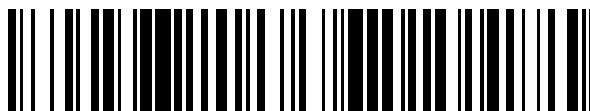


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 875 759**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/6869 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2016 PCT/US2016/064206**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017 WO17095917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2016 E 16816512 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.04.2021 EP 3384046**

54 Título: **Sistema microfluídico digital para aislamiento de células individuales y caracterización de analitos**

30 Prioridad:

01.12.2015 US 201562261786 P

21.01.2016 US 201662281510 P

28.03.2016 US 201662314071 P

06.07.2016 US 201662358968 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:

**JAMSHIDI, ARASH;
LIN, YAN-YOU;
ABSALAN, FARNAZ;
STUART, SARAH;
CANN, GORDON;
WU, YIR-SHYUAN;
KHURANA, TARUN y
FISHER, JEFFREY, S.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 875 759 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema microfluídico digital para aislamiento de células individuales y caracterización de analitos

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud refiere y reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. número 62/314,071, presentada el 28 de marzo de 2016; la Solicitud Provisional de EE.UU. número 62/281,510, presentada el 21 de enero de 2016; la Solicitud Provisional de EE.UU. número 62/261,786, presentada el 1 de diciembre de 2015; y la Solicitud Provisional de EE.UU. número 62/358,968, presentada el 6 de julio de 2016.

Antecedentes de la invención

10 La importancia de los datos a nivel de células individuales (por ejemplo, datos de secuenciación de próxima generación) se aprecia cada vez más en una gran variedad de áreas médicas y de investigación. Por ejemplo, en el documento US 2015/141261 A1, titulado *High throughput sequencing of multiple transcripts of a single cell* se hace referencia a un método de captura de células. Además, Dino di Carlo et al., *Dynamic single cell culture array*, «Lab on a Chip: Miniaturisation for Chemistry, Physics, Biology, Material Science and Bioengineering», vol. 6, número 11, 1 de enero de 2006, página 1445, se refieren a un análisis de alto rendimiento de células individuales usando un sistema microfluídico. En el documento US 2015/253284 A1 se hace referencia a accionadores de gotitas y al uso de un sistema microfluídico digital. En el documento US 2014/262787 A1 se describe un sistema microfluídico para atrapar y, en consecuencia, lisar células.

15 Rettig Jacqueline et al., «Large-scale single-cell trapping and imaging using microwell arrays», *Analytical Chemistry, American Society*, EE.UU., vol. 77, número 17, 1 de septiembre de 2005, páginas 5628-5634, DOI: 10.1021/AC0505977, Yamamura Shohei et al., «Single-cell microarray for analysing cellular response», *Analytical Chemistry, American Society*, EE.UU., vol. 77, número 24, 12 de noviembre de 2005, páginas 8050-8056, DOI: 10.1021/AC05015632, y Nilsson J et al., «Review of cell and particle trapping in microfluidic systems», *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, Ámsterdam, NL, vol. 649, número 2, 7 de septiembre de 2009, páginas 141-157, describen el aislamiento de células por sedimentación en micropocillos. David M Rissin et al., «Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations», *Nature Biotechnology*, Gale group Inc., EE.UU., vol. 28, número 6, 1 de junio de 2010, páginas 595-599 describen depositar perlas por sedimentación en micropocillos. A. M. Thompson et al., *Microfluidics of single-cell genetics analysis*, «Lab on a Chip: Miniaturisation for Chemistry, Physics, Biology, Material Science and Bioengineering», vol. 14, número 17, 31 de marzo de 2014, página 3135, describen el uso de métodos de aislamiento celular en el contexto del análisis genético de células individuales. En el documento US 2015/072900 A1 se describe un sustrato de manipulación de fluidos que contiene líneas de electrodos para manipulación de fluidos a micropocillos integrados. En consecuencia, se han desarrollado varias tecnologías para el análisis de células individuales. Común a muchas de estas tecnologías es la necesidad de segregar físicamente una sola célula y mantener la información de la célula de origen en los pasos posteriores de procesamiento y análisis. En un ejemplo, la fluidica de gotitas basada en canales se ha usado para el aislamiento automatizado y la codificación de barras de múltiples células individuales en una muestra para su secuenciación. Sin embargo, algunos pasos del procedimiento posteriores en la elaboración de una colección de secuenciaciones pueden no estar automatizados y se requiere un flujo de trabajo manual. Existe la necesidad de una plataforma automatizada y flexible para el aislamiento de células individuales y la posterior caracterización de analitos (por ejemplo, preparación de colecciones de células individuales listas para la secuenciación).

Definiciones

40 Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados indicados.

«Activar», con referencia a uno o más electrodos, significa influir en un cambio en el estado eléctrico de uno o más electrodos que, en presencia de una gotita, da como resultado una operación de gotitas. La activación de un electrodo se puede lograr usando corriente alterna (CA) o corriente continua (CC). Puede usarse cualquier voltaje adecuado que efectúe la operación deseada, tal como una operación de gotitas. Por ejemplo, un electrodo puede activarse usando un voltaje que sea mayor que aproximadamente 150 V, o mayor que aproximadamente 200 V, o mayor que aproximadamente 250 V, o de aproximadamente 275 V a aproximadamente 1000 V, o aproximadamente 300 V. Si se usa una señal de CA, se puede emplear cualquier frecuencia adecuada que efectúe la operación deseada, tal como una operación de gotitas. Por ejemplo, un electrodo puede activarse usando una señal de CA que tenga una frecuencia de aproximadamente 1 Hz a aproximadamente 10 MHz, o de aproximadamente 10 Hz a aproximadamente 60 Hz, o de aproximadamente 20 Hz a aproximadamente 40 Hz, o aproximadamente 30 Hz.

«Perla», con respecto a perlas en un accionador de gotitas, significa cualquier perla o partícula que pueda interactuar con una gotita en un accionador de gotitas o en sus cercanías.

«Gotita» significa un volumen de líquido en un accionador de gotitas. Normalmente, una gotita está al menos parcialmente limitada por un fluido de relleno. Por ejemplo, una gotita puede estar completamente rodeada por un fluido de relleno o puede estar limitada por un fluido de relleno y una o más superficies del accionador de gotitas. Como otro ejemplo, una gotita puede estar limitada por fluido de relleno, una o más superficies del accionador de

gotitas y/o la atmósfera. Como otro ejemplo más, una gotita puede estar limitada por fluido de relleno y la atmósfera. Las gotitas pueden ser, por ejemplo, acuosas o no acuosas o pueden ser mezclas o emulsiones que incluyan componentes acuosos y no acuosos. Las gotitas pueden adoptar una gran variedad de conformaciones; los ejemplos no limitantes incluyen generalmente conformación de disco, conformación de lingote, esfera truncada, elipsoide, conformación esférica, esfera parcialmente comprimida, conformación semiesférica, ovoide, cilíndrica, combinaciones de tales conformaciones y varias conformaciones formadas durante operaciones de gotitas, tales como fusión o partición o formadas como resultado del contacto de tales conformaciones con una o más superficies de un accionador de gotitas. Para ejemplos no limitantes de fluidos de gotitas que pueden someterse a operaciones de gotitas usando el enfoque de la presente divulgación, véase Eckhardt et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2007/120241, titulada *Droplet-Based Biochemistry*, publicada el 25 de octubre de 2007. En varias realizaciones, una gotita puede incluir una muestra biológica, como sangre entera, líquido linfático, suero, plasma, sudor, lágrima, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido seminal, excreción vaginal, líquido seroso, líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido pleural, trasudados, exudados, líquido quístico, bilis, orina, líquido gástrico, líquido intestinal, muestras fecales, líquidos que contienen células individuales o múltiples células, líquidos que contienen orgánulos, tejidos fluidizados, organismos fluidizados, líquidos que contienen organismos multicelulares, hisopos biológicos y lavados biológicos. Además, una gotita puede incluir un reactivo, como agua, agua desionizada, soluciones salinas, soluciones ácidas, soluciones básicas, soluciones detergentes y/o tampones. Una gotita puede incluir ácidos nucleicos, tales como ADN, ADN genómico, ARN, ARNm o análogos de los mismos; nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos, tales como análogos que tienen restos terminadores tales como los descritos en Bentley et al., *Nature* 456: 53-59 (2008); Gormley et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2013/131962, titulada *Improved Methods of Nucleic Acid Sequencing*, publicada el 12 de septiembre de 2013; Barnes et al. Patente de EE.UU. número 7,057,026, titulada *Labelled Nucleotides*, expedida el 6 de junio de 2006; Kozlov et al. Publicación de Patente Internacional número WO/2008/042067, titulada *Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing*, publicada el 10 de abril de 2008; Rigatti et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2013/117595, titulada *Targeted Enrichment and Amplification of Nucleic Acids on a Support*, publicada el 15 de agosto de 2013; Hardin et al. Patente de EE.UU. número 7,329,492, titulada *Methods for Real-Time Single Molecule Sequence Determination*, expedida el 12 de febrero de 2008; Hardin et al. Patente de EE.UU. número 7,211,414, titulada *Enzymatic Nucleic Acid Synthesis: Compositions and Methods for Altering Monomer Incorporation Fidelity*, expedida el 1 de mayo de 2007; Turner et al. Patente de EE.UU. número 7,315,019, titulada *Arrays of Optical Confinements and Uses Thereof*, expedida el 1 de enero de 2008; Xu et al. Patente de EE.UU. número 7,405,281, titulada *Fluorescent Nucleotide Analogs and Uses Thereof*, expedida el 29 de julio de 2008; y Ranket al., Publicación de Patente de EE.UU. número 20080108082, titulada *Polymerase Enzymes and Reagents for Enhanced Nucleic Acid Sequencing*, publicada el 8 de mayo de 2008; enzimas como polimerasas, ligasas, recombinasas o transposasas; parejas de unión tales como anticuerpos, epítomos, estreptavidina, avidina, biotina, lectinas o carbohidratos; u otras moléculas bioquímicamente activas. Otros ejemplos de contenidos de gotitas incluyen reactivos, como un reactivo para un protocolo bioquímico, como un protocolo de amplificación de ácido nucleico, un protocolo de ensayo basado en afinidad, un protocolo de ensayo enzimático, un protocolo de secuenciación y/o un protocolo para análisis de fluidos biológicos. Una gotita puede incluir una o más perlas.

«Accionador de gotitas» significa un dispositivo para manipular gotitas. Para ejemplos de varios componentes estructurales de accionadores de gotitas adecuados para su uso en la presente invención, véase Pamula et al., Patente de EE.UU. número 6,911,132, titulada *Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques*, expedida el 28 de junio de 2005; Pamula et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20060194331, titulada *Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board*, publicada el 31 de agosto de 2006; Pollack et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2007/120241, titulada *Droplet-Based Biochemistry*, publicada el 25 de octubre de 2007; Shenderov, Patente de EE.UU. número 6,773,566, titulada *Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same*, expedida el 10 de agosto de 2004; Shenderov, Patente de EE.UU. número 6,565,727, titulada *Actuators for Microfluidics Without Moving Parts*, expedida el 20 de mayo de 2003; Kim et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20030205632, titulada *Electrowetting-driven Micropumping*, publicada el 6 de noviembre de 2003; Kim et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20060164490, titulada *Method and Apparatus for Promoting the Complete Transfer of Liquid Drops from a Nozzle*, publicada el 27 de julio de 2006; Kim et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20070023292, titulada *Small Object Moving on Printed Circuit Board*, publicada el 1 de febrero de 2007; Shah et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20090283407, titulada *Method for Using Magnetic Particles in Droplet Microfluidics*, publicada el 19 de noviembre de 2009; Kim et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20100096266, titulada *Method and Apparatus for Real-time Feedback Control of Electrical Manipulation of Droplets on Chip*, publicada el 22 de abril de 2010; Velev, Patente de EE.UU. número 7,547,380, titulada *Droplet Transportation Devices and Methods Having a Fluid Surface*, expedida el 16 de junio de 2009; Sterling et al. Patente de EE.UU. número 7,163,612, titulada *Method, Apparatus and Article for Microfluidic Control via Electrowetting, for Chemical, Biochemical and Biological Assays and the Like*, publicada el 16 de enero de 2007; Becker et al. Patente de EE.UU. número 7,641,779, titulada *Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing*, expedida el 5 de enero de 2010; Becker et al. Patente de EE.UU. número 6,977,033, titulada *Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing*, expedida el 20 de diciembre de 2005; Decre et al., Patente de EE.UU. número 7,328,979, titulada *System for Manipulation of a Body of Fluid*, expedida el 12 de febrero de 2008; Yamakawa et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20060039823, titulada *Chemical Analysis Apparatus*, publicada el 23 de febrero de 2006; Wu, Publicación de Patente de EE.UU. número 20110048951, titulada *Digital Microfluidics Based Apparatus for Heat-exchanging Chemical Processes*, publicada el 3

de marzo de 2011; Fouillet et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20090192044, titulada *Electrode Addressing Method*, publicada el 30 de julio de 2009; Fouillet et al. Patente de EE.UU. número 7,052,244, titulada *Device for Displacement of Small Liquid Volumes Along a Micro-catenary Line by Electrostatic Forces*, expedida el 30 de mayo de 2006; Marchand et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20080124252, titulada *Droplet Microreactor*, publicada el 29 de mayo de 2008; Adachi et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20090321262, titulada *Liquid Transfer Device*, publicada el 31 de diciembre de 2009; Roux et al. Publicación de Patente de EE.UU. número 20050179746, titulada *Device for Controlling the Displacement of a Drop Between Two or Several Solid Substrates*, publicada el 18 de agosto de 2005; y Dhindsa et al., «Virtual Electrowetting Channels: Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality», *Lab Chip*, 10: 832-836 (2010). Ciertos accionadores de gotitas incluirán uno o más sustratos dispuestos con un espacio de operaciones de gotitas entre ellos y electrodos asociados (por ejemplo, en capas, adheridos y/o incrustados) con uno o más sustratos y dispuestos para realizar una o más operaciones de gotitas. Por ejemplo, ciertos accionadores de gotitas incluirán un sustrato base (o fondo), electrodos de operaciones de gotitas asociados con el sustrato, una o más capas dieléctricas encima del sustrato y/o electrodos, y opcionalmente una o más capas hidrofóbicas encima del sustrato, capas dieléctricas y/o los electrodos que forman una superficie de operaciones de gotitas. También se puede proporcionar un sustrato superior, que está separado de la superficie de operaciones de gotitas por un espacio, comúnmente denominado espacio de operaciones de gotitas. Varias disposiciones de electrodos en los sustratos superior y/o inferior se analizan en las patentes y solicitudes mencionadas anteriormente y ciertas disposiciones de electrodos novedosas se analizan en la descripción de la presente divulgación. Durante las operaciones de gotitas, se prefiere que las gotitas permanezcan en contacto continuo o en contacto frecuente con un electrodo de tierra o de referencia. Puede asociarse un electrodo de tierra o de referencia con el sustrato superior que mira hacia el espacio, el sustrato inferior que mira hacia el espacio, en el espacio. Cuando se proporcionan electrodos en ambos sustratos, los contactos eléctricos para acoplar los electrodos a un instrumento accionador de gotitas para controlar o supervisar los electrodos pueden asociarse con una o ambas placas. En algunos casos, los electrodos de un sustrato se acoplan eléctricamente al otro sustrato de modo que solo un sustrato está en contacto con el accionador de gotitas. En una realización, un material conductor (por ejemplo, una resina epoxídica, como MASTER BOND™ Polymer System EP79, disponible de Master Bond, Inc., Hackensack, NJ) proporciona la conexión eléctrica entre los electrodos en un sustrato y las líneas eléctricas en los otros sustratos, por ejemplo, un electrodo de tierra en un sustrato superior se puede acoplar a una línea eléctrica en un sustrato inferior mediante tal material conductor. Cuando se usan múltiples sustratos, se puede proporcionar un espaciador entre los sustratos para determinar la altura del espacio entre ellos y definir depósitos de dispensación en el accionador. En algunos casos, la o las aberturas pueden estar alineadas para la interacción con uno o más electrodos, por ejemplo, alineadas de manera que el líquido que fluye a través de la abertura se acerque lo suficiente a uno o más electrodos de operación de gotitas para permitir que una operación de gotitas sea efectuada por los electrodos de operaciones de gotitas usando el líquido. En algunos casos, los sustratos base (o inferiores) y superiores pueden formarse como un componente integral. Se pueden proporcionar uno o más electrodos de referencia en la base (o el fondo) y/o los sustratos superiores y/o en el espacio. Se proporcionan ejemplos de disposiciones de electrodos de referencia en las patentes y solicitudes de patente mencionadas anteriormente. En diversas realizaciones, la manipulación de gotitas por un accionador de gotitas puede estar mediada por electrodos, por ejemplo, mediada por electrohumectación o mediada por dielectroforesis o mediada por fuerza coulombica. Ejemplos de técnicas para controlar operaciones de gotitas que pueden usarse en los accionadores de gotitas de la presente divulgación incluyen el uso de dispositivos que inducen presión fluidica hidrodinámica, tales como los que operan sobre la base de principios mecánicos (por ejemplo, bombas de jeringa externas, bombas de membrana neumática, bombas de membrana vibratoria, dispositivos de vacío, fuerzas centrífugas, bombas piezoeléctricas/ultrasónicas y fuerzas acústicas); principios eléctricos o magnéticos (por ejemplo, flujo electroosmótico, bombas electrocinéticas, tapones ferrofluidicos, bombas electrohidrodinámicas, atracción o repulsión mediante fuerzas magnéticas y bombas magnetohidrodinámicas); principios termodinámicos (por ejemplo, generación de burbujas de gas / expansión de volumen inducida por cambio de fase); otros tipos de principios de humectación de superficies (por ejemplo, electrohumectación y optoelectrohumectación, así como gradientes de tensión superficial inducidos química, térmica, estructural y radioactivamente); gravedad; tensión superficial (por ejemplo, acción capilar); fuerzas electrostáticas (por ejemplo, flujo electroosmótico); flujo centrífugo (sustrato dispuesto en un disco compacto y girado); fuerzas magnéticas (por ejemplo, los iones oscilantes provocan el flujo); fuerzas magnetohidrodinámicas; y vacío o presión diferencial. En determinadas realizaciones, se pueden emplear combinaciones de dos o más de las técnicas anteriores para realizar una operación de gotitas en un accionador de gotitas de la presente divulgación. De manera similar, uno o más de los anteriores pueden usarse para suministrar líquido en un espacio de operaciones de gotitas, por ejemplo, desde un depósito en otro dispositivo o desde un depósito externo del accionador de gotitas (por ejemplo, un depósito asociado con un sustrato del accionador de gotitas y una línea de flujo desde el depósito hasta el espacio de operaciones de gotitas). Las superficies de operaciones de gotitas de ciertos accionadores de gotitas de la presente divulgación pueden estar hechas de materiales hidrofóbicos o pueden estar recubiertas o ser tratadas para hacerlas hidrofóbicas. Por ejemplo, en algunos casos, una parte o la totalidad de las superficies de operaciones de gotitas pueden derivatizarse con materiales o químicas de baja energía superficial, por ejemplo, por deposición o usando síntesis *in situ* usando compuestos tales como compuestos poli- o perfluorados en solución o monómeros polimerizables. En algunos casos, la superficie de operaciones de gotitas puede incluir un revestimiento hidrófobo. Además, en algunas realizaciones, el sustrato superior del accionador de gotitas incluye un polímero orgánico eléctricamente conductor, que luego se recubre con un recubrimiento hidrofóbico o se trata de otro modo para hacer que la superficie de operaciones de gotitas sea hidrofóbica. Por ejemplo, el polímero orgánico eléctricamente conductor que se deposita sobre un sustrato plástico puede ser poli(3,4-etilendioxitiofeno)-poli(estirenosulfonato) (PEDOT:PSS). Otros ejemplos

de polímeros orgánicos eléctricamente conductores y capas conductoras alternativas se describen en Pollack et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2011/002957, titulada *Droplet Actuator Devices and Methods*, publicada el 6 de enero de 2011. Uno o ambos sustratos pueden fabricarse usando, por ejemplo, una placa de circuito impreso (PCB, por sus siglas en inglés), vidrio, vidrio recubierto de óxido de indio y estaño (ITO, por sus siglas en inglés) y/o materiales semiconductores como sustrato.

«Operación de gotitas» significa cualquier manipulación de una gotita en un accionador de gotitas. Una operación de gotitas puede incluir, por ejemplo: cargar una gotita en el accionador de gotitas; dispensar una o más gotitas de una gotita fuente; partir, separar o dividir una gotita en dos o más gotitas; transportar una gotita de un lugar a otro en cualquier dirección; fusionar o combinar dos o más gotitas en una gotita individual; diluir una gotita; mezclar una gotita; agitar una gotita; deformar una gotita; retener una gotita en una posición; incubar una gotita; calentar una gotita; vaporizar una gotita; enfriar una gotita; disponer una gotita; transportar una gotita de un accionador de gotitas; otras operaciones de gotitas descritas en la presente memoria; y/o cualquier combinación de los anteriores. Los términos «fusionar», «fusionando», «combinar», «combinando» y similares se usan para describir la creación de una gotita a partir de dos o más gotitas. Debe entenderse que cuando tal término se usa en referencia a dos o más gotitas, se puede usar cualquier combinación de operaciones de gotitas que sea suficiente para dar como resultado la combinación de dos o más gotitas en una gotita. Por ejemplo, «fusionar la gotita A con la gotita B» se puede lograr transportando la gotita A en contacto con una gotita B estacionaria, transportando la gotita B en contacto con una gotita A estacionaria o transportando las gotitas A y B en contacto entre sí. Los términos «partir», «separar» y «dividir» no implican ningún resultado en particular con respecto al volumen de las gotitas resultantes (p. ej., el volumen de las gotitas resultantes puede ser el mismo o diferente) o el número de gotitas resultantes (el número de gotitas resultantes puede ser 2, 3, 4, 5 o más). El término «mezclar» se refiere a operaciones de gotitas que dan como resultado una distribución más homogénea de uno o más componentes dentro de una gotita. Ejemplos de operaciones de «carga» de gotitas incluyen carga de microdiálisis, carga asistida por presión, carga robótica, carga pasiva y carga de pipetas. Las operaciones de gotitas pueden estar mediadas por electrodos. En algunos casos, las operaciones de gotitas se facilitan más mediante el uso de regiones hidrófilas y/o hidrófobas en superficies y/o por elementos físicos, tales como obstáculos, cambios de altura de espacios o hendiduras en la superficie. Para ver ejemplos de operaciones de gotitas, consulte las patentes y solicitudes de patente citadas anteriormente bajo la definición de «accionador de gotitas». En ocasiones, se pueden utilizar técnicas de detección o formación de imágenes de impedancia o capacitancia para determinar o confirmar el resultado de una operación de gotitas. Se describen ejemplos de tales técnicas en Sturmer et al., Publicación de Patente de EE.UU. número 20100194408, titulada *Capacitance Detection in a Droplet Actuator*, publicada el 5 de agosto de 2010. En términos generales, las técnicas de detección o formación de imágenes pueden usarse para confirmar la presencia o ausencia de una gotita en un electrodo específico. Por ejemplo, la presencia de una gotita dispensada en el electrodo de destino después de una operación de dispensación de gotitas confirma que la operación de dispensación de gotitas fue eficaz. De manera similar, la presencia de una gotita en un punto de detección en un paso apropiado en un protocolo de ensayo puede confirmar que una serie previa de operaciones de gotitas ha producido con éxito una gotita para la detección. El tiempo de transporte de las gotitas puede ser bastante rápido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, el transporte de una gotita de un electrodo al siguiente puede exceder de aproximadamente 1 segundo, o aproximadamente 0,1 segundos, o aproximadamente 0,01 segundos, o aproximadamente 0,001 segundos. En una realización, el electrodo funciona en modo CA, pero se cambia al modo CC para la formación de imágenes. A veces es útil (aunque no un requisito absoluto) para realizar operaciones de gotitas que el área de huella de la gotita sea similar al área de electrohumectación; en otras palabras, las gotitas 1x, 2x, 3x se controlan de manera útil usando 1, 2 y 3 electrodos, respectivamente. Si la huella de la gotita es mayor que el número de electrodos disponibles para realizar una operación de gotitas en un momento dado, la diferencia entre el tamaño de la gotita y el número de electrodos no debería ser típicamente mayor que 1; en otras palabras, una gotita 2x se controla de manera útil usando 1 electrodo y una gotita 3x se controla de manera útil usando 2 electrodos. Cuando las gotitas incluyen perlas, es útil que el tamaño de la gotita sea igual al número de electrodos que controlan la gotita, por ejemplo, que transportan la gotita.

«Fluido de relleno» significa un fluido asociado con un sustrato de operaciones de gotitas de un accionador de gotitas, fluido que es suficientemente inmiscible con una fase de gotitas para hacer que la fase de gotitas esté sujeta a operaciones de gotitas mediadas por electrodos. Por ejemplo, el espacio de operaciones de gotitas de un accionador de gotitas se llena típicamente con un fluido de relleno. El fluido de relleno puede ser, por ejemplo, o incluir, un aceite de baja viscosidad, tal como aceite de silicona o fluido de relleno de hexadecano. El fluido de relleno puede ser o incluir un aceite halogenado, tal como un aceite fluorado o perfluorado. El fluido de relleno puede llenar todo el espacio del accionador de gotitas o puede revestir una o más superficies del accionador de gotitas. Los fluidos de relleno pueden ser conductores o no conductores. Los fluidos de relleno pueden seleccionarse para mejorar las operaciones de las gotitas y/o reducir la pérdida de reactivo o sustancias diana de las gotitas, mejorar la formación de microgotitas, reducir la contaminación cruzada entre las gotitas, reducir la contaminación de las superficies del accionador de gotitas, reducir la degradación de los materiales del accionador de gotitas, etc. Ejemplos de fluidos de relleno y formulaciones de fluido de relleno adecuados para su uso con los métodos y aparatos expuestos en la presente memoria se proporcionan en Srinivasan et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2010/027894, titulada *Droplet Actuators, Modified Fluids and Methods*, publicada el 3 de junio de 2010; Srinivasan et al. Publicación de Patente Internacional número WO/2009/021173, titulada *Use of Additives for Enhancing Droplet Operations*, publicada el 12 de febrero de 2009; Sista et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2008/098236, titulada *Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads*, publicada el 15 de enero de 2009; y Monroe et

al., Publicación de Patente de EE.UU. número 20080283414, titulada *Electrowetting Devices*, publicada el 20 de noviembre de 2008. En algunos casos, los aceites fluorados pueden estar dopados con tensioactivos fluorados, por ejemplo, Zonyl FSO-100 (Sigma-Aldrich) y/u otros. Un fluido de relleno es típicamente un líquido. En algunas realizaciones, se puede usar un gas de relleno en lugar de un líquido.

5 «Depósito» significa un recinto o recinto parcial configurado para contener, almacenar y/o suministrar líquido. Un sistema accionador de gotitas de la presente divulgación puede incluir depósitos dentro del cartucho y/o depósitos fuera del cartucho. Los depósitos en el cartucho pueden incluir, por ejemplo, (1) depósitos en el accionador, que son depósitos en el espacio de operaciones de gotitas o en la superficie de operaciones de gotitas; (2) depósitos fuera del accionador, que son depósitos en el cartucho accionador de gotitas, pero fuera del espacio de operaciones de gotitas, y no en contacto con la superficie de operaciones de gotitas; o (3) depósitos híbridos que tienen regiones en el accionador y regiones fuera del accionador. Un ejemplo de un depósito fuera del accionador es un depósito en el sustrato superior. Un depósito fuera del accionador está típicamente en comunicación fluida con una abertura o línea de flujo dispuesta para que fluya líquido desde el depósito fuera del accionador al espacio de operaciones de gotitas, tal como a un depósito en el accionador. Un depósito fuera del cartucho puede ser un depósito que no forma parte del cartucho accionador de gotitas en absoluto, pero que hace fluir líquido a alguna parte del cartucho accionador de gotitas. Por ejemplo, un depósito fuera del cartucho puede ser parte de un sistema o una estación de acoplamiento a la que se acopla el cartucho accionador de gotitas durante el funcionamiento. De manera similar, un depósito fuera del cartucho puede ser un recipiente de almacenamiento de reactivos o una jeringa que se use para forzar el ingreso de fluido en un depósito en el cartucho o en un espacio de operaciones de gotitas. Un sistema en que se usa un depósito fuera del cartucho incluirá típicamente un medio de paso de fluido mediante el cual el líquido pueda transferirse desde el depósito fuera del cartucho a un depósito dentro del cartucho o a un espacio de operaciones de gotitas.

Los términos «superior», «inferior», «encima de», «debajo de» y «sobre» se usan en toda la descripción con referencia a las posiciones relativas de los componentes del accionador de gotitas, como las posiciones relativas de los sustratos superior e inferior del accionador de gotitas. Se apreciará que el accionador de gotitas es funcional independientemente de su orientación en el espacio.

Cuando un líquido en cualquier forma (por ejemplo, una gotita o un cuerpo continuo, ya sea en movimiento o estacionario) se describe que está «sobre», «en» o «encima de» un electrodo, un chip, una matriz o una superficie, dicho líquido podría estar ya sea en contacto directo con el electrodo / el chip / la matriz / la superficie, o podría estar en contacto con una o más capas o películas que se interpongan entre el líquido y el electrodo / el chip / la matriz / la superficie. En un ejemplo, el fluido de relleno se puede considerar como una película entre dicho líquido y el electrodo / el chip / la matriz / la superficie.

Cuando una gotita se describe que está «sobre» o «cargada en» un accionador de gotitas, debe entenderse que la gotita está dispuesta en el accionador de gotitas de una manera que facilita el uso del accionador de gotitas para realizar una o más operaciones de gotitas en la gotita, la gotita está dispuesta en el accionador de gotitas de una manera que facilita la detección de una propiedad o una señal de la gotita, y/o la gotita se ha sometido a una operación de gotita en el accionador de gotitas.

Los términos «cartucho de fluidos», «cartucho de fluidos digitales», «accionador de gotitas» y «cartucho accionador de gotitas», tal como se usan a lo largo de la descripción, pueden ser sinónimos.

Breve descripción de la invención

40 La invención proporciona métodos y sistemas de acuerdo con las reivindicaciones 1, 6, 9 y 14 independientes. Otros elementos y aspectos resultarán evidentes a partir de las reivindicaciones dependientes. De acuerdo con las realizaciones en la presente memoria, se proporciona un método para capturar células de interés en un sistema microfluídico digital, que comprende utilizar un accionador de gotitas para transportar una gotita de muestra a un dispositivo de micropocillos. El dispositivo de micropocillos incluye un sustrato que tiene una pluralidad de micropocillos que se abren sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos. La gotita de muestra incluye células de interés que entran en los micropocillos. El método introduce perlas de captura en los micropocillos y los elementos de captura se inmovilizan en las perlas de captura. En el método se utiliza el accionador de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos. Partes de la gotita del reactivo de lisis celular entran en los micropocillos y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen el analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas de captura.

Opcionalmente, el método puede comprender además utilizar el accionador de gotitas para transportar la gotita de muestra lejos del dispositivo de micropocillos si bien dejando al menos una parte de las células de interés capturadas en los micropocillos. El método puede permitir que al menos una parte de las células de interés se sedimenten en los micropocillos. La superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos puede incluir áreas intersticiales entre los micropocillos que sean hidrófobas de manera que sustancialmente no quede ningún residuo de las células de interés o perlas de captura en la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos. El método permite eliminar de los micropocillos las perlas de captura con el analito capturado en ellas. La operación de eliminación puede incluir colocar un imán cerca de los micropocillos para formar un campo magnético que extraiga las perlas de captura de los micropocillos. El método permite utilizar un campo magnético para mover las perlas de captura

hacia y desde, los micropocillos.

Opcionalmente, cada una de las perlas de captura puede incluir una pluralidad de elementos de captura. La pluralidad de elementos de captura puede incluir una secuencia de captura y una secuencia de código de barras única. La secuencia de captura puede ser una de i) una secuencia poli-T para la captura del ARNm total, o ii) una pluralidad de secuencias de captura específicas de la transcripción que se dirigen a un panel de genes de interés. Las perlas de captura pueden tener un tamaño tal que solo una de las perlas de captura quepa en uno de los micropocillos. Las perlas de captura se pueden depositar en los micropocillos por gravedad. Las perlas de captura pueden ser magnéticas y se depositan en los micropocillos utilizando una atracción magnética.

De acuerdo con las realizaciones en la presente memoria, se proporciona un sistema de fluídica digital para capturar células de interés, que comprende un accionador de gotitas que incluye un espacio de operaciones de gotitas. El accionador de gotitas incluye electrodos de operaciones de gotitas dispuestos cerca del espacio de operaciones de gotitas. Un dispositivo de micropocillos incluye un sustrato. El dispositivo de micropocillos incluye micropocillos formados en el sustrato. Los micropocillos se abren sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos. El dispositivo de micropocillos se acopla al accionador de gotitas y se coloca de manera que los micropocillos se enfrenten al espacio de operaciones de las gotitas. El controlador está configurado para ejecutar instrucciones de programa para dirigir el accionador de gotitas para que transporte una gotita de muestra a un dispositivo de micropocillos. La gotita de muestra incluye células de interés que entran en los micropocillos. El controlador introduce además perlas de captura en los micropocillos, en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas de captura y dirige el accionador de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos. Partes de la gotita de reactivo de lisis entran en los micropocillos y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen el analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas de captura.

Opcionalmente, el sustrato puede incluir una capa hidrófoba dispuesta sobre él. La capa hidrófoba se puede formar sobre la superficie de operaciones de las gotitas. El espacio de operaciones de gotitas puede configurarse para retener un fluido de relleno que incluya la gotita de muestra que contiene las células de interés. Los micropocillos pueden tener un tamaño y estar a una distancia dimensionados para recibir solo una célula individual de las células de interés en la gotita de muestra y para recibir solo una de las micropocillos. Los micropocillos pueden tener una profundidad entre 30 μm y 50 μm . Los micropocillos pueden tener un diámetro entre 3 μm y 60 μm . Los micropocillos pueden estar separados entre sí por una distancia no mayor que 80 μm .

En otras realizaciones, el dispositivo de micropocillos incluye un segundo sustrato que tiene una pluralidad de trampas de células que se abren sobre la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos. Las trampas de células están dispuestas cerca de los micropocillos. Por ejemplo, el segundo sustrato es una superficie superior del dispositivo de micropocillos, mientras que los micropocillos están en la superficie inferior del dispositivo. En una realización, las trampas de células en el segundo sustrato se colocan directamente encima de los micropocillos sobre el primer sustrato. La gotita de muestra incluye células de interés que entran en las trampas de células. El método introduce perlas de captura en los micropocillos y los elementos de captura se inmovilizan en las perlas de captura. En el método se utiliza el accionador de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos.

En algunas realizaciones se contemplan métodos para capturar células de interés en un sistema microfluídico digital, comprendiendo el método: (a) utilizar un accionador de gotitas para transportar una gotita de muestra a un dispositivo de micropocillos, incluyendo el dispositivo de micropocillos un primer sustrato que tiene una pluralidad de micropocillos que se abren a una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos, y una pluralidad de trampas de células que se abren a la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos, incluyendo la gotita de muestra células de interés que entran en las trampas de células; (b) introducir perlas de captura en los micropocillos, en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas de captura; y (c) utilizar el accionador de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos, en donde partes de la gotita de reactivo de lisis celular entran en los micropocillos y las trampas de células y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas de captura.

En algunas realizaciones, las perlas de captura tienen un tamaño tal que solo una de las perlas de captura cabe en uno de los micropocillos. En otras realizaciones, las trampas de células tienen un tamaño tal que solo una de las células de interés cabe en una de las trampas de células. En otras realizaciones, los métodos comprenden además: (d) durante el período de incubación y/o antes del mismo, utilizar el accionador de gotitas para transportar un fluido inmiscible con la gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos, en donde el fluido inmiscible no entra en los micropocillos y las trampas de células, encapsulándose así perlas individuales con células individuales con reactivo de lisis celular. En algunas realizaciones, el método comprende además eliminar de los micropocillos las perlas de captura con el analito capturado en ellas. En algunas realizaciones, la eliminación incluye colocar un imán cerca de los micropocillos para formar un campo magnético que extraiga las perlas de captura de los micropocillos. En algunas realizaciones, los métodos comprenden además la utilización de un campo magnético para mover las perlas de captura hacia y desde, los micropocillos. En algunas realizaciones, cada una de las perlas de captura incluye una pluralidad de elementos de captura. En algunas realizaciones, la pluralidad de elementos de captura incluye una secuencia de captura y una secuencia de código de barras única, en donde la secuencia de captura es opcionalmente una de i) una secuencia poli-T para la captura de ARNm total, o ii) una pluralidad de secuencias de captura específicas

de la transcripción que se dirigen a un panel de genes de interés.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1A ilustra una vista en perspectiva de un ejemplo de un accionador de gotitas que incluye una disposición de micropocillos (por ejemplo, una matriz de micropocillos) para aislar células individuales para la caracterización de analitos de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 1B ilustra una vista superior del accionador de gotitas de la figura 1A y muestra la disposición de los depósitos de fluido para dispensar y/o recoger los fluidos de reacción de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 2 ilustra una vista lateral de una parte de un dispositivo de micropocillos y el accionador de gotitas de la figura 1 de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 10 La figura 3A ilustra un ejemplo de un procedimiento de fabricación de los micropocillos mostrados en las figuras 1 y 2 de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 3B ilustra un ejemplo de un procedimiento de fabricación de los micropocillos mostrados en las figuras 1 y 2 de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 15 La figura 3C ilustra un ejemplo de un procedimiento de fabricación de los micropocillos mostrados en las figuras 1 y 2 de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 3D ilustra un ejemplo de un procedimiento de fabricación de los micropocillos mostrados en las figuras 1 y 2 de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 4 muestra una foto de una parte de un dispositivo de micropocillos.
- 20 La figura 5A ilustra vistas laterales del accionador de gotitas de la figura 2 y muestra un procedimiento de uso de un dispositivo de micropocillos para aislar células individuales para la caracterización de un analito de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 5B ilustra vistas laterales del accionador de gotitas de la figura 2 y muestra un procedimiento de uso de un dispositivo de micropocillos para aislar células individuales para la caracterización de un analito de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 25 La figura 5C ilustra vistas laterales del accionador de gotitas de la figura 2 y muestra un procedimiento de uso de un dispositivo de micropocillos para aislar células individuales para la caracterización de un analito de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 5D ilustra vistas laterales del accionador de gotitas de la figura 2 y muestra un procedimiento de uso de un dispositivo de micropocillos para aislar células individuales para la caracterización de un analito de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 30 La figura 5E ilustra vistas laterales del accionador de gotitas de la figura 2 y muestra un procedimiento de uso de un dispositivo de micropocillos para aislar células individuales para la caracterización de un analito de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 5F ilustra vistas laterales del accionador de gotitas de la figura 2 y muestra un procedimiento de uso de un dispositivo de micropocillos para aislar células individuales para la caracterización de un analito de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 35 La figura 5G ilustra vistas laterales del accionador de gotitas de la figura 2 y muestra un procedimiento de uso de un dispositivo de micropocillos para aislar células individuales para la caracterización de un analito de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 40 La figura 6A es una vista superior de una parte de un dispositivo de micropocillos de un accionador de gotitas que muestra la coencapsulación de células y perlas de captura en los micropocillos de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 6B es una vista superior de una parte de un dispositivo de micropocillos de otro accionador de gotitas que muestra la coencapsulación de células y perlas de captura en los micropocillos de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 45 La figura 7A muestra gráficos de ADNc preparado a partir de ARN recuperado de un procedimiento basado en un accionador de gotitas para capturar ARN de células individuales usando perlas con códigos de barras que no son magnéticamente sensibles de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 7B muestra gráficos de la distribución del tamaño de los fragmentos de las inserciones de la colección preparadas en banco a partir del ADNc de la figura 7A de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 50

- La figura 8A muestra un gráfico del recuento de lecturas de transcripciones humanas y transcripciones de ratón para cada código de barras único de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 5 La figura 8B muestra un gráfico de los recuentos de lecturas para las transcripciones humanas y de ratón para cada código de barras único en un segundo experimento de especies mixtas de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 9 ilustra una vista superior de un ejemplo de un sustrato inferior de un accionador de gotitas adecuado para su uso en la realización de un protocolo de construcción de colecciones de células individuales multiplexada de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 10 La figura 10A ilustra un ejemplo de un procedimiento de fabricación de una matriz de micropocillos en el sustrato inferior de un accionador de gotitas de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 10B ilustra un ejemplo de un procedimiento de fabricación de una matriz de micropocillos en el sustrato inferior de un accionador de gotitas de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 10C ilustra un ejemplo de un procedimiento de fabricación de una matriz de micropocillos en el sustrato inferior de un accionador de gotitas de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 15 La figura 11A ilustra vistas en perspectiva de un dispositivo de microcanales y muestra un procedimiento para tapar una matriz de micropocillos con una fase inmisible para formar compartimentos de reacción aislados de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 11B ilustra vistas en perspectiva de un dispositivo de microcanales y muestra un procedimiento para tapar una matriz de micropocillos con una fase inmisible para formar compartimentos de reacción aislados de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 20 La figura 11C ilustra vistas en perspectiva de un dispositivo de microcanales y muestra un procedimiento para tapar una matriz de micropocillos con una fase inmisible para formar compartimentos de reacción aislados de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 11D ilustra vistas en perspectiva de un dispositivo de microcanales y muestra un procedimiento para tapar una matriz de micropocillos con una fase inmisible para formar compartimentos de reacción aislados de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 25 La figura 11E ilustra vistas en perspectiva de un dispositivo de microcanales y muestra un procedimiento para tapar una matriz de micropocillos con una fase inmisible para formar compartimentos de reacción aislados de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 30 La figura 12A ilustra una vista superior de una parte de un dispositivo de microcanales que muestra un microcanal completamente cargado y micropocillos asociados, y micropocillos «tapados» después de la inyección de aceite, respectivamente, de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 12B ilustra una vista superior de una parte de un dispositivo de microcanales que muestra un microcanal completamente cargado y micropocillos asociados, y micropocillos «tapados» después de la inyección de aceite, respectivamente, de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 35 La figura 13 es una vista superior de una parte de un dispositivo 1300 de microcanales que incluye micropocillos que son de forma rectangular de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 14 es una vista superior de una parte de una matriz de microcanales altamente paralelos de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 40 La figura 15A ilustra un ejemplo de una estructura de pocillo «positiva» de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 15B ilustra un ejemplo de una estructura de pocillo «positiva» de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 15C ilustra un ejemplo de una estructura de pocillo «positiva» de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 45 La figura 15D ilustra un ejemplo de una estructura de pocillo «positiva» de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- La figura 16A ilustra otro ejemplo de una estructura de pocillo «positiva» de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.
- 50 La figura 16B ilustra otro ejemplo de una estructura de pocillo «positiva» de acuerdo con las realizaciones en la

presente memoria.

La figura 16C ilustra otro ejemplo de una estructura de pocillo «positiva» de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.

5 La figura 17 ilustra un diagrama de bloques de un ejemplo de un sistema de microfluidos que incluye un accionador de gotitas de acuerdo con las realizaciones en la presente memoria.

10 Las figuras 18A-18B ilustran un dispositivo de microfluidos digital con estructuras de trampa de células en la placa superior que permiten que las células de interés queden atrapadas físicamente por encima de micropocillos que contienen perlas. En la figura 18A se proporciona una vista lateral del dispositivo donde las perlas y las células están colocalizadas. Los rectángulos vacíos son estructuras de captura de células fijadas a la tapa superior, los puntos de color gris claro son células atrapadas en dichas estructuras y los puntos negros son perlas en micropocillos en la superficie inferior. La figura 18B ilustra una vista superior de tal dispositivo, mostrando que la estructura de captura de células en la tapa superior colocaliza las células atrapadas con perlas en micropocillos en la superficie inferior.

15 Las figuras 19A-19B ilustran el dispositivo de la figura 18 donde se ha cargado aceite a través del canal para desplazar una gotita de fase acuosa y efectuar la encapsulación de pares de perlas/células. La figura 19A ilustra que el aceite cargado en el microcanal (área sombreada en gris) rodea las ubicaciones de la trampa de micropocillos/células, pero no las llena, dejando la célula, la perla y el medio de gotitas encapsulados o compartimentados dentro de una única microcámara acuosa con un borde de aceite. La figura 19B ilustra una vista superior del dispositivo cargado de aceite, donde el aceite rodea el micropocillo / la trampa, encapsulando la célula y la perla juntas en una microcámara acuosa.

20 Las figuras 20A-D ilustran el atrapamiento y la encapsulación de aceite para esferas atrapadas en estructuras de trampas de células. La figura 20A es una imagen fluorescente de microesferas (círculos blancos) fluorescentes de 10 um, usadas como proxy de las células para permitir la visualización, atrapadas en un dispositivo como en la figura 18. La figura 20B muestra imágenes fluorescentes y de luz blanca superpuestas de las partículas fluorescentes ubicadas en las estructuras de atrapamiento de células. La figura 20C muestra el flujo de aceite hacia el canal dando como resultado la formación de gotitas acuosas aisladas que imitan la forma de las estructuras de la trampa, encapsulando así las esferas. La altura del espacio entre las superficies superior e inferior del dispositivo en las estructuras de la trampa de células es menor que la altura del espacio en los sitios circundantes, y el aceite no puede desplazar el agua de estos espacios en condiciones de caudal lento. En la figura 20D se muestran cámaras acuosas aisladas rodeadas de aceite después de descargar aceite a través del canal. Las esferas se encapsulan dentro de las gotitas acuosas.

30 Descripción detallada de la invención

Las realizaciones en la presente memoria proporcionan dispositivos, sistemas y métodos para aislar células individuales para la caracterización de analitos. En algunas realizaciones, los dispositivos son dispositivos accionadores de gotitas haciendo uso de la tecnología de microfluidos, como la electrohumección. Los dispositivos, sistemas y métodos de la invención pueden proporcionar una manipulación de líquidos automatizada para el procesamiento de muestras biológicas (por ejemplo, suspensiones de células) para el análisis de analitos. Los ejemplos de analitos incluyen ácidos nucleicos (p. ej., ADN metilado de ADN genómico, ADN mitocondrial, híbridos de ADN/ARN, ARN mensajero de ARN (ARNm), ARN viral, microARN), proteínas, orgánulos, etc.

40 En varias realizaciones, un accionador de gotitas incluye una matriz de micropocillos en los que se aíslan múltiples células individuales (es decir, una célula individual por micropocillo). La célula se puede lisar y se pueden procesar los analitos de cada célula individual. En una realización, los analitos se capturan en una o más perlas de captura. Una perla de captura puede ser, por ejemplo, una perla de gel, o una perla porosa, o una perla hueca (por ejemplo, una cubierta) y puede o no ser magnéticamente sensible. Una perla de captura puede incluir un código de barras que sea exclusivo para esa perla de captura o la perla de captura puede no incluir un código de barras. Una perla de captura puede codificarse de otra manera, como codificada por colores.

45 En una realización, la matriz de micropocillos se forma por separado a partir del accionador de gotitas y se integra en el sustrato inferior del accionador de gotitas. La matriz puede integrarse en el espacio de operaciones de gotitas del accionador de gotitas. En otra realización, la matriz se fabrica directamente sobre un sustrato, tal como un sustrato inferior de un accionador de gotitas. En una realización, el tamaño de un micropocillo y el tamaño de una perla de captura pueden seleccionarse de manera que cada micropocillo en la matriz acomode una perla individual de captura.

50 En una realización, se forma una pluralidad de trampas de células por separado a partir del accionador de gotitas y se integra en el sustrato superior del accionador de gotitas. La pluralidad de trampas de células puede integrarse en el espacio de operaciones de gotitas del accionador de gotitas. En otra realización, la pluralidad de trampas de células se fabrica directamente sobre un sustrato, tal como un sustrato superior de un accionador de gotitas. En una realización, el tamaño de la trampa de células puede seleccionarse de manera que cada trampa de la pluralidad acomode una célula individual.

55 En varias realizaciones, una perla de captura incluye una pluralidad de elementos de captura inmovilizados en la superficie de la perla. En una realización, los elementos de captura son oligonucleótidos de captura inmovilizados en

la superficie de una perla para la captura de ácidos nucleicos de una célula individual. Un oligonucleótido de captura puede incluir, por ejemplo, una secuencia de captura de ácido nucleico, una secuencia de identificador molecular único (UMI, por sus siglas en inglés) y una secuencia única de código de barras específica de la perla. En un ejemplo, la secuencia de captura de ácido nucleico es una secuencia poli-T para la captura de ARN total de una célula individual.

5 En otro ejemplo, la secuencia de captura de ácido nucleico es una pluralidad de secuencias de captura específicas de la transcripción que se dirigen a un panel de genes de interés. La secuencia de código de barras única permite que los ácidos nucleicos de cada célula (por ejemplo, el transcriptoma) se asocien con la célula original. Por lo tanto, para cualquier célula individual determinada, los genes y las transcripciones se pueden identificar y asignar a la misma célula porque las secuencias comparten el mismo código de barras único. En algunas realizaciones, un oligonucleótido de captura también incluye una secuencia escindible para liberar ácidos nucleicos capturados de la perla.

10 Un accionador de gotitas de la invención puede configurarse para realizar uno o más pasos en un protocolo de análisis de muestra. En una realización, se puede configurar un accionador de gotitas para realizar uno o más pasos del procedimiento para el análisis de ácidos nucleicos. El análisis de los ácidos nucleicos puede incluir, por ejemplo, análisis de PCR y/o análisis de secuenciación. En un ejemplo, un accionador de gotitas puede configurarse para realizar uno o más pasos en una muestra para el protocolo de colección lista para secuenciar. Se puede configurar un accionador de gotitas para el aislamiento de múltiples células individuales en micropocillos individuales en el accionador de gotitas junto con microesferas individuales en micropocillos individuales, y la captura del ácido nucleico de cada célula individual en una perla con código de barras único. Las perlas con código de barras de cada micropocillo en el accionador de gotitas se recuperan luego del accionador de gotitas y se procesan en banco para generar una colección lista para secuenciar.

15 En otro ejemplo, se puede configurar un accionador de gotitas para el aislamiento de múltiples células individuales en micropocillos individuales en el accionador de gotitas junto con perlas individuales en micropocillos individuales, captura del ácido nucleico de cada célula individual en una perla con código de barras único y procesamiento del ácido nucleico capturado en el accionador de gotitas para generar una colección lista para la secuenciación.

20 En otro ejemplo, se puede configurar un accionador de gotitas para el aislamiento de múltiples células individuales en trampas de células individuales en el accionador de gotitas y para el aislamiento de perlas individuales en micropocillos individuales, donde cada trampa de células se coloca proximalmente a un micropocillo individual, captura del ácido nucleico de cada célula individual en una perla de código de barras única, y procesamiento del ácido nucleico capturado en el accionador de gotitas para generar una colección lista para secuenciar.

25 Dispositivo de micropocillos integrado en un accionador de gotitas

30 Un accionador de gotitas típicamente incluye uno o más sustratos configurados para formar una superficie o espacio para realizar operaciones de gotitas. Dicho o dichos sustratos establecen una superficie de operaciones de gotitas o un espacio para realizar operaciones de gotitas y también pueden incluir electrodos dispuestos para realizar las operaciones de gotitas. El sustrato de operaciones de gotitas o el espacio entre los sustratos puede recubrirse o llenarse con un fluido de relleno que sea inmiscible con el líquido que forma las gotitas.

35 La figura 1A ilustra una vista en perspectiva de un ejemplo de un accionador 100 de gotitas que incluye una disposición de micropocillos (por ejemplo, una matriz de micropocillos) para aislar células de interés (por ejemplo, células individuales) para la caracterización de analitos. El accionador 100 de gotitas incluye un sustrato 110 inferior y un sustrato 112 superior que están separados por un espacio de operaciones de gotitas. El sustrato 110 inferior es, por ejemplo, una placa de circuito impreso (PCB, por sus siglas en inglés). El sustrato 112 superior es, por ejemplo, un sustrato de plástico o vidrio. El accionador 100 de gotitas incluye un compartimento 113 formado en uno o ambos de los sustratos 112, 110 superior e inferior. El compartimento 113 está conformado y dimensionado para recibir un dispositivo 115 de micropocillos. Por ejemplo, el dispositivo 115 de micropocillos se forma por separado del sustrato 110 inferior. A continuación, el dispositivo 115 de micropocillos se acopla al sustrato 110 inferior del accionador 100 de gotitas. Al hacerlo, el dispositivo 115 de micropocillos se proporciona en relación con el espacio de operaciones de gotitas del accionador 100 de gotitas. Opcionalmente, el dispositivo 115 de micropocillos puede insertarse en un compartimento en el sustrato 112 superior, o formarse integral con uno de los sustratos 112, 110 superior e inferior.

40 En un ejemplo, el dispositivo 115 de micropocillos tiene un tamaño de aproximadamente 10,2 mm x 9,5 mm. El dispositivo 115 de micropocillos incluye, por ejemplo, una matriz de micropocillos (no mostrada).

45 La figura 1B ilustra una vista superior del accionador 100 de gotitas de la figura 1A y muestra la disposición de los depósitos de fluido para dispensar y/o recoger los fluidos de reacción. El accionador 100 de gotitas incluye múltiples depósitos 120 de fluido (por ejemplo, 4 depósitos 120a a 120d de fluido), que pueden, por ejemplo, asignarse como depósitos de recogida y/o distribución de fluido de desecho. En este ejemplo, el depósito 120a de fluido puede usarse como depósito dispensador de muestras para dispensar una o más gotitas de muestra que incluyen una cantidad de células individuales de interés; el depósito 120b de fluido puede usarse como depósito de dispensación de reactivo para dispensar una o más gotitas de reactivo que incluyen una cantidad de perlas de captura (por ejemplo, perlas de captura con código de barras que son magnéticamente sensibles); el depósito 120c de fluido puede usarse como depósito dispensador de reactivo para dispensar una o más gotitas de tampón de lisis celular; y el depósito 120d de fluido puede usarse como depósito de recogida de fluido de desecho para recibir gotitas de reacción gastadas. En

diversas realizaciones, se pueden proporcionar otros depósitos y reactivos, por ejemplo, un tampón para recuperar las perlas de captura de los micropocillos después de la lisis celular y la unión del analito según el paso descrito a continuación con referencia a la figura 5G. El accionador 100 de gotitas y el dispositivo 115 de micropocillos se describen con más detalle con referencia a la figura 2.

5 La figura 2 ilustra una vista lateral de una parte del dispositivo 115 de micropocillos y el accionador 100 de gotitas de la figura 1. El sustrato 110 inferior está separado del sustrato 112 superior por un espacio 215 de operaciones de gotitas. Las operaciones de gotitas se llevan a cabo en un espacio 215 de operaciones de gotitas en una superficie de operaciones de gotitas. El dispositivo 115 de micropocillos está acoplado al compartimento 113, y se mantiene dentro de él, de manera que una superficie del dispositivo 115 de micropocillos forma un segmento de la superficie de
10 operaciones de las gotitas. El sustrato 110 inferior incluye una disposición de electrodos 220 de operación de gotitas (por ejemplo, electrodos de electrohumectación). Las operaciones de gotitas se llevan a cabo encima del electrodo 220 de operaciones de gotitas sobre una superficie de operaciones de gotitas. El dispositivo 115 de micropocillos integrado en el sustrato 110 inferior incluye un sustrato 225. En un ejemplo, el sustrato 225 es un sustrato de silicio. Una capa 230 hidrófoba está dispuesta sobre la superficie del sustrato 225 que se enfrenta al espacio 215 de
15 operaciones de gotitas. La capa 230 hidrófoba forma un lado del espacio 215 de operaciones de gotitas para la región del espacio 215 de operaciones de gotitas alineada con el dispositivo 115 de micropocillos. En un ejemplo, la capa 230 hidrófoba está formada por CYTOP (polímero óptico transparente cíclico, por sus siglas en inglés). Se forma una pluralidad (por ejemplo, una matriz) de micropocillos 235 y se abren sobre el sustrato 225 y la capa 230 hidrófoba. Los micropocillos 235 se abren sobre la superficie de operación de gotitas del dispositivo 115 de micropocillos. La
20 fabricación del dispositivo 115 de micropocillos se describe en más detalle con referencia a las figuras 3A a 3D.

Una gotita de muestra (no mostrada) puede transportarse usando operaciones de gotitas a lo largo de los electrodos 220 de operación de gotitas al dispositivo 115 de micropocillos. En un ejemplo, la gotita de muestra puede contener una pluralidad de células de interés (por ejemplo, células individuales) para ser procesadas para la construcción de una colección de ácidos nucleicos para secuenciar como se describe con más detalle con referencia a las figuras 5A a 5G.

25 Las figuras 3A a 3D ilustran un ejemplo de un procedimiento 300 de fabricación del dispositivo 115 de micropocillos de las figuras 1 y 2. La densidad de los micropocillos 235 en el dispositivo 115 de micropocillos se puede afinar fácilmente ajustando el tamaño y la distancia de los micropocillos 235. En este ejemplo, solo se muestra una parte del dispositivo 115 de micropocillos.

30 En un primer paso y con referencia ahora a la figura 3A, se proporciona el sustrato 225. En un ejemplo, el sustrato 225 es una oblea de silicio que tiene un tamaño de aproximadamente 10,2 mm x 9,5 mm. Luego, se forma la capa 230 hidrófoba (por ejemplo, CYTOP, FOTS u otras monocapas o polímeros fluorados) sobre la superficie del sustrato 225.

35 En un siguiente paso y haciendo referencia ahora a la figura 3B, usando un procedimiento de fotolitografía estándar, se proporciona una capa 310 fotorresistente encima de la capa 230 hidrófoba. Luego, una matriz de huecos 315 circulares se modela en la capa 310 fotorresistente. Al hacerlo, se forma una máscara de sombra encima de la capa 230 hidrófoba que deja expuestas regiones circulares de la capa 230 hidrófoba. Esta máscara de sombra se usa para definir la ubicación de los micropocillos 235 y grabarlos.

40 El diámetro de cada uno de los huecos 315 circulares puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 3 μm a aproximadamente 60 μm . En un ejemplo, el diámetro de cada uno de los huecos 315 circulares es de aproximadamente 40 μm y la distancia de los huecos 315 circulares es de aproximadamente 80 μm . En este ejemplo, la densidad de los huecos 315 circulares en el sustrato 225 es de aproximadamente 150 círculos/ mm^2 . Por consiguiente, se pueden proporcionar aproximadamente 15 000 huecos 315 circulares en un área de aproximadamente 10,2 mm x 9,5 mm. El tamaño de los huecos 315 circulares se selecciona basándose en el tamaño de una microperla que se usa en un protocolo a base de perlas para la captura de analitos diana (por ejemplo, ácidos nucleicos).

45 En un paso siguiente y haciendo referencia ahora a la figura 3C, se usa un procedimiento de grabado para eliminar material de las partes de la capa 230 hidrófoba y el sustrato 225 que están expuestos a través de huecos 315 circulares en la capa 310 fotorresistente y de ese modo formar micropocillos 235. En un ejemplo, el procedimiento de grabado es un procedimiento de grabado con iones reactivos (RIE, por sus siglas en inglés). En los huecos 315 circulares, los micropocillos 235 se pueden grabar a una profundidad de, por ejemplo, desde aproximadamente 30 μm hasta
50 aproximadamente 50 μm . En un ejemplo, los micropocillos 235 se graban hasta una profundidad de aproximadamente 30 μm . La profundidad de los micropocillos 225 se selecciona de modo que solo una microperla y una célula individual puedan caber en cualquier micropocillo 225.

55 En un paso siguiente y haciendo referencia ahora a la figura 3D, se elimina la capa 310 de fotorresistencia para exponer la parte de la capa 230 hidrófoba que queda fuera de los micropocillos 225. Por ejemplo, la capa 310 de fotorresistencia se elimina usando un protocolo de extracción con acetona. El dispositivo 115 de micropocillos puede describirse como que tiene una superficie «semihidrófoba», es decir, las superficies de los micropocillos 225 son hidrófilas, mientras que las regiones intersticiales entre los micropocillos 225 están recubiertas con una capa 230 hidrófoba.

En la figura 4 se muestra una sección 400 de una parte de un dispositivo de micropocillos, tal como el dispositivo 115 de micropocillos. En este ejemplo, los micropocillos tienen aproximadamente 40 μm de diámetro en una distancia de

aproximadamente 80 µm.

Aislamiento de células individuales y captura de analitos en un accionador de gotitas

5 Las figuras 5A a 5G ilustran vistas laterales del accionador 100 de gotitas de la figura 2 y muestran un procedimiento 500 de uso de un dispositivo de micropocillos (por ejemplo, dispositivo 115 de micropocillos) para aislar células individuales para la caracterización de un analito. El método de las figuras 5A a 5H es un ejemplo de un protocolo en donde se aíslan células individuales en micropocillos, se lisan y se captura un analito diana en perlas para su posterior procesamiento. En un ejemplo, las perlas de captura son perlas con código de barras que son magnéticamente sensibles y el analito diana es el ARN. El procedimiento 500 puede incluir, entre otros, los siguientes pasos.

10 En un paso y con referencia ahora a la figura 5A, una gotita 510 de muestra se transporta mediante operaciones de gotitas al dispositivo 115 de micropocillos. La gotita 510 de muestra incluye una cantidad de células 515 individuales.

15 En otro paso y con referencia ahora a la figura 5B, la gotita 510 de muestra se incuba en el dispositivo 115 de micropocillos durante un período de tiempo (por ejemplo, de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 segundos) que es suficiente para que las células 515 individuales se depositen (por gravedad) en los micropocillos 235. La tasa de captura de células en los micropocillos 235 es una función de la concentración inicial de células 515 individuales en la gotita 510 de muestra y la cantidad de tiempo que la gotita 510 de muestra se coloca en el dispositivo 115 de micropocillos.

20 En otro paso y con referencia ahora a la figura 5C, la gotita 510 de muestra se transporta usando operaciones de gotitas fuera del dispositivo 115 de micropocillos. A medida que la gotita 510 de muestra se transporta lejos del dispositivo 115 de micropocillos, el fluido de muestra residual y las células 515 individuales capturadas en los micropocillos 235 se retienen en el dispositivo 115 de micropocillos. Debido a la presencia de la capa 230 hidrófoba en la región intersticial entre los micropocillos 235, el líquido de muestra residual y las células se localizan en los micropocillos 235 y el área intersticial está sustancialmente sin residuos de muestra.

25 En otro paso y con referencia ahora a la figura 5D, una gotita 520 de reactivo que incluye una cantidad de perlas 525 de captura magnéticamente sensibles se transporta usando operaciones de gotitas al dispositivo 115 de micropocillos. Inmovilizado en cada perla 525 de captura magnéticamente sensible hay una pluralidad de elementos de captura (p. ej., sondas de captura de ácido nucleico (no mostradas)) que incluyen una secuencia de captura y una secuencia de código de barras única (no mostrada). En un ejemplo, la secuencia de captura es una secuencia poli-T para la captura del ARNm total. En otro ejemplo, la secuencia de captura es una pluralidad de secuencias de captura específicas de la transcripción que se dirigen a un panel de genes de interés. Las perlas 525 de captura que son magnéticamente sensibles se depositan, por ejemplo, en micropocillos 235 por gravedad. En otro ejemplo, se puede colocar un imán (no mostrado) debajo del dispositivo 115 de micropocillos de manera que la fuerza magnética del imán atraiga perlas 30 525 de captura magnéticamente sensibles a los micropocillos 235. La concentración de perlas 525 de captura magnéticamente sensibles en la gotita 520 de reactivo es suficientemente alta de manera que cada micropocillo 235 en el dispositivo 115 de micropocillos contiene una perla 525 de captura magnéticamente sensible. El tamaño de las perlas 525 de captura magnéticamente sensibles es tal que solo una perla cabe en un micropocillo 235.

35 En otro paso y con referencia ahora a la figura 5E, la gotita 520 de reactivo se transporta usando operaciones de gotitas fuera del dispositivo 115 de micropocillos. Como la gotita 520 de reactivo, que contiene cualquier exceso de perlas 525 de captura magnéticamente sensibles, se transporta lejos del dispositivo 115 de micropocillos, el fluido reactivo residual y las perlas 525 de captura magnéticamente sensibles en los micropocillos 235 se retienen en el dispositivo 115 de micropocillos.

40 En otro paso y con referencia ahora a la figura 5F, se transporta una gotita 530 de reactivo de lisis celular usando operaciones de gotitas al dispositivo 115 de micropocillos. La gotita 530 de reactivo de lisis celular se transporta luego usando operaciones de gotitas lejos del dispositivo 115 de micropocillos. Cada micropocillo 235 ahora incluye una cantidad de reactivo de lisis celular y una perla 525 de captura magnéticamente sensible. Algunos micropocillos 235 pueden incluir una sola célula 515. Otros micropocillos 235 pueden incluir más de una (por ejemplo, dos) células 515 solas. En un período de incubación (por ejemplo, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 15 minutos), las células 515 solas se lisan en micropocillos 235 y el analito liberado (por ejemplo, ARN) se captura en perlas 525 de captura que son magnéticamente sensibles.

50 En otro paso y con referencia ahora a la figura 5G, una gotita 535 de captura se transporta usando operaciones de gotitas al dispositivo 115 de micropocillos. Se coloca un imán 540 sobre el sustrato 112 superior y se alinea con el dispositivo 115 de micropocillos de manera que el dispositivo 115 de micropocillos está dentro del campo magnético del mismo. El campo magnético del imán 540 se usa para extraer perlas 525 de captura magnéticamente sensibles con analito capturado (por ejemplo, ARN (no mostrado)) fuera de los micropocillos 235 y dentro de la gotita 535 de captura.

55 En otro paso y con referencia ahora a la figura 5H, el imán 540 se aleja del dispositivo 115 de micropocillos y el sustrato 112 superior. A medida que el imán 540 se aleja del dispositivo 115 de micropocillos, las perlas 525 de captura magnéticamente sensibles con el analito capturado (por ejemplo, ARN) están suspendidas en la gotita 535 de captura. Luego, la gotita 535 de captura con perlas 525 de captura magnéticamente sensibles en su interior se transporta usando operaciones de gotitas fuera del dispositivo 115 de micropocillos para los pasos posteriores de procesamiento (por ejemplo, transcripción inversa de ARN a ADNc, amplificación por PCR, preparación de colecciones y secuenciación).

En un ejemplo, la gotita 535 de captura con perlas 525 de captura magnéticamente sensibles en las mismas se elimina del accionador 100 de gotitas y los pasos posteriores de procesamiento (por ejemplo, limpieza de la muestra, transcripción inversa de ARN a ADNc, amplificación por PCR, preparación de la colección (por ejemplo, protocolo Nextera) y secuenciación) se realizan fuera del accionador de gotitas.

- 5 En otro ejemplo, los pasos posteriores de procesamiento (por ejemplo, limpieza de la muestra, transcripción inversa de ARN a ADNc, amplificación por PCR y preparación de la colección) se realizan en el accionador de gotitas para generar una colección lista para la secuenciación. La colección lista para la secuenciación se elimina del accionador de gotitas para la secuenciación posterior.

10 La figura 6A es una vista superior de una parte de un dispositivo 600 de micropocillos de un accionador de gotitas que muestra la coencapsulación de células y perlas de captura en los micropocillos. En este ejemplo, los micropocillos en el dispositivo 600 de micropocillos tienen aproximadamente 30 μm de diámetro (250 micropocillos/ mm^2). Las perlas de captura son perlas magnéticamente sensibles que tienen aproximadamente 20 μm de diámetro. Las células se muestran en rojo y las perlas de captura se muestran en verde. Las células y las perlas de captura se localizan en los micropocillos del dispositivo 600 de micropocillos. En este ejemplo, donde el tamaño de una perla de captura es menor que el tamaño de un micropocillo, aproximadamente el 95 % de los micropocillos contienen una perla. Debido a que la superficie del dispositivo 600 de micropocillos es hidrófoba, no se observa ningún residuo de células y/o perlas en las superficies entre los micropocillos.

15 La figura 6B es una vista superior de una parte de un dispositivo 650 de micropocillos de otro accionador de gotitas que muestra la coencapsulación de células y perlas de captura en los micropocillos. En este ejemplo, los micropocillos en el dispositivo 650 de micropocillos tienen aproximadamente 40 μm de diámetro (150 micropocillos/ mm^2) y las perlas de captura tienen un diámetro de aproximadamente 40 μm . Las células se muestran en rojo y las perlas de captura se muestran en verde. Las células y las perlas de captura se localizan en los micropocillos del dispositivo 600 de micropocillos. En este ejemplo, donde el tamaño de una perla de captura es aproximadamente igual que el tamaño de un micropocillo, un número sustancial de micropocillos no contiene una perla de captura.

25 Eficiencia de captura celular

Para evaluar la eficiencia de la captura de células en un dispositivo de micropocillos de un accionador de gotitas, se usaron dos accionadores de gotitas diferentes. Un primer accionador de gotitas incluía un dispositivo de micropocillos que tenía un tamaño de 9,2 mm x 2 mm e incluía aproximadamente 3000 micropocillos que tenían aproximadamente 40 μm de diámetro en una distancia de aproximadamente 80 μm . Un segundo accionador de gotitas incluía un dispositivo de micropocillos que tenía un tamaño de 9,2 mm x 10,5 mm e incluía aproximadamente 15 000 micropocillos que tenían aproximadamente 40 μm de diámetro en una distancia de aproximadamente 80 μm . Cada accionador de gotitas se colocó en la platina de un microscopio para permitir la visualización y el recuento de células. Se usaron tres soluciones de muestra con diferentes concentraciones de células (es decir, 50 células/ μl , 100 células/ μl y 250 células/ μl). Se cargó una solución de muestra en un accionador de gotitas y se transportó una gotita de muestra usando operaciones de gotitas al dispositivo de micropocillos del accionador de gotitas. Después de un período de tiempo (p. ej., aproximadamente 60 segundos) suficiente para que las células individuales se sedimentaran (por gravedad) en los micropocillos del dispositivo de micropocillos, la gotita de muestra se transportó usando operaciones de gotitas fuera del dispositivo de micropocillos. A medida que la gotita de muestra se transportaba fuera del dispositivo de micropocillos, el fluido de muestra residual y las células individuales se retuvieron en los micropocillos del dispositivo de micropocillos. Se visualizaron y contaron las células capturadas en los micropocillos. En la tabla 1 a continuación se muestran los datos de captura de células. Los datos muestran que para la misma concentración de células (50 células/ μl o 100 células/ μl), el porcentaje de micropocillos que contenían una célula individual («célula individual / micropocillos») es aproximadamente el mismo para el dispositivo de micropocillos de 9,2 mm x 2 mm (es decir, ~2,2 % para 50 células/ μl y ~3,6 % para 100 células/ μl) y el dispositivo de micropocillos de 9,2 mm x 10,5 mm (es decir, ~2 % para 50 células/ μl y ~4 % para 100 células/ μl). Los datos también muestran que a medida que se incrementó la concentración de células en la gotita de muestra, se incrementó la velocidad de captura de células, pero también se incrementó el número de pocillos con múltiples células (por ejemplo, dos células por pocillo). Varias células (por ejemplo, dos células) por micropocillo pueden definirse como contaminación intercelular o «contaminación cruzada». La eficiencia de la captura de una célula individual puede modularse seleccionando el tamaño del área del conjunto de micropocillos, la concentración de células en la gotita de muestra y/o el tiempo que la gotita de muestra se incubó en el dispositivo de micropocillos.

Tabla 1. Tasa de captura de células antes de la carga de perlas

Área de la matriz de micropocillos	Concentración celular	Célula individual	Varias células	Micropocillos	Célula individual / micropocillos
9,2 mm x 2 mm	50/μl	68	4	~3000	~2,2 %
	100/μl	108	19	~3000	~3,6 %
9,2 mm x 10,5 mm	50/μl	218	18	~15 000	~2 %
	100/μl	435	80	~15 000	~4 %
	250/μl	644	226	~15 000	~6 %

Construcción de colecciones a partir de ARN capturado de una célula individual

5 En la figura 7A se muestra un gráfico 700 y un gráfico 705 de ADNc preparado a partir de ARN recuperado de un procedimiento basado en un accionador de gotitas para capturar ARN de células individuales usando perlas con
 10 códigos de barras que no son magnéticamente sensibles. En el gráfico 700 se muestra la distribución de tamaños de ADNc de una primera fracción (MW11-1) de perlas que llevan ADNc que contienen 100 células individuales de ADNc. En el gráfico 705 se muestra la distribución de tamaños de ADNc de una segunda fracción (MW11-2) de perlas que
 15 llevan ADNc que contienen 100 células individuales de ADNc. En este ejemplo, una gotita de muestra de células que contenía aproximadamente 50 células/μl se cargó en un accionador de gotitas y se transportó usando operaciones de gotitas a un dispositivo de micropocillos en el accionador de gotitas. Después de un período de tiempo suficiente para
 20 que las células de la gotita de muestra se sedimentaran (por gravedad) en los micropocillos del dispositivo de micropocillos, la gotita de muestra se transportó usando operaciones de gotitas fuera del dispositivo de micropocillos. Una gotita de reactivo que incluía una cantidad de perlas con códigos de barras no magnéticos se transportó mediante
 25 operaciones de gotitas al dispositivo de micropocillos. Después de un período de tiempo suficiente para que las perlas con código de barras se depositaran (por gravedad) en los micropocillos del dispositivo de micropocillos, la gotita de reactivo se transportó usando operaciones de gotitas lejos del dispositivo de micropocillos. Se transportó una gotita de reactivo de lisis (por ejemplo, una gotita de tampón de lisis LDS al 1 %) usando operaciones de gotitas al dispositivo de micropocillos. Después de un período de incubación de lisis celular (por ejemplo, aproximadamente 15 min), la
 30 gotita de reactivo de lisis se transportó usando operaciones de gotitas lejos del dispositivo de micropocillos. Después de eliminar la gotita de reactivo de lisis, se abrió el cartucho accionador de gotitas y se pipeteó una solución tampón de hibridación (por ejemplo, SSC 6x) en el dispositivo de micropocillos. Las perlas de código de barras no magnéticas con ARN unido a las mismas se eliminaron luego pipeteando del dispositivo de micropocillos del accionador de gotitas para su posterior procesamiento en ADNc usando un protocolo de transcripción inversa en banco. Los datos muestran que el ARN de las células lisadas se capturó en las perlas con código de barras y se transcribió inversamente de
 35 manera fácil a ADNc en una reacción en banco.

En la figura 7B se muestra un gráfico 715 y un gráfico 720 de la distribución del tamaño de los fragmentos de inserciones de la colección preparadas en banco a partir del ADNc del gráfico 700 y el gráfico 705, respectivamente, de la figura 7A. Los datos muestran un rendimiento de la colección y un tamaño de inserción consistentes entre las
 40 dos reacciones de preparación de la colección diferentes.

Cuantificación de la contaminación cruzada

Varias células (por ejemplo, dos células) por micropocillo pueden definirse como contaminación intercelular o
 45 contaminación cruzada. Para cuantificar la contaminación cruzada durante el aislamiento de células individuales y la captura de ácido nucleico en un accionador de gotitas, se usó una mezcla 1 a 1 de células humanas y de ratón. Brevemente, la muestra de células mixtas (50 células/μl) se cargó en un accionador de gotitas y se transportó a un dispositivo de micropocillos en el accionador de gotitas. Después de un período de tiempo suficiente para que las células individuales se sedimentaran (por gravedad) en los micropocillos, la gotita de muestra mezclada se transportó usando operaciones de gotitas lejos del dispositivo de micropocillos. Las células se lisaron y el ARN liberado en cada micropocillo se capturó en una única perla con código de barras. Las perlas con código de barras con ARN se recuperaron del accionador de gotitas y el ARN capturado se procesó para la construcción de una colección de ADNc. Se secuenció la colección de ADNc y se determinaron las transcripciones asociadas con cada código de barras único. Debido a que las células humanas y de ratón contienen cada una transcripciones únicas, la información de la secuencia del código de barras y de la transcripción se usó para identificar el tipo de célula o los tipos de células asociados con cada micropocillo.

En la figura 8A se muestra un gráfico 800 del recuento de lecturas de transcripciones humanas y transcripciones de ratón para cada código de barras único. Cada punto del gráfico representa un código de barras único, que representa un pocillo individual. Si se aísla una célula individual en un micropocillo, una transcripción asociada con un código de barras particular será de una célula humana o de una célula de ratón. En el caso de contaminación cruzada, por

ejemplo, una célula de ratón y una célula humana por micropocillo, las transcripciones tanto de ratón como de ser humano se asociarán con un código de barras particular. Los recuentos de lectura de las transcripciones humanas asociadas con un código de barras particular se representan en el eje x. Los recuentos de lecturas de las transcripciones de ratón asociadas con un código de barras particular se representan en el eje y. El área encerrada en un círculo designa lecturas de células tanto humanas como de ratón asociadas con un código de barras particular e indica contaminación cruzada (es decir, transcripciones tanto de ser humano como de ratón aisladas del mismo micropocillo). En este ejemplo, 158 códigos de barras únicos están asociados con transcripciones de ratón, 137 códigos de barras únicos están asociados con transcripciones humanas y 5 códigos de barras únicos están asociados con una combinación de transcripciones humanas y de ratón. El porcentaje de contaminación cruzada es de aproximadamente el 3 % y la pureza es de aproximadamente el 97 %.

En la figura 8B se muestra un gráfico 805 de los recuentos de lecturas para las transcripciones de seres humanos y ratones para cada código de barras único en un segundo experimento de especies mixtas. El experimento se realizó esencialmente como se describió anteriormente con referencia a la figura 8A, excepto que se usaron menos células. En este ejemplo, 54 códigos de barras únicos están asociados con transcripciones de ratón, 18 códigos de barras únicos están asociados con transcripciones humanas y 0 códigos de barras únicos están asociados con una combinación de transcripciones humanas y de ratón. El porcentaje de contaminación cruzada es de aproximadamente el 0 % y la pureza es de aproximadamente el 97 %. Pureza, por ejemplo, del 97 %, significa que, en promedio, los códigos de barras asociados al ratón contienen un 97 % de transcripciones de ratón y un 3 % de transcripciones humanas; de manera similar, los códigos de barras asociados a seres humanos contienen un 97 % de transcripciones humanas y un 3 % de transcripciones de ratón.

Tamaño de célula y sesgo de captura

Para evaluar el efecto del tamaño de la célula sobre la eficiencia de la captura celular en un dispositivo de micropocillos de un accionador de gotitas, se usaron dos especies de células, es decir, células Hek humanas y células 3T3 de ratón. Se tiñó una alícuota de cada especie de células con un marcador diferente y se mezcló en una proporción 1 : 1. Las células se combinaron en una gotita de aproximadamente 120 µl y se transportaron sobre el sustrato de micropocillos y luego lejos de él. En el caso ideal, las células se capturan en los micropocillos en una proporción 1 : 1 debido a la proporción inicial (por ejemplo, 300 células capturadas en micropocillos, la mitad de ellas son de ratones y la otra mitad son humanas). Sin embargo, debido al tamaño de las células, existe un sesgo. En un experimento similar, dos tamaños diferentes de perlas capturadas en micropocillos mostraron un sesgo similar, es decir, las partículas más grandes se capturan a velocidades más altas que las partículas más pequeñas.

Accionador de gotitas configurado para entrada de suspensión de células para salida de colección de secuenciación

En la figura 9 se ilustra una vista superior de un ejemplo de un sustrato 900 inferior de un accionador de gotitas adecuado para su uso en la realización de un protocolo de construcción de colecciones de células individuales multiplexada. El sustrato 900 inferior puede ser, por ejemplo, una PCB. El sustrato 900 inferior incluye una disposición 910 de electrodos configurada para el procesamiento multiplexado de múltiples células individuales para la construcción de una o más colecciones de células individuales. Las operaciones de gotitas se llevan a cabo encima de la disposición 910 de electrodos en una superficie de operaciones de gotitas. En este ejemplo, la disposición 910 de electrodos está configurada para procesar hasta 4 muestras diferentes en paralelo en regiones de reacción dedicadas para la construcción de 4 colecciones de secuenciación de células individuales diferentes.

La disposición 910 de electrodos incluye 4 zonas 915 de entrada de muestra (por ejemplo, zonas 915a a 915d de entrada de muestra) para introducir y dispensar una solución de muestra (por ejemplo, una suspensión de células individuales). La disposición 910 de electrodos también incluye 4 matrices 920 de micropocillos (p. ej., las matrices 920a a 920d de micropocillos) configuradas para el aislamiento de múltiples células individuales, lisis celular y captura de ácidos nucleicos (p. ej., ARN) en perlas de captura (p. ej., perlas de captura con código de barras). La disposición 910 de electrodos también incluye 4 zonas 925 de reacción (por ejemplo, las zonas 925a a 925d de reacción) para realizar los pasos de procesamiento para la construcción de una colección de células individuales. Los pasos de procesamiento incluyen, por ejemplo, la transcripción inversa de ARN a ADNc, digestión con exonucleasa I, amplificación por PCR y preparación de la colección Nextera. La disposición 910 de electrodos también incluye 4 zonas 930 de salida de la colección (por ejemplo, las zonas 930a a 930d de salida de la colección) para recopilar y recuperar la salida de la colección.

Cada zona 915 de entrada de muestra, matriz 920 de micropocillos, zona 925 de reacción y zona 930 de salida de la colección están interconectadas a través de una disposición, tal como una línea o matriz, de electrodos 935 de operación de gotitas (por ejemplo, electrodos de electrohumectación). Por ejemplo, la zona 915a de entrada de muestra, la matriz 920a de micropocillos, la zona 925a de reacción y la zona 930a de salida de la colección están interconectadas a través de una disposición de electrodos 935 de operación de gotitas. La disposición de cada zona 915 de entrada de muestra, matriz 920 de micropocillos, zona 925 de reacción, zona 930 de salida de la colección y los electrodos 935 de operación de gotitas proporcionan regiones dedicadas en el sustrato 900 inferior para procesar 4 muestras diferentes.

Fabricación de una matriz de micropocillos en un accionador de gotitas

Se puede fabricar una matriz de micropocillos directamente sobre el sustrato inferior de un accionador de gotitas. En un ejemplo, la matriz de micropocillos se forma en un área definida del sustrato inferior de un accionador de gotitas.

5 Las figuras 10A a 10C ilustran un ejemplo de un procedimiento 1000 de fabricación de una matriz de micropocillos en el sustrato inferior de un accionador de gotitas. Con referencia ahora a la figura 10A, se proporciona un sustrato 1010 inferior. En este ejemplo, el sustrato 1010 inferior es una PCB. El material de la PCB puede ser, por ejemplo, poliimida con RIE. Encima del sustrato 1010 inferior hay una capa 1015 de poliimida. En un ejemplo, el espesor de la capa 1015 de poliimida es de aproximadamente 30 μm . Encima de la capa 1015 de poliimida hay una capa 1020 hidrófoba. En un ejemplo, la capa 1015 de poliimida es una capa de Kapton y la capa 1020 hidrófoba es una capa de CYTOP.

10 En un primer paso y con referencia ahora a la figura 10B, se usa una máscara 1025 (por ejemplo, máscara fotorresistente) para definir una matriz de huecos 1030 circulares. En otro ejemplo, la máscara 1025 es una máscara de metal. En un ejemplo, los huecos 1030 circulares tienen aproximadamente 50 μm de diámetro en una distancia de aproximadamente 80 μm . La densidad de los huecos 1030 circulares es de aproximadamente 150 círculos/ mm^2 . En otro ejemplo, el intervalo de tamaño del hueco 1030 circular es de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 50 μm de diámetro en un intervalo de distancia de aproximadamente 60 μm a aproximadamente 100 μm . El rango de densidad de los huecos 1030 circulares es de aproximadamente 100 círculos/ mm^2 a unos 1000 círculos/ mm^2 .

20 En un paso siguiente y haciendo referencia ahora a la figura 10C, se usa un procedimiento de grabado para eliminar material de las partes de la capa 1020 hidrófoba y la capa 1015 de poliimida que están expuestas a través de la máscara 1025 y, por lo tanto, forman los micropocillos 1035. En un ejemplo, el procedimiento de grabado es un procedimiento de grabado por iones reactivos (RIE). En este ejemplo, los micropocillos 1035 se graban, por ejemplo, a una profundidad de aproximadamente 2,5 μm .

En un paso siguiente y haciendo referencia ahora a la figura 10D, se elimina la máscara 1025.

25 En otro ejemplo, la máscara 1025 (por ejemplo, una máscara fotorresistente) se reemplaza con otro material adecuado (por ejemplo, una máscara de metal) y se usa un procedimiento de fabricación alternativo para formar una matriz de micropocillos en donde la capa 1015 de poliimida y el sustrato 1010 inferior se graban a una profundidad total de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 50 μm .

30 En otro ejemplo, la capa 1015 de poliimida se reemplaza con un material fotoimagen, tal como Pyralux® PC 1000 disponible de DuPont (Wilmington, DE). El espesor de la capa de Pyralux® PC 1000 es de aproximadamente 50 μm . A continuación, se usa un procedimiento de fotolitografía para definir y desarrollar una matriz de micropocillos que tienen aproximadamente 50 μm de diámetro en una distancia de aproximadamente 100 μm con una profundidad de aproximadamente 30 μm a aproximadamente 50 μm . A continuación, se forma una capa CYTOP (por ejemplo, la capa 1020 hidrófoba) sobre la superficie de la superficie restante de la capa fotoimagen.

35 En otra realización más, los micropocillos 1035 se forman imprimiendo una capa de película de polímero (por ejemplo, capa 1015 de poliimida). En un ejemplo, la película de polímero es Kapton. En otro ejemplo, la película de polímero es una olefina cíclica. En un ejemplo, el procedimiento de impresión es un procedimiento de rollo a rollo que se usa para crear estructuras de micropocillos en el sustrato de polímero.

En otra realización más, los micropocillos 1035 se forman en una capa de película de polímero (por ejemplo, capa 1015 de poliimida) usando un procedimiento de estampado en caliente convencional para crear estructuras de micropocillos en el sustrato de polímero.

40 En otra realización más, los micropocillos 1035 se forman en una capa de resina dispuesta encima de una capa de película de polímero (por ejemplo, la capa 1015 de poliimida). En este ejemplo, se puede usar después un procedimiento de impresión o estampado para crear las estructuras de micropocillos (por ejemplo, los micropocillos 1035). La capa de resina se cura posteriormente usando, por ejemplo, un tratamiento térmico o de luz para crear estructuras rígidas de micropocillos en la parte superior de la película de polímero. Posteriormente, la película se lamina sobre la PCB microfluídica digital que contiene electrodos y la capa hidrófoba, como CYTOP, se deposita sobre la capa de polímero. Aún se pueden usar otros procedimientos en el procedimiento de formación de micropocillos, tales como procedimientos de rollo a panel en que se usan transferencia de patrón iniciada térmicamente y/o transferencia de patrón iniciada por UV.

Incorporación de estructuras de atrapamiento de células

50 En algunas realizaciones, los dispositivos descritos en la presente memoria comprenden un accionador de gotitas con uno o más sustratos configurados para formar una superficie o espacio para realizar operaciones de gotitas. Dicho o dichos sustratos establecen una superficie de operaciones de gotitas o un espacio para realizar operaciones de gotitas y también pueden incluir electrodos dispuestos para realizar las operaciones de gotitas. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, un dispositivo de micropocillos incluye un primer sustrato que tiene una pluralidad de micropocillos que se abren sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende además un segundo sustrato que comprende una pluralidad de

trampas de células que se abren sobre la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos. En algunas realizaciones, las trampas de células se colocan en el segundo sustrato muy cerca de los micropocillos y abiertas a los micropocillos en el primer sustrato. En algunas realizaciones, las trampas de células en un sustrato superior se colocan cada una por encima de un micropocillo en el sustrato inferior del dispositivo.

5 Las trampas de células incluyen estructuras como las descritas en, p. ej., Di Carlo, et al., «Dynamic single cell culture array», *Lab Chip* 2006, 6, 1445-1449, y pueden tener cualquier forma adecuada, como forma de copa, forma de U o forma de puente, o una combinación de las mismas. Las dimensiones de la trampa de células (ancho, largo, profundidad) se pueden optimizar fácilmente de acuerdo con el tamaño de las células diana de interés. Las trampas de células pueden fabricarse con cualquier material adecuado, tal como polidimetilsiloxano (PDMS), y moldearse sobre el segundo sustrato, que puede ser vidrio u otro material adecuado. En algunas realizaciones, las trampas de células están dispuestas en filas que están desplazadas asimétricamente. Los moldes para atrapar dispositivos de matrices se pueden fabricar usando fotorresistencias negativas u otros métodos adecuados conocidos en la técnica.

15 En las figuras 18A-18B se ilustra un dispositivo de microfluidos digital con estructuras de trampa de células en un sustrato superior que permiten que las células de interés queden atrapadas físicamente por encima de los micropocillos en un sustrato inferior que contiene perlas. En la figura 18A se proporciona una vista lateral del dispositivo donde las perlas y las células están colocadas. Los rectángulos abiertos son estructuras para atrapar células fijadas al sustrato 1710 superior, los puntos de color gris claro son células atrapadas en tales estructuras y los puntos negros son perlas 525 de captura en micropocillos en el sustrato 110 inferior. Ambos sustratos se abren en un espacio 215 de operaciones de gotitas. Abajo el sustrato 110 incluye una disposición de electrodos 220 de operación de gotitas (por ejemplo, electrodos de electrohumectación). En la figura 18B se ilustra una vista superior de tal dispositivo, mostrando que la estructura para atrapar células en el sustrato superior sirve para colocalizar células atrapadas con perlas en micropocillos en el sustrato inferior.

«Tapado» o encapsulado de pocillos de muestra con una fase inmiscible

25 La invención proporciona dispositivos de microcanales y métodos para compartimentar reacciones individuales en una matriz de micropocillos. El dispositivo de microcanal incluye una matriz de micropocillos formados en el suelo de un microcanal de manera que el microcanal intersecta cada micropocillo a lo largo de un solo borde o cara. Cada micropocillo es un compartimento de reacción que puede llenarse con una mezcla de reacción acuosa y luego «taparse» con una fase inmiscible (p. ej., aceite) de modo que cada micropocillo (y su contenido) se aisle de otro. En una realización, la mezcla de reacción incluye una cantidad de células individuales para encapsular en compartimentos de reacción individuales.

30 Las figuras 11A a 11E ilustran vistas en perspectiva de un dispositivo de microcanales y se muestra un procedimiento 1100 para tapar una matriz de micropocillos con una fase inmiscible para formar compartimentos de reacción aislados. El procedimiento 1100 puede incluir, entre otros, los siguientes pasos.

35 En un paso y haciendo referencia ahora a la figura 11A, un dispositivo 1110 de microcanales incluye un microcanal 1115. Formado en la superficie inferior del microcanal 1115 hay una línea o matriz de micropocillos 1120. En un ejemplo, los micropocillos 1120 son pocillos circulares. En otro ejemplo, los micropocillos 1120 tienen forma rectangular.

40 En otros pasos y con referencia ahora a las figuras 11B y 11C, se hace fluir una mezcla 1125 de reacción al microcanal 1115, llenando el microcanal 1115 y los micropocillos 1120. En un ejemplo, la mezcla 1125 de reacción incluye una cantidad de células individuales (no mostradas) para encapsular en micropocillos 1120 individuales para los siguientes pasos de procesamiento. En un ejemplo, las células individuales se encapsulan en micropocillos 1120 individuales para su procesamiento en un protocolo de genómica de células individuales. La mezcla 1125 de reacción se deja en el dispositivo 1110 de microcanales durante un período de tiempo suficiente para que las células individuales (no mostradas) se sedimenten (por gravedad) en los micropocillos 1120. La velocidad de captura de las células (no mostradas) en los micropocillos 1120 es una función de la concentración inicial de células individuales en la mezcla de reacción y la cantidad de tiempo que la mezcla 1125 de reacción se retiene en el dispositivo 1110 de microcanales.

45 En otros pasos y con referencia ahora a las figuras 11D y 11E, se carga una fase 1130 inmiscible en el microcanal 1115. En un ejemplo, la fase 1130 inmiscible es un aceite. Como la fase 1130 inmiscible se carga en el microcanal 1115, la mezcla 1125 de reacción se desplaza del microcanal 1115 y la mezcla 1125 de reacción se retiene en los micropocillos 1120. Al hacerlo, los micropocillos 1120 se «tapan» con la fase 1130 inmiscible de modo que cada micropocillo 1120 se aísla ahora de todos los demás micropocillos 1120 y las reacciones posteriores (por ejemplo, transcripción inversa o amplificación por PCR) se realizan en compartimentos aislados. Los productos de reacción en cada micropocillo 1120 pueden recuperarse, por ejemplo, haciéndolos fluir en una segunda solución de fase acuosa (no mostrada) y recogiendo esta.

50 Las figuras 12A y 12B son vistas superiores de una parte de, por ejemplo, el dispositivo 1110 de microcanales de las figuras 11A a 11E y muestran un microcanal completamente cargado y micropocillos asociados y micropocillos «tapados» después de la inyección de aceite, respectivamente.

55 La figura 13 es una vista superior de una parte de un dispositivo 1300 de microcanales que incluye micropocillos de forma rectangular. En este ejemplo, los micropocillos se llenan con una solución acuosa y se tapan con una fase

inmiscible (por ejemplo, aceite).

La figura 14 es una vista superior de una parte de una matriz 1400 de microcanales altamente paralelos.

En realizaciones alternativas, la divulgación proporciona dispositivos de microcanales y métodos para compartimentar reacciones individuales usando una matriz de micropocillos junto con una matriz de trampas de células. El dispositivo de microcanales incluye una matriz de micropocillos formados en el suelo de un microcanal de manera que el microcanal intersecta cada micropocillo a lo largo de un solo borde o cara. El dispositivo de microcanales incluye una matriz de estructuras de trampas de células formadas en la cubierta de un microcanal de manera que el microcanal interseca cada trampa de células a lo largo de un segundo borde o cara. Cada ubicación de micropocillos / trampa de células es un compartimento de reacción que puede llenarse con una mezcla de reacción acuosa y luego encapsularse con una fase inmiscible (p. ej., aceite) de modo que cada unidad de micropocillos / trampa de células (y su contenido) se aisle de otra unidad de micropocillos / trampa de células. Una vez que las células y perlas se han colocalizado en trampas de células y micropocillos, respectivamente, usando, por ejemplo, un medio acuoso, se puede introducir un fluido inmiscible en el sistema para desplazar el medio acuoso. El espacio reducido entre los sustratos superior e inferior en la ubicación de la unidad de micropocillos / trampa de células evita el desplazamiento del medio acuoso en esa posición. Como se muestra en las figuras 19A-19B, las células se cargaron en las trampas de células en un sustrato 1710 superior y las perlas 525 se cargaron en los micropocillos en un sustrato 110 inferior. El aceite se carga a través del microcanal 215 para desplazar una gotita de fase acuosa y efectuar la encapsulación de pares de perlas/células. La figura 19A ilustra que el aceite cargado en el microcanal (área sombreada en gris) rodea las ubicaciones de los micropocillos / la trampa de células pero no las llena, dejando la célula, la perla y el medio acuoso encapsulados o compartimentados dentro de una única microcámara acuosa con una envoltura de aceite. La figura 19B ilustra una vista superior del dispositivo cargado de aceite, donde el aceite rodea el micropocillo / la trampa, encapsulando la célula y la perla juntas en una microcámara acuosa.

En realizaciones ejemplares, las figuras 20A-D ilustran el atrapamiento y la encapsulación de aceite para esferas atrapadas en estructuras de trampa de células. La figura 20A es una imagen fluorescente de microesferas fluorescentes de 10 μm (círculos blancos), usadas como proxy de las células para permitir la visualización, atrapadas en un dispositivo como en la figura 18. La figura 20B muestra imágenes fluorescentes y de luz blanca superpuestas de las partículas fluorescentes ubicadas en las estructuras de atrapamiento de células. La figura 20C muestra el flujo de aceite hacia el canal dando como resultado la formación de gotitas acuosas aisladas que imitan la forma de las estructuras de la trampa, encapsulando así las esferas. La altura del espacio entre las superficies superior e inferior del dispositivo en las estructuras de la trampa de células es menor que la altura del espacio en los sitios circundantes, y el aceite no puede desplazar el agua de estos espacios en condiciones de caudal lento. La figura 20D muestra cámaras acuosas aisladas rodeadas de aceite después de descargar aceite a través del canal. Las esferas se encapsulan dentro de las gotitas acuosas.

Pocillos «positivos»

Las figuras 15A, 15B, 15C y 15D muestran un ejemplo de una estructura 1500 de pocillo «positiva». La mayoría de los diseños de pocillo descritos anteriormente incluyen una geometría que está empotrada en el sustrato. Con los pocillos empotrados, el fluido acuoso puede ser atrapado/aislado/compartimentado incluyendo un diferencial de energía superficial (235 vs 230) o sin uno (1400). En estos casos, la mayor parte del fluido atrapado está en la superficie del sustrato o debajo de ella. Sin embargo, con un diferencial suficiente en la energía superficial, también es posible lograr un efecto similar incluso con un recoveco insignificante o ausente (es decir, un pocillo «positivo»), donde la mayor parte del fluido atrapado estará en el nivel de la superficie del sustrato o por encima del nivel de la superficie del sustrato.

La estructura 1500 de pocillo positivo incluye una capa 1510 hidrófila, tal como una capa de vidrio, óxido de silicio y/o polímero tratado hidrófilamente. Una capa 1512 hidrófoba, como una capa de CYTOP, parileno y/o FOTS, está encima de la capa 1510 hidrófila. Se forma un hueco en la capa 1512 hidrófoba, formando así un pocillo 1514 «positivo» (es decir, profundidad para empotrar insignificante, pero energía superficial diferencial) en la que se expone una parte de la capa 1510 hidrófila. Cuando una gotita o bolo 1513 acuoso más grande pasa sobre el pocillo 1514 «positivo», las partes de la gotita o bolo 1513 acuoso permanecerán atrapadas como volúmenes 1530 aislados más pequeños dentro del pocillo 1514 «positivo».

Con referencia ahora a las figuras 16A, 16B y 16C, para promover la captura de, por ejemplo, una célula 1520 y/o una perla 1522 dentro del pocillo 1514 «positivo», la superficie del pocillo 1514 «positivo» se puede recubrir con productos químicos que tengan afinidad por las células 1520 y/o perlas 1522. Además, un par de elementos 1516 de atrapamiento hidrofílico se pueden formar encima de la capa 1510 hidrofílica y dentro del pocillo 1514 «positivo». Es decir, ciertos elementos 1516 de atrapamiento hidrofílico se pueden usar para atrapar físicamente una célula 1520 y/o una perla 1522 a medida que fluyen a través de la estructura 1500 de pocillo «positivo». Por ejemplo, en el caso de que la gotita 1513 de carga contenga una pluralidad de células 1520 y/o perlas 1522 a medida que fluye por un pocillo 1514 «positivo», las químicas de afinidad pueden unirse a las células 1520 y/o perlas 1522 manteniéndolas en el pocillo 1514«positivo», o los elementos 1516 de atrapamiento hidrofílico con una forma apropiada (aquí se muestra con un estrechamiento más pequeño que el tamaño de la célula 1520 y/o la perla 1522 para capturar) pueden atrapar una o más células 1520 y/o perlas 1522 dentro del pocillo 1514 «positivo».

Sistemas

La figura 17 ilustra un diagrama de bloques funcional de un ejemplo de un sistema 1700 de microfluidos que incluye un accionador 1705 de gotitas, que es un ejemplo de un cartucho de fluidos. La tecnología de microfluidos digital realiza operaciones de gotitas en gotitas discretas en un accionador de gotitas, como el accionador 1705 de gotitas, mediante el control eléctrico de su tensión superficial (electrohumección). Las gotitas pueden estar intercaladas entre dos sustratos del accionador 1705 de gotitas, un sustrato inferior y un sustrato superior separados por un espacio de operaciones de gotitas. El sustrato inferior puede incluir una disposición de electrodos direccionables eléctricamente. El sustrato superior puede incluir un plano de electrodo de referencia hecho, por ejemplo, de tinta conductora u óxido de indio y estaño (ITO, por sus siglas en inglés). El sustrato inferior y el sustrato superior pueden revestirse con un material hidrófobo. Las operaciones de gotitas se llevan a cabo en el espacio de operaciones de gotitas. El sitio alrededor de las gotitas (es decir, el espacio entre los sustratos inferior y superior) puede llenarse con un fluido inerte inmiscible, como aceite de silicona, para evitar la evaporación de las gotitas y facilitar su transporte dentro del dispositivo. Pueden efectuarse otras operaciones de gotitas variando los patrones de activación de voltaje; los ejemplos incluyen fusionar, partir, mezclar y dispensar gotitas.

El accionador 1705 de gotitas puede diseñarse para que quepa en una plataforma de instrumentos (no mostrada) del sistema 1700 de microfluidos. La plataforma de instrumentos puede contener el accionador 1705 de gotitas y albergar otros elementos del accionador de gotitas, tales como, entre otros, uno o más imanes y uno o más dispositivos de calentamiento. Por ejemplo, la plataforma de instrumentos puede albergar uno o más imanes 1710, que pueden ser imanes permanentes. Opcionalmente, la plataforma de instrumentos puede albergar uno o más electroimanes 1715. Los imanes 1710 y/o electroimanes 1715 se colocan en relación con el accionador 1705 de gotitas para la inmovilización de perlas magnéticamente sensibles. Opcionalmente, las posiciones de los imanes 1710 y/o electroimanes 1715 pueden ser controladas por un motor 1720. Además, la plataforma de instrumentos puede albergar uno o más dispositivos 1725 de calentamiento para controlar la temperatura dentro, por ejemplo, de ciertas zonas de reacción y/o lavado de accionador 1705 de gotitas. En un ejemplo, los dispositivos 1725 de calentamiento pueden ser barras calentadoras que se colocan en relación con el accionador 1705 de gotitas para proporcionar control térmico del mismo.

Un controlador 1730 del sistema 1700 de microfluidos está acoplado eléctricamente a varios componentes de *hardware* del aparato establecido en la presente memoria, como el accionador 1705 de gotitas, los electroimanes 1715, el motor 1720 y los dispositivos 1725 de calentamiento, así como a un detector 1735, un sistema 1740 de detección de impedancia, y cualquier otro dispositivo de entrada y/o salida (no mostrado). El controlador 1730 controla el funcionamiento general del sistema 1700 de microfluidos. El controlador 1730 puede ser, por ejemplo, un ordenador de propósito general, un ordenador de propósito especial, un ordenador personal u otro aparato de procesamiento de datos programable. El controlador 1730 sirve para proporcionar capacidades de procesamiento, tales como almacenar, interpretar y/o ejecutar instrucciones de *software*, así como para controlar el funcionamiento general del sistema. El controlador 1730 puede configurarse y programarse para controlar datos y/o aspectos de energía de estos dispositivos. Por ejemplo, en un aspecto, con respecto al accionador 1705 de gotitas, el controlador 1730 controla la manipulación de gotitas activando/desactivando electrodos.

El controlador 1730 está configurado para ejecutar instrucciones de programa para implementar los procedimientos descritos en la presente memoria. El controlador 1730 dirige el accionador de gotitas para transportar una gotita de muestra a un dispositivo de micropocillos. La gotita de muestra incluye células de interés que entran en los micropocillos. El controlador 1730 gestiona además el sistema para introducir perlas de captura en los micropocillos, en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas de captura y dirige el accionador de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos. Partes de la gotita de reactivo de lisis entran en los micropocillos y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen el analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas de captura. El controlador 1730 dirige el accionador de gotitas para que transporte la gotita de muestra lejos del dispositivo de micropocillos si bien dejando al menos una parte de las células de interés capturadas en los micropocillos. El controlador 1730 dirige los componentes del sistema para que eliminen de los micropocillos las perlas de captura con el analito capturado en ellas. Por ejemplo, el controlador 1730 dirige los imanes 1710 y/o electroimanes 1715 (situados cerca de los micropocillos) para formar un campo magnético que extraiga las perlas de captura de los micropocillos. Opcionalmente, el controlador 1730 gestiona los imanes 1710 y los electroimanes 1715 para utilizar un campo magnético para mover las perlas de captura hacia los micropocillos y lejos de ellos.

En algunas realizaciones, el controlador del sistema está configurado además para ejecutar instrucciones de programa para, durante el periodo de incubación y/o antes del periodo de incubación, dirigir el accionador de gotitas para transportar un fluido inmiscible con la gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos, en donde el fluido inmiscible no entra en los micropocillos ni en las trampas de células, encapsulando así perlas individuales con células individuales con reactivo de lisis celular.

En un ejemplo, el detector 1735 puede ser un sistema de formación de imágenes que se coloca en relación con el accionador 1705 de gotitas. En un ejemplo, el sistema de formación de imágenes puede incluir uno o más diodos emisores de luz (los LED) (es decir, una fuente de iluminación) y un dispositivo de captura de imágenes digital, como una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD, por sus siglas en inglés). La detección se puede llevar a cabo usando un aparato adecuado para un reactivo o etiqueta particular en uso. Por ejemplo, se puede usar un detector óptico como un detector de fluorescencia, un detector de absorbancia, un detector de luminiscencia o similares para

detectar etiquetas ópticas apropiadas. Los sistemas diseñados para la detección a base de matrices son particularmente útiles. Por ejemplo, los sistemas ópticos para usar con los métodos establecidos en la presente memoria pueden construirse para incluir varios componentes y ensamblajes como se describe en Banerjee et al., Patente de EE.UU. número 8,241,573, titulada «Systems and Devices for Sequence by Synthesis Analysis», expedida el 14 de agosto de 2012; Feng et al., Patente de EE.UU. número 7,329,860, titulada «Confocal Imaging Methods and Apparatus», expedida el 12 de febrero de 2008; Feng et al., Patente de EE.UU. número 8,039,817, titulada «Compensator for Multiple Surface Imaging», expedida el 18 de octubre de 2011; Feng et al., Publicación de Patente de EE.UU. número 20090272914, titulada «Compensator for Multiple Surface Imaging», publicada el 5 de noviembre de 2009; y Reed et al., Publicación de Patente de EE.UU. número 20120270305, titulada «Systems, Methods, and Apparatuses to Image a Sample for Biological or Chemical Analysis», publicada el 25 de octubre de 2012. Dichos sistemas de detección son particularmente útiles para realizaciones de secuenciación de ácidos nucleicos.

El sistema 1740 de detección de impedancia puede ser cualquier circuito para detectar la impedancia en un electrodo específico del accionador 1705 de gotitas. En un ejemplo, el sistema 1740 de detección de impedancia puede ser un espectrómetro de impedancia. El sistema 1740 de detección de impedancia puede usarse para monitorear la carga capacitiva de cualquier electrodo, tal como cualquier electrodo de operación de gotitas, con o sin una gotita sobre el mismo. Para obtener ejemplos de técnicas de detección de capacitancia adecuadas, consulte Sturmer et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2008/101194, titulada «Capacitance Detection in a Droplet Actuator», publicada el 30 de diciembre de 2009; y Kale et al., Publicación de Patente Internacional número WO/2002/080822, titulada «System and Method for Dispersing Liquids», publicada el 26 de febrero de 2004.

El accionador 1705 de gotitas puede incluir un dispositivo 1745 de ruptura molecular. El dispositivo 1745 de ruptura molecular puede incluir cualquier dispositivo que promueva la ruptura molecular (lisis) de materiales, tales como tejidos, células y esporas en un accionador de gotitas. El dispositivo 1745 de ruptura molecular puede ser, por ejemplo, un mecanismo de sonicación, un mecanismo de calentamiento, un mecanismo de cizallamiento mecánico, un mecanismo de batido de perlas, elementos físicos incorporados en el accionador 1705 de gotitas, un mecanismo de generación de campo eléctrico, un mecanismo de ciclo térmico y cualquier combinación de los mismos. El dispositivo 1745 de ruptura molecular puede ser controlado por el controlador 1730.

En algunas realizaciones, la divulgación contempla un sistema de fluidica digital para capturar células de interés, comprendiendo el sistema: (a) un accionador de gotitas que incluye un espacio de operaciones de gotitas, incluyendo el accionador de gotitas electrodos de operaciones de gotitas dispuestos cerca del espacio de operaciones de gotitas; (b) un dispositivo de micropocillos que incluye: (1) un primer sustrato, incluyendo el dispositivo de micropocillos micropocillos formados en el primer sustrato, abriéndose los micropocillos sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos, el dispositivo de micropocillos acoplado al accionador de gotitas y colocado de tal manera que los micropocillos se enfrenten al espacio de operaciones de las gotitas; y (2) un segundo sustrato, incluyendo el dispositivo de micropocillos trampas de células formadas en el segundo sustrato, abriéndose las trampas de células sobre la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo de micropocillos; (c) un controlador configurado para ejecutar instrucciones de programa para: (1) dirigir el accionador de gotitas para que transporte una gotita de muestra a un dispositivo de micropocillos, incluyendo la gotita de muestra células de interés que entran en las trampas de células; (2) introducir perlas de captura en los micropocillos, en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas de captura; y (3) dirigir el accionador de gotitas para que transporte una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo de micropocillos, en donde partes de la gotita de reactivo de lisis entran en las trampas de células y micropocillos y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen el analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas de captura.

En algunas realizaciones del sistema, el primer sustrato incluye una capa hidrófoba dispuesta sobre el mismo, formando la capa hidrófoba la superficie de operaciones de gotitas. En algunas realizaciones, los micropocillos tienen un tamaño y una distancia dimensionados para recibir solo una sola de las perlas de captura.

Se apreciará que varios aspectos de la presente divulgación pueden materializarse como un método, sistema, medio legible por ordenador y/o producto de programa informático. Los aspectos de la presente divulgación pueden tomar la forma de realizaciones de *hardware*, realizaciones de *software* (incluido *firmware*, *software* residente, microcódigo, etc.) o realizaciones que combinan aspectos de *software* y *hardware* que generalmente se denominan en la presente memoria como un «circuito», «módulo» o «sistema». Además, los métodos de la presente divulgación pueden adoptar la forma de un producto de programa informático en un medio de almacenamiento utilizable por ordenador que tenga un código de programa utilizable por ordenador incorporado en el medio.

Puede utilizarse cualquier medio utilizable por ordenador adecuado para los aspectos de *software* de la presente divulgación. El medio utilizable o legible por ordenador puede ser, por ejemplo, entre otros, un sistema, aparato, dispositivo o medio de propagación electrónico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo o semiconductor. El medio legible por ordenador puede incluir realizaciones transitorias. Ejemplos más específicos (una lista no exhaustiva) del medio legible por ordenador incluirían algunos o todos los siguientes: una conexión eléctrica con uno o más cables, un disquete de ordenador portátil, un disco duro, una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), una memoria de solo lectura programable y borrable (EPROM o memoria Flash), una fibra óptica, un disco compacto portátil de memoria de solo lectura (CD-ROM), un dispositivo de almacenamiento óptico, un medio de transmisión como los que admiten Internet o una intranet, o un dispositivo de almacenamiento magnético. Tenga en

5 cuenta que el medio utilizable o legible por ordenador podría incluso ser papel u otro medio adecuado en el que se imprima el programa, ya que el programa puede capturarse electrónicamente, por ejemplo, mediante escaneo óptico del papel u otro medio, y luego compilarse, interpretarse o procesarse de otro modo de una manera adecuada, si es necesario, y luego almacenarse en una memoria de ordenador. En el contexto de este documento, un medio utilizable o legible por ordenador puede ser cualquier medio que pueda contener, almacenar, comunicar, propagar o transportar el programa para su uso por el sistema, aparato o dispositivo de ejecución de instrucciones o en conexión con el sistema, aparato o dispositivo de ejecución de instrucciones.

10 El código de programa para llevar a cabo operaciones de los métodos y aparatos expuestos en la presente memoria puede escribirse en un lenguaje de programación orientado a objetos como Java, Smalltalk, C++ o similar. Sin embargo, el código de programa para llevar a cabo operaciones de los métodos y aparatos expuestos en la presente memoria también puede estar escrito en lenguajes de programación de procedimientos convencionales, tales como el lenguaje de programación «C» o lenguajes de programación similares. El código del programa puede ser ejecutado por un procesador, un circuito integrado específico de la aplicación (ASIC) u otro componente que ejecute el código del programa. El código del programa puede denominarse simplemente una aplicación de *software* que se almacena en la memoria (tal como el medio legible por ordenador descrito anteriormente). El código del programa puede hacer que el procesador (o cualquier dispositivo controlado por procesador) produzca una interfaz gráfica de usuario («GUI»). La interfaz gráfica de usuario puede producirse visualmente en un dispositivo de visualización, pero la interfaz gráfica de usuario también puede tener elementos audibles. Sin embargo, el código del programa puede funcionar en cualquier dispositivo controlado por procesador, como un ordenador, servidor, asistente digital personal, teléfono, televisión o cualquier dispositivo controlado por procesador que utilice el procesador y/o un procesador de señal digital.

15 El código del programa se puede ejecutar de forma local y/o remota. El código de programa, por ejemplo, puede almacenarse total o parcialmente en la memoria local del dispositivo controlado por procesador. Sin embargo, el código de programa también se puede almacenar, acceder y descargar al menos parcialmente de forma remota en el dispositivo controlado por procesador. El ordenador de un usuario, por ejemplo, puede ejecutar completamente el código del programa o ejecutar solo parcialmente el código del programa. El código del programa puede ser un paquete de *software* autónomo que se encuentre al menos en parte en el ordenador del usuario y/o se ejecute parcialmente en un ordenador remoto o completamente en un ordenador o servidor remoto. En el último escenario, el ordenador remoto puede estar conectado al ordenador del usuario a través de una red de comunicaciones.

20 Los métodos y aparatos expuestos en la presente memoria pueden aplicarse independientemente del entorno de red. La red de comunicaciones puede ser una red de cable que opere en el dominio de radiofrecuencia y/o en el dominio del Protocolo de Internet (IP). Sin embargo, la red de comunicaciones también puede incluir una red informática distribuida, como Internet (a veces conocida alternativamente como «*World Wide Web*»), una intranet, una red de área local (LAN) y/o una red de área amplia (WAN). La red de comunicaciones puede incluir cables coaxiales, cables de cobre, líneas de fibra óptica y/o líneas híbridas-coaxiales. La red de comunicaciones puede incluso incluir partes inalámbricas que utilizan cualquier parte del espectro electromagnético y cualquier estándar de señalización (como la familia de estándares IEEE 802, GSM/CDMA/TDMA o cualquier estándar celular y/o la banda ISM). La red de comunicaciones puede incluso incluir partes de líneas eléctricas, en las que las señales se comunican mediante cableado eléctrico. Los métodos y aparatos expuestos en la presente memoria pueden aplicarse a cualquier red de comunicaciones inalámbricas/alámbricas, independientemente de los componentes físicos, la configuración física o los estándares de comunicaciones.

25 Ciertos aspectos de la presente divulgación se describen con referencia a varios métodos y pasos del método. Se entenderá que cada paso del método puede implementarse mediante el código del programa y/o mediante instrucciones de la máquina. El código del programa y/o las instrucciones de la máquina pueden crear medios para implementar las funciones / los actos especificados en los métodos.

30 El código de programa también puede almacenarse en una memoria legible por ordenador que pueda dirigir el procesador, ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable para que funcione de una manera particular, de modo que el código de programa almacenado en la memoria legible por ordenador produzca o transforme un artículo de fabricación incluyendo medios de instrucción que implementen varios aspectos de los pasos del método.

35 El código del programa también puede cargarse en un ordenador u otro aparato de procesamiento de datos programable para hacer que se realicen una serie de pasos operativos para producir un proceso implementado por el procesador/ordenador de manera que el código del programa proporcione pasos para implementar varias funciones / varios actos especificados en los métodos de la presente divulgación.

Conclusión

40 La descripción detallada anterior de realizaciones se refiere a los dibujos adjuntos, que ilustran realizaciones específicas de la presente divulgación.

45 Esta memoria descriptiva está dividida en secciones solo para conveniencia del lector. Los títulos no deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención. Se pretende que las definiciones formen parte de la descripción de la invención. Además, la descripción anterior es únicamente con fines ilustrativos y no con fines limitativos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para capturar células de interés en un sistema (1700) microfluídico digital, comprendiendo el método:
 - (a) utilizar un accionador (100, 1705) de gotitas del sistema (1700) microfluídico digital para transportar una gotita de muestra a un dispositivo (115) de micropocillos, incluyendo el dispositivo (115) de micropocillos un sustrato (225) que tiene una pluralidad de micropocillos (235) que se abren sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos, incluyendo la gotita de muestra las células de interés que entran en los micropocillos (235);
 - (b) introducir perlas (525) de captura en los micropocillos (235), en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas (525) de captura; y
 - (c) utilizar el accionador (100, 1705) de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo (115) de micropocillos, en donde partes de la gotita de reactivo de lisis celular entran en los micropocillos (235) y, durante un período de incubación, hacen que la células de interés liberen el analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas (525) de captura.
2. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - (i) el método comprende además utilizar el accionador (100, 1705) de gotitas para transportar la gotita de muestra lejos del dispositivo (115) de micropocillos si bien dejando al menos una parte de las células de interés capturadas en los micropocillos (235);
 - (ii) el método comprende además permitir que al menos una parte de las células de interés se sedimenten en los micropocillos (235); o
 - (iii) en donde la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos incluye áreas intersticiales entre los micropocillos (235) que son hidrófobas de manera que sustancialmente no queda ningún residuo de las células de interés o perlas (525) de captura en la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además retirar las perlas (525) de captura con el analito capturado en ellas de los micropocillos (235), en donde opcionalmente la operación de eliminación incluye colocar un imán (1710, 1715) próximo a los micropocillos (235) para formar un campo magnético que extraiga las perlas (525) de captura de los micropocillos (235).
4. El método de la reivindicación 1, en donde cada una de las perlas (525) de captura incluye una pluralidad de elementos de captura, en donde opcionalmente la pluralidad de elementos de captura incluye una secuencia de captura y una secuencia de código de barras única, en donde opcionalmente la secuencia de captura es una de i) una secuencia poli-T para la captura de ARNm total, o ii) una pluralidad de secuencias de captura específicas de la transcripción que se dirigen a un panel de genes de interés.
5. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - (i) el método comprende además utilizar un campo magnético para mover las perlas (525) de captura a los micropocillos (235) y lejos de ellos;
 - (ii) las perlas (525) de captura tienen un tamaño tal que solo una de las perlas (525) de captura cabe en uno de los micropocillos (235);
 - (iii) las perlas (525) de captura se depositan en los micropocillos (235) por gravedad; o
 - (iv) las perlas (525) de captura son magnéticas y se depositan en los micropocillos (235) utilizando una atracción magnética.
6. Un sistema de fluídica digital para la captura de células de interés, comprendiendo el sistema:
 - (a) un accionador (100, 1705) de gotitas que incluye un espacio (215) de operaciones de gotitas, incluyendo el accionador (100, 1705) de gotitas electrodos (220) de operaciones de gotitas dispuestos cerca del espacio (215) de operaciones de gotitas;
 - (b) un dispositivo (115) de micropocillos que incluye un sustrato (225), incluyendo el dispositivo (115) de micropocillos micropocillos (235) formados en el sustrato (225), abriéndose los micropocillos (235) sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos, acoplado el dispositivo (115) de micropocillos al accionador (100, 1705) de gotitas y posicionado de manera que los micropocillos (235) se enfrenten al espacio (215) de operaciones de gotitas; y
 - (c) un controlador (1730) configurado para ejecutar instrucciones de programa para
- (1) dirigir el accionador (100, 1705) de gotitas para transportar una gotita de muestra a un dispositivo (115) de

micropocillos, incluyendo la gotita de muestra las células de interés que entran en los micropocillos (235);

(2) introducir perlas (525) de captura en los micropocillos (235), en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas (525) de captura; y

5 (3) dirigir el accionador (100, 1705) de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo (115) de micropocillos, en donde partes de la gotita de reactivo de lisis entran en los micropocillos (235) y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen el analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas (525) de captura.

7. El sistema de la reivindicación 6, en donde:

10 (i) el sustrato (225) incluye una capa (230) hidrófoba dispuesta sobre el mismo, formando la capa (230) hidrófoba la superficie de operaciones de gotitas;

(ii) el espacio (215) de operaciones de gotitas está configurado para retener un fluido de relleno que incluye la gotita de muestra que contiene las células de interés; o

(iii) los micropocillos (235) tienen un tamaño y una distancia dimensionados para recibir solo una célula individual de las células de interés en la gotita de muestra y para recibir solo una sola de las perlas (525) de captura.

15 8. El sistema de la reivindicación 6, en donde:

(i) los micropocillos (235) tienen una profundidad entre 30 μm y 50 μm ;

(ii) los micropocillos (235) tienen un diámetro entre 3 μm y 60 μm ;

(iii) los micropocillos (235) están separados entre sí por una distancia no mayor que 80 μm ; o

20 (iv) el controlador está configurado además para ejecutar instrucciones de programa para dirigir el accionador (100, 1705) de gotitas, durante el período de incubación y/o antes del período de incubación, para transportar un fluido inmiscible con la gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo (115) de micropocillos, en donde el fluido inmiscible no entra en los micropocillos (235) y las trampas de células, encapsulando así perlas individuales con células individuales con reactivo de lisis celular.

9. Un método para capturar células de interés en un sistema (1700) microfluídico digital, comprendiendo el método:

25 (a) utilizar un accionador (100, 1705) de gotitas del sistema (1700) microfluídico digital para transportar una gotita de muestra a un dispositivo (115) de micropocillos, incluyendo el dispositivo (115) de micropocillos un primer sustrato (225) con una pluralidad de micropocillos (235) que se abren sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos, y una pluralidad de trampas de células que se abren sobre la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos, en donde las trampas de células se colocan muy cerca
30 de los micropocillos (235), y abiertos a ellos, en el primer sustrato (225), incluyendo la gotita de muestra células de interés que entran en las trampas de células;

(b) introducir perlas (525) de captura en los micropocillos (235), en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas (525) de captura; y

35 (c) utilizar el accionador (100, 1705) de gotitas para transportar una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo (115) de micropocillos, en donde partes de la gotita de reactivo de lisis celular entran en los micropocillos (235) y trampas de células y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas (525) de captura.

10. El método de la reivindicación 9, en donde:

40 (i) las perlas (525) de captura tienen un tamaño tal que solo una de las perlas (525) de captura cabe en uno de los micropocillos (235); y/o

(ii) las trampas de células tienen un tamaño tal que solo una de las células de interés cabe en una de las trampas de células.

45 11. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, que comprende además: (d) durante el período de incubación y/o antes del período de incubación, utilizar el accionador (100, 1705) de gotitas para transportar un fluido inmiscible con la gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo (115) de micropocillos, en donde el fluido inmiscible no entra en los micropocillos (235) y las trampas de células, encapsulando así perlas individuales con células individuales con reactivo de lisis celular.

50 12. El método de la reivindicación 9, que comprende además retirar de los micropocillos (235) las perlas (525) de captura con el analito capturado en ellas; en donde opcionalmente la operación de eliminación incluye colocar un imán cerca de los micropocillos (235) para formar un campo magnético que extraiga las perlas (525) de captura de los

micropocillos (235).

13. El método de la reivindicación 9, en donde:

(i) el método comprende además utilizar un campo magnético para mover las perlas (525) de captura a los micropocillos (235) y lejos de ellos; o

5 (ii) cada una de las perlas (525) de captura incluye una pluralidad de elementos de captura, opcionalmente en donde la pluralidad de elementos de captura incluye una secuencia de captura y una secuencia de código de barras única, en donde la secuencia de captura es opcionalmente una de i) una secuencia poli-T para la captura del ARNm total, o ii) una pluralidad de secuencias de captura específicas de la transcripción que se dirigen a un panel de genes de interés.

10 14. Un sistema de fluídica digital para la captura de células de interés, comprendiendo el sistema:

(a) un accionador (100, 1705) de gotitas que incluye un espacio (215) de operaciones de gotitas, incluyendo el accionador (100, 1705) de gotitas electrodos de operaciones de gotitas dispuestos cerca del espacio (215) de operaciones de gotitas;

(b) un dispositivo (115) de micropocillos que incluye:

15 (1) un primer sustrato (110), incluyendo el dispositivo (115) de micropocillos micropocillos (235) formados en el primer sustrato (110), abriéndose los micropocillos (235) sobre una superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos, el dispositivo de micropocillos (115) acoplado al accionador (100, 1705) de gotitas y colocado de manera que los micropocillos (235) se enfrenten al espacio (215) de operaciones de gotitas; y

20 (2) un segundo sustrato (1710), incluyendo el dispositivo (115) de micropocillos trampas de células formadas en el segundo sustrato (1710), en donde las trampas de células se colocan muy cerca de los micropocillos (235), y abiertas a estos, en el primer sustrato (110), las trampas de células abriéndose sobre la superficie de operaciones de gotitas del dispositivo (115) de micropocillos;

(c) un controlador configurado para ejecutar instrucciones de programa para

25 (1) dirigir el accionador (100, 1705) de gotitas para transportar una gotita de muestra a un dispositivo (115) de micropocillos, incluyendo la gotita de muestra células de interés que entran en las trampas de células;

(2) introducir perlas (525) de captura en los micropocillos (235), en donde los elementos de captura se inmovilizan en las perlas (525) de captura; y

30 (3) dirigir el accionador (100, 1705) de gotitas para que transporte una gotita de reactivo de lisis celular al dispositivo (115) de micropocillos, en donde partes de la gotita de reactivo de lisis entran en las trampas de células y los micropocillos (235) y, durante un período de incubación, hacen que las células de interés liberen el analito que es capturado por los elementos de captura en las perlas (525) de captura.

15. El sistema de la reivindicación 14, en donde:

(i) el primer sustrato (110) incluye una capa (1020) hidrófoba dispuesta sobre el mismo, formando la capa (1020) hidrófoba la superficie de operaciones de gotitas; o

35 (ii) los micropocillos (235) tienen un tamaño y una distancia dimensionados para recibir solo una sola de las perlas (525) de captura.

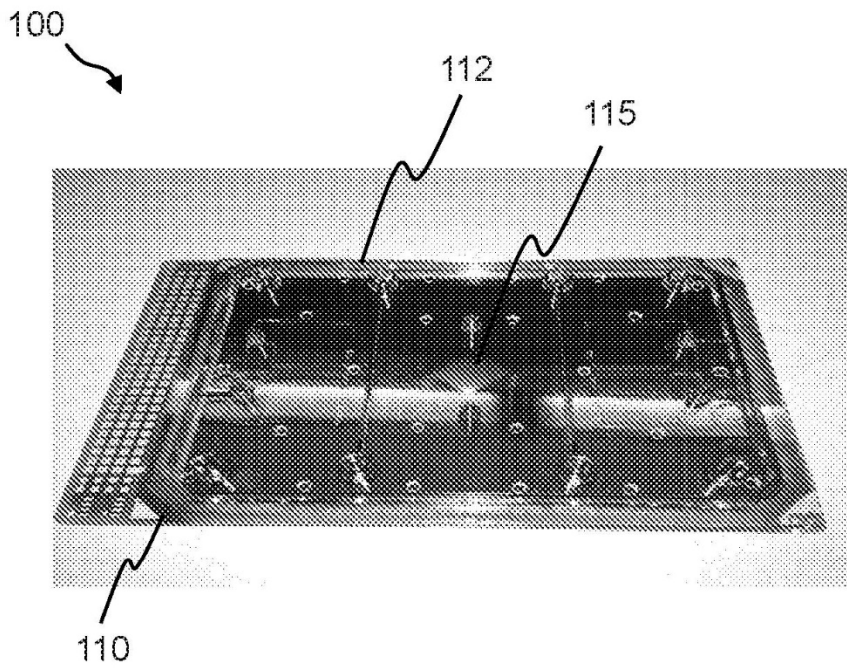


Figura 1A

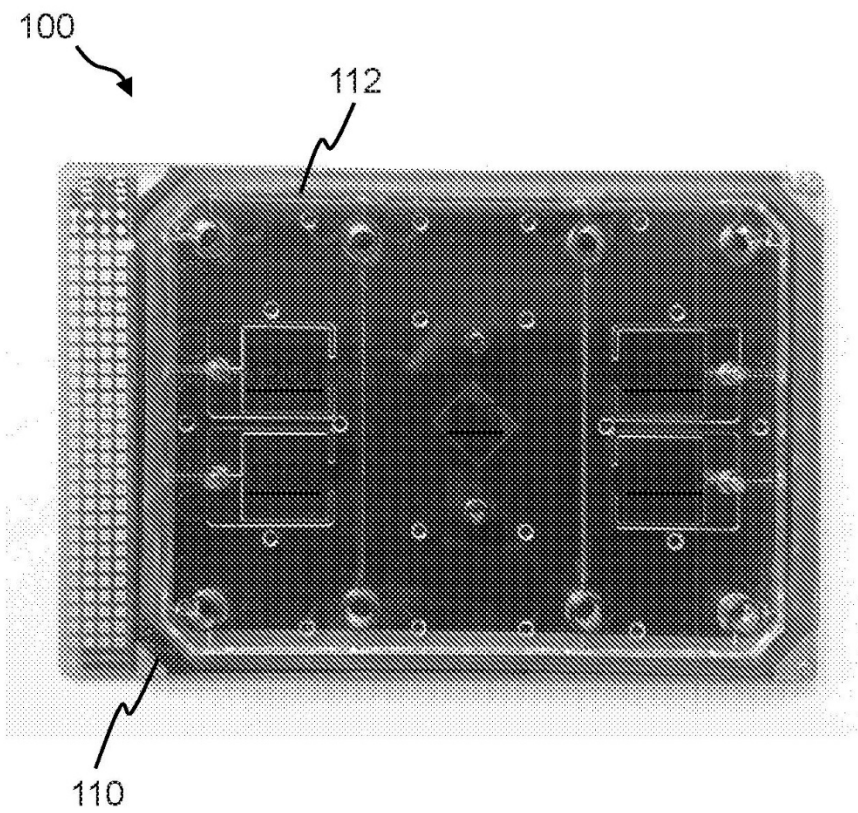


Figura 1B

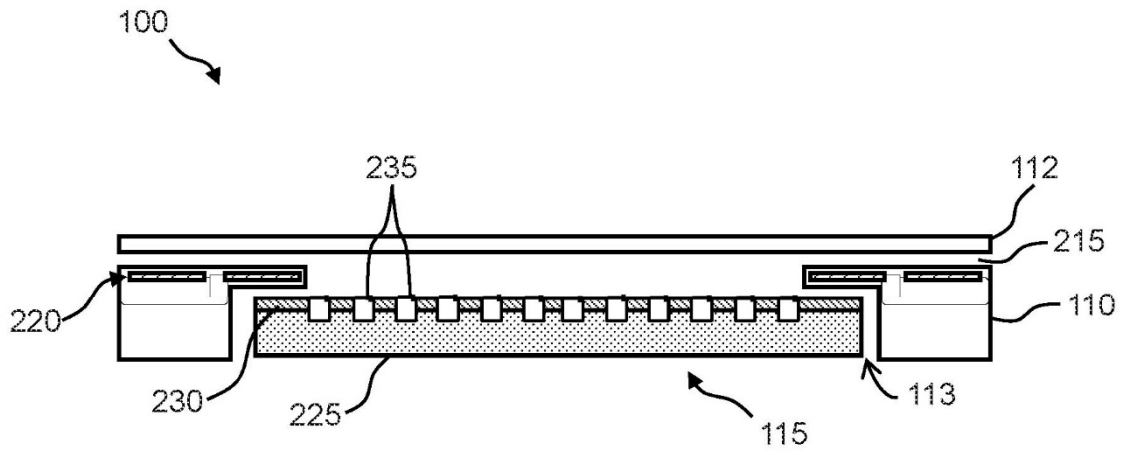


Figura 2

300 ↘

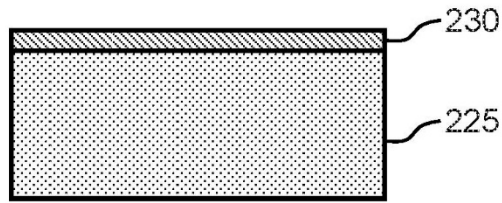


Figura 3A

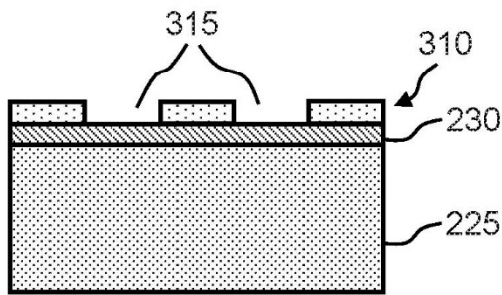


Figura 3B

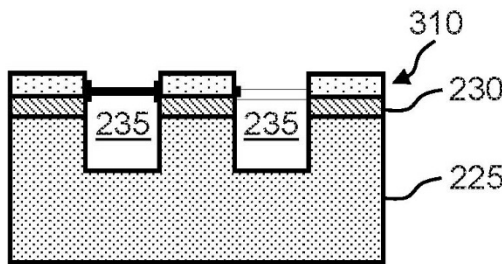


Figura 3C

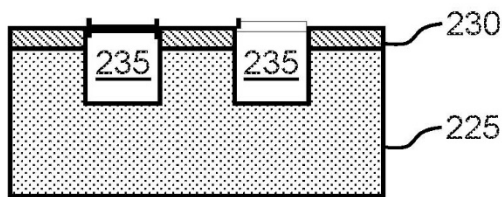


Figura 3D

400

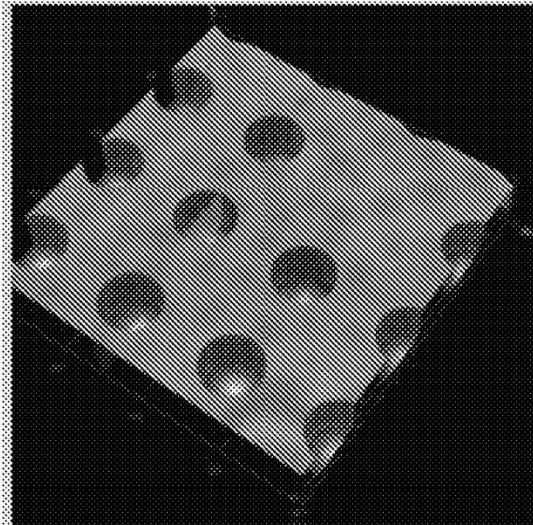
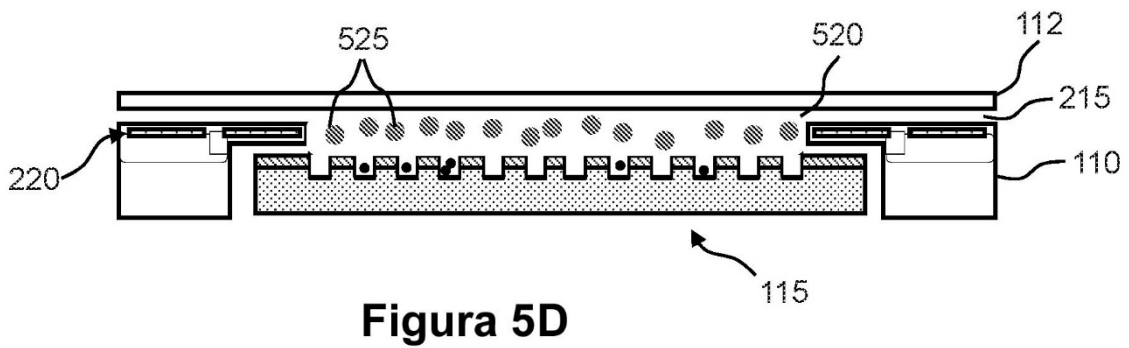
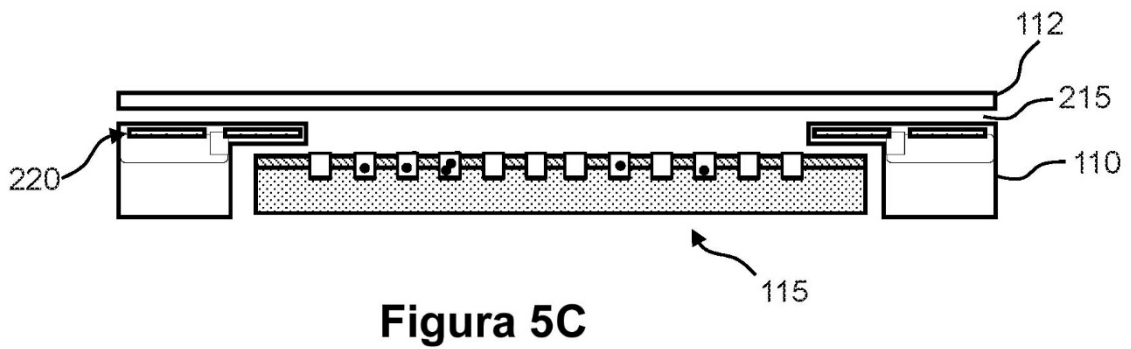
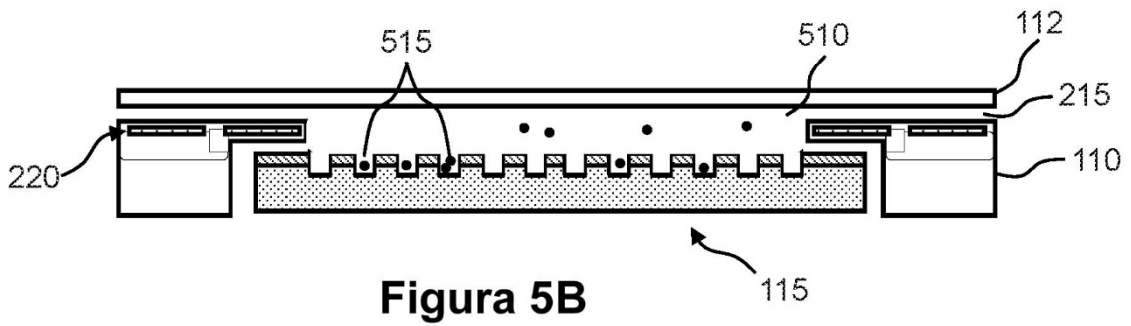
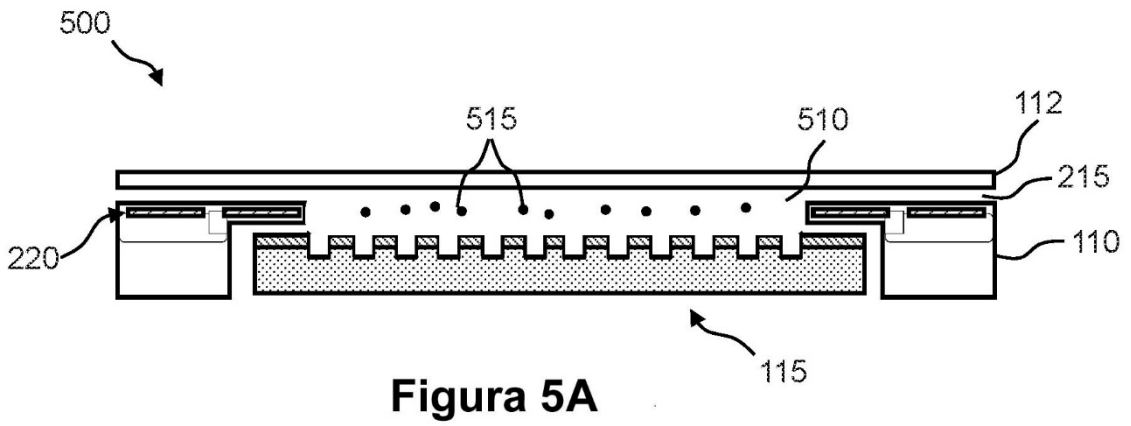


Figura 4



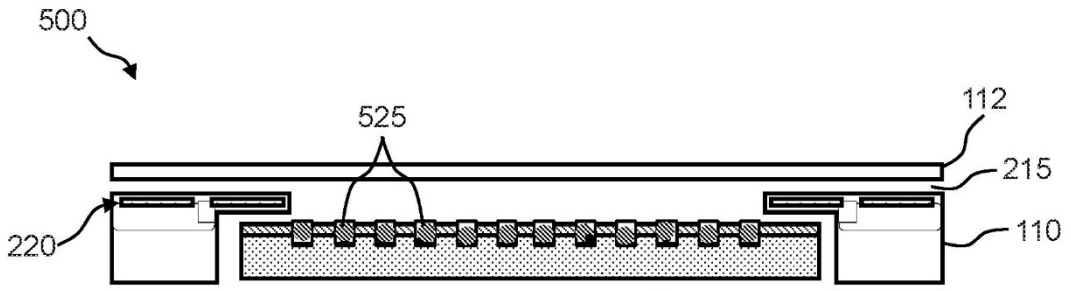


Figura 5E

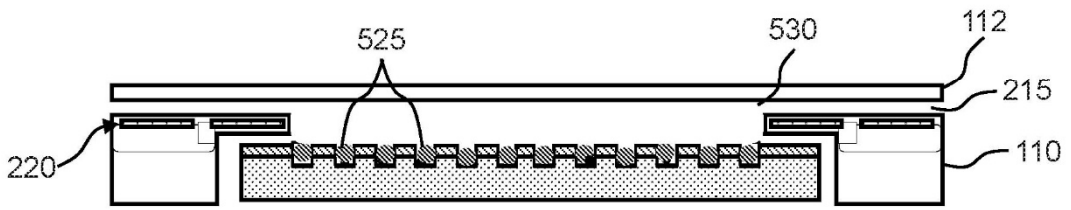


Figura 5F

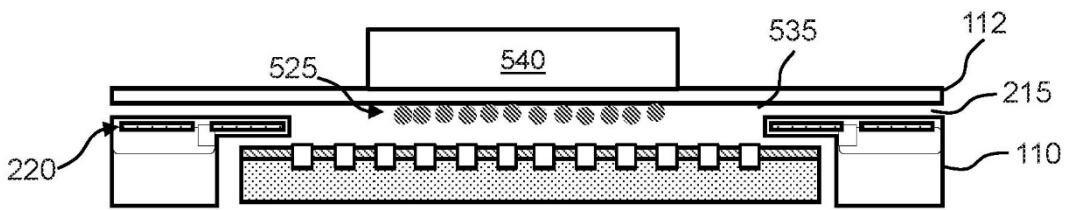


Figura 5G

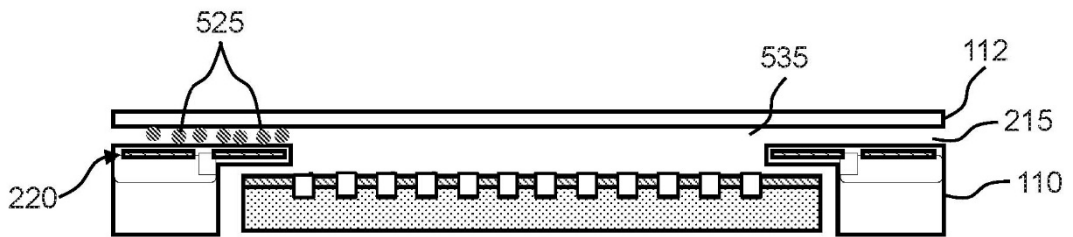


Figura 5H

600

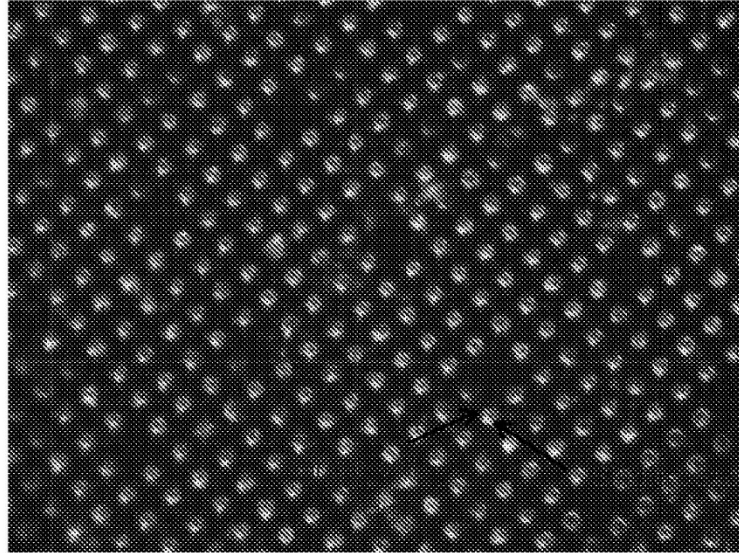


Figura 6A

650

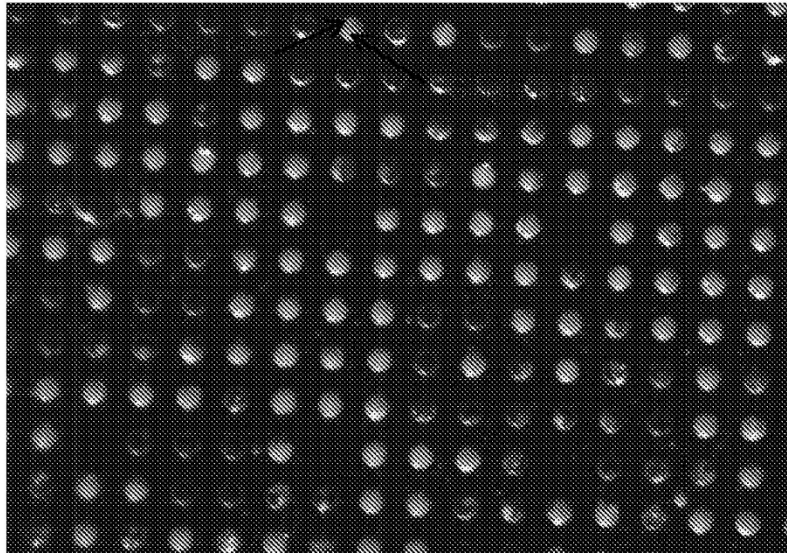


Figura 6B

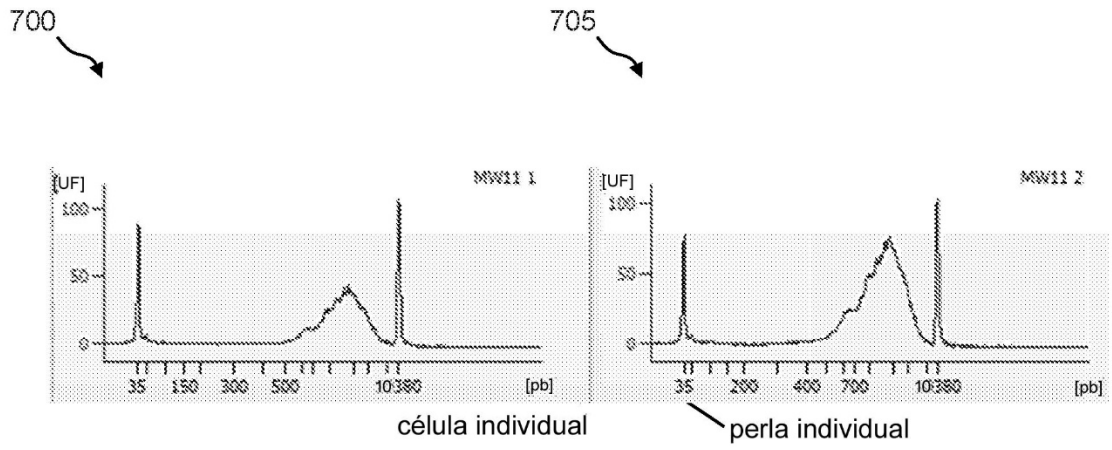


Figura 7A

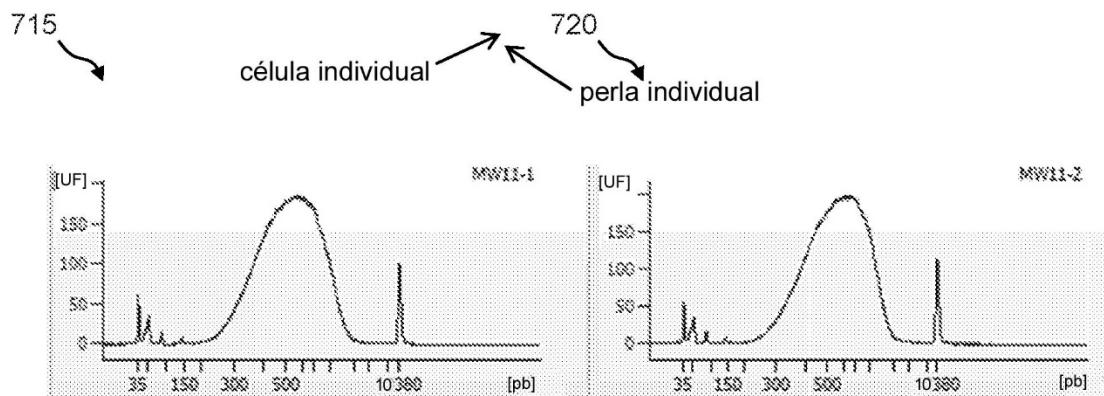


Figura 7B

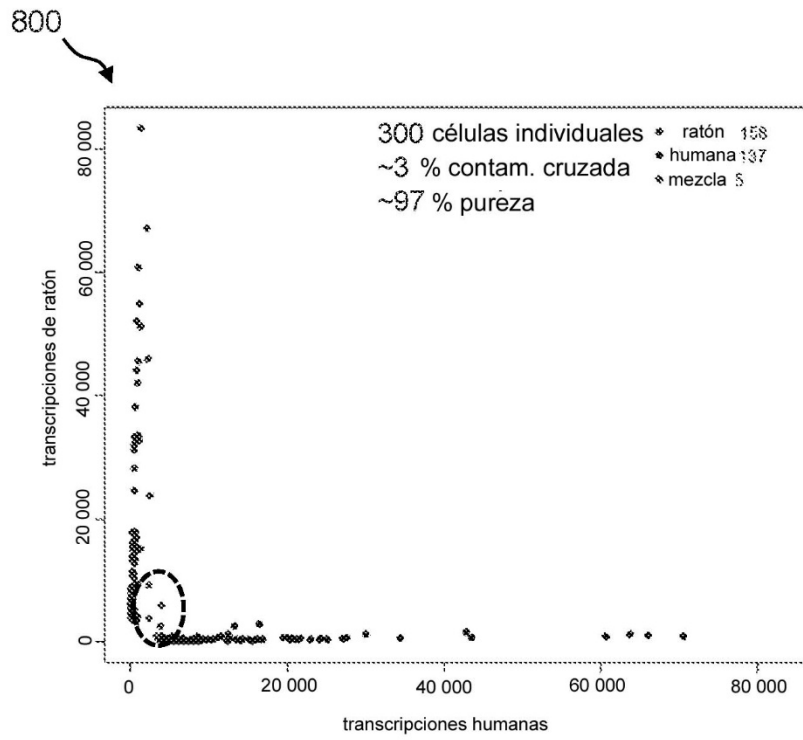


Figura 8A

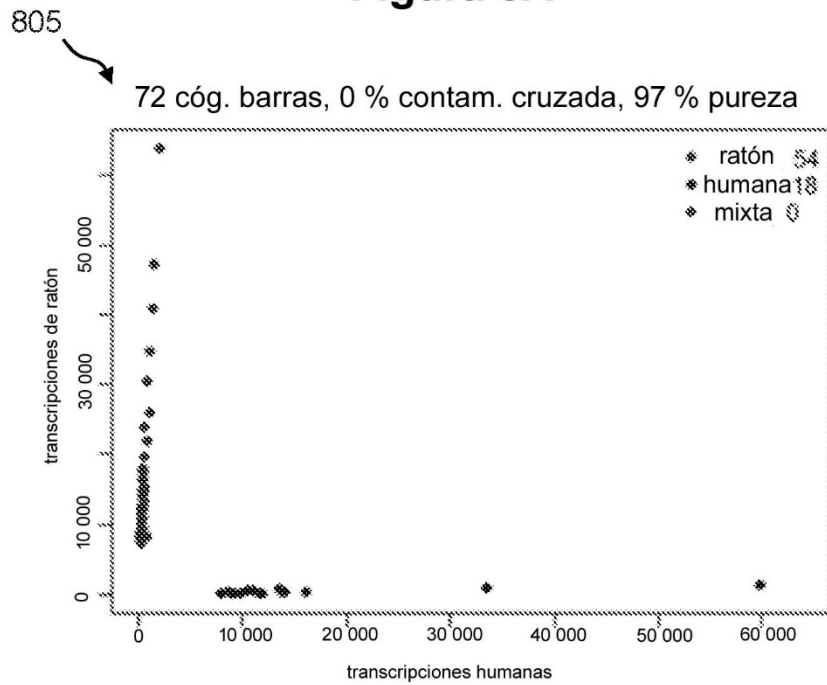


Figura 8B

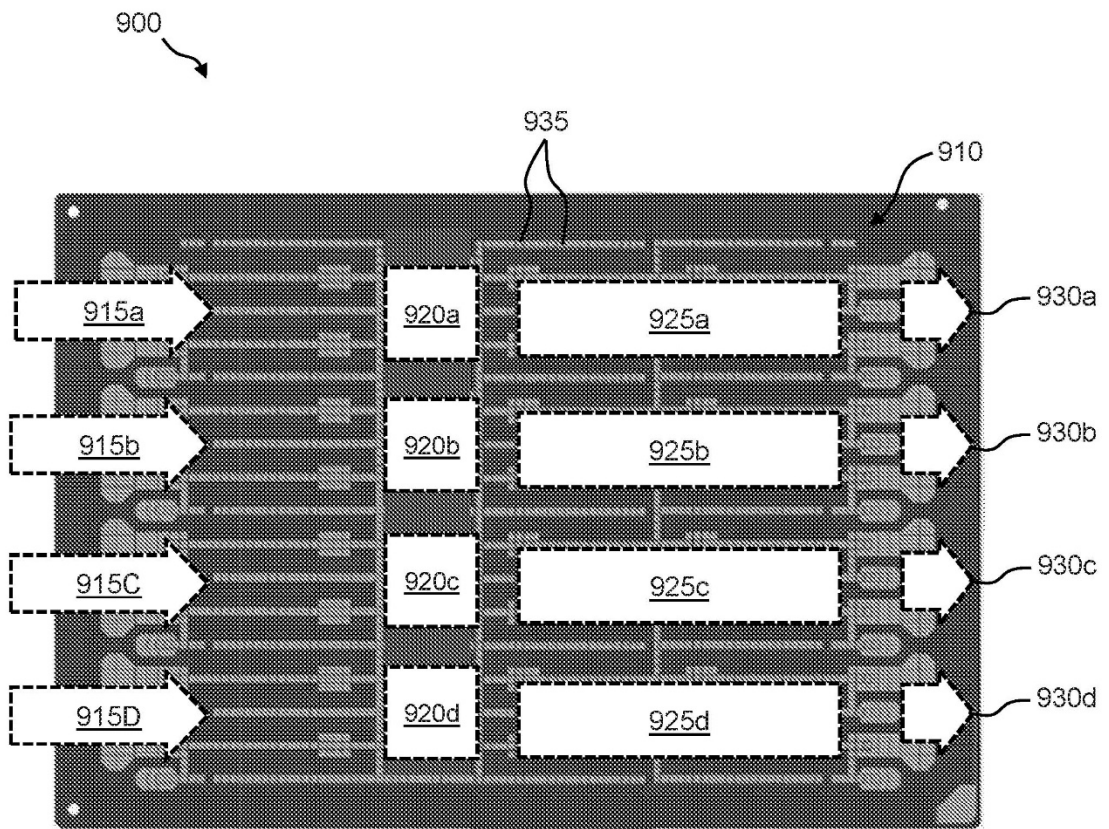


Figura 9

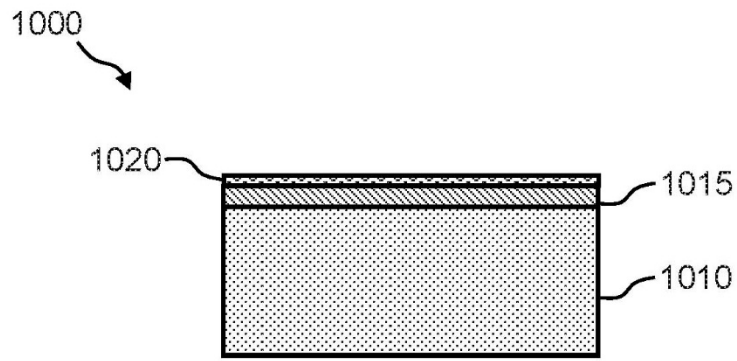


Figura 10A

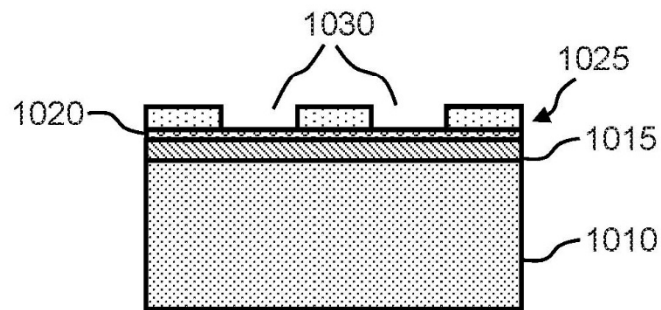


Figura 10B

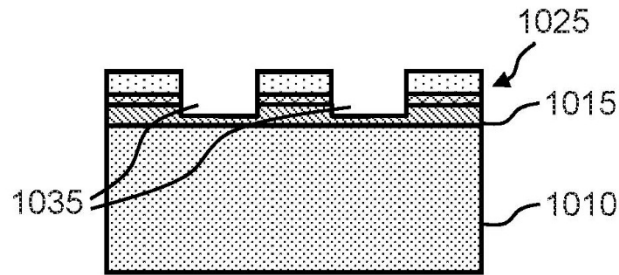


Figura 10C

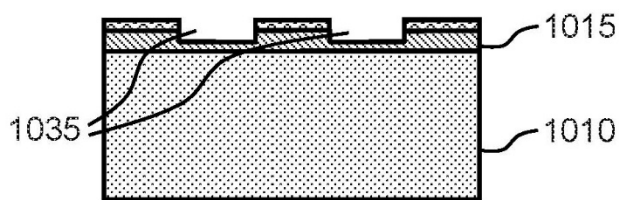
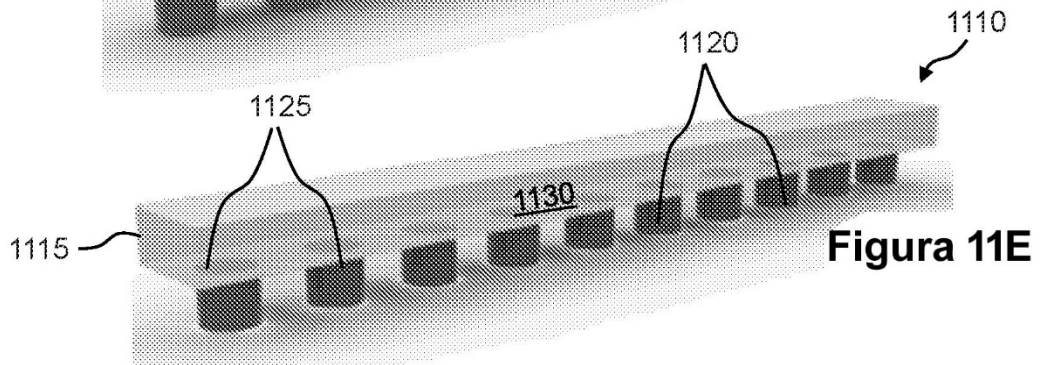
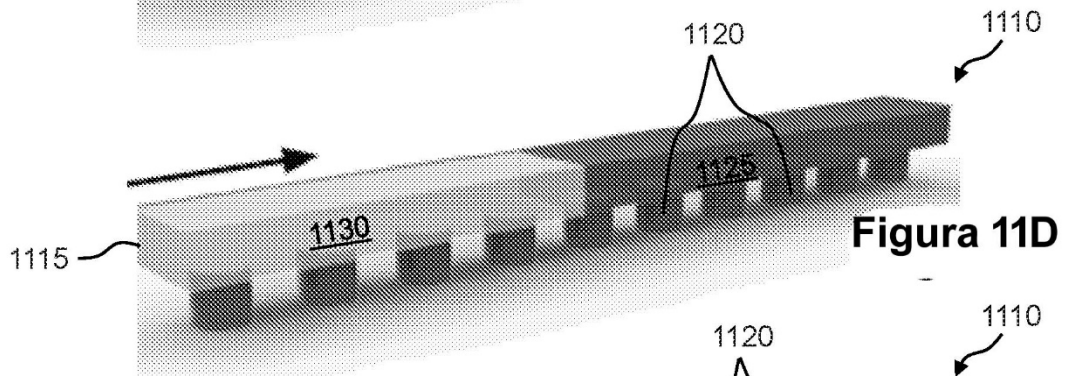
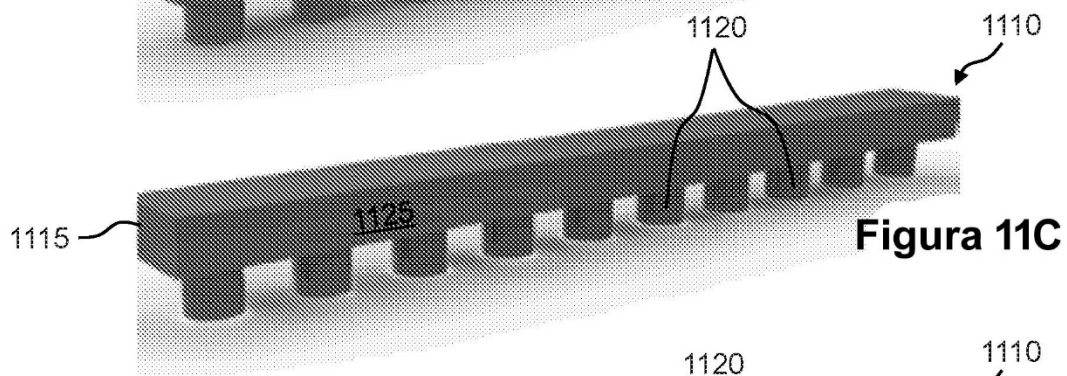
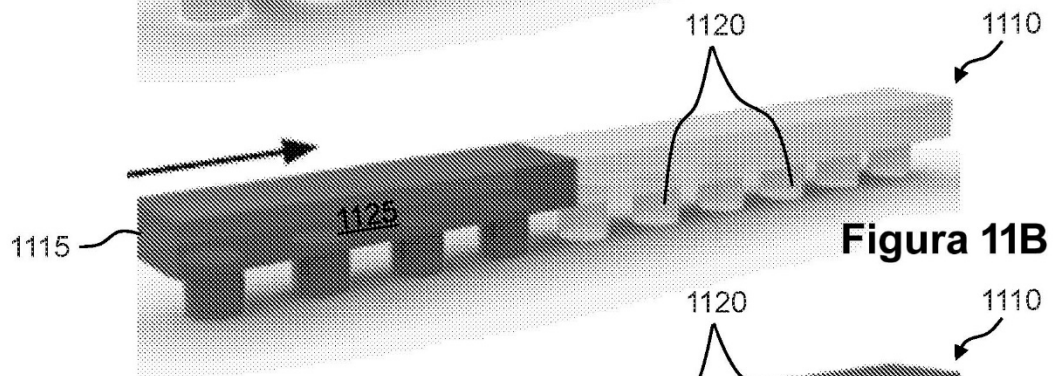
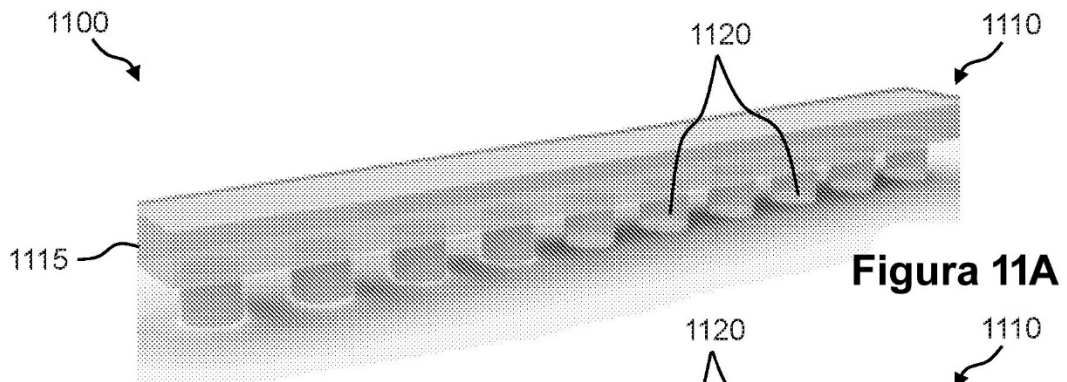


Figura 10D



1110
↘

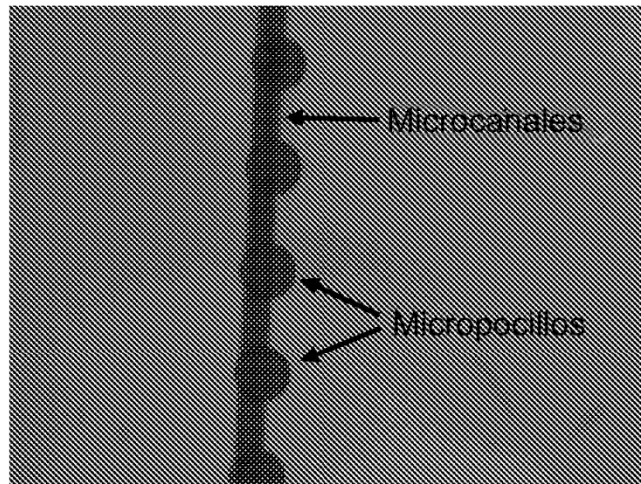


Figura 12A

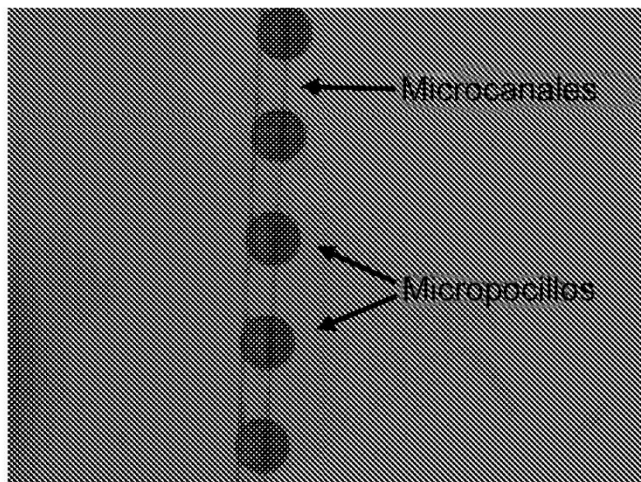


Figura 12B

1300

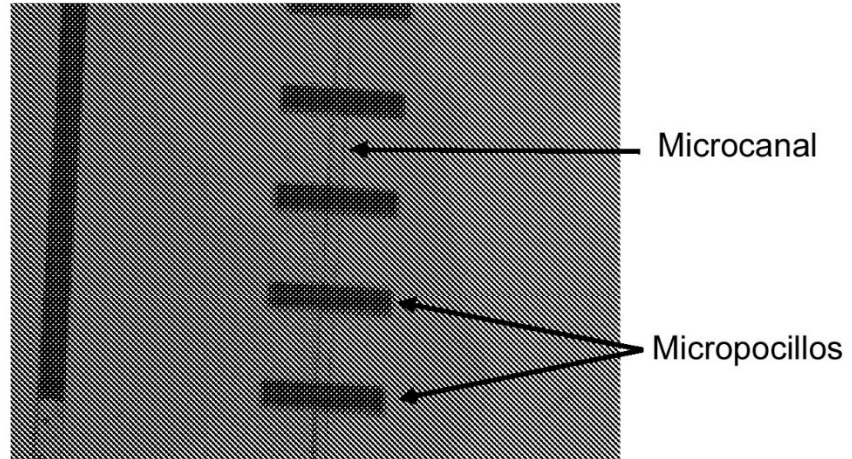


Figura 13

1400

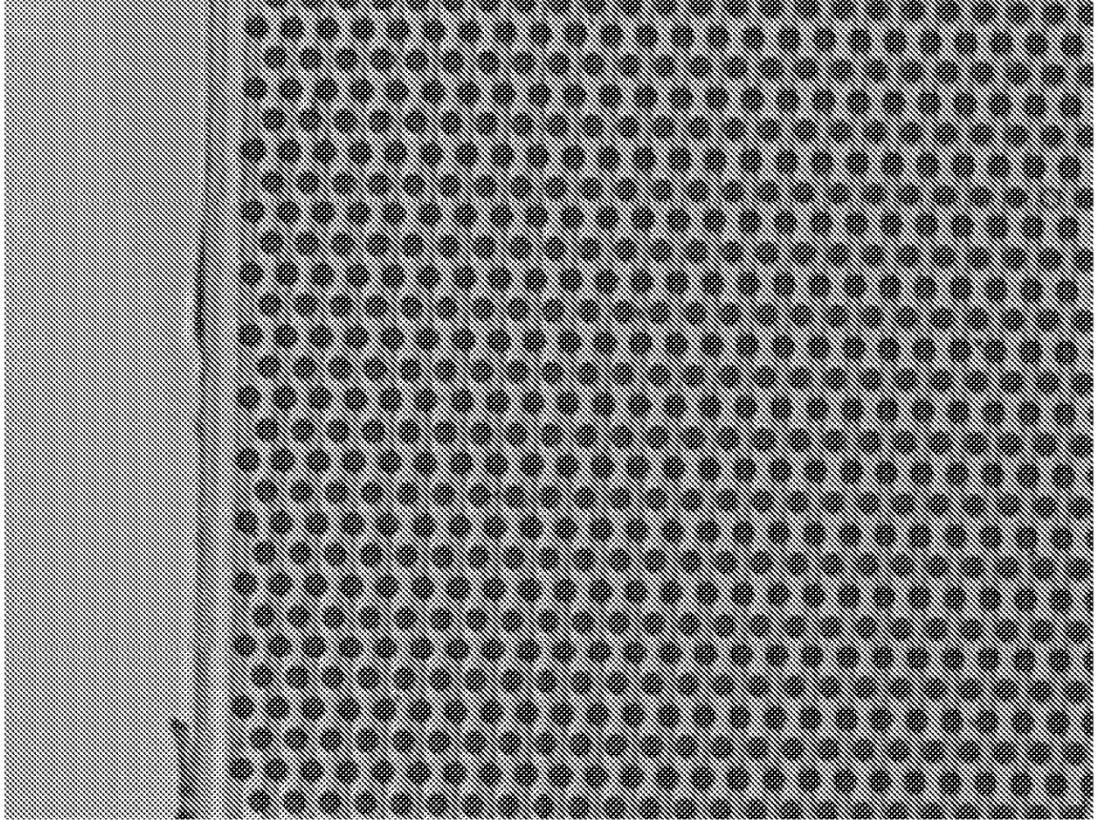


Figura 14

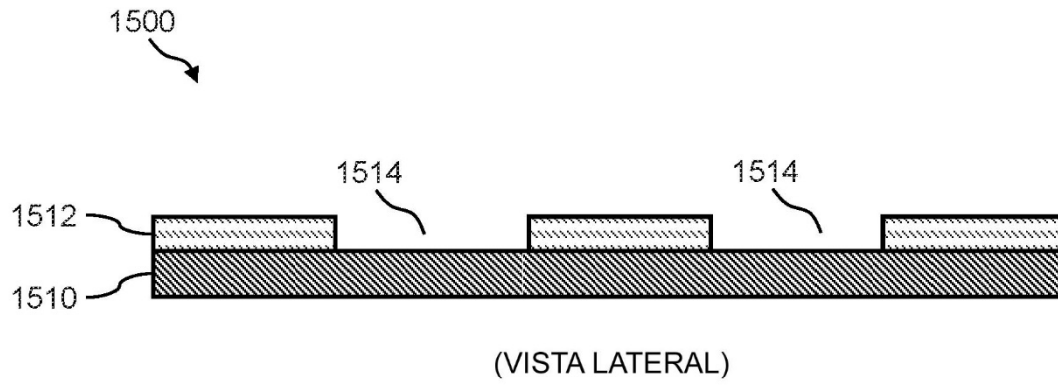


Figura 15A

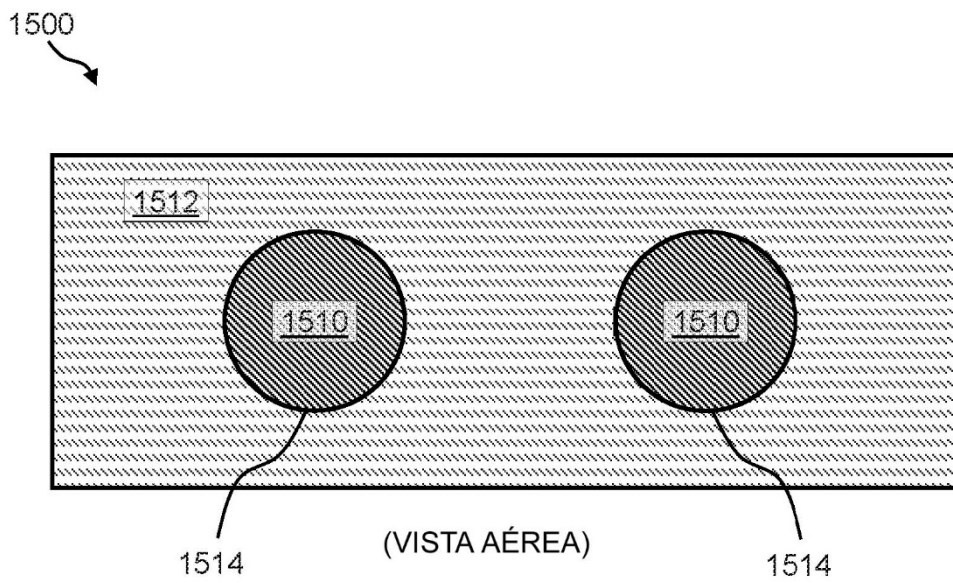
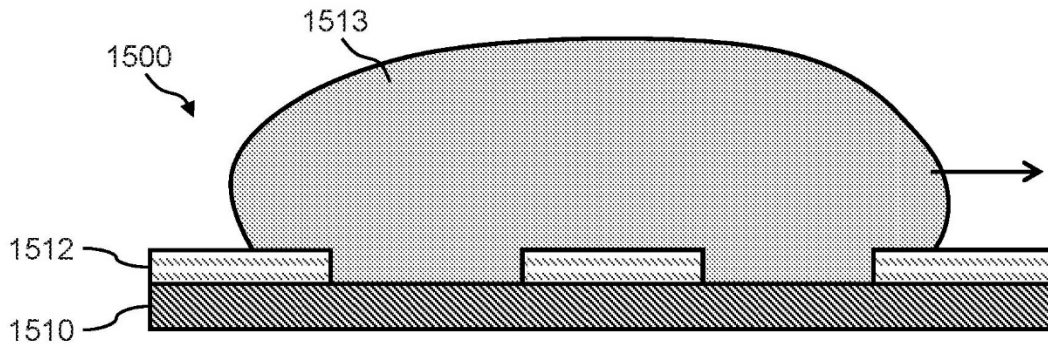
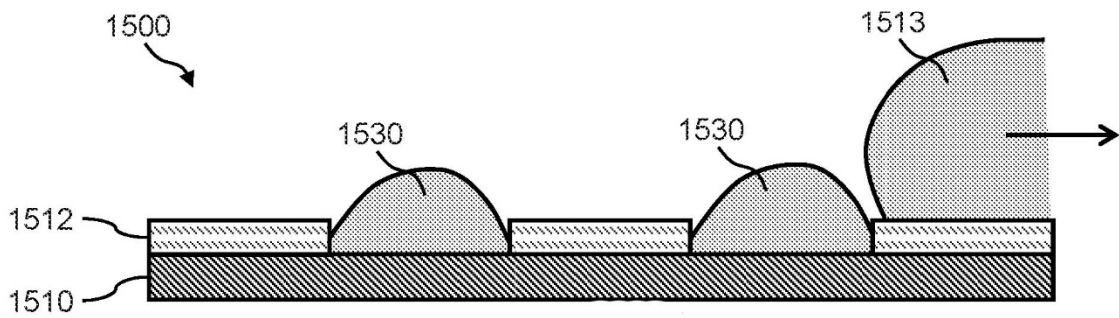


Figura 15B



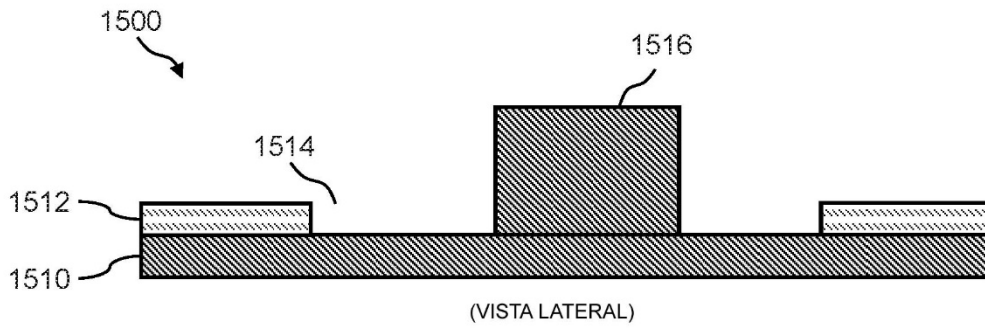
(VISTA LATERAL)

Figura 15C



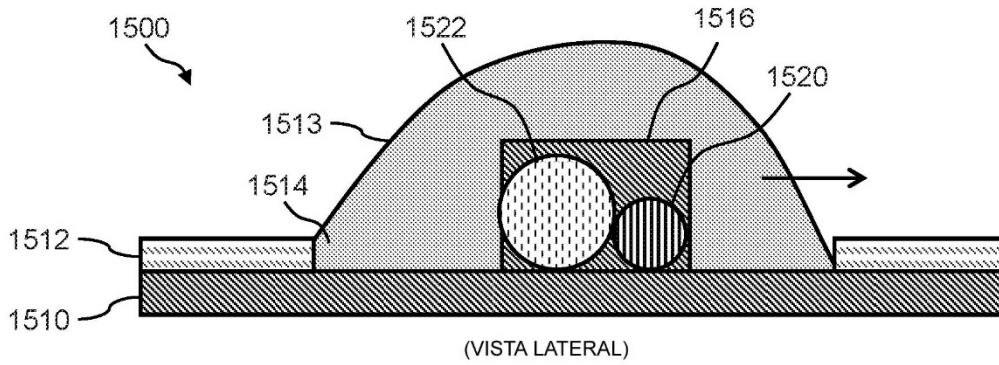
(VISTA LATERAL)

Figura 15D



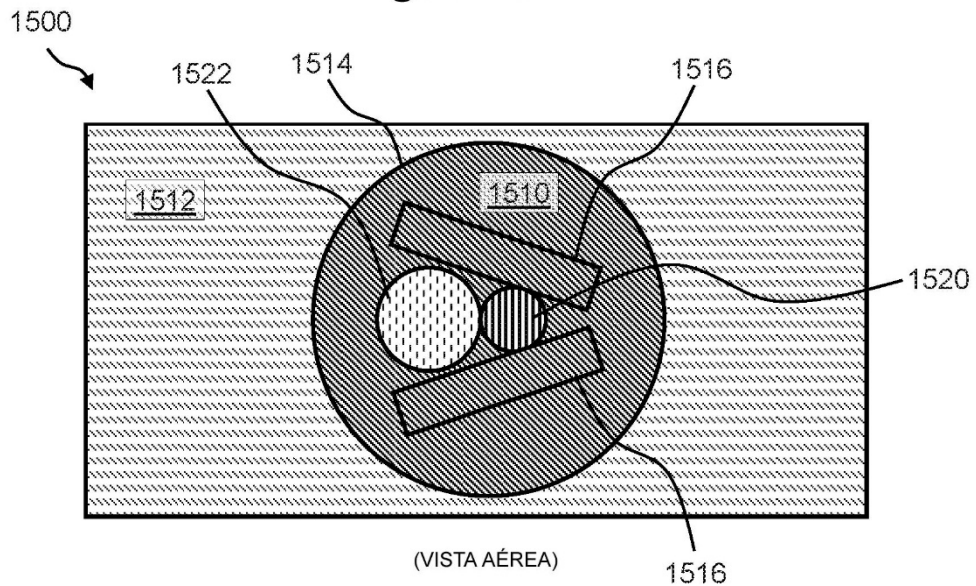
(VISTA LATERAL)

Figura 16A



(VISTA LATERAL)

Figura 16B



(VISTA AÉREA)

Figura 16C

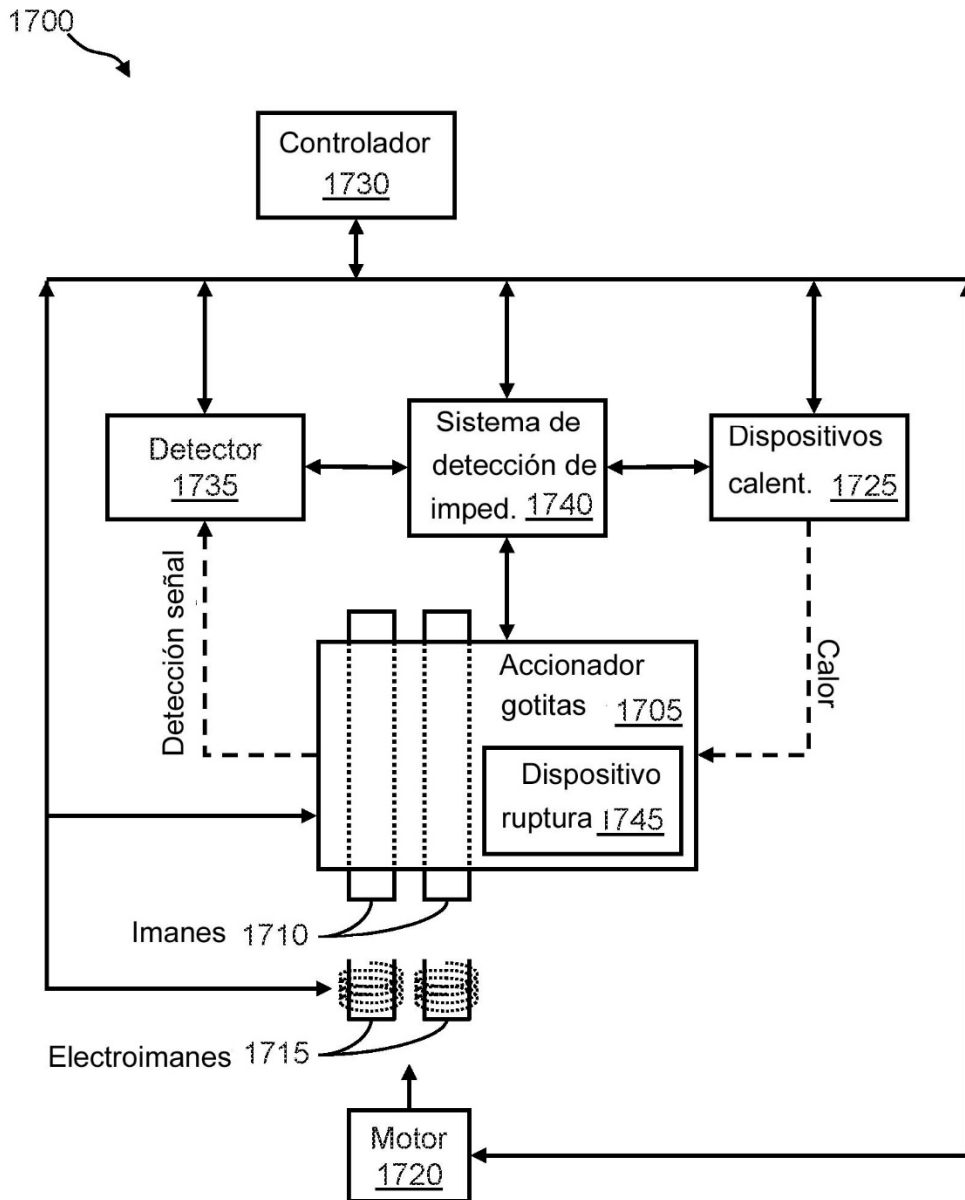


Figura 17

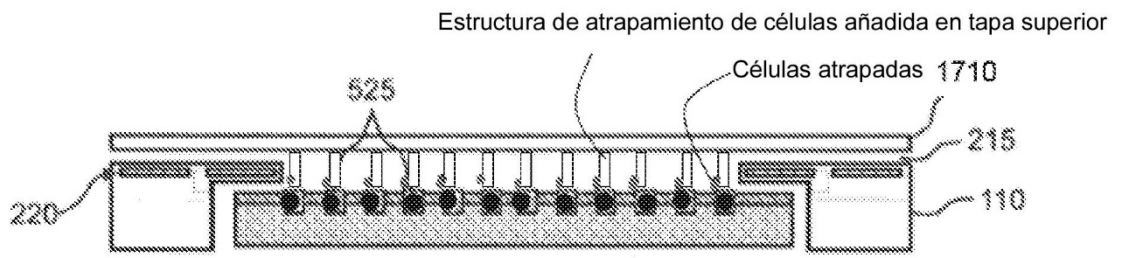


Figura 18A

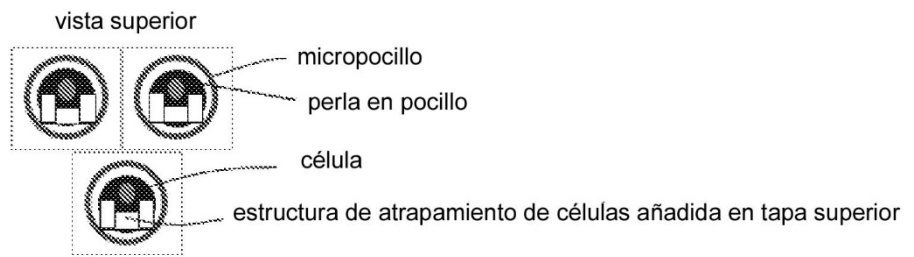


Figura 18B

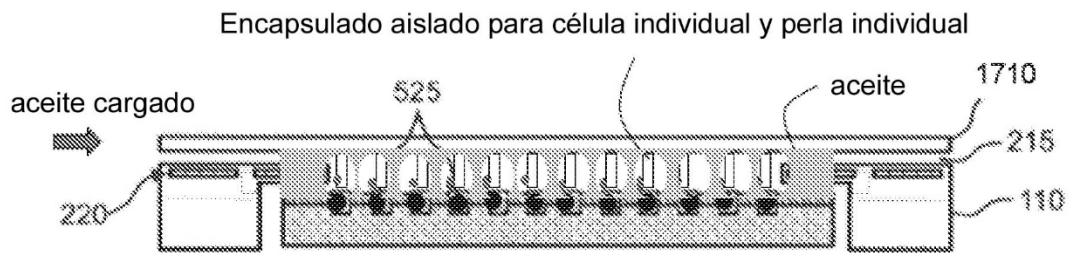


Figura 19A

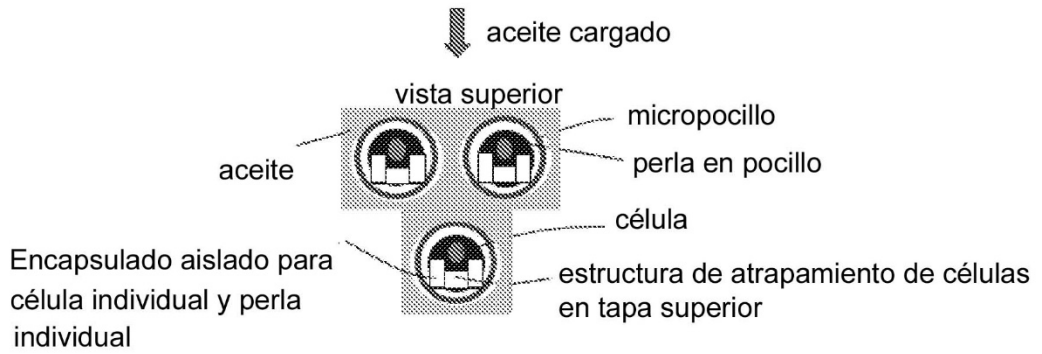


Figura 19B

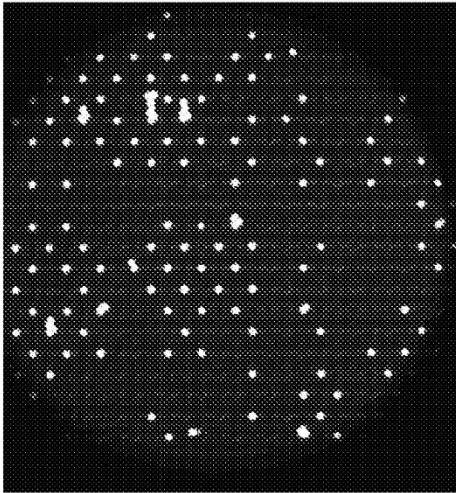


Figura 20A

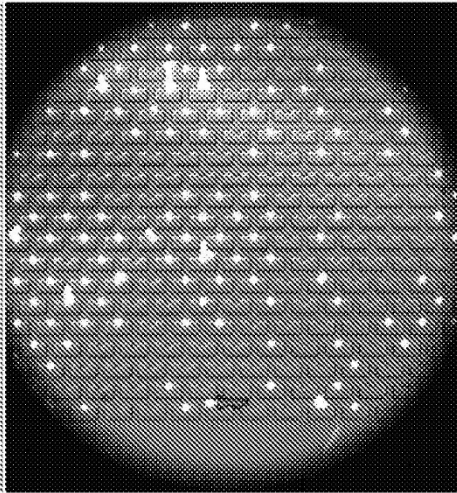


Figura 20B

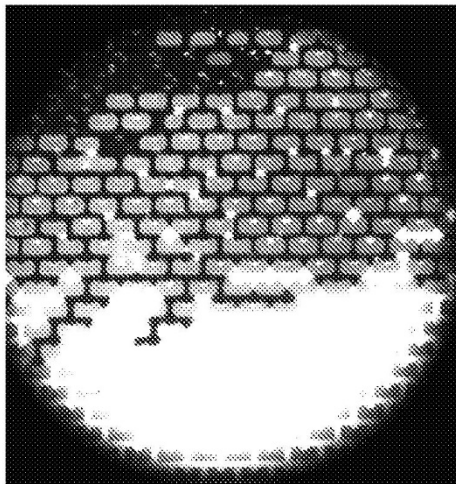


Figura 20C

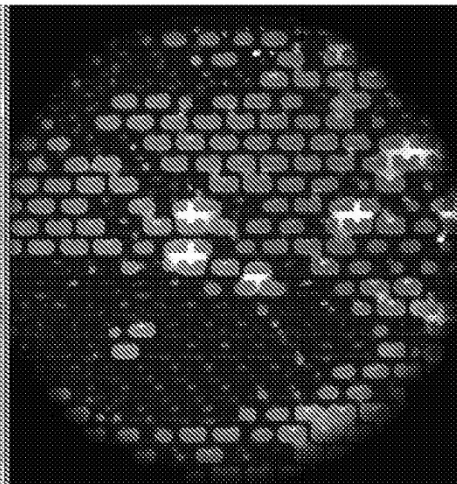


Figura 20D