 100 a 300 por μl . En algunas realizaciones, las partículas son perlas, que están presentes en el fluido de perlas a una concentración de 500 a 3000 por μl o de 1000 a 3000 por μl .

En algunas realizaciones, las tasas de ocupación de partículas A o perlas para las gotitas producidas por los sistemas descritos en el presente documento son al menos del 60, 70, 75, 80, 85 o 90%. En algunas realizaciones, las tasas de ocupación de las partículas B o de las células para las gotitas producidas por los sistemas descritos en el presente documento son al menos del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90%.

Ejemplos

Algunos aspectos de las realizaciones discutidas anteriormente se describen con más detalle en el siguiente ejemplo, que de ninguna manera pretende limitar el alcance de la presente divulgación.

Ejemplo 1

Enfoque de perlas de 30 μm de diámetro a las cuatro posiciones de enfoque en un canal cuadrado recto dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas

Este ejemplo demuestra que el enfoque de perlas de 30 μm de diámetro a las cuatro posiciones de enfoque en un canal cuadrado se logró dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas.

Usando las propiedades de las interacciones fluido-perla y perla-perla en los canales de perlas, se diseñó un conjunto de dispositivos microfluidos que permitieron que perlas de diferentes tamaños se enfocaran y ordenaran antes de entrar en la unión de generación de gotitas. Con referencia a la Figura 9, se fabricó un dispositivo 900 de microfluidos con un canal 904 de perlas recto de 125 x 125 μm que enfocaba perlas de 30 μm de diámetro en sus cuatro posiciones de enfoque dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada a un caudal de 60 $\mu\text{l}/\text{min}$. A 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ de caudal de fluido 924 de perlas, no se observó ningún orden de partículas y las perlas se distribuyeron aleatoriamente en la unión de generación de gotitas. A 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ de caudal de fluido 924 de perlas, las perlas 922 se ordenaron antes de entrar en la unión 926 de generación de gotitas. En la salida 918 del dispositivo, las gotitas 934 salieron del dispositivo 900 de microfluidos de manera ordenada y con cada gotita encapsulando una perla en general. La combinación de la dimensión del canal de perlas y el caudal generó más gotitas de una sola partícula y menos gotitas vacías o de partículas múltiples de lo que hubiera sido posible con la carga estocástica (Poisson).

En conjunto, estos datos indican que el enfoque de perlas de 30 μm de diámetro a las cuatro posiciones de enfoque en un canal cuadrado se puede lograr dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada de fluido de perlas.

Ejemplo 2

Enfoque de perlas de $\leq 40 \mu\text{m}$ de diámetro para lograr una perla por gotita

Este ejemplo demuestra que el enfoque de perlas de $\leq 40 \mu\text{m}$ de diámetro a las dos posiciones de enfoque en un microcanal rectangular se logró dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas. Esta configuración de dispositivo dio como resultado que la gran mayoría de las gotitas contuvieran una perla por gotita.

Usando las propiedades de las interacciones fluido-perla y perla-perla en los canales de perla, se diseñó un dispositivo de microfluidos que permitía que perlas de 40 μm o menos (por ejemplo, 20 a 40 μm , o 30 μm) se enfocaran y ordenaran antes de entrar en una unión de generación de gotitas del dispositivo de microfluidos. El dispositivo de microfluidos tenía un canal de perlas con una dimensión en sección transversal de 100 x 125 μm que enfocaba las perlas a sus dos posiciones de enfoque dentro de una longitud de aproximadamente 1,2-3 cm desde la entrada. El caudal de la solución de perlas y la solución de células se establecieron en 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. El caudal del aceite se estableció en 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, lo que resultó en la creación de aproximadamente 4000 gotitas por segundo. A estos caudales, se observó un orden de perlas claro y se observó una corriente ordenada de perlas entrando en la unión de generación de gotitas. Solo alrededor del 0,6% de las gotitas resultantes tenían más de una perla dentro de una gotita y una reducción del 90% en comparación con las estadísticas de Poisson.

En conjunto, estos datos indican que el enfoque de perlas a las dos posiciones de enfoque en un canal rectangular se puede lograr dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas.

Ejemplo 3

Enfoque de perlas de poliestireno de 40 µm de diámetro para lograr una perla por gotita

Este ejemplo demuestra que el enfoque de perlas de poliestireno de 40 µm de diámetro a las dos posiciones de enfoque en un microcanal rectangular se logró dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas. Como se muestra en la Figura 10, esta configuración del dispositivo dio como resultado que la gran mayoría de las gotitas contuvieran una perla por gotita.

Usando las propiedades de las interacciones fluido-perla y perla-perla en los canales de perlas, se diseñó un dispositivo de microfluidos que permitía que las perlas de 40 µm o menos se enfocaran y ordenaran antes de entrar en una unión de generación de gotitas del dispositivo de microfluidos. El dispositivo de microfluidos tenía un canal de perlas con una dimensión de sección transversal de 75 x 125 µm que enfocaba las perlas a sus dos posiciones de enfoque dentro de una longitud de aproximadamente 1,2-3 cm desde la entrada. El caudal de la solución de perlas se estableció en 50 µl/min y la solución de células se estableció en 10 µl/min. La concentración de perlas de entrada se estableció en 2000 perlas/µl. El caudal del aceite se estableció en 250 µl/min, lo que resultó en la creación de aproximadamente 2000 gotitas por segundo. A estos caudales, se observó un orden claro de las perlas y se observó una corriente ordenada de perlas que entraban en la unión de generación de gotitas (Figura 10). Solo alrededor del 2,7% de las gotitas resultantes tenían más de una perla dentro de una gotita y una reducción del 83,3% en comparación con las estadísticas de Poisson. Los resultados de la distribución de perlas dentro de las gotitas para otras condiciones de caudal se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de gotitas con una sola perla de poliestireno ("Deseada"), dos o más perlas de poliestireno ("Error") y gotitas vacías ("Vacías") para diversas condiciones de operación, en comparación con la distribución de Poisson.

Caudal de fluido de perlas (µl/min)	Caudal de fluido de células (µl/min)	Caudal de aceite (µl/min)	Gotitas deseadas (%)	Gotitas de error (%)	Gotitas vacías (%)
40	5	250	73,4	8,4	18,2
40	10	250	64,3	10,8	24,9
50	10	250	72,9	2,7	24,4
Poisson	Poisson	Poisson	35,0	16,2	48,8

En conjunto, estos datos indican que el enfoque de perlas de poliestireno de 40 µm de diámetro a las dos posiciones de enfoque en un canal rectangular se puede lograr dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas.

Ejemplo 4Enfoque de perlas de polimetilmetacrilato de 40 µm de diámetro para lograr una perla por gotita

Este ejemplo demuestra que el enfoque de perlas de polimetilmetacrilato (PMMA) de 30 a 40 µm de diámetro en las dos posiciones de enfoque en un microcanal rectangular se logró dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas. Como se muestra en la Figura 11, esta configuración del dispositivo dio como resultado que la gran mayoría de gotitas contuvieran una perla por gotita.

Utilizando las propiedades de las interacciones fluido-perla y perla-perla en los canales de perlas, se diseñó un dispositivo de microfluidos que permitía que las perlas de PMMA de 40 µm o menos se enfocaran y ordenaran antes de entrar en una unión de generación de gotitas del dispositivo de microfluidos. El dispositivo de microfluidos tenía un canal de perlas con una dimensión de sección transversal de 75 x 125 µm que enfocaba las perlas a sus dos posiciones de enfoque dentro de una longitud de aproximadamente 1,2-3 cm desde la entrada. El caudal de la solución de perlas se estableció en 60 µl/min y la solución de células se estableció en 10 µl/min. La concentración de perlas de entrada se estableció en 1500 perlas/µl. El caudal del aceite se estableció en 260 µl/min, lo que resultó en la creación de aproximadamente ~2000 gotitas por segundo. A estos caudales, como se muestra en la Figura 11, se observó un orden de perlas claro y se observó una corriente ordenada de perlas que entraban en la unión de generación de gotitas. Como se muestra en la Tabla 3, solo alrededor del 5,3% de las gotitas resultantes tenían más de una perla dentro de una gotita y una reducción del 67,3% en comparación con las estadísticas de Poisson.

Tabla 3. Distribución de perlas dentro de gotitas para otras condiciones de caudal.

Caudal de fluido de perlas (µl/min)	Caudal de fluido de células (µl/min)	Caudal de aceite (µl/min)	Gotitas deseadas (%)	Gotitas de error (%)	Gotitas vacías (%)
50	10	250	57,3	13,4	29,3
60	10	260	65,6	5,3	29,1

En conjunto, estos datos indican que el enfoque de perlas de PMMA de 30 a 40 μm de diámetro a las dos posiciones de enfoque en un canal rectangular se puede lograr dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas.

5 Ejemplo 5

Enfoque de perlas de gel de sefarosa de 40 μm de diámetro para lograr una perla por gotita

Este ejemplo demuestra que el enfoque de perlas de gel de sefarosa de 30 a 40 μm de diámetro en las dos posiciones de enfoque en un microcanal rectangular recto se logró dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas. Como se muestra en las Figuras 12A y 12B, esta configuración del dispositivo dio como resultado que la gran mayoría de gotitas contuvieran una perla por gotita. Se puede usar el mismo enfoque para otros tipos de perlas de gel de polímero poroso, tales como poliacrilamida, agarosa, quitosano, gelatina y similares.

Usando las propiedades de las interacciones fluido-perla y perla-perla en los canales de perlas, se diseñó un dispositivo de microfluidos que permitía que perlas de 40 μm o menos se enfocaran y ordenaran antes de entrar en una unión de generación de gotitas del dispositivo de microfluidos. El dispositivo de microfluidos tenía un canal de perlas con una dimensión de sección transversal de 75 x 125 μm que enfocaba las perlas a sus dos posiciones de enfoque dentro de una longitud de aproximadamente 1,2-3 cm desde la entrada. El caudal de la solución de perlas se estableció en 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la solución de células se estableció en 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. La concentración de perlas de entrada se estableció en 2100 perlas/ μl . El caudal del aceite se estableció en 270 $\mu\text{l}/\text{min}$, lo que dio como resultado la creación de aproximadamente ~2500 gotitas por segundo. Como se muestra en las Figuras 12A y 12B, a estos caudales, se observó un orden claro de perlas y se observó una corriente ordenada de perlas entrando en la unión de generación de gotitas. Como se muestra en la Tabla 4, sólo alrededor del 6,1% de las gotitas resultantes tenían más de una perla dentro de una gotita y una reducción del 62,3% en comparación con las estadísticas de Poisson.

Tabla 4. Distribución de perlas dentro de gotitas para otras condiciones de caudal

Caudal de fluido de perlas ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Caudal de fluido de células ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Caudal de aceite ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Gotitas deseadas (%)	Gotitas de error (%)	Gotitas vacías (%)
35	35	270	44,4	3,7	52,0
35	35	280	39,0	4,0	57,1
40	35	280	45,0	3,2	51,8
45	40	250	55,4	5,9	38,7
50	10	240	69,8	9,5	20,6
60	10	270	70,0	6,1	24,0

En conjunto, estos datos indican que el enfoque de perlas de gel de sefarosa de 30 a 40 μm de diámetro a las dos posiciones de enfoque en un canal rectangular se puede lograr dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas.

40 Ejemplo 6

Enfoque de perlas de gel de sefarosa de 40 μm de diámetro para lograr una perla por gotita

Este ejemplo demuestra que el enfoque de perlas de gel de sefarosa de 30 a 40 μm de diámetro a las dos posiciones de enfoque en un microcanal rectangular en espiral se logró dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas. Como se muestra en las Figuras 13A y 13B, esta configuración del dispositivo dio como resultado que la gran mayoría de gotitas contuvieran una perla por gotita. Se puede usar el mismo enfoque para otros tipos de perlas de gel de polímero poroso, tales como poliacrilamida, agarosa, quitosano, gelatina y similares.

Utilizando las propiedades de las interacciones fluido-perla y perla-perla en los canales de perla, se diseñó un dispositivo de microfluidos en espiral que permitía que las perlas de gel de 40 μm o menos se enfocaran y ordenaran antes de entrar en una unión de generación de gotitas del dispositivo de microfluidos. El dispositivo de microfluidos tenía un canal de perlas con una dimensión de sección transversal de 75 x 100 μm que enfocaba las perlas a sus dos posiciones de enfoque dentro de una longitud de aproximadamente 1,2-3 cm desde la entrada. El caudal de la solución de perlas se estableció en 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ y la solución de células se estableció en 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. La concentración de perlas de entrada se estableció en 1800 perlas/ μl . El caudal del aceite se estableció en 180 $\mu\text{l}/\text{min}$, lo que dio como resultado la creación de aproximadamente ~2000 gotitas por segundo. A estos caudales, como se muestra en las Figuras 13A y 13B, se observó un orden de perlas claro y se observó una corriente ordenada de perlas entrando en la unión de generación de gotitas. Como se muestra en la Tabla 5, aproximadamente el 5,2% de las gotitas resultantes tenían más de una perla dentro de una gotita y una reducción del 67,9% en comparación con las estadísticas de Poisson.

55

Tabla 5. Distribución de perlas dentro de gotitas para otras condiciones de caudal

Caudal de fluido de perlas ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Caudal de fluido de células ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Caudal de aceite ($\mu\text{l}/\text{min}$)	Gotitas deseadas (%)	Gotitas de error (%)	Gotitas vacías (%)
40	10	180	42,1	1,9	56,0
40	20	180	39,1	1,8	59,1
50	10	180	52,1	5,2	42,8

En conjunto, estos datos indican que el enfoque de perlas de gel de sefarosa de 30 a 40 μm de diámetro a las dos posiciones de enfoque en un canal rectangular se puede lograr dentro de una longitud de 1,2-3 cm desde la entrada del fluido de perlas.

En al menos algunas de las realizaciones descritas anteriormente, uno o más elementos usados en una realización pueden usarse indistintamente en otra realización a menos que tal reemplazo no sea técnicamente factible. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse otras diversas omisiones, adiciones y modificaciones a los procedimientos y estructuras descritos anteriormente sin apartarse del alcance del tema reivindicado. Todas estas modificaciones y cambios están destinados a caer dentro del alcance del tema reivindicado, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Con respecto al uso de sustancialmente cualquier término en plural y/o singular en este documento, los expertos en la técnica pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural según sea apropiado para el contexto y/o aplicación. Las diversas permutaciones de singular/plural se pueden establecer expresamente en este documento por motivos de claridad.

Los expertos en la técnica entenderán que, en general, los términos usados en este documento, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (por ejemplo, los cuerpos de las reivindicaciones adjuntas) generalmente se entienden 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 al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye pero no se limita a", etc.).

Los expertos en la técnica entenderán además que si se pretende un número específico de una mención introducida de una reivindicación, dicha intención se mencionará explícitamente en la reivindicación y, en ausencia de dicha mención, no está presente dicha intención. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases introductorias "al menos uno" y "uno o más" para introducir las menciones en las reivindicaciones. Sin embargo, el uso de tales frases no debe interpretarse en el sentido de que la introducción de una mención en las reivindicaciones por parte de los artículos indefinidos "un" o "uno, una" limita cualquier reivindicación particular que contenga dicha mención introducida en la reivindicación a realizaciones que contengan solo una de dichas menciones, incluso cuando la misma reivindicación incluye las frases introductorias "uno o más" o "al menos uno" y artículos indefinidos como "un" o "uno, una" (por ejemplo, "un" y/o "uno, una" debe interpretarse como "al menos uno" o "uno o más"); lo mismo es válido para el uso de artículos definidos utilizados para introducir menciones en las reivindicaciones. Además, incluso si se menciona explícitamente un número específico de una mención introducida en las reivindicaciones, los expertos en la técnica reconocerán que dicha mención debe interpretarse en el sentido de al menos el número mencionado (por ejemplo, la simple mención de "dos menciones", sin otros modificadores, significa al menos dos menciones, o dos o más menciones). Además, en aquellos casos en los que una convención análoga a "al menos uno de A, B y C, etc." se utiliza, en general, dicha construcción está pensada en el sentido en que un experto en la técnica entendería la convención (por ejemplo, "un sistema que tiene al menos uno de A, B y C" incluiría, entre otros, sistemas que tienen 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 convención análoga a "al menos uno de A, B o C, etc.", en general, dicha construcción se pretende en el sentido en que un experto en la técnica entendería la convención (por ejemplo, "un sistema que tiene al menos uno de A, B o C" incluiría, entre otros, sistemas que tienen solo A, solo B, solo C, 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 entenderán además que prácticamente cualquier palabra y/o frase disyuntiva que presente dos o más términos alternativos, ya sea en la descripción, las reivindicaciones o los dibujos, debe entenderse que 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".

Además, cuando las características o aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush.

Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los propósitos, como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en este documento también abarcan todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos. Cualquier intervalo enumerado se puede reconocer fácilmente como que describe suficientemente y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como ejemplo no limitativo, cada intervalo discutido en el presente documento se puede desglosar fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio

5 superior, etc. Como también entenderá un experto en la técnica, todas las expresiones tales como "hasta", "al menos", "mayor que", "menor que" y similares incluyen el número mencionado y se refieren a intervalos que se pueden dividir posteriormente en subintervalos como se discutió anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, un intervalo incluye cada miembro individual. Por lo tanto, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 artículos. De manera similar, un grupo que tiene de 1 a 5 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 artículos, y así sucesivamente.

10 Si bien se han descrito en el presente documento varios aspectos y realizaciones, otros aspectos y realizaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los diversos aspectos y realizaciones descritos en este documento tienen el propósito de ilustrar y no pretenden ser limitantes, estando indicado el alcance real por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de generación de gotitas de líquido que contienen dos o más tipos de partículas, comprendiendo el procedimiento:

5 enfocar un fluido de perlas (124, 224, 324, 524A-F, 624, 724) que tiene perlas (122, 222, 322, 422A-D, 622, 722) suspendidas en el mismo mediante enfoque inercial en una primera corriente ordenada de perlas dentro de un primer microcanal (104, 204, 304, 404, 504A-F, 604, 704), en el que el enfoque inercial de las perlas comprende hacer pasar las perlas a través de una primera porción de enfoque inercial del primer microcanal;
 10 enfocar un fluido de células (132) que tiene células (130, 630, 730) suspendidas en el mismo mediante enfoque inercial en una segunda corriente ordenada de células dentro de un segundo microcanal (108, 110, 308, 310, 508A-F, 510A-F, 608, 610, 708, 710), en el que el enfoque inercial de las células comprende hacer pasar las células a través de una segunda porción de enfoque inercial del segundo microcanal; y
 15 fusionar la primera corriente ordenada con la segunda corriente ordenada para formar una pluralidad de gotitas que tienen un número predeterminado de células y perlas dentro de cada gotita, en el que la fusión de la primera corriente ordenada y la segunda corriente ordenada comprende poner en contacto la primera corriente ordenada y la segunda corriente ordenada con un tercer fluido inmiscible en el primer fluido y el segundo fluido,
 20 en el que el primer microcanal tiene una dimensión D de sección transversal mínima y las perlas tienen una dimensión de sección transversal que es al menos aproximadamente 0,1D.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células tienen una dimensión de sección transversal que es al menos aproximadamente 0,1D.

25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que enfocar las perlas comprende hacer pasar las perlas a través de una primera porción de enfoque inercial del primer microcanal, y en el que enfocar las células comprende hacer pasar las células a través de una segunda porción de enfoque inercial del segundo microcanal, en el que preferiblemente al menos una de la primera porción de enfoque inercial del primer microcanal y la segunda porción de enfoque inercial del segundo microcanal tiene una región (305) curva, en el que preferiblemente cada región curva tiene forma de S, sigmoideal, sinusoidal o espiral independientemente.

35 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las perlas comprenden fragmentos de nucleótidos, que preferiblemente comprenden una región de código de barras, una región índice y una región de captura en el que preferiblemente la región de código de barras de cada fragmento de nucleótidos tiene al menos aproximadamente seis nucleótidos de longitud.

40 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la región índice de cada fragmento de nucleótidos tiene una longitud de al menos aproximadamente cuatro nucleótidos, en el que preferiblemente la región de captura comprende nucleótidos poli-T y tiene una longitud de al menos aproximadamente diez nucleótidos.

6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el número predeterminado de células es uno y el número predeterminado de perlas es uno.

45 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que cada perla tiene un número de Reynolds de al menos aproximadamente 1, en el que el número de Reynolds de una perla se define como

$$Re = \frac{\rho U_m H}{\mu}$$

50 en la que ρ es la densidad del fluido de perlas, U_m es la velocidad máxima de flujo del fluido de perlas, H es el diámetro hidráulico del fluido de perlas y μ es la viscosidad dinámica del fluido de perlas, en el que cada célula tiene un número de Reynolds de al menos aproximadamente 1, y en el que el número de Reynolds de una célula se define como

$$Re = \frac{\rho U_m H}{\mu}$$

55 en la que ρ es la densidad del fluido de células, U_m es la velocidad máxima de flujo del fluido de células, H es el diámetro hidráulico del fluido de células y μ es la viscosidad dinámica del fluido de células,

en el que preferiblemente la proporción de la pluralidad de gotitas que contienen k_1 perlas y k_2 células es mayor que $(\lambda_1^{k_1} \exp(-\lambda_1)/(k_1!)) (\lambda_2^{k_2} \exp(-\lambda_2)/(k_2!))$, en el que λ_1 es el número promedio de perlas por gotita y λ_2 es el número promedio de células por gotita.

- 5 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el caudal de la primera corriente ordenada es de al menos aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, en el que preferiblemente el caudal de la segunda corriente ordenada es de al menos aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

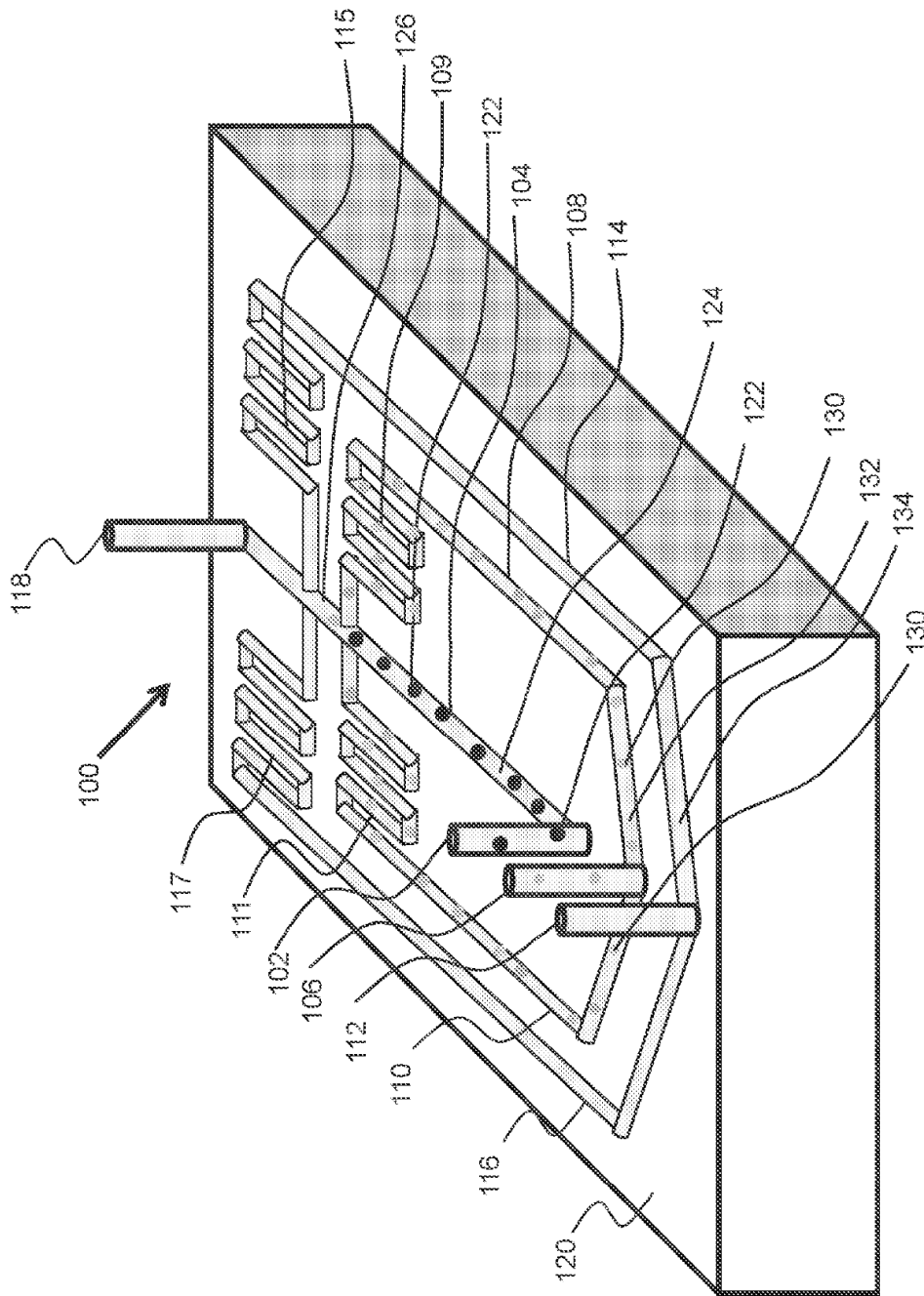


Figura 1

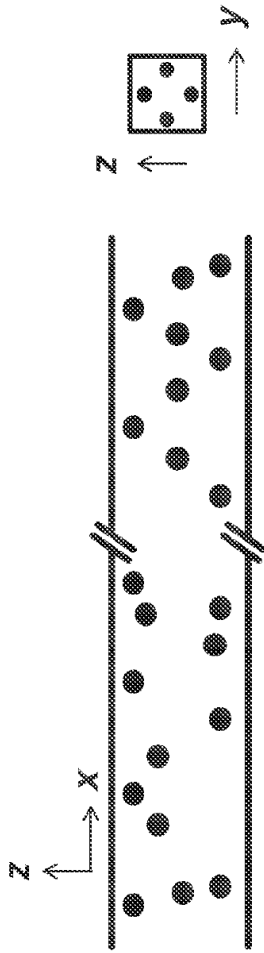


Figura 2A



Figura 2B

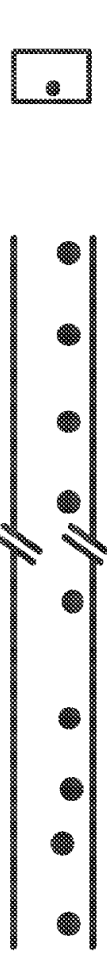


Figura 2C

Corriente abajo Sección Transversal

Flujo →

Entrada

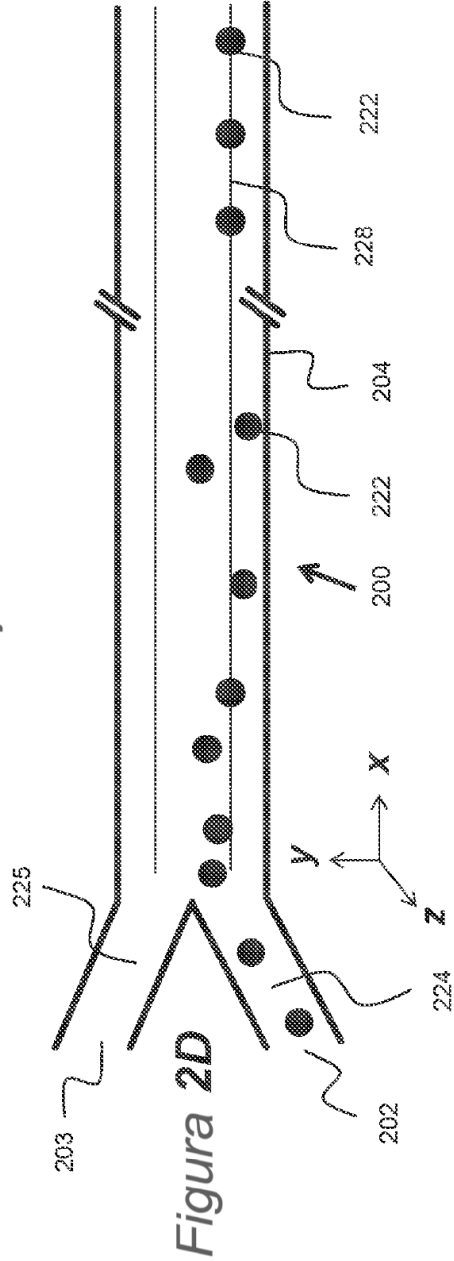


Figura 2D

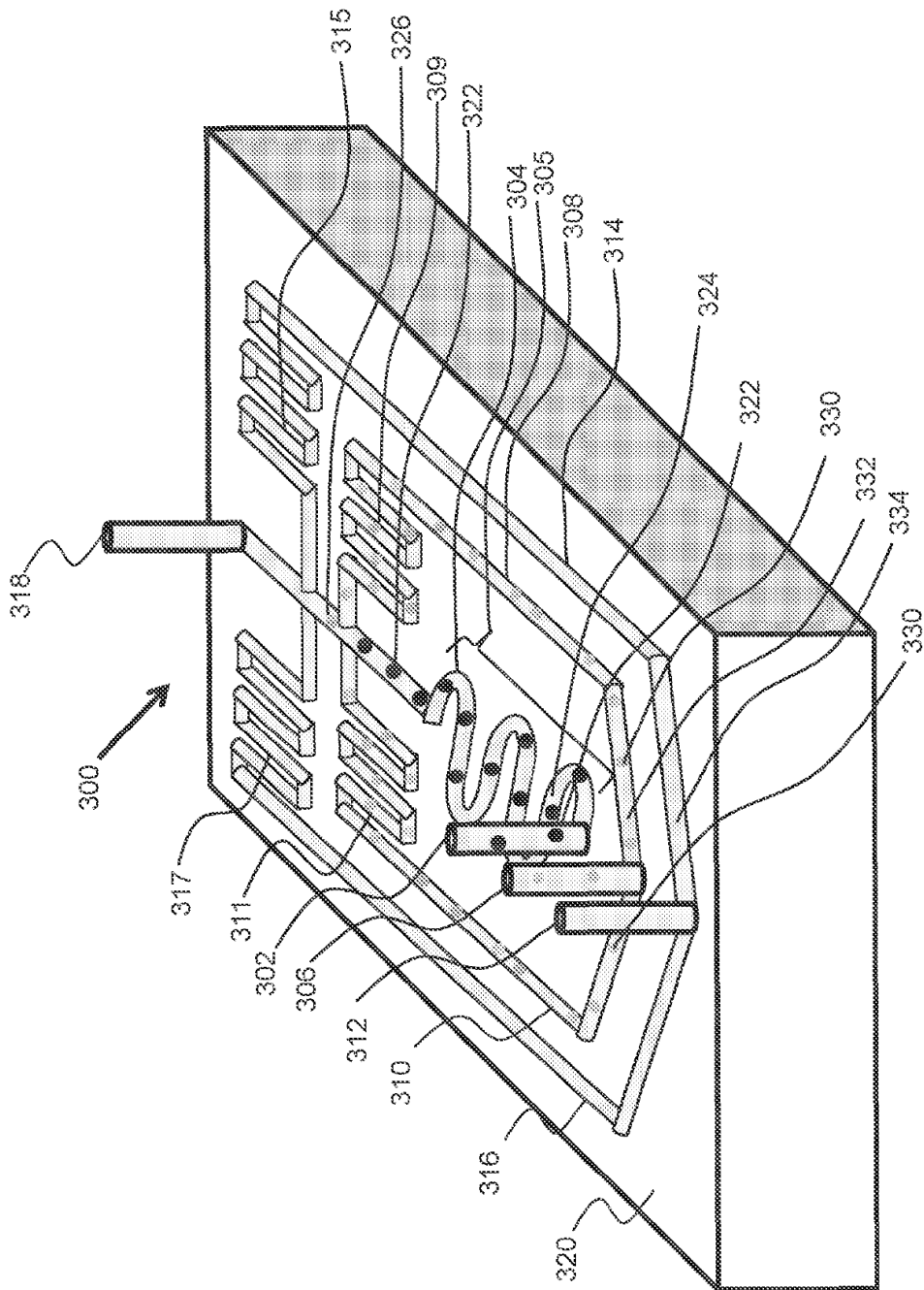
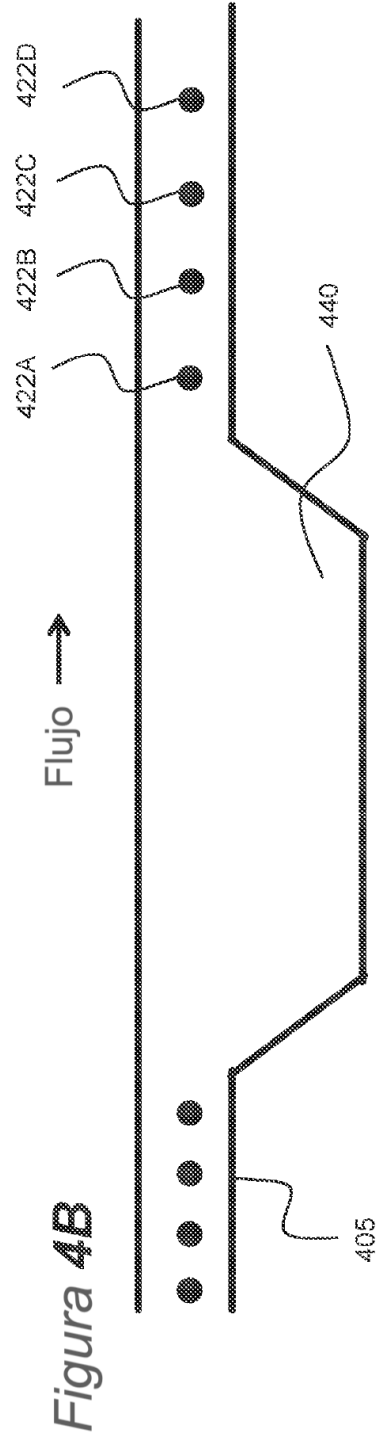
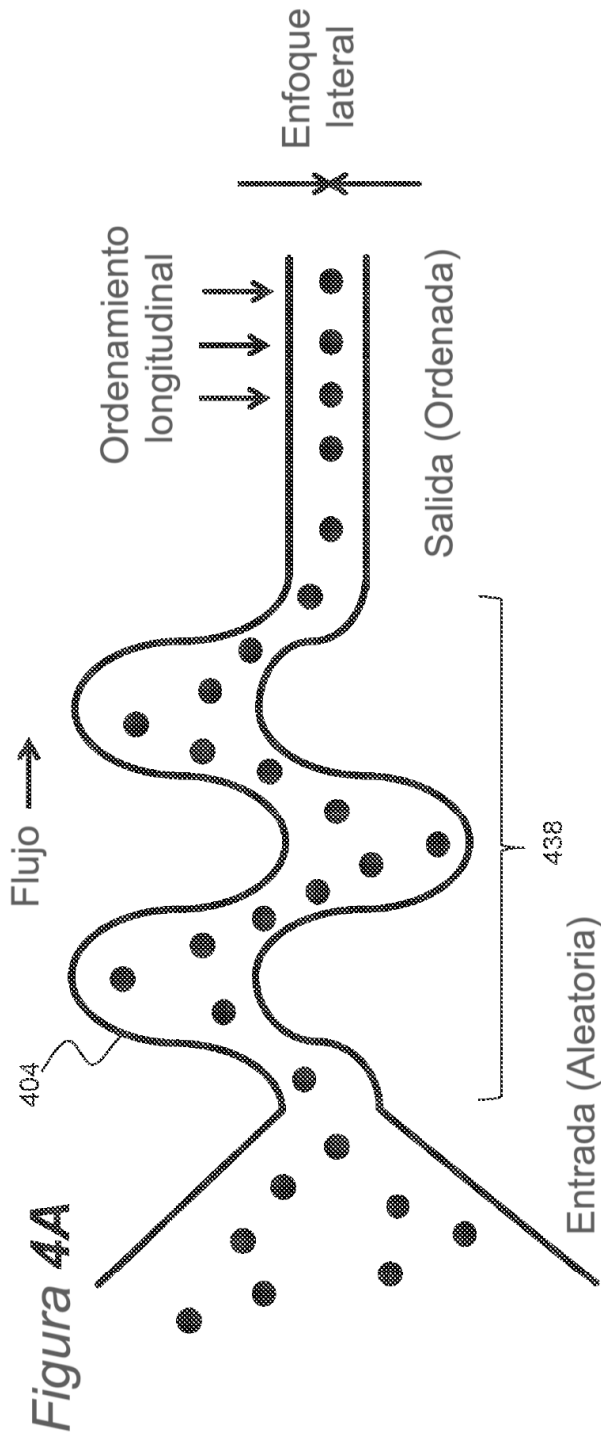


Figura 3



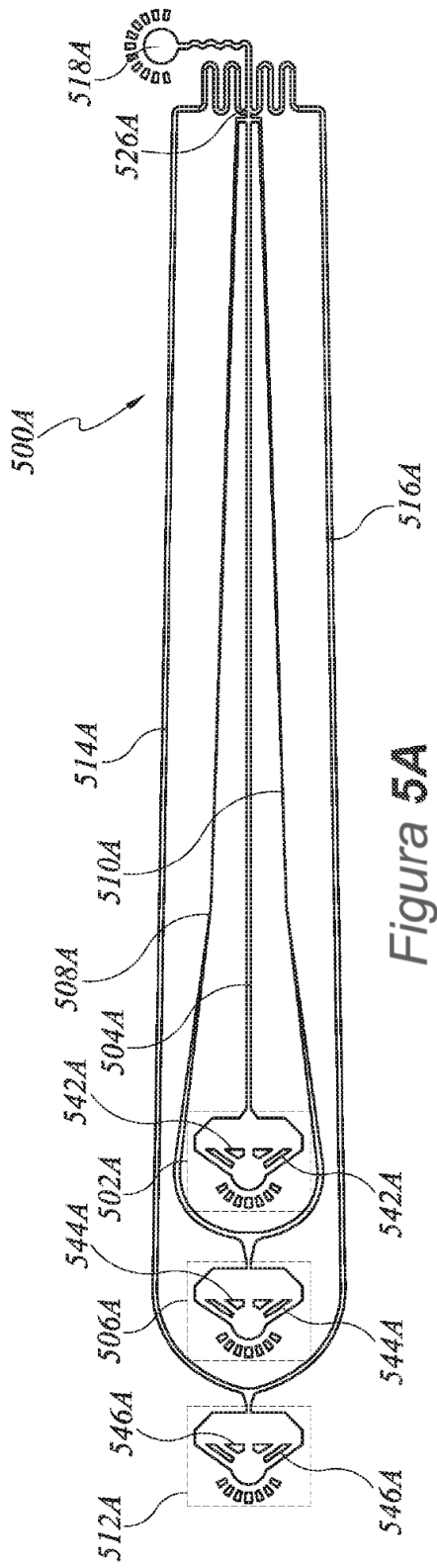


Figura 5A

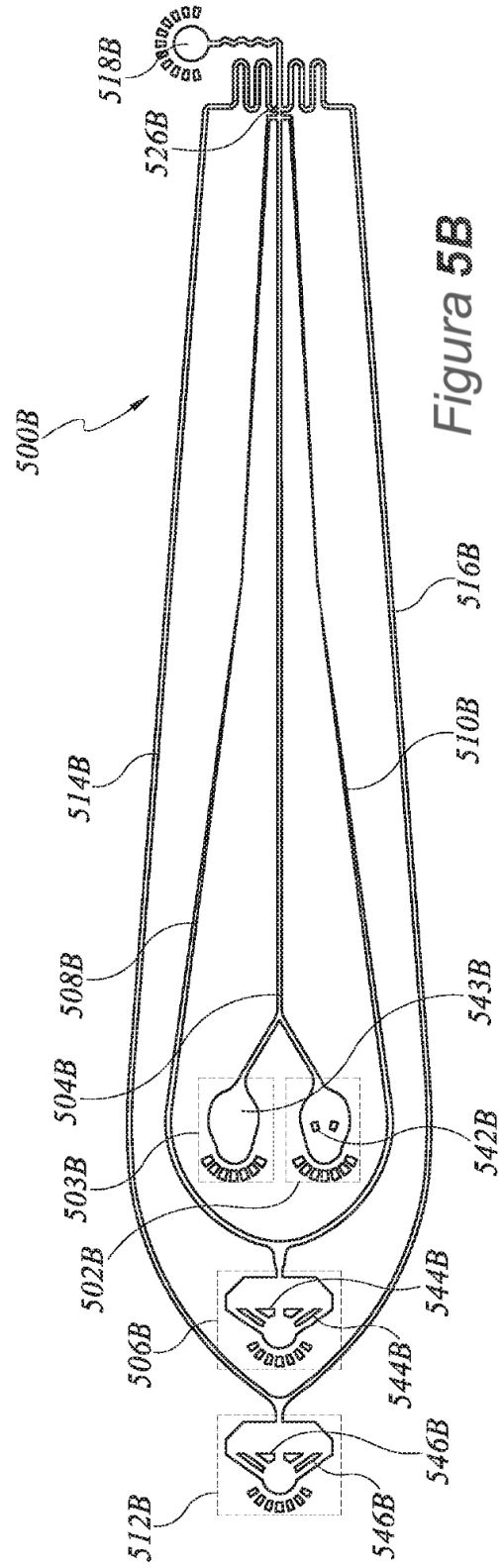


Figura 5B

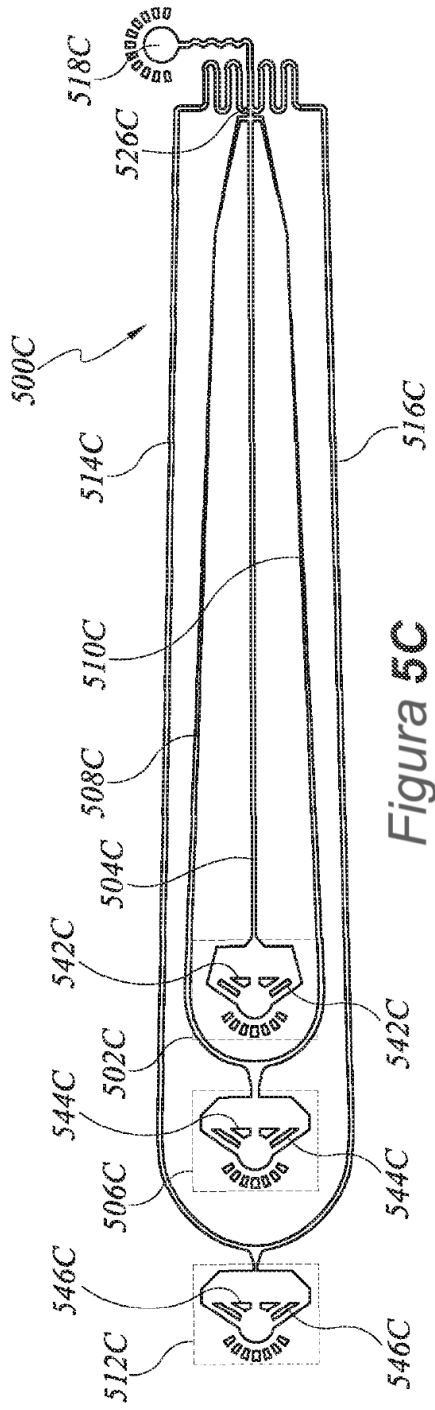


Figura 5C

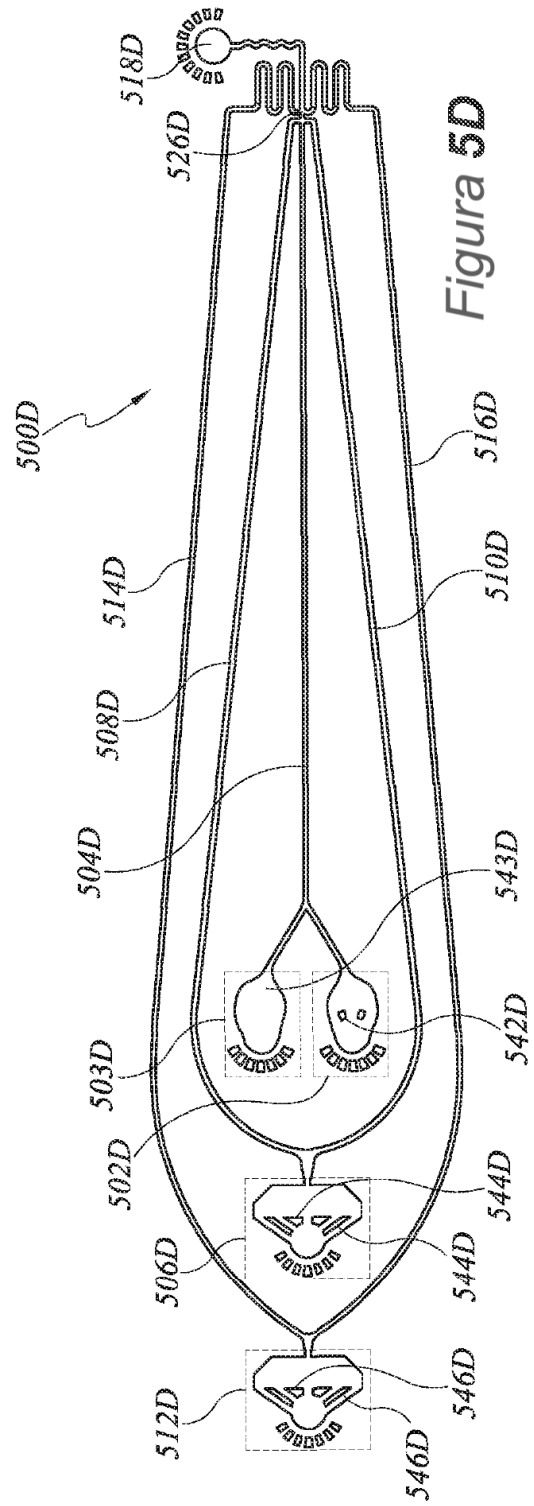


Figura 5D

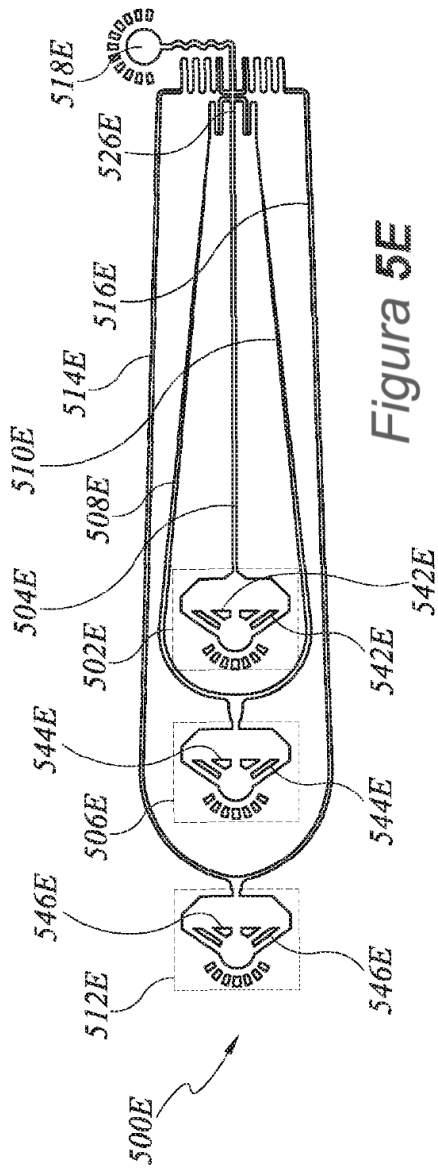


Figura 5E

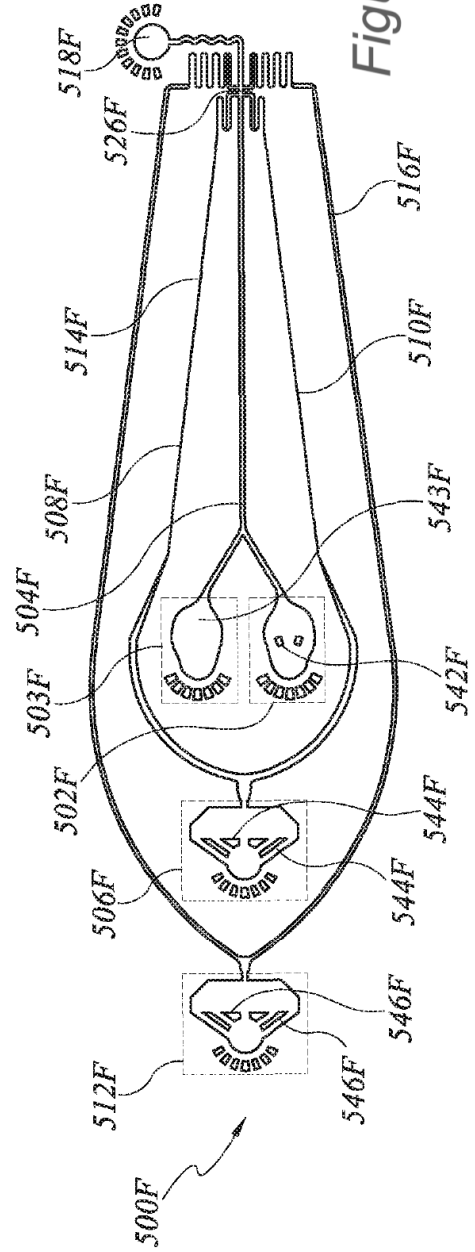


Figura 5F

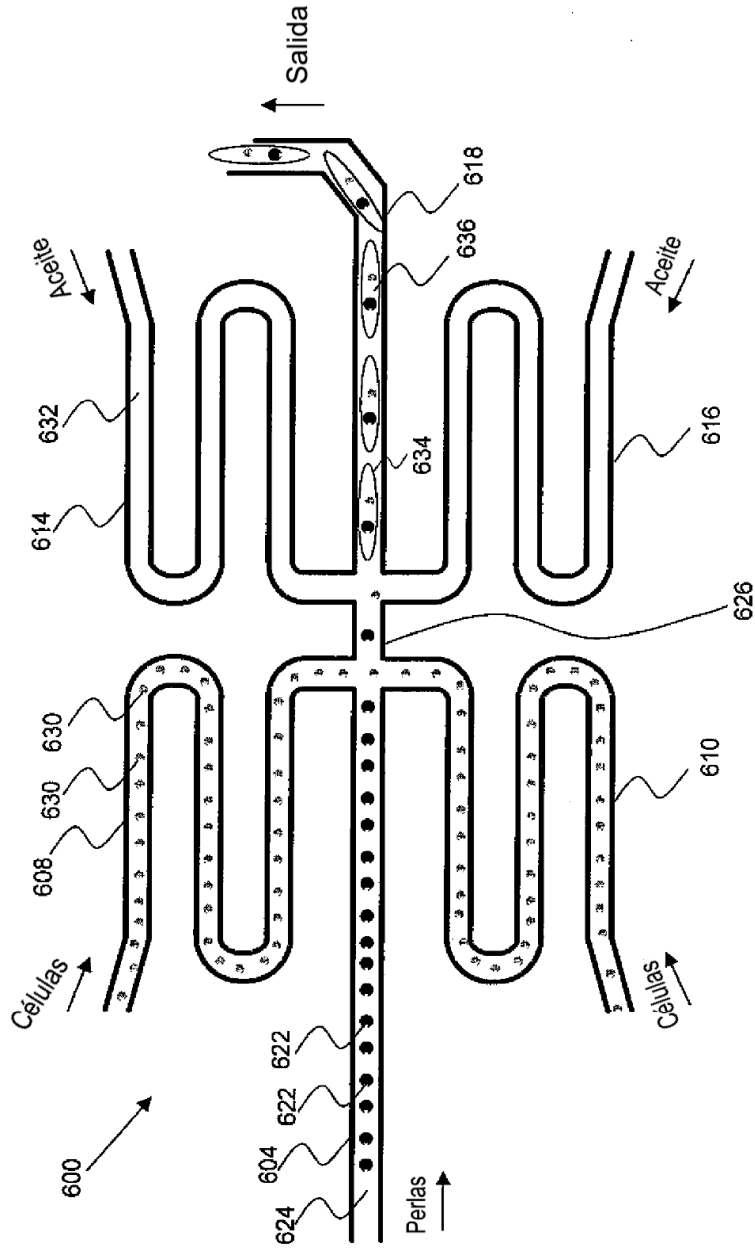


Figura 6

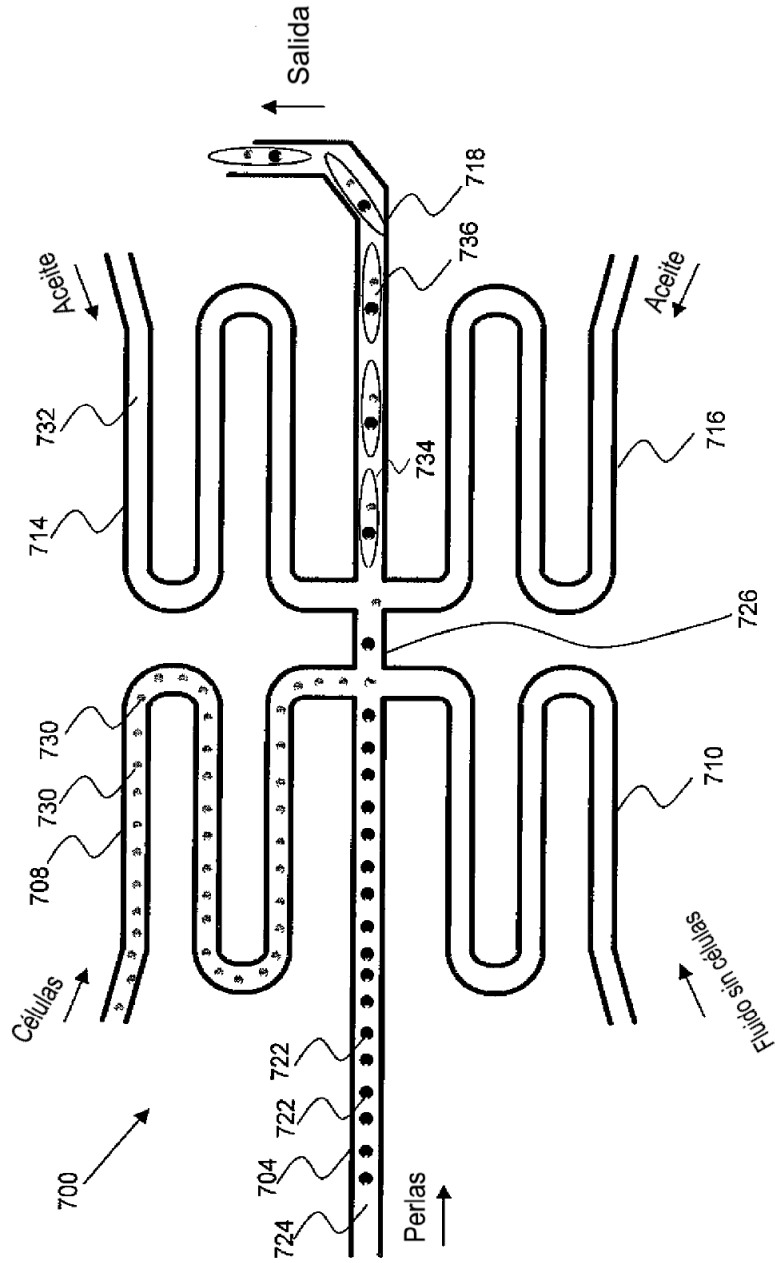


Figura 7

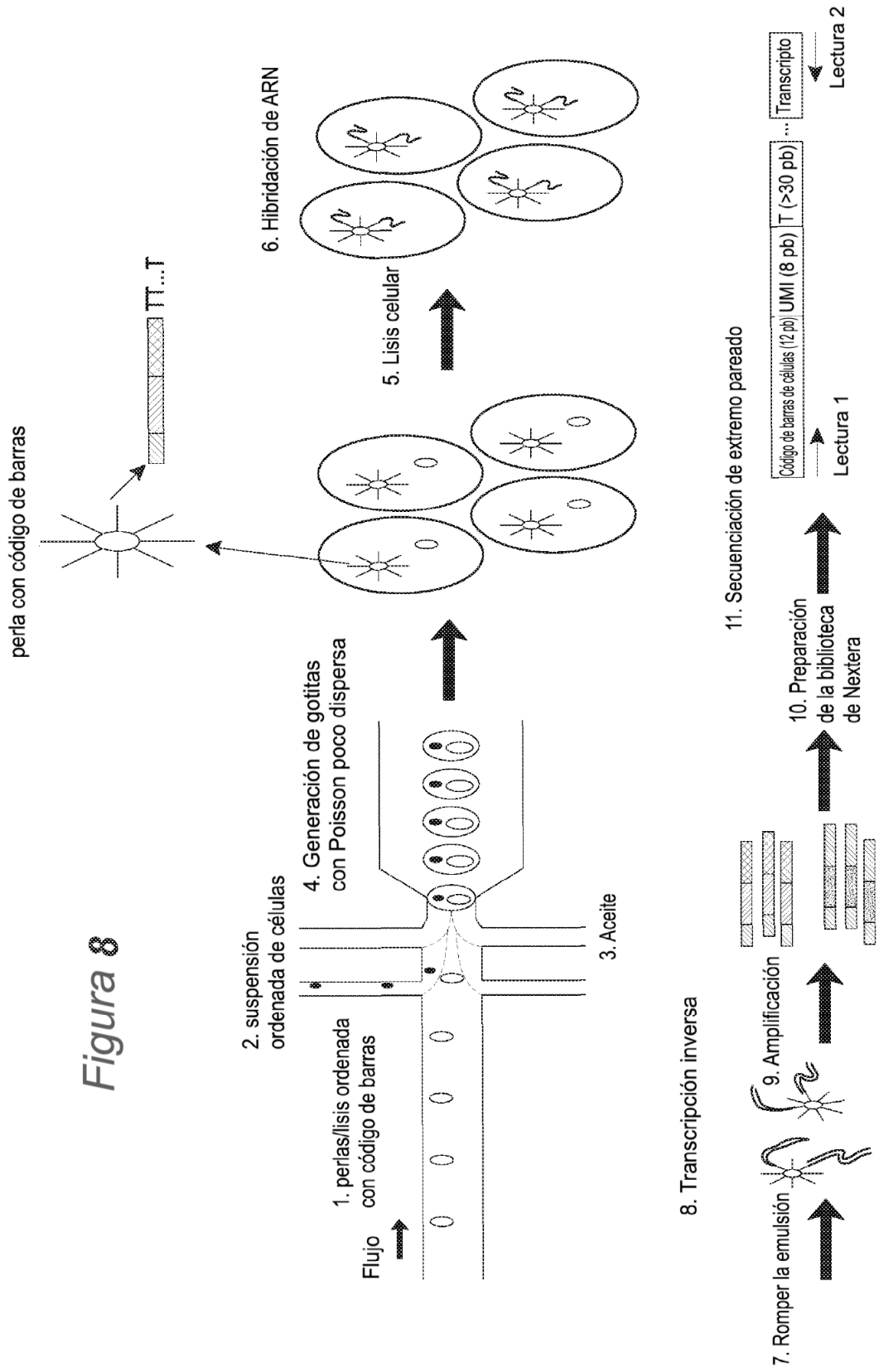


Figura 8

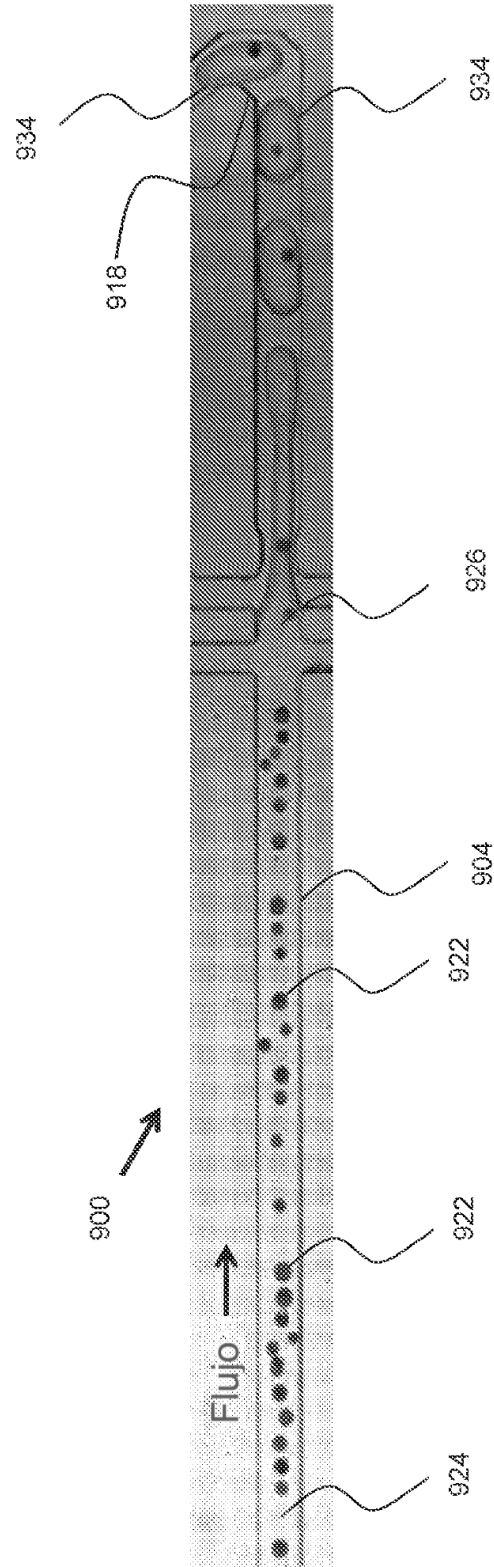


Figura 9



Figura 10

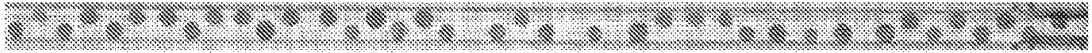


Figura 11



Figura 12A



Figura 12B

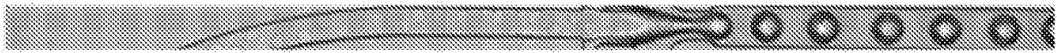
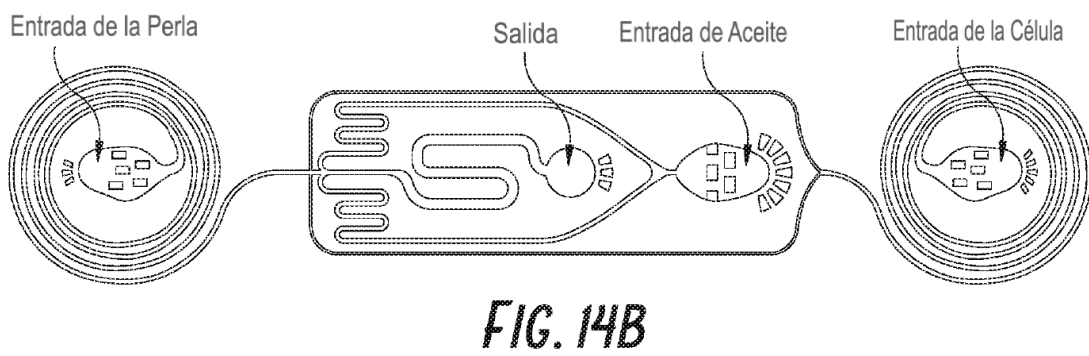
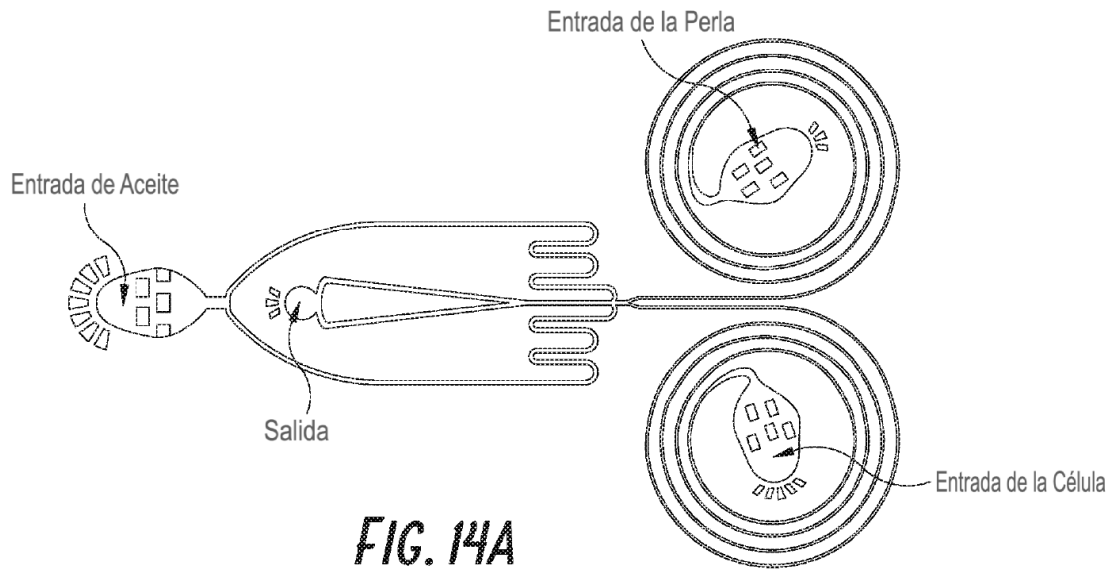


Figura 13A



Figura 13B



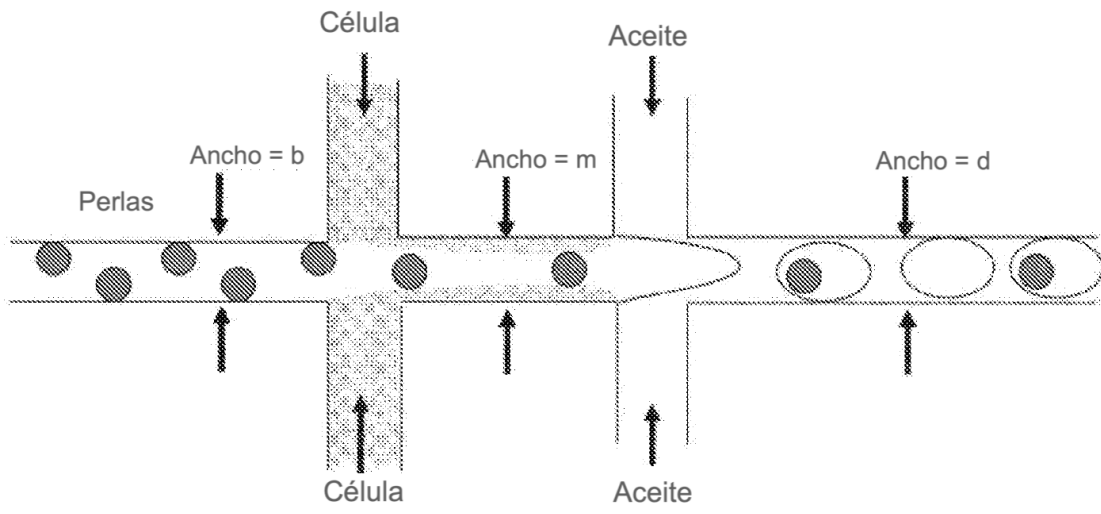


Figura 15A

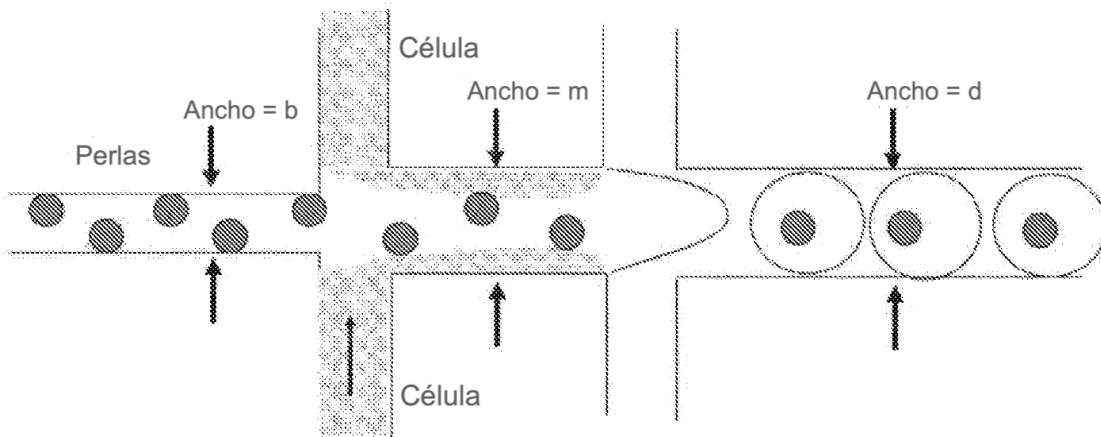


Figura 15B



Figura 16