

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 462**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6816 (2008.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2017 E 21211332 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3984642**

54 Título: **Método y sistema para el análisis y la cuantificación de ácido nucleico**

30 Prioridad:

17.11.2016 US 201662423601 P

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

30.04.2024

73 Titular/es:

**COMBINATI INCORPORATED (100.0%)
3436 Rambow Drive
Palo Alto, California 94306, US**

72 Inventor/es:

**ZAYAC, ANDREW;
HUNG, JU-SUNG;
KING, HOWARD GREGG;
COX, DAVID y
DUECK, MEGAN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 967 462 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

Método y sistema para el análisis y la cuantificación de ácido nucleico

5 **Referencia cruzada****Declaración de interés del gobierno**

10 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la subvención de investigación de innovación de pequeñas empresas número 1R43OD023028-01 y 1R43HG009640 otorgada por el Instituto nacional de salud. El gobierno de los EE. UU. tiene determinados derechos sobre la invención.

Antecedentes

15 Los dispositivos microfluídicos son dispositivos que contienen estructuras que manejan fluidos a pequeña escala. Típicamente, un dispositivo de microfluídico opera en una escala submilimétrica y maneja microlitros, nanolitros o cantidades más pequeñas de fluidos. En los dispositivos microfluídicos, un importante mecanismo de ensuciamiento es el aire atrapado, o burbujas, dentro de la microestructura. Esto puede ser particularmente problemático cuando se usa un material termoplástico para crear la estructura microfluídica, ya que la permeabilidad al gas de los termoplásticos es muy baja.

20 Para evitar el ensuciamiento por el aire atrapado, las estructuras microfluídicas anteriores usan diseños de canal recto simple o de canal ramificado con materiales termoplásticos, o fabrican el dispositivo mediante el uso de materiales de alta permeabilidad a los gases, tales como elastómeros. Sin embargo, los diseños simples limitan la posible funcionalidad del dispositivo microfluídico, y los materiales elastoméricos son difíciles y costosos de fabricar, particularmente a escala.

25 Una aplicación de las estructuras microfluídicas es la reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR). La dPCR diluye una muestra de ácidos nucleicos hasta una plantilla o menos de ácido nucleico en cada partición de una estructura microfluídica que proporciona una matriz de muchas particiones y realiza una reacción de PCR en toda la matriz. Contando las particiones en las que la plantilla se amplificó con éxito mediante PCR y aplicando estadísticas de Poisson al resultado, se cuantifica el ácido nucleico diana. A diferencia de la popular PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), donde las plantillas se cuantifican comparando la velocidad de amplificación por PCR de una muestra desconocida con la velocidad de un conjunto de estándares de qPCR conocidos, la dPCR ha demostrado exhibir una mayor sensibilidad, una mejor precisión y una mayor reproducibilidad.

35 Para los investigadores y médicos genómicos, la dPCR es particularmente poderosa en la detección de mutaciones raras, la cuantificación de variantes del número de copias y la cuantificación de bibliotecas de secuenciación de próxima generación. El uso potencial en entornos clínicos para la biopsia líquida con ADN libre de células y la cuantificación de la carga viral aumenta aún más el valor de la tecnología de dPCR. Las soluciones de dPCR existentes han usado las matrices de válvulas elastoméricas, enfoques de orificio pasante de silicio y encapsulación microfluídica de gotas en aceite. A pesar del creciente número de plataformas de dPCR disponibles, la dPCR ha estado en desventaja en comparación con la tecnología qPCR más antigua que se basa en contar la cantidad de ciclos de amplificación de PCR. La combinación de rendimiento, facilidad de uso, desempeño y costo son las principales barreras para lograr la adopción en el mercado de la dPCR.

45 El documento WO2014/039963 describe métodos y dispositivos para amplificar simultáneamente una pluralidad de pocillos de muestra para una cantidad predeterminada de amplificación, detectar si se ha producido amplificación en un primer conjunto de los pocillos, amplificar para una cantidad adicional de amplificación y detectar si se ha producido la amplificación en un segundo conjunto de los pocillos.

50 El documento WO2013/177206 describe métodos y dispositivos para analizar partículas individuales en una población de partículas, en donde se miden al menos dos parámetros para cada partícula.

Resumen

55 En la presente descripción se proporcionan los métodos y sistemas que pueden ser útiles para amplificar y cuantificar ácidos nucleicos y detectar la presencia o ausencia de dianas (por ejemplo, dianas reales o sospechadas), tales como, por ejemplo, patógenos (por ejemplo, bacterias). La presente descripción proporciona los métodos, sistemas y dispositivos que pueden permitir la preparación de muestras, la amplificación de muestras y el análisis de muestras mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR). Esto puede permitir que un ácido nucleico sea amplificado y cuantificado a un costo y complejidad reducidos en comparación con otros sistemas y métodos.

65 Los métodos y sistemas de la presente descripción pueden emplear análisis de fusión de alta resolución (HRM) para detectar las variantes de secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ácido desoxirribonucleico, ADN). Los métodos de HRM de la presente descripción pueden crear curvas de fusión dependientes de la secuencia con resolución de un solo nucleótido, todo completado a través de una integración perfecta con la amplificación de ácidos nucleicos, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en algunos casos sin ninguna etapa de procesamiento posterior

a la amplificación. Junto con la PCR de amplio rango, los métodos y sistemas de HRM de la presente descripción pueden expandir en gran medida la amplitud de las variantes de secuencia que pueden identificarse.

5 En la presente descripción se reconocen varias limitaciones asociadas con los enfoques de la curva de fusión que están actualmente disponibles. El diseño de análisis de PCR/HRM en masa convencional puede estar limitado para abordar varias necesidades críticas en los análisis genéticos y epigenéticos. Una limitación crítica es la sensibilidad inadecuada debido a la interferencia de los inhibidores de la PCR o al exceso de ADN humano de fondo. Otra limitación crítica es su incapacidad para diseccionar múltiples variantes de secuencia en una población heterogénea y cuantificar con precisión cada variante.

10 En la presente descripción se reconoce la necesidad de determinar cantidades absolutas de variantes alélicas raras y proporciones alélicas relativas. En enfermedades infecciosas, la detección e identificación precisas de la carga mínima de patógenos y la resolución cuantitativa de poblaciones microbianas mixtas para diferenciar la infección de la colonización o la contaminación subrayan aún más la importancia de distinguir cuantitativamente las variantes que coexisten en una muestra.

15 La presente descripción proporciona una plataforma de análisis de HRM digital que integra la cuantificación absoluta en PCR digital (dPCR) con el análisis de HRM. Esto puede proporcionar análisis profundos a nivel de una sola molécula y de una manera de alto rendimiento.

20 Un sistema para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico es el primer aspecto de la presente invención y se proporciona en la reivindicación 1. Las modalidades preferidas se proporcionan en las reivindicaciones dependientes. Cualquier aspecto o modalidad de la descripción más abajo que no esté incluido en las reivindicaciones se proporciona solo como referencia.

25 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que comprende proporcionar un dispositivo que comprende una pluralidad de particiones, en donde al menos un subconjunto de la pluralidad de particiones comprende la pluralidad de moléculas de ácido nucleico, en donde cada partición del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se configura para permitir el flujo de gas desde el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a un medio externo al el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a través de al menos una barrera que separa el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones del medio externo; mientras se somete al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a un calentamiento controlado, recopilar señales del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones; y procesar las señales recopiladas para producir datos indicativos de un punto de fusión de al menos un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.

35 En algunas modalidades, el método comprende, además, antes de proporcionar el dispositivo que comprende la pluralidad de moléculas de ácido nucleico, realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en una muestra de ácidos nucleicos en condiciones suficientes para producir la pluralidad de moléculas de ácido nucleico como productos de amplificación de la muestra de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el método comprende además cargar la muestra de ácidos nucleicos en al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones antes de realizar las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se realizan en al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones. En algunas modalidades, realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en la muestra de ácidos nucleicos comprende amplificar al menos una porción de una región espaciadora transcrita interna de al menos un subconjunto de moléculas de ácido nucleico de la muestra de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos usan uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste de cebadores, desoxirribonucleótidos, tampones, cofactores, colorantes intercalantes y polimerasas. En algunas modalidades, uno o más reactivos comprenden un fluoróforo o marcador fluorescente. En algunas modalidades, el método comprende, además, antes de realizar las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en la muestra de ácidos nucleicos, poner en contacto al menos un subconjunto de las moléculas de ácido nucleico de la muestra de ácidos nucleicos con un colorante intercalante.

50 En algunas modalidades, la recopilación de señales de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones mientras se somete al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a calentamiento controlado se realiza en una pluralidad de puntos de tiempo.

55 En algunas modalidades, la recopilación de señales de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones mientras se somete al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a calentamiento controlado comprende generar imágenes del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones para recopilar las señales.

60 En algunas modalidades, el procesamiento de las señales recopiladas comprende usar las señales para generar datos de señal frente a temperatura para al menos el subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.

65 En algunas modalidades, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico se deriva de una muestra que contiene o se sospecha que contiene un patógeno. En algunas modalidades, el patógeno es al menos una bacteria. En algunas modalidades, la al menos una bacteria se selecciona del grupo que consiste de *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*,

- 5 Bacillus halodurans, Bacillus mycoides, Bacillus polymexa, Bacillus subtilis, Bacillus thuringensis, Staphylococcus capitis, Staphylococcus caprae, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus hominis, Staphylococcus lentus, Staphylococcus lugdunensis, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus xylosus, Propionibacterium acnes, Enterococcus faecalis, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, Betaproteobacteria, Chlamydiae, Epsilonproteobacteria, Firmicutes, Gammaproteobacteria, Spirochaetales y Tenericutes. En algunas modalidades, el método comprende, además, antes de proporcionar el dispositivo que comprende la pluralidad de moléculas de ácido nucleico, aislar o extraer la pluralidad de moléculas de ácido nucleico, o un subconjunto de las mismas, de al menos una bacteria. En algunas modalidades, el método comprende, además, usar los datos indicativos de un punto de fusión para determinar la presencia o ausencia del patógeno en cada partición de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.
- 10 En algunas modalidades, la muestra de la que se deriva la pluralidad de moléculas de ácido nucleico es una muestra biológica. En algunas modalidades, la muestra biológica comprende un fluido corporal seleccionado del grupo que consiste de sangre, orina, semen, mucosidad y saliva. En otras modalidades, la muestra de la que se deriva la pluralidad de moléculas de ácido nucleico es una muestra ambiental.
- 15 En algunas modalidades, proporcionar el dispositivo comprende además cargar la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en la pluralidad de particiones, en donde durante la carga, el gas en al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se somete a flujo desde al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones al medio externo a al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.
- 20 En algunas modalidades, la barrera comprende un material polimérico. En algunas modalidades, el material polimérico es un material termoplástico. En algunas modalidades, la barrera es al menos parcialmente permeable a un gas bajo un diferencial de presión aplicado a través de la barrera. En algunas modalidades, la barrera es sustancialmente transparente ópticamente. En algunas modalidades, la barrera tiene un grosor de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 200 µm.
- 25 En algunas modalidades, el dispositivo comprende al menos un microcanal que comprende al menos una entrada, al menos una salida y una pluralidad de aberturas de sifón, en donde cada uno de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones está en comunicación fluida con al menos un microcanal por la pluralidad de aberturas de sifón.
- 30 En algunas modalidades, la pluralidad de particiones comprende de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000 particiones.
- 35 En algunas modalidades, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico son moléculas de ácido desoxirribonucleico. En otras modalidades, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico son moléculas de ácido ribonucleico.
- 40 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que comprende proporcionar un dispositivo que comprende una pluralidad de particiones, en donde al menos un subconjunto de la pluralidad de particiones comprende la pluralidad de moléculas de ácido nucleico, en donde cada partición del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se configura para permitir el flujo de gas desde el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a un medio externo al al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a través de al menos una barrera que separa el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones del medio externo; someter al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a condiciones suficientes para realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos mediante el uso de la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos para generar productos de amplificación a partir de al menos un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos.
- 45 mientras se somete al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a las condiciones, recopilar señales del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones en una pluralidad de puntos de tiempo; y procesar las señales para determinar un número de moléculas de ácido nucleico en el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.
- 50 En algunas modalidades, someter al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a condiciones suficientes para llevar a cabo las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos comprende ciclos térmicos, y recopilar señales comprende recopilar señales de cada partición de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones más de una vez por ciclo térmico. En algunas modalidades, el ciclo térmico comprende una fase de desnaturalización, una fase de extensión y una fase hibridación. En algunas modalidades, el termociclado se realiza mediante el uso de un termociclador de bloque plano.
- 55 En algunas modalidades, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos usan uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste de cebadores, desoxirribonucleótidos, tampones, cofactores, colorantes intercalantes y polimerasas. En algunas modalidades, uno o más reactivos comprenden un fluoróforo o marcador fluorescente. En algunas modalidades, recopilar señales de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones en una pluralidad de puntos de tiempo comprende generar imágenes del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones para recopilar las señales. En algunas modalidades, al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se visualiza simultáneamente. En algunas modalidades, la formación de imágenes se realiza mediante el uso de un detector que detecta la emisión de fluorescencia en dos o más longitudes de onda. En algunas modalidades, el procesamiento de señales para determinar una cantidad de moléculas de ácido nucleico en al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones comprende determinar una intensidad óptica para cada partición de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones, en donde la intensidad óptica es proporcional a la cantidad de productos de amplificación en cada uno de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.
- 60
- 65

5 En algunas modalidades, proporcionar el dispositivo que comprende la pluralidad de moléculas de ácido nucleico comprende además cargar la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en la pluralidad de particiones, en donde durante la carga, el gas en al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se somete a flujo desde el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones hasta el medio externo a al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.

10 En algunas modalidades, la barrera comprende un material polimérico. En algunas modalidades, el material polimérico es un material termoplástico. En algunas modalidades, la barrera es al menos parcialmente permeable a un gas bajo un diferencial de presión aplicado a través de la barrera. En algunas modalidades, la barrera es sustancialmente transparente ópticamente. En algunas modalidades, la barrera tiene un grosor de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 200 µm.

15 En algunas modalidades, el dispositivo comprende al menos un microcanal que comprende al menos una entrada, al menos una salida y una pluralidad de aberturas de sifón, en donde cada uno de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones está en comunicación fluida con al menos un microcanal por la pluralidad de aberturas de sifón.

En algunas modalidades, la pluralidad de particiones comprende de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20 000 particiones.

20 En algunas modalidades, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico son moléculas de ácido desoxirribonucleico. En otras modalidades, la pluralidad de moléculas de ácido nucleico son moléculas de ácido ribonucleico.

25 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un sistema para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que comprende: una unidad de soporte configurada para aceptar un dispositivo que comprende una pluralidad de particiones, en donde cada partición del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se configura para permitir el flujo de gas desde al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a un entorno externo al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a través de al menos una barrera que separa el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones del entorno externo; un detector configurado para recopilar señales de al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones en una pluralidad de puntos de tiempo; y uno o más procesadores informáticos acoplados operativamente al detector, en donde el uno o más procesadores informáticos están programados individualmente o colectivamente para: (i) someter al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a condiciones suficientes para realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos mediante el uso de la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos para generar productos de amplificación a partir de al menos un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos; (ii) mientras se somete el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a las condiciones en (i), recibir las señales recopiladas desde al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones por el detector en la pluralidad de puntos de tiempo; y (iii) procesar las señales para determinar un número de moléculas de ácido nucleico en al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.

35 En algunas modalidades, el sistema comprende además una unidad de flujo de fluido que se configura para dirigir la pluralidad de moléculas de ácido nucleico a la pluralidad de particiones. En algunas modalidades, uno o más procesadores informáticos están programados individual o colectivamente para dirigir la unidad de flujo de fluido para cargar la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en la pluralidad de particiones.

40 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un sistema para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico que comprende: una unidad de soporte configurada para aceptar un dispositivo que comprende una pluralidad de particiones, en donde cada partición del al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se configura para permitir el flujo de gas desde al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a un entorno externo al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a través de al menos una barrera que separa el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones del entorno externo; una unidad térmica configurada para someter al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a calentamiento controlado; un detector configurado para recoger señales de al menos un subconjunto de la pluralidad de particiones; y uno o más procesadores informáticos acoplados operativamente a la unidad térmica y al detector, en donde el uno o más procesadores informáticos están programados individualmente o colectivamente para: (i) dirigir la unidad térmica para someter al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones a calentamiento controlado; (ii) recibir las señales recopiladas desde al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones por el detector mientras que el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones se somete a calentamiento controlado; y (iii) procesar las señales recopiladas en (ii) para producir datos indicativos de un punto de fusión de al menos un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en el al menos el subconjunto de la pluralidad de particiones.

45 En algunas modalidades, el sistema comprende además una unidad de flujo de fluido que se configura para dirigir la pluralidad de moléculas de ácido nucleico a la pluralidad de particiones. En algunas modalidades, uno o más procesadores informáticos están programados individual o colectivamente para dirigir la unidad de flujo de fluido para cargar la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en la pluralidad de particiones.

50 Otro aspecto de la presente descripción proporciona un medio legible por computadora no transitorio que comprende un código ejecutable por máquina que, al ser ejecutado por uno o más procesadores de computadora, implementa cualquiera de los métodos anteriores o en cualquier otra parte de la presente descripción.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un sistema que comprende uno o más procesadores informáticos y una memoria informática acoplada a los mismos. La memoria de la computadora comprende un código ejecutable a máquina que, al ser ejecutado por uno o más procesadores de computadora, implementa cualquiera de los métodos anteriores o en cualquier otra parte de la presente descripción.

Los aspectos y ventajas adicionales de la presente descripción serán fácilmente evidentes para los expertos en esta técnica a partir de la siguiente descripción detallada, en donde solo se muestran y describen modalidades ilustrativas de la presente descripción. Como se comprenderá, la presente descripción es susceptible de otras y diferentes modalidades, y sus diversos detalles pueden sufrir modificaciones en varios aspectos obvios, todo ello sin apartarse de la descripción. En consecuencia, los dibujos y la descripción deben considerarse de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone las modalidades ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y los dibujos acompañantes (también, "Figura" y "Fig." en la presente descripción) de los cuales:

las **Figuras 1A y 1B** ilustran un ejemplo de una estructura microfluídica; la **Figura 1A** muestra la estructura desde una vista superior, mientras que la **Figura 1B** ilustra una sección transversal de la estructura;

las **Figuras 2A y 2B** ilustran esquemáticamente disposiciones de microcámaras, aberturas de sifón y microcanales de ejemplo dentro de un dispositivo microfluídico; la **Figura 2A** muestra una realización en la que se usan subcanales paralelos y uno o más canales transversales para formar una rejilla de microcámaras; la **Figura 2B** muestra una realización en la que un solo microcanal en un patrón de serpentina forma una rejilla hexagonal de microcámaras;

las **Figuras 3A-3D** muestran métodos para el uso de un dispositivo microfluídico ilustrativo; la **Figura 3A** muestra una etapa de aplicar reactivo a baja presión; la **Figura 3B** muestra una etapa de aplicar un diferencial de presión a través del dispositivo microfluídico para forzar la partición y desgasificación; la **Figura 3C** muestra una etapa de aplicar fluido a baja presión para liberar el microcanal; la **Figura 3D** muestra el estado del sistema después de la finalización del método;

la **Figura 4** ilustra esquemáticamente un método de fabricación de un dispositivo microfluídico;

la **Figura 5** ilustra esquemáticamente un proceso de PCR digital ilustrativo para ser empleado con un dispositivo microfluídico;

la **Figura 6** ilustra esquemáticamente una máquina para realizar un método de amplificación y cuantificación de ácido nucleico en una sola máquina;

la **Figura 7** ilustra esquemáticamente un sistema de control informático de ejemplo que está programado o configurado de cualquier otra manera para implementar los métodos proporcionados en la presente memoria;

las **Figuras 8A y 8B** muestran el dispositivo microfluídico y la partición de muestra; la **Figura 8A** muestra un dispositivo microfluídico formado por micromoldeo de un termoplástico; la **Figura 8B** muestra imágenes fluorescentes del proceso de partición de muestra;

la **Figura 9** muestra un sistema de ejemplo para procesar una muestra de ácido nucleico;

las **Figuras 10A-10D** muestran una detección fluorescente de dos colores (un color que representa la señal de muestra y el otro que representa una señal de normalización) de amplificación de ácido nucleico de particiones que contienen aproximadamente una copia de plantilla de ácido nucleico en promedio y particiones que contienen cero copias de plantilla de ácido nucleico (sin control de plantilla o NTC, por sus siglas en inglés); la **Figura 10A** muestra cero copias por partición (NTC) después de la amplificación; la **Figura 10B** muestra la amplificación de ácido nucleico de particiones que contienen aproximadamente una copia por partición; la **Figura 10C** muestra una representación de la intensidad de fluorescencia de NTC de ambos colores fluorescentes; y la **Figura 10D** muestra una representación de intensidad de fluorescencia de ambos colores fluorescentes de la muestra amplificada;

las **Figuras 11A-11C** muestran representaciones de un proceso de reacción en cadena de la polimerasa digital cuantitativa (qdPCR); la **Figura 11A** muestra una representación de las particiones de un dispositivo microfluídico ilustrativo; la **Figura 11B** muestra la dinámica de amplificación de las muestras en cada partición del dispositivo ilustrativo; la **Figura 11C** muestra los resultados de un proceso de qdPCR aplicado a la dinámica de amplificación que se muestra en la **Figura 11B**;

las **Figuras 12A-12B** muestran un dispositivo para el procesamiento y/o análisis de muestras; la **Figura 12A** muestra el dispositivo; la **Figura 12B** ilustra una disposición de una parte de las particiones dentro de una matriz de reacción del dispositivo;

la **Figura 13** ilustra una representación esquemática de un dispositivo para el procesamiento y/o análisis de muestras, junto con una unidad neumática para uso en el control de fluidos del dispositivo;

5 las **Figuras 14A-14B** ilustran esquemáticamente una unidad de ciclo térmico de bloque plano; la **Figura 14A** ilustra la unidad de ciclo térmico de bloque plano; la **Figura 14B** ilustra la unidad de ciclo térmico de bloque plano de la **Figura 14A** con la adición de una abrazadera neumática, con la abrazadera abierta de manera que un dispositivo tal como el dispositivo de la **Figura 12A** puede cargarse en la unidad de ciclo térmico;

10 la **Figura 15** ilustra un sistema de qdPCR completo para procesamiento y/o análisis de muestras, que incluye unidades térmicas, ópticas, neumáticas y mecánicas;

la **Figura 16** ilustra un método para realizar la qdPCR para procesamiento y/o análisis de muestras;

15 las **Figuras 17A-17B** muestran un sistema de ejemplo para procesar una molécula de ácido nucleico; la **Figura 17A** muestra el sistema de ejemplo completo para procesar una molécula de ácido nucleico; la **Figura 17B** muestra la parte del sistema de ejemplo que incluye componentes de formación de imágenes y un dispositivo para procesamiento y/o análisis de muestras;

20 la **Figura 18** muestra las imágenes de la muestra tomadas después de la amplificación de un subconjunto de particiones en diferentes condiciones en un dispositivo útil para el procesamiento y/o análisis de muestras;

la **Figura 19** muestra datos de qdPCR de muestra tomados usando el sistema de ejemplo de las **Figuras 17A-17B** y corresponde a las imágenes de la **Figura 18**;

25 las **Figuras 20A - 20B** muestran una carga diferencial de un procesamiento y/o análisis de muestra útil de dispositivo; la **Figura 20A** muestra imágenes de un subconjunto de particiones en un dispositivo que incluye diferentes números de moléculas de ácido nucleico; la **Figura 20B** muestra un análisis de Poisson de las imágenes de la **Figura 20A**;

30 la **Figura 21** muestra las imágenes y la densidad correspondiente y la ocupación de partición para dispositivos cargados de forma diferente útiles para el procesamiento y/o análisis de las muestras;

las **Figuras 22A - 22B** ilustran esquemáticamente un análisis de fusión de alta resolución (HRM); la **Figura 22A** ilustra las diferencias entre los análisis de HRM digitales y masivos; la **Figura 22B** muestra curvas de HRM para diferentes especies bacterianas y su uso para determinar la ocupación de las particiones;

35 las **Figura 23A - 23E** muestran los datos de HRM para varias especies bacterianas; la **Figura 23A** muestra las curvas de HRM derivadas compuestas de 16S y el espaciador transcrito interno (ITS) para bacterias diversas; la **Figura 23B** muestra curvas de HRM para diferentes especies del género Bacillus; la **Figura 23C** muestra curvas de HRM para diferentes especies del género Staphylococcus; la **Figura 23D** muestra curvas de HRM de ITS para diferentes especies de S. pneumoniae; la **Figura 23E** muestra un mapa de calor de la homología de secuencia ITS para especies bacterianas diferentes organizadas por filo;

45 las **Figuras 24A - 24B** ilustran esquemáticamente un análisis de HRM; la **Figura 24A** ilustra la partición de ADN de una muestra que incluye una pluralidad de moléculas de ADN; la **Figura 24B** muestra una señal fluorescente dependiente de la temperatura correspondiente a las diferentes poblaciones de partición teóricas;

la **Figura 25** muestra las imágenes de muestra tomadas durante un análisis de HRM de un subconjunto de particiones en un dispositivo útil para el procesamiento y/o análisis de muestras tomadas en diferentes condiciones; y

50 la **Figura 26** muestra los datos de HRM de la muestra correspondiente a las imágenes de la **Figura 25**.

Descripción detallada

55 Aunque diversas modalidades de la invención se han mostrado y descrito en la presente descripción, será obvio para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan solo a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios, y sustituciones se les ocurrirán ahora a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Debe entenderse que en la práctica de la invención pueden emplearse diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente descripción.

60 Como se usa en la presente descripción, los términos “amplificación” y “amplificar” se usan indistintamente y generalmente se refieren a generar una o más copias o “producto amplificado” de un ácido nucleico. Tal amplificación puede ser mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o amplificación isotérmica, por ejemplo.

65 Como se usa en la presente descripción, el término “ácido nucleico” generalmente se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 500 o 1000 nucleótidos), ya sean

desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Un ácido nucleico puede incluir una o más subunidades seleccionadas de adenosina (A), citosina (C), guanina (G), timina (T) y uracilo (U) o variantes de las mismas. Un nucleótido puede incluir A, C, G, T o U, o variantes de los mismos. Un nucleótido puede incluir cualquier subunidad que pueda incorporarse en una cadena de ácido nucleico en crecimiento. Tal subunidad puede ser A, C, G, T o U, o cualquier otra subunidad que sea específica de una de las más complementarias A, C, G, T o U, o complementaria de una purina (es decir, A o G, o variante de la misma) o pirimidina (es decir, C, T o U, o variante de la misma). En algunos ejemplos, un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario; en algunos casos, una molécula de ácido nucleico es circular. Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos pueden incluir las regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir del análisis de ligamiento, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosomal, ARN de interferencia corto (ARNic), ARN corto en horquilla (ARNhc), micro-ARN (miARN), ribozimas, ADNc, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un ácido nucleico puede comprender uno o más nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos.

Como se usa en la presente descripción, los términos “reactivo de reacción en cadena de la polimerasa” o “reactivo de PCR” se usan indistintamente y generalmente se refieren a una composición que comprende los reactivos necesarios para completar una reacción de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, amplificación de ADN), con ejemplos no limitantes de tales reactivos que incluyen los conjuntos de cebadores o sitios de cebado (por ejemplo, corte) que tienen especificidad por un ácido nucleico diana, polimerasas, tampones adecuados, cofactores (por ejemplo, cationes divalentes y monovalentes), dNTP y otras enzimas. Un reactivo de PCR también puede incluir sondas, indicadores y moléculas que comprenden sondas e indicadores.

Como se usa en la presente descripción, el término “sonda” generalmente se refiere a una molécula que comprende un resto detectable, cuya presencia o ausencia puede usarse para detectar la presencia o ausencia de un producto amplificado. Los ejemplos no limitantes de restos detectables pueden incluir radiomarcadores, marcadores de isótopos estables, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores enzimáticos, marcadores colorimétricos o cualquier combinación de los mismos.

Como se usa en la presente descripción, el término “extensión” generalmente se refiere a la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico de una manera dirigida por plantilla. La extensión puede ocurrir con la ayuda de una enzima. Por ejemplo, la extensión puede ocurrir con la ayuda de una polimerasa. Las condiciones en las que puede ocurrir la extensión incluyen una “temperatura de extensión” que generalmente se refiere a una temperatura a la que se logra la extensión y una “duración de la extensión” que generalmente se refiere a una cantidad de tiempo asignada para que ocurra la extensión.

Como se usa en la presente descripción, el término “molécula indicadora” generalmente se refiere a una molécula que comprende un resto detectable, cuya presencia o ausencia puede usarse para indicar la partición de la muestra. Los ejemplos no limitantes de restos detectables pueden incluir radiomarcadores, marcadores de isótopos estables, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores enzimáticos, marcadores colorimétricos o cualquier combinación de los mismos.

El término “muestra”, como se usa en la presente descripción, generalmente se refiere a cualquier muestra que contenga o se sospeche que contenga una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede estar en o a partir de una muestra celular u organismo, tal como, por ejemplo, una bacteria o bacterias. Por ejemplo, una muestra puede ser una muestra biológica que contiene una o más moléculas de ácido nucleico. La muestra biológica puede obtenerse (por ejemplo, extraerse o aislarse) de o incluir uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste de sangre (por ejemplo, sangre total), plasma, suero, orina, saliva, excreciones mucosas, esputo, heces y lágrimas. La muestra biológica puede ser una muestra de fluido o tejido (por ejemplo, una muestra de piel). La muestra puede obtenerse de un fluido corporal libre de células, tal como sangre total. Una muestra de un fluido corporal libre de células puede incluir ADN libre de células y/o ARN libre de células. La muestra puede incluir células tumorales circulantes. La muestra puede tomarse de un sujeto y el análisis de los ácidos nucleicos incluidos en la misma puede usarse con fines de diagnóstico. Alternativamente, la muestra puede ser una muestra ambiental (por ejemplo, suelo, desechos, aire ambiental, etc.), una muestra industrial (por ejemplo, muestras de cualquier proceso industrial) o una muestra de alimentos (por ejemplos, productos lácteos, productos vegetales y productos cármicos).

Como se usa en la presente descripción, el término “fluido” generalmente se refiere a un líquido o un gas. Un fluido no puede mantener una forma definida y fluirá durante un período de tiempo observable para llenar el recipiente en el que se coloca. Así, el fluido puede tener cualquier viscosidad adecuada que permita el flujo. Si están presentes dos o más fluidos, cada fluido puede seleccionarse independientemente entre esencialmente cualquier fluido (líquidos, gases y similares) por parte de los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, el término “partición” generalmente se refiere a una división o distribución en porciones o acciones. Por ejemplo, una muestra dividida es una muestra aislada de otras muestras. Los ejemplos de estructuras que permiten la partición de muestras incluyen pocillos y microcámaras.

Como se usa la presente descripción, el término “microfluídico” generalmente se refiere a un chip, área, dispositivo, artículo o sistema que incluye al menos un microcanal, una pluralidad de aberturas de sifón y una matriz de microcámaras. El microcanal puede tener una dimensión transversal menor o igual a aproximadamente 10 milímetros (mm), menor o igual a aproximadamente 5 mm, menor o igual a aproximadamente 4 mm, menor o igual a aproximadamente 3 mm, menor o igual a aproximadamente 2 mm, menor o igual a aproximadamente 1,5 mm, menor o igual a aproximadamente 1 mm, menor o igual a aproximadamente 750 micrómetros (μm), menor o igual a aproximadamente 500 μm , menor o igual a aproximadamente 250 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , o menos.

Como se usa en la presente descripción, el término “profundidad” generalmente se refiere a la distancia medida desde la parte inferior del microcanal, la abertura del sifón o la partición (por ejemplo, la microcámara) hasta la película delgada que cubre el microcanal, la pluralidad de aberturas del sifón y la matriz de particiones (por ejemplo, microcámaras).

Como se usa la presente descripción, los términos “sección transversal” o “de la sección transversal” pueden usarse indistintamente y generalmente se refieren a una dimensión o área de un microcanal o abertura de sifón que es sustancialmente perpendicular a la dimensión larga de la característica.

La presente descripción describe los métodos que implican el uso de y los sistemas que comprenden un dispositivo microfluídico formado a partir de un material polimérico, tal como un material termoplástico, e incorporando una película delgada para permitir la desgasificación presurizada mientras sirve como barrera de gas cuando se libera la presión. El uso de termoplásticos para formar la estructura microfluídica puede permitir el uso de un proceso de moldeo por inyección económico y altamente escalable, mientras que la película delgada puede brindar la capacidad de desgasificarse mediante presurización, lo que evita los problemas de ensuciamiento que pueden estar presentes en algunas estructuras microfluídicas que no incorporan películas tan delgadas.

Un uso de esta estructura es un diseño microfluídico que incorpora una matriz de microcámaras sin salida conectadas por microcanales, formadas, por ejemplo, a partir de termoplásticos. Este diseño puede usarse, por ejemplo, en una aplicación de PCR digital (dPCR) o dPCR cuantitativa (qdPCR) para dividir los reactivos en la matriz de microcámaras y, por lo tanto, puede usarse para cuantificar los ácidos nucleicos o en un análisis de fusión de alta resolución (HRM) para analizar la cantidad y características de los ácidos nucleicos repartidos entre la matriz de microcámaras.

Dispositivo microfluídico para analizar muestras

En un aspecto, la presente descripción proporciona los métodos de uso y sistemas que comprenden un dispositivo microfluídico para procesar y/o analizar muestras. El dispositivo puede comprender un microcanal conectado a una entrada y una salida. El dispositivo microfluídico también puede incluir una pluralidad de microcámaras y una pluralidad de aberturas de sifón. La pluralidad de microcámaras puede estar conectada al microcanal por la pluralidad de aberturas de sifón. El dispositivo microfluídico puede incluir una película delgada termoplástica que tapa y sella (por ejemplo, sella herméticamente) el microcanal, las microcámaras y las aberturas del sifón. La película delgada termoplástica puede ser al menos parcialmente permeable a los gases cuando se aplica un diferencial de presión a través de la película delgada termoplástica.

Las **Figuras 1A** y **1B** muestran ejemplos de una estructura microfluídica según ciertas realizaciones de la presente descripción. La **Figura 1A** muestra un dispositivo microfluídico de ejemplo desde una vista superior. El dispositivo microfluídico comprende un microcanal **110**, con una entrada **120** y una salida **130**. El microcanal está conectado a una pluralidad de aberturas de sifón **101B - 109B**. La pluralidad de aberturas de sifón conecta el microcanal a una pluralidad de microcámaras **101A - 109A**. La **Figura 1B** muestra una vista en sección transversal de una sola microcámara a lo largo de la línea discontinua marcada como **A-A'**. La microcámara única **101A** está conectada al microcanal **110** mediante una abertura de sifón **101B**. El cuerpo del dispositivo microfluídico **140** puede formarse a partir de un material plástico rígido (p. ej., un material termoplástico). Las microestructuras del dispositivo microfluídico pueden taparse y sellarse con una película delgada **150**. La película delgada **150** puede ser impermeable a los gases cuando se aplica una pequeña diferencia de presión a través de la película y permeable a los gases cuando se aplica una gran diferencia de presión a través de la película. Esto puede permitir la desgasificación a través de la película delgada **150** cuando se aplica presión a la estructura interior del dispositivo microfluídico. Alternativamente, la desgasificación puede ocurrir cuando se aplica un vacío externo al dispositivo microfluídico.

La permeabilidad al gas de la película delgada puede ser inducida por presiones elevadas. La película delgada permeable al gas inducida por presión puede cubrir la matriz de microcámaras, o un subconjunto de las mismas, y las aberturas del microcanal y del sifón pueden estar cubiertas por una película no permeable al gas. Alternativamente, la película delgada permeable al gas inducida por presión puede cubrir la matriz de microcámaras, o un subconjunto de las mismas, y las aberturas de sifón y el microcanal pueden estar cubiertos por una película no permeable al gas. Alternativamente, la película delgada permeable al gas inducida por presión puede cubrir la matriz de microcámaras, o un subconjunto de las mismas, las aberturas de sifón y el microcanal. El grosor de la película delgada puede ser menor o igual a aproximadamente 500 micrómetros (μm), menor o igual a aproximadamente 250 μm , menor o igual a aproximadamente 200 μm , menor o igual a aproximadamente 150 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , menor o igual a aproximadamente 75 μm , menor o igual a aproximadamente 50 μm , menor o igual a aproximadamente 25 μm , o menos. El espesor de la película delgada puede ser de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 200 μm o de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente

150 μm . Por ejemplo, el espesor de la película delgada puede ser de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 200 μm . En algunos ejemplos, el espesor de la película delgada puede ser de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 200 μm . Por ejemplo, el espesor de la película delgada es de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 150 μm . En un ejemplo, la película delgada tiene aproximadamente 100 μm de espesor. El grosor de la película puede seleccionarse según la capacidad de fabricación de la película delgada, la permeabilidad al aire de la película delgada, el volumen de cada partición a desgasificar, la presión disponible y/o el tiempo deseado para completar el proceso de sifón, entre otros factores.

El dispositivo microfluídico puede comprender una única matriz de microcámaras. Alternativamente, el dispositivo microfluídico puede comprender múltiples matrices de microcámaras, cada matriz de microcámaras aislada de los demás. Los conjuntos de microcámaras pueden disponerse en fila, en una configuración de rejilla, en un patrón alterno o en cualquier otra configuración. El dispositivo microfluídico puede tener al menos 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50 o más matrices de microcámaras. Las matrices de microcámaras pueden ser idénticas. El dispositivo microfluídico puede comprender múltiples matrices de microcámaras que no son idénticas. Las matrices de microcámaras pueden tener todas la misma dimensión externa (es decir, la longitud y el ancho de la matriz de microcámaras que abarca todas las características de la matriz de microcámaras) o las matrices de microcámaras pueden tener diferentes dimensiones externas.

Una matriz de microcámaras puede tener un ancho máximo de aproximadamente 100 mm, aproximadamente 75 mm, aproximadamente 50 mm, aproximadamente 40 mm, aproximadamente 30 mm, aproximadamente 20 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 8 mm, aproximadamente 6 mm, aproximadamente 4 mm, aproximadamente 2 mm, aproximadamente 1 mm o menos. La matriz de microcámaras puede tener una longitud máxima de aproximadamente 50 mm, aproximadamente 40 mm, aproximadamente 30 mm, aproximadamente 20 mm, aproximadamente 10 mm, aproximadamente 8 mm, aproximadamente 6 mm, aproximadamente 4 mm, aproximadamente 2 mm, 1 mm, o menos. El ancho puede ser de aproximadamente 1 mm a 100 mm, o de 10 mm a 50 mm. La longitud puede ser de aproximadamente 1 mm a 50 mm o de 5 mm a 20 mm.

En algunos ejemplos, la matriz de microcámaras puede tener un ancho de unos 100 mm y una longitud de unos 40 mm. En algunos ejemplos, la matriz de microcámaras puede tener un ancho de unos 80 mm y una longitud de unos 30 mm. En algunos ejemplos, la matriz de microcámaras puede tener un ancho de unos 60 mm y una longitud de unos 25 mm. En algunos ejemplos, la matriz de microcámaras puede tener un ancho de unos 40 mm y una longitud de unos 15 mm. En algunos ejemplos, la matriz de microcámaras puede tener un ancho de unos 30 mm y una longitud de unos 10 mm. En algunos ejemplos, la matriz de microcámaras puede tener un ancho de unos 20 mm y una longitud de unos 8 mm. En algunos ejemplos, la matriz de microcámaras puede tener un ancho de unos 10 mm y una longitud de unos 4 mm. La dimensión externa puede estar determinada por el número total de microcámaras deseadas, la dimensión de cada microcámara y la distancia mínima entre cada microcámara para la fabricación.

El microcanal puede ser sustancialmente paralelo o sustancialmente perpendicular a la dimensión larga del dispositivo microfluídico. Alternativamente, el microcanal puede no ser sustancialmente paralelo ni sustancialmente perpendicular a la dimensión larga del dispositivo microfluídico. El ángulo entre el microcanal y la dimensión larga del dispositivo microfluídico puede ser de al menos aproximadamente 5°, al menos aproximadamente 10°, al menos aproximadamente 15°, al menos aproximadamente 20°, al menos aproximadamente 30°, al menos aproximadamente 40°, al menos aproximadamente 50°, al menos aproximadamente 60°, al menos aproximadamente 70°, al menos aproximadamente 90°, al menos aproximadamente 100°, al menos aproximadamente 110°, al menos aproximadamente 120°, al menos aproximadamente 130°, al menos aproximadamente 140°, al menos aproximadamente 150°, al menos aproximadamente 160° o al menos aproximadamente 170°. El microcanal puede ser un solo canal largo. El microcanal puede tener codos, curvas o ángulos. El microcanal puede tener una dimensión larga menor o igual a 100 mm, menor o igual a aproximadamente 75 mm, menor o igual a aproximadamente 50 mm, menor o igual a aproximadamente 40 mm, menor o igual a aproximadamente 30 mm, menor o igual a aproximadamente 20 mm, menor o igual a aproximadamente 10 mm, menor o igual a aproximadamente 8 mm, menor o igual a aproximadamente 6 mm, menor o igual a aproximadamente 4 mm, menor o igual a aproximadamente 2 mm, o menos. La longitud del microcanal puede estar limitada por la longitud o ancho externo del dispositivo microfluídico. El microcanal puede tener una profundidad menor o igual a aproximadamente 500 μm , menor o igual a aproximadamente 250 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , menor o igual a aproximadamente 80 μm , menor o igual a aproximadamente 60 μm , menor o igual a aproximadamente 30 μm , menor o igual a aproximadamente 20 μm , menor o igual a aproximadamente 10 μm , o menos. El microcanal puede tener una dimensión de sección transversal (por ejemplo, ancho) menor o igual a aproximadamente 500 μm , menor o igual a aproximadamente 250 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , menor o igual a aproximadamente 75 μm , menor o igual a aproximadamente 50 μm , menor o igual a aproximadamente 40 μm , menor o igual a aproximadamente 30 μm , menor o igual a aproximadamente 20 μm , menor o igual a aproximadamente 10 μm , o menos.

En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 80 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 60 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal

5 pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 40 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 20 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 10 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 80 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 60 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 40 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 20 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 10 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 80 μm de ancho por aproximadamente 80 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 60 μm de ancho por aproximadamente 60 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 40 μm de ancho por aproximadamente 40 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 20 μm de ancho por aproximadamente 20 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del microcanal pueden ser de aproximadamente 10 μm de ancho por aproximadamente 10 μm de profundidad. La forma de la sección transversal del microcanal puede ser cualquier forma de sección transversal adecuada que incluye, pero que no se limita a, circular, ovalada, triangular, cuadrada o rectangular. El área de la sección transversal del microcanal puede ser constante a lo largo del microcanal. Alternativamente, o, además, el área de la sección transversal del microcanal puede variar a lo largo de la longitud del microcanal. El área de la sección transversal del microcanal puede variar entre aproximadamente 50 % y 150 %, entre aproximadamente 60 % y 125 %, entre aproximadamente 70 % y 120 %, entre aproximadamente 80 % y 115 %, entre aproximadamente 90 % y 110 %, entre aproximadamente 95 % y 100 % o entre aproximadamente 98 % y 102 %. El área de la sección transversal del microcanal puede ser menor o igual a aproximadamente 10 000 micrómetros cuadrados (μm^2), menor o igual a aproximadamente 7500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 5000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 2500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 1000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 750 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 400 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 300 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 200 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 100 μm^2 , o menos.

35 El microcanal puede tener una sola entrada y una sola salida. Alternativamente, el microcanal puede tener múltiples entradas, múltiples salidas o múltiples entradas y múltiples salidas. Las entradas y salidas pueden tener el mismo diámetro o pueden tener diámetros diferentes. Las entradas y salidas pueden tener diámetros menores o iguales a aproximadamente 2,5 milímetros (mm), menores o iguales a aproximadamente 2 mm, aproximadamente o iguales a aproximadamente 1,5 mm, menores o iguales a aproximadamente 1 mm, menores que aproximadamente 0,5 mm, o menores.

40 La matriz de microcámaras puede tener al menos aproximadamente 1000 microcámaras, al menos aproximadamente 5000 microcámaras, al menos aproximadamente 10 000 microcámaras, al menos aproximadamente 20 000 microcámaras, al menos aproximadamente 30 000 microcámaras, al menos aproximadamente 40 000 microcámaras, al menos aproximadamente 50 000 microcámaras, al menos aproximadamente 100 000 microcámaras, o más. En algunos ejemplos, el dispositivo microfluídico puede tener de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 30 000 microcámaras. En algunos ejemplos, el dispositivo microfluídico puede tener de aproximadamente 15 000 a aproximadamente 25 000 microcámaras. Las microcámaras pueden tener forma cilíndrica, forma hemisférica o una combinación de forma cilíndrica y hemisférica. Las microcámaras pueden tener diámetros menores o iguales a aproximadamente 500 μm , menores o iguales a aproximadamente 250 μm , menores o iguales a aproximadamente 100 μm , menores o iguales a aproximadamente 80 μm , menores o iguales a aproximadamente 60 μm , menores o iguales a aproximadamente 30 μm , menores o iguales a aproximadamente 15 μm , o menores. La profundidad de las microcámaras puede ser menor o igual a aproximadamente 500 μm , menor o igual a aproximadamente 250 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , menor o igual a aproximadamente 80 μm , menor o igual a aproximadamente 60 μm , menor o igual a aproximadamente 30 μm , menor o igual a aproximadamente 15 μm , o menor. En algunos ejemplos, las microcámaras pueden tener un diámetro de aproximadamente 30 μm y una profundidad de aproximadamente 100 μm . En algunos ejemplos, las microcámaras pueden tener un diámetro de aproximadamente 35 μm y una profundidad de aproximadamente 80 μm . En algunos ejemplos, las microcámaras pueden tener un diámetro de aproximadamente 40 μm y una profundidad de aproximadamente 70 μm . En algunos ejemplos, las microcámaras pueden tener un diámetro de aproximadamente 50 μm y una profundidad de aproximadamente 60 μm . En algunos ejemplos, las microcámaras pueden tener un diámetro de aproximadamente 60 μm y una profundidad de aproximadamente 40 μm . En algunos ejemplos, las microcámaras pueden tener un diámetro de aproximadamente 80 μm y una profundidad de aproximadamente 35 μm . En algunos ejemplos, las microcámaras pueden tener un diámetro de aproximadamente 100 μm y una profundidad de aproximadamente 30 μm . Las microcámaras y el microcanal pueden tener la misma profundidad. Alternativamente, las microcámaras y el microcanal pueden tener diferentes profundidades.

65 Las longitudes de las aberturas del sifón pueden ser constantes. Alternativamente, las longitudes de las aberturas del sifón pueden variar. Las aberturas de sifón pueden tener una dimensión larga que sea menor o igual a aproximadamente 150 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , menor o igual a aproximadamente 50 μm , menor o igual a aproximadamente 25 μm , menor o igual a aproximadamente 25 μm , menor o igual a

aproximadamente 10 μm , menor o igual a aproximadamente 5 μm , o menor. La profundidad de la abertura del sifón puede ser menor o igual a aproximadamente 50 μm , menor o igual a aproximadamente 25 μm , menor o igual a aproximadamente 10 μm , menor o igual a aproximadamente 5 μm o menor. Las aberturas de sifón pueden tener un ancho de sección transversal menor o igual a aproximadamente 50 μm , menor o igual a aproximadamente 40 μm , menor o igual a aproximadamente 30 μm , menor o igual a aproximadamente 20 μm , menor o igual a aproximadamente 20 μm a aproximadamente 10 μm , menor o igual a aproximadamente 5 μm , o menor.

En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 50 μm de ancho por aproximadamente 50 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 50 μm de ancho por aproximadamente 40 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 50 μm de ancho por aproximadamente 30 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 50 μm de ancho por aproximadamente 20 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 50 μm de ancho por aproximadamente 10 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 50 μm de ancho por aproximadamente 5 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 40 μm de ancho por aproximadamente 50 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 30 μm de ancho por aproximadamente 50 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 20 μm de ancho por aproximadamente 50 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 10 μm de ancho por aproximadamente 50 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 5 μm de ancho por aproximadamente 50 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 40 μm de ancho por aproximadamente 40 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 30 μm de ancho por aproximadamente 30 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 20 μm de ancho por aproximadamente 20 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 10 μm de ancho por aproximadamente 10 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal de la abertura del sifón pueden ser de aproximadamente 5 μm de ancho por aproximadamente 5 μm de profundidad. La forma de la sección transversal de la abertura del sifón puede tener cualquier forma de sección transversal adecuada que incluye, pero que no se limita a, circular, ovalada, triangular, cuadrada o rectangular. El área de la sección transversal de la abertura del sifón puede ser constante a lo largo de la longitud de la abertura del sifón. Alternativamente, o, además, el área de la sección transversal de la abertura del sifón puede variar a lo largo de la longitud de la abertura del sifón. El área de la sección transversal de la abertura del sifón puede ser mayor en la conexión con el microcanal que el área de la sección transversal de la abertura del sifón en la conexión con la microcámara. Alternativamente, el área de la sección transversal de la abertura del sifón en la conexión con la microcámara puede ser mayor que el área de la sección transversal de la abertura del sifón en la conexión con el microcanal. El área de la sección transversal de la abertura del sifón puede variar entre aproximadamente 50 % y 150 %, entre aproximadamente 60 % y 125 %, entre aproximadamente 70 % y 120 %, entre aproximadamente 80 % y 115 %, entre aproximadamente 90 % y 110 %, entre aproximadamente 95 % y 100 %, o entre aproximadamente 98 % y 102 %. El área de la sección transversal de la abertura del sifón puede ser menor o igual a aproximadamente 2500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 1000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 750 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 250 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 100 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 75 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 50 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 25 μm^2 , o menor. El área de la sección transversal de la abertura del sifón en la conexión con el microcanal puede ser menor o igual que el área de la sección transversal del microcanal. El área de la sección transversal de la abertura del sifón en la conexión con el microcanal puede ser menor o igual a aproximadamente 98 %, menor o igual a aproximadamente 95 %, menor o igual a aproximadamente 90 %, menor o igual a aproximadamente 85 %, menor o igual a aproximadamente 80 %, menor o igual a aproximadamente 75 %, menor o igual a aproximadamente 70 %, menor o igual a aproximadamente 60 %, menor o igual a aproximadamente 50 %, menor a o igual a aproximadamente 40 %, menor o igual a aproximadamente 30 %, menor o igual a aproximadamente 20 %, menor o igual a aproximadamente 10 %, menor o igual a aproximadamente 5 %, menor o igual a aproximadamente 1 % o menor o igual a aproximadamente 0,5 % del área de la sección transversal del microcanal.

Las aberturas de sifón pueden ser sustancialmente perpendiculares al microcanal. Alternativamente, las aberturas de sifón pueden no ser sustancialmente perpendiculares al microcanal. Un ángulo entre las aberturas del sifón y el microcanal puede ser de al menos aproximadamente 5 °, al menos aproximadamente 10 °, al menos aproximadamente 15 °, al menos aproximadamente 20 °, al menos aproximadamente 30 °, al menos aproximadamente 40 °, al menos aproximadamente 50 °, al menos aproximadamente 60 °, al menos aproximadamente 70 °, al menos aproximadamente 80 °, al menos aproximadamente 90 °, al menos aproximadamente 100 °, al menos aproximadamente 110 °, al menos aproximadamente 120 °, al menos

aproximadamente 130 °, al menos aproximadamente 140 °, al menos aproximadamente 150 °, al menos aproximadamente 160 ° o al menos aproximadamente 170 °.

Las microcámaras pueden estar dispuestas en una variedad de patrones. Las **Figuras 2A y 2B** ilustran los patrones ilustrativos de las disposiciones de microcámaras, aberturas de sifón y microcanales. Pueden emplearse múltiples microcanales, o puede usarse un solo microcanal. Un microcanal puede comprender un grupo de subcanales. El grupo de subcanales puede estar conectado por uno o más canales cruzados. Los subcanales pueden ser sustancialmente paralelos entre sí de modo que la serie de microcámaras forme una matriz de microcámaras. La **Figura 2A** ilustra una realización en la que se usan subcanales paralelos **230** y uno o más canales transversales **220** para formar una rejilla de microcámaras.

Las microcámaras pueden construirse para formar una rejilla hexagonal de microcámaras, con subcanales curvos o en ángulo que conectan las microcámaras. También puede formarse una rejilla hexagonal de microcámaras y conectarse mediante un solo microcanal, tal como mediante un microcanal que forma un patrón de serpentina **240** a través del dispositivo microfluídico. La **Figura 2B** ilustra una realización en la que un solo microcanal en un patrón de serpentina forma una rejilla hexagonal de microcámaras. En la **Figura 12B** se muestra otro ejemplo de microcámaras dispuestas en una configuración de serpentina.

Las longitudes de los subcanales pueden ser constantes. Alternativamente, las longitudes del subcanal pueden variar. El subcanal puede tener una dimensión larga menor o igual a 100 mm, menor o igual a aproximadamente 75 mm, menor o igual a aproximadamente 50 mm, menor o igual a aproximadamente 40 mm, menor o igual a aproximadamente 30 mm, menor o igual a aproximadamente 20 mm, menor o igual a aproximadamente 10 mm, menor o igual a aproximadamente 8 mm, menor o igual a aproximadamente 6 mm, menor o igual a aproximadamente 4 mm, menor o igual a aproximadamente 2 mm, o menor. La longitud del subcanal puede estar limitada por la longitud o ancho externo del dispositivo microfluídico. El subcanal puede tener la misma dimensión de sección transversal que el microcanal. Alternativamente, el subcanal puede tener una dimensión transversal diferente a la del microcanal. El subcanal puede tener la misma profundidad que el microcanal y una dimensión transversal diferente. Alternativamente, el subcanal puede tener la misma dimensión de sección transversal que el microcanal y una profundidad diferente. Por ejemplo, el subcanal puede tener una profundidad menor o igual a aproximadamente 500 µm, menor o igual a aproximadamente 250 µm, menor o igual a aproximadamente 100 µm, menor o igual a aproximadamente 80 µm, menor a o igual a aproximadamente 60 µm, menor o igual a aproximadamente 30 µm, menor o igual a aproximadamente 15 µm, o menor. El subcanal puede tener un ancho de sección transversal menor o igual a aproximadamente 500 µm, menor o igual a aproximadamente 250 µm, menor o igual a aproximadamente 100 µm, menor o igual a aproximadamente 75 µm, menor o igual a aproximadamente 75 µm, menor o igual a aproximadamente 50 µm, menor o igual a aproximadamente 40 µm, menor o igual a aproximadamente 30 µm, menor o igual a aproximadamente 20 µm, menor o igual a aproximadamente 10 µm, o menor.

En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 100 µm de ancho por aproximadamente 100 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 100 µm de ancho por aproximadamente 80 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 100 µm de ancho por aproximadamente 60 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 100 µm de ancho por aproximadamente 40 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 100 µm de ancho por aproximadamente 20 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 100 µm de ancho por aproximadamente 10 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 80 µm de ancho por aproximadamente 100 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 60 µm de ancho por aproximadamente 100 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 40 µm de ancho por aproximadamente 100 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 20 µm de ancho por aproximadamente 100 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 10 µm de ancho por aproximadamente 100 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 80 µm de ancho por aproximadamente 80 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 60 µm de ancho por aproximadamente 60 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 40 µm de ancho por aproximadamente 40 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 20 µm de ancho por aproximadamente 20 µm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del subcanal pueden ser de aproximadamente 10 µm de ancho por aproximadamente 10 µm de profundidad. La forma de la sección transversal del subcanal puede ser cualquier forma de sección transversal adecuada que incluye, pero no se limita a, circular, ovalada, triangular, cuadrada o rectangular. La forma de la sección transversal del subcanal puede ser diferente de la forma de la sección transversal del microcanal. La forma de la sección transversal del subcanal puede ser la misma que la forma de la sección transversal del microcanal. El área de la sección transversal del subcanal puede ser constante a lo largo del subcanal. Alternativamente, o, además, el área de la sección transversal del subcanal puede variar a lo largo del microcanal. El

área de la sección transversal del subcanal puede variar entre aproximadamente 50 % y 150 %, entre aproximadamente 60 % y 125 %, entre aproximadamente 70 % y 120 %, entre aproximadamente 80 % y 115 %, entre aproximadamente 90 % y 110 %, entre aproximadamente 95 % y 100 %, o entre aproximadamente 98 % y 102 %. El área de la sección transversal del subcanal puede ser menor o igual a aproximadamente 10 000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 7500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 5000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 2500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 1000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 750 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 400 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 300 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 200 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 100 μm^2 , o menor. El área de la sección transversal del subcanal puede ser la misma que el área de la sección transversal del microcanal. El área de la sección transversal del subcanal puede ser menor o igual que el área de la sección transversal del microcanal. Por ejemplo, el área de la sección transversal del subcanal puede ser menor o igual a aproximadamente 98 %, menor o igual a aproximadamente 95 %, menor o igual a aproximadamente 90 %, menor o igual a aproximadamente 85 %, menor o igual a aproximadamente 80 %, menor o igual a aproximadamente 75 %, menor o igual a aproximadamente 70 %, menor o igual a aproximadamente 60 %, menor o igual a aproximadamente 50 %, menor o igual a aproximadamente 50 %, menor o igual a aproximadamente 40 %, menor o igual a aproximadamente 30 %, menor o igual a aproximadamente 20 %, menor o igual a aproximadamente 20 %, o menor del área transversal del microcanal.

Las longitudes de los canales transversales pueden ser constantes. Alternativamente, las longitudes del canal transversal pueden variar. El canal transversal puede tener una dimensión larga que sea menor o igual a aproximadamente 100 mm, menor o igual a aproximadamente 75 mm, menor o igual a aproximadamente 50 mm, menor o igual a aproximadamente 40 mm, menor o igual a aproximadamente 30 mm, menor o igual a aproximadamente 20 mm, menor o igual a aproximadamente 10 mm, menor o igual a aproximadamente 8 mm, menor o igual a aproximadamente 6 mm, menor o igual a aproximadamente 4 mm, menor o igual a aproximadamente 2 mm, o menor. La longitud del canal transversal puede estar limitada por la longitud o ancho externo del dispositivo microfluídico. El canal transversal puede tener la misma dimensión de sección transversal que el microcanal. Alternativamente, el canal transversal puede tener una dimensión de sección transversal diferente a la del microcanal. El canal transversal puede tener la misma profundidad que el microcanal y una dimensión de sección transversal diferente. Alternativamente, el canal transversal puede tener la misma dimensión de sección transversal que el microcanal y una profundidad diferente. Por ejemplo, el canal transversal puede tener una profundidad menor o igual a aproximadamente 500 μm , menor o igual a aproximadamente 250 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , menor o igual a aproximadamente 80 μm , menor o igual a aproximadamente 60 μm , menor o igual a aproximadamente 30 μm , menor o igual a aproximadamente 15 μm , o menor. El canal transversal puede tener un ancho de sección transversal menor o igual a aproximadamente 500 μm , menor o igual a aproximadamente 250 μm , menor o igual a aproximadamente 100 μm , menor o igual a aproximadamente 75 μm , menor o igual a aproximadamente 75 μm , menor o igual a aproximadamente 50 μm , menor o igual a aproximadamente 40 μm , menor o igual a aproximadamente 30 μm , menor o igual a aproximadamente 20 μm , menor o igual a aproximadamente 10 μm , o menor.

En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 80 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 60 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 40 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 20 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 100 μm de ancho por aproximadamente 10 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 80 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 60 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 40 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 20 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 10 μm de ancho por aproximadamente 100 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 80 μm de ancho por aproximadamente 80 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 60 μm de ancho por aproximadamente 60 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 40 μm de ancho por aproximadamente 40 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 20 μm de ancho por aproximadamente 20 μm de profundidad. En algunos ejemplos, las dimensiones de la sección transversal del canal transversal pueden ser de aproximadamente 10 μm de ancho por aproximadamente 10 μm de profundidad.

La forma de la sección transversal del canal transversal puede ser cualquier forma de sección transversal adecuada que incluye, pero que no se limita a, circular, ovalada, triangular, cuadrada o rectangular. La forma de la sección transversal del canal transversal puede ser diferente de la forma de la sección transversal del microcanal. La forma de la sección transversal del canal transversal puede ser la misma que la forma de la sección transversal del microcanal. El área de la sección

transversal del canal transversal puede ser constante a lo largo del canal transversal. Alternativamente, o, además, el área de la sección transversal del canal transversal puede variar a lo largo del microcanal. El área de la sección transversal del canal transversal puede variar entre aproximadamente 50 % y 150 %, entre aproximadamente 60 % y 125 %, entre aproximadamente 70 % y 120 %, entre aproximadamente 80 % y 115 %, entre aproximadamente 90 % y 110 %, entre aproximadamente 95 % y 100 %, o entre aproximadamente 98 % y 102 %. El área de la sección transversal del canal transversal puede ser menor o igual a aproximadamente 10 000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 7500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 5000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 2500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 1000 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 750 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 500 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 400 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 300 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 200 μm^2 , menor o igual a aproximadamente 100 μm^2 , o menor. El área de la sección transversal del canal transversal puede ser la misma que el área de la sección transversal del microcanal. Alternativamente, el área de la sección transversal del canal transversal puede ser menor que el área del área de la sección transversal del microcanal. El área de la sección transversal del canal transversal puede ser menor o igual a aproximadamente 98 %, menor o igual a aproximadamente 95 %, menor o igual a aproximadamente 90 %, menor o igual a aproximadamente 85 %, menor o igual a aproximadamente 80 %, menor o igual a aproximadamente 75 %, menor o igual a aproximadamente 70 %, menor o igual a aproximadamente 60 %, menor o igual a aproximadamente 50 %, menor o igual a aproximadamente 40 %, menor o igual a aproximadamente 30 %, menor o igual a aproximadamente 20 %, menor o igual a aproximadamente 20 %, o menor al área de la sección transversal del microcanal.

Método para fabricar un dispositivo microfluídico

Un dispositivo microfluídico útil en los métodos y sistemas de la presente descripción puede fabricarse a través de cualquier método útil. Por ejemplo, la fabricación del dispositivo puede implicar el moldeo por inyección de un termoplástico para crear una estructura microfluídica. La estructura microfluídica puede comprender un microcanal, una pluralidad de microcámaras y una pluralidad de aberturas de sifón. La pluralidad de microcámaras puede estar conectada al microcanal por la pluralidad de aberturas de sifón. El microcanal puede comprender una entrada y una salida. Puede aplicarse una película delgada termoplástica para tapar la estructura microfluídica. La película delgada termoplástica puede ser al menos parcialmente permeable a los gases cuando se aplica un diferencial de presión a través de la película delgada termoplástica.

La película delgada termoplástica puede formarse mediante moldeo por inyección. La película delgada termoplástica puede aplicarse a la estructura microfluídica mediante unión térmica. Alternativamente, o, además, la película delgada puede aplicarse mediante enlace químico. La película delgada termoplástica puede formarse como parte y durante el proceso de moldeo por inyección para formar el dispositivo microfluídico.

El cuerpo del dispositivo microfluídico y la película delgada pueden comprender los mismos materiales. Alternativamente, el cuerpo del dispositivo microfluídico y la película delgada pueden comprender diferentes materiales. El cuerpo del dispositivo microfluídico y la película delgada pueden comprender un termoplástico. Los ejemplos de termoplásticos incluyen, pero no se limitan a, polímeros de cicloolefina, acrílico, acrilonitrilo butadieno estireno, nailon, ácido poliláctico, polibencimidazol, policarbonato, poliéter sulfona, poliéter éter cetona, polieterimida, polietileno, óxido de polifenileno, sulfuro de polifenileno, polipropileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, politetrafluoroetileno, poliéster, poliuretano o cualquier derivado de los mismos. El dispositivo microfluídico puede comprender homopolímeros, copolímeros o una combinación de los mismos. El dispositivo microfluídico puede estar formado por materiales inelásticos. Alternativamente, o, además, el dispositivo microfluídico puede estar formado por materiales elásticos.

Tanto el termoplástico como la película delgada pueden estar compuestos por un polímero de cicloolefina. Un termoplástico adecuado es Zeonor 1430R (Zeon Chemical, Japón) mientras que una película fina adecuada es Zeonox 1060R (Zeon Chemical, Japón). La película delgada puede comprender un material que es impermeable a los gases a baja presión y al menos parcialmente permeable a los gases bajo presión.

La entrada y la salida de un dispositivo microfluídico de la presente descripción pueden formarse mediante perforación mecánica. Alternativamente, la entrada y la salida se forman fundiendo, disolviendo o grabando el termoplástico.

La **Figura 4** ilustra un método de fabricación de dispositivos útiles para el procesamiento y/o análisis de muestras. En la **Figura 4**, se usa un proceso de moldeo por inyección **401** para formar una estructura microfluídica. La estructura microfluídica incluye una matriz de microcámaras, que están conectadas a al menos un microcanal a través de aberturas de sifón, como se muestra en las **Figuras 1A** y **1B**. La estructura microfluídica está cubierta por una película delgada. En el proceso de tapado, las aberturas en al menos un lado de la microestructura se cubren para cerrar y sellar las microestructuras. El recubrimiento puede realizarse mediante un proceso **402** de aplicación de una película delgada a la estructura microfluídica moldeada por inyección. Alternativamente, el tapado puede realizarse formando la película delgada como parte del proceso de moldeo por inyección **401**.

Como otro ejemplo, mientras se describe en el contexto de una microestructura que se forma mediante moldeo por inyección, los dispositivos microfluídicos formados por otras técnicas de microfabricación también pueden beneficiarse del uso de una película termoplástica tan delgada para permitir la desgasificación como se describe anteriormente. Tales técnicas incluyen micromecanizado, microlitografía y estampado en caliente, así como también otras técnicas de microfabricación.

Los dispositivos de la presente descripción pueden ser dispositivos consumibles (por ejemplo, diseñados para un solo uso, tal como análisis y/o procesamiento de una sola muestra) o dispositivos reutilizables (por ejemplo, diseñados para múltiples usos, como análisis y/o procesamiento de varias muestras). Las opciones de materiales para su inclusión en el dispositivo pueden reflejar si el dispositivo se usará una o más veces. Por ejemplo, un dispositivo consumible puede comprender materiales que son menos costosos que un dispositivo reutilizable. De manera similar, los procesos de fabricación pueden adaptarse al uso del dispositivo. Por ejemplo, un proceso de fabricación para un dispositivo consumible puede implicar la producción de menos desperdicio y/o implicar menos etapas o menos costosas. Un dispositivo reutilizable puede limpiarse y/o esterilizarse para facilitar los análisis y/o el procesamiento de múltiples muestras mediante el uso del mismo dispositivo. Por ejemplo, un dispositivo reutilizable puede comprender materiales capaces de soportar altas temperaturas apropiadas para la esterilización. Un dispositivo consumible puede comprender o no tales materiales.

Método de análisis de una muestra

En un aspecto, la presente descripción proporciona los métodos para usar un dispositivo microfluídico para analizar una muestra, tales como moléculas de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar en o de una muestra que contenga o se sospeche que contenga un patógeno, tal como una bacteria o bacterias. El método puede comprender proporcionar un dispositivo microfluídico como se describe en la presente descripción. El dispositivo puede comprender un microcanal. El microcanal puede comprender una entrada y una salida. El dispositivo microfluídico puede comprender además una pluralidad de microcámaras conectadas al microcanal por una pluralidad de aberturas de sifón. El dispositivo microfluídico puede sellarse mediante una película delgada (por ejemplo, una película delgada termoplástica) dispuesta junto a una superficie del dispositivo microfluídico de modo que la película delgada cubra el microcanal, la pluralidad de microcámaras y la pluralidad de aberturas de sifón. Puede aplicarse un reactivo y/o una muestra a la entrada o a la salida. El dispositivo microfluídico puede llenarse proporcionando un primer diferencial de presión entre el reactivo y/o la muestra y el dispositivo microfluídico, haciendo que el reactivo y/o la muestra fluyan hacia el dispositivo microfluídico. El reactivo y/o la muestra pueden dividirse en las microcámaras aplicando un segundo diferencial de presión entre el microcanal y la pluralidad de microcámaras para mover el reactivo y/o la muestra hacia la pluralidad de microcámaras y forzar el paso del gas dentro de la pluralidad de microcámaras, a través de la película delgada. El segundo diferencial de presión puede ser mayor que el primer diferencial de presión. Puede aplicarse un tercer diferencial de presión entre la entrada y la salida para introducir un fluido en el microcanal sin introducir el fluido en las microcámaras. El tercer diferencial de presión puede ser menor que el segundo diferencial de presión. Puede adicionarse un reactivo antes, después o al mismo tiempo que una muestra. También puede proporcionarse un reactivo en una o más particiones del dispositivo mediante otro método. Por ejemplo, puede depositarse un reactivo dentro de una o más particiones antes de cubrir una o más particiones con la película delgada.

La entrada y la salida del dispositivo pueden estar en comunicación fluida con una bomba neumática o un sistema de vacío. La bomba neumática o el sistema de vacío pueden ser un componente o estar separados de un sistema de la presente descripción. El llenado y la partición de una muestra y/o reactivo pueden realizarse aplicando diferenciales de presión a través de varias características del dispositivo microfluídico. El llenado y la partición de la muestra y/o el reactivo pueden realizarse sin el uso de válvulas entre las microcámaras y el microcanal para aislar la muestra y/o el reactivo. Por ejemplo, el llenado del microcanal puede realizarse aplicando un diferencial de presión entre la muestra y/o el reactivo a cargar y el microcanal. Este diferencial de presión puede lograrse presurizando la muestra y/o el reactivo o aplicando vacío al microcanal. El llenado de las microcámaras puede realizarse aplicando un diferencial de presión entre el microcanal y las microcámaras. Esto puede lograrse presurizando el microcanal o aplicando vacío a las microcámaras. La partición de la muestra y/o el reactivo puede realizarse aplicando un diferencial de presión entre un fluido y el microcanal. Este diferencial de presión puede lograrse presurizando el fluido o aplicando vacío al microcanal.

La película delgada puede tener diferentes características de permeabilidad bajo diferentes diferenciales de presión aplicada. Por ejemplo, la película delgada puede ser impermeable a los gases en los diferenciales de presión primero y tercero (por ejemplo, presión baja), que pueden ser diferenciales de presión de menor magnitud. La película delgada puede ser al menos parcialmente permeable a los gases en el segundo diferencial de presión (por ejemplo, alta presión), que puede ser un diferencial de presión de mayor magnitud. Los diferenciales de presión primero y tercero pueden ser iguales o pueden ser diferentes. El primer diferencial de presión puede ser la diferencia de presión entre el reactivo en la entrada o salida y el dispositivo microfluídico. Durante el llenado del dispositivo microfluídico, la presión del reactivo puede ser mayor que la presión del dispositivo microfluídico. Durante el llenado del dispositivo microfluídico, la diferencia de presión entre el reactivo y el dispositivo microfluídico (por ejemplo, baja presión) puede ser menor o igual a aproximadamente 8 libras por pulgada cuadrada (psi), menor o igual a aproximadamente 6 psi, menos menor o igual a aproximadamente 4 psi, menor o igual a aproximadamente 2 psi, menor o igual a aproximadamente 1 psi, o menor. En algunos ejemplos, durante el llenado del dispositivo microfluídico, el diferencial de presión entre el reactivo y el dispositivo microfluídico puede ser de aproximadamente 1 psi a aproximadamente 8 psi. En algunos ejemplos, durante el llenado del dispositivo microfluídico, el diferencial de presión entre el reactivo y el dispositivo microfluídico puede ser de aproximadamente 1 psi a aproximadamente 6 psi. En algunos ejemplos, durante el llenado del dispositivo microfluídico, el diferencial de presión entre el reactivo y el dispositivo microfluídico puede ser de aproximadamente 1 psi a aproximadamente 4 psi. El dispositivo microfluídico puede llenarse aplicando un diferencial de presión entre el reactivo y el dispositivo microfluídico durante menos de o igual a unos 20 minutos, menos de o igual a unos 15 minutos, menos de o igual a unos 10 minutos, menos de o igual a aproximadamente 5 minutos, menor o igual a aproximadamente 3 minutos, menor o igual a aproximadamente 2 minutos, menor o igual a aproximadamente 1 minuto, o menos.

Un dispositivo microfluídico lleno puede tener una muestra o uno o más reactivos en el microcanal, las aberturas del sifón, las microcámaras o cualquier combinación de los mismos. El relleno de la muestra o de uno o más reactivos en las microcámaras puede ocurrir al llenar el dispositivo microfluídico o puede ocurrir durante la aplicación de un segundo diferencial de presión. El segundo diferencial de presión (por ejemplo, alta presión) puede corresponder a la diferencia de presión entre el microcanal y la pluralidad de microcámaras. Durante la aplicación del segundo diferencial de presión, un primer fluido en el dominio de mayor presión puede empujar un segundo fluido en el dominio de menor presión a través de la película delgada y fuera del dispositivo microfluídico. Los fluidos primero y segundo pueden comprender un líquido o un gas. El líquido puede comprender una mezcla acuosa o una mezcla de aceite. El segundo diferencial de presión puede lograrse presurizando el microcanal. Alternativamente, o, además, la segunda diferencia de presión puede lograrse aplicando vacío a las microcámaras. Durante la aplicación del segundo diferencial de presión, la muestra y/o el reactivo del microcanal pueden fluir hacia las microcámaras. Además, durante la aplicación del segundo diferencial de presión, el gas atrapado dentro de las aberturas del sifón, las microcámaras y los microcanales puede desgasificarse a través de la película delgada. Durante el relleno y desgasificación de las microcámaras, el diferencial de presión entre las microcámaras y el microcanal puede ser mayor o igual a aproximadamente 6 psi, mayor o igual a aproximadamente 8 psi, mayor o igual a aproximadamente 10 psi, mayor o igual a aproximadamente 12 psi, mayor o igual a aproximadamente 14 psi, mayor o igual a aproximadamente 16 psi, mayor o igual a aproximadamente 18 psi, mayor o igual a aproximadamente 20 psi, o mayor. En algunos ejemplos, durante el relleno de las microcámaras, el diferencial de presión entre las microcámaras y el microcanal es de aproximadamente 8 psi a aproximadamente 20 psi. En algunos ejemplos, durante el relleno de las microcámaras, el diferencial de presión entre las microcámaras y el microcanal es de aproximadamente 8 psi a aproximadamente 18 psi. En algunos ejemplos, durante el relleno de las microcámaras, el diferencial de presión entre las microcámaras y el microcanal es de aproximadamente 8 psi a aproximadamente 16 psi. En algunos ejemplos, durante el relleno de las microcámaras, el diferencial de presión entre las microcámaras y el microcanal es de aproximadamente 8 psi a aproximadamente 14 psi. En algunos ejemplos, durante el relleno de las microcámaras, el diferencial de presión entre las microcámaras y el microcanal es de aproximadamente 8 psi a aproximadamente 12 psi. En algunos ejemplos, durante el relleno de las microcámaras, el diferencial de presión entre las microcámaras y el microcanal es de aproximadamente 8 psi a aproximadamente 10 psi. Las microcámaras pueden rellenarse y desgasificarse aplicando un diferencial de presión durante más de unos 5 minutos, más de unos 10 minutos, más de unos 15 minutos, más de unos 20 minutos, más de unos 25 minutos, más de unos 30 minutos o más.

La muestra y/o el reactivo pueden dividirse eliminando el exceso de muestra y/o reactivo del microcanal. Quitar el exceso de muestra y/o reactivo del microcanal puede evitar que los reactivos y/o la muestra en una microcámara se difundan a través de la abertura del sifón hacia el microcanal y hacia otras microcámaras. El exceso de muestra y/o reactivo dentro del microcanal puede eliminarse introduciendo un fluido en la entrada o la salida del microcanal. La presión del fluido puede ser mayor que la presión del microcanal, creando así un diferencial de presión entre el fluido y el microcanal. El fluido puede ser oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, aire, un gas noble o cualquier combinación de los mismos. Durante la partición de la muestra, el diferencial de presión entre el fluido y el microcanal puede ser menor o igual a aproximadamente 8 psi, menor o igual a aproximadamente 6 psi, menor o igual a aproximadamente 4 psi, menor o igual a aproximadamente 2 psi, menor o igual a aproximadamente 1 psi o menor. En algunos ejemplos, durante la partición de la muestra y/o el reactivo, el diferencial de presión entre el fluido y el microcanal puede ser de aproximadamente 1 psi a aproximadamente 8 psi. En algunos ejemplos, durante la partición de la muestra y/o el reactivo, el diferencial de presión entre el fluido y el microcanal puede ser de aproximadamente 1 psi a aproximadamente 6 psi. En algunos ejemplos, durante la partición de la muestra y/o el reactivo, el diferencial de presión entre el fluido y el microcanal puede ser de aproximadamente 1 psi a aproximadamente 4 psi. La muestra y/o el reactivo pueden particionarse aplicando un diferencial de presión entre el fluido y el microcanal durante menos de igual a aproximadamente 20 minutos, menos de o igual a aproximadamente 15 minutos, menos de o igual a aproximadamente 10 minutos, menos de o igual a aproximadamente 5 minutos, menor o igual a aproximadamente 3 minutos, menor o igual a aproximadamente 2 minutos, menor o igual a aproximadamente 1 minuto o menos.

Las Figuras 3A-3D ilustran un método para usar el dispositivo microfluídico que se muestra en la Figura 1A. En la Figura 3A, se aplica una presión baja al reactivo en la entrada 120 a través de una bomba neumática 300 para forzar el reactivo dentro del microcanal 110 y así llenar las microcámaras a través de las aberturas del sifón. La presión obliga al reactivo a fluir a través del microcanal y, por lo tanto, a fluir hacia las microcámaras a través de las aberturas del sifón. En este momento, las burbujas de gas, tal como la burbuja 301, pueden permanecer dentro de las microcámaras, las aberturas del sifón o el microcanal. El llenado mediante la aplicación de baja presión puede continuar hasta que las microcámaras, las aberturas del sifón y el microcanal estén sustancialmente llenos de reactivo. El reactivo puede ser un reactivo para usar en una reacción en cadena de la polimerasa. El reactivo puede diluirse de manera que no haya más de una plantilla de PCR presente en el reactivo por microcámara del dispositivo microfluídico. Por ejemplo, cada partición de al menos un subconjunto de la pluralidad de particiones de un dispositivo puede incluir como máximo una molécula de ácido nucleico. En algunos ejemplos, cada partición de un subconjunto de la pluralidad de particiones de un dispositivo puede incluir solo una molécula de ácido nucleico.

En la Figura 3B, la bomba neumática 300 está conectada tanto a las entradas 120 como a las salidas 130 y se aplica una alta presión. La alta presión se transmite a través del reactivo y se aplica a las burbujas de gas, tal como la burbuja 301. Bajo la influencia de esta alta presión, la película delgada 150 se vuelve permeable al gas y la burbuja 301 puede desgasificarse a través de la película delgada 150. Al aplicar esta alta presión, las microcámaras, las aberturas del sifón y el microcanal pueden quedar sustancialmente libres de burbujas de gas, lo que evita así el ensuciamiento.

En la **Figura 3C**, el fluido se vuelve a introducir aplicando baja presión a un gas en la entrada **120** a través de la bomba neumática **300**. La presión del aire puede no ser suficiente para permitir que el gas se desgasifique a través de la película delgada o lo suficientemente alta como para forzar las burbujas de gas hacia las aberturas del sifón y las microcámaras. En su lugar, el gas puede limpiar el microcanal de reactivo, dejando el reactivo aislado en cada microcámara y abertura de sifón. El gas puede ser aire. Alternativamente, el gas puede ser un gas inerte tal como nitrógeno, dióxido de carbono o un gas noble. Tal gas puede usarse para evitar la reacción entre el reactivo y los gases componentes del aire.

La **Figura 3D** ilustra el estado del sistema después de que se haya aplicado la baja presión en la **Figura 3C**. Después de la aplicación del gas a baja presión, las microcámaras y las aberturas del sifón pueden permanecer llenas de reactivo, mientras que el microcanal puede limpiarse de reactivo. El reactivo puede permanecer estacionario dentro de las microcámaras debido a la fuerza capilar y la alta tensión superficial creada por la abertura del sifón. La fuerza capilar y la alta tensión superficial pueden evitar que el reactivo fluya hacia el microcanal y minimizar la evaporación del reactivo. Un proceso similar al descrito con respecto a las **Figuras 3A-3D** se puede usar para dividir la muestra dentro del dispositivo.

La partición de la muestra puede verificarse mediante la presencia de un indicador dentro del reactivo. Un indicador puede incluir una molécula que comprende un resto detectable. El resto detectable puede incluir especies radioactivas, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores enzimáticos, marcadores colorimétricos o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de especies radioactivas incluyen ^3H , ^{14}C , ^{22}Na , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{42}K , ^{45}Ca , ^{59}Fe , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I o ^{203}Hg . Los ejemplos no limitantes de marcadores fluorescentes incluyen proteínas fluorescentes, colorantes ópticamente activos (por ejemplo, un colorante fluorescente), fluoróforos organometálicos o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de marcadores quimioluminiscentes incluyen enzimas de la clase de las luciferasas tales como las luciferasas de *Cypridina*, *Gaussia*, *Renilla* y de luciérnaga. Los ejemplos no limitantes de marcadores enzimáticos incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa, glucosa oxidasa u otros marcadores bien conocidos.

Una molécula indicadora puede ser una molécula fluorescente. Las moléculas fluorescentes pueden incluir proteínas fluorescentes, colorantes fluorescentes y fluoróforos organometálicos. La molécula indicadora puede ser un fluoróforo de proteína. Los fluoróforos de proteínas pueden incluir proteínas fluorescentes verdes (GFP, proteínas fluorescentes que emiten fluorescencia en la región verde del espectro, que generalmente emiten luz con una longitud de onda de 500 a 550 nanómetros), proteínas fluorescentes cian (CFP, proteínas fluorescentes que emiten fluorescencia en la región cian del espectro, generalmente emitiendo luz con una longitud de onda de 450-500 nanómetros), proteínas fluorescentes rojas (RFP, proteínas fluorescentes que emiten fluorescencia en la región roja del espectro, generalmente emitiendo luz con una longitud de onda de 600-650 nanómetros). Los ejemplos no limitantes de fluoróforos de proteínas incluyen mutantes y variantes espectrales de AcGFP, AcGFP1, AmCyan, Am Cyan1, AQ143, AsRed2, Azami Green, Azurite, BFP, Cerulean, CFP, CGFP, Citrine, copGFP, CyPet, dKeima-Tandem, DsRed, dsRed-Express, monómero DsRed, DsRed2, dTomato, dTomato-Tandem, EBFP, EBFP2, ECFP, EGFP, Emerald, EosFP, EYFP, GFP, HcRed-Tandem, HcRed1, JRed, Katuska, Kusabira Orange, Kusabira Orange2, mApple, mBanana, mCerulean, mCFP, mCherry, mCitrine, mEGFP, mEmerald, mGrape1, mGrape2, mHoneydew, Midori-Ishi Cyan, mKeima, mKO, mOrange, mOrange2, mPlum, mRaspberry, mRFP1, mRuby, mStrawberry, mTagBFP, mTangerine, mTeal, mTomato, mTurquoise, mWasabi, PhiYFP, ReAsH, Sapphire, Superfolder GFP, T-Sapphire, TagCFP, TagGFP, TagRFP, TagRFP-T, TagYFP, tdTomato, Topaz, TurboGFP, Venus, YFP, YPet, ZsGreen y ZsYellow1.

La molécula indicadora puede ser un colorante fluorescente. Los ejemplos no limitativos de tintes fluorescentes incluyen verde de SYBR; azul SYBR; DAPI; yoduro de propidio; Hoeste; dorado de SYBR; bromuro de etidio; acridinas; proflavina; naranja de acridina; acriflavina; fluorocumanina; elipticina; daunomicina; cloroquina; distamicina D; cromomicina; homidio; mitramicina; polipiridilos de rutenio; antramicina; fenantridinas y acridinas; yoduro de propidio; yoduro de hexidio; dihidroetidio; monoazida de etidio; ACMA; Hoechst 33258; Hoechst 33342; Hoechst 34580; DAPI; naranja de acridina; 7-AAD; actinomicina D; LDS751; hidroxietilbamidina; azul SYTOX; verde SYTOX; naranja SYTOX; POPO-1; POPO-3; YOYO-1; YOYO-3; TOTO-1; TOTO-3; JOJO-1; LOLO-1; BOBO-1; BOBO-3; PO-PRO-1; PO-PRO-3; BO-PRO-1; BO-PRO-3; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; JO-PRO-1; LO-PRO-1; YO-PRO-1; YO-PRO-3; PicoGreen; OliGreen; RiboGreen; dorado SYBR; verde SYBR I; verde SYBR II; SYBR DX; SYTO-40, SYTO-41, SYTO-42, SYTO-43, SYTO-44 y SYTO-45 (azul); SYTO-13, SYTO-16, SYTO-24, SYTO-21, SYTO-23, SYTO-12, SYTO-11, SYTO-20, SYTO-22, SYTO-15, SYTO-14, y SYTO-25 (verde); SYTO-81, SYTO-80, SYTO-82, SYTO-83, SYTO-84 y SYTO-85 (naranja); SYTO-64, SYTO-17, SYTO-59, SYTO-61, SYTO-62, SYTO-60 y SYTO-63 (rojo); fluoresceína; isotiocianato de fluoresceína (FITC); isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC); rodamina; tetrametil rodamina; R-ficoeritrina; Cy-2; Cy-3; Cy-3,5; Cy-5; Cy5.5; ; Cy-7; rojo Texas; rojo Phar; alofocianina (APC); verde Sybr I; verde Sybr II; dorado Sybr; verde CellTracker; 7-AAD; homodímero de etidio I; homodímero de etidio II; homodímero de etidio III; umbeliferona; eosina; proteína fluorescente verde; eritrosina; cumarina; cumarina de metilo; pireno; verde malaquita; estilbeno; amarillo lucifer; azul cascada; fluoresceína de diclorotriazinilamina; cloruro de dansilo; complejos de lantánido fluorescente tales como los que incluyen europio y terbio; fluoresceína de tetracloro carboxi; 5 y/o 6-carboxifluoresceína (FAM); 5- (o 6-)yodoacetamidofluoresceína; 5-[(2(y 3)-5-(acetilmercapto)-succinil]amino} fluoresceína (SAMSA-fluoresceína); cloruro de sulfonilo de rodamina B; 5 y/o 6 carboxi rodamina (ROX); 7-amino-metil-cumarina; ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA); fluoróforos de BODIPY; 8-metoxipireno-1;3;sal trisódica de ácido 6-trisulfónico; 3;6-disulfonato-4-amino-naftalimida; ficobiliproteínas; tintes AlexaFluor 350, 405, 430, 488, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750, y 790; tintes Dylight 350, 405, 488, 550, 594, 633, 650, 680, 755, y 800; y otros fluoróforos.

La molécula indicadora puede ser un fluoróforo organometálico. Los ejemplos no limitantes de fluoróforos organometálicos incluyen quelatos de iones lantánidos, cuyos ejemplos no limitantes incluyen tris(dibenzoilmetano) mono(1,10-fenantrolina)europio(III), tris(dibenzoilmetano) mono(5-amino-1,10-fenantrolina)europio (III) y criptato de Lumi4-Tb.

5 Pueden recopilarse señales (por ejemplo, tomar imágenes) del dispositivo microfluídico o un subconjunto de la pluralidad de particiones (por ejemplo, microcámaras) del mismo. La recopilación de señales puede comprender tomar imágenes del dispositivo o un subconjunto de la pluralidad de particiones del mismo. Las señales (por ejemplo, imágenes) pueden recopilarse de microcámaras individuales, una matriz de microcámaras o múltiples matrices de microcámaras al mismo tiempo. Las señales pueden recopilarse a través del cuerpo del dispositivo microfluídico, a través de la película delgada del dispositivo microfluídico, o de ambos. El cuerpo del dispositivo microfluídico puede ser sustancialmente transparente ópticamente. Alternativamente, el cuerpo del dispositivo microfluídico puede ser sustancialmente opaco ópticamente. De manera similar, la película delgada puede ser sustancialmente transparente ópticamente. Alternativamente, el cuerpo del dispositivo microfluídico puede ser sustancialmente opaco ópticamente.

15 Las señales pueden recopilarse del dispositivo microfluídico o de un subconjunto de la pluralidad de particiones del mismo en cualquier momento útil y con cualquier frecuencia útil. Por ejemplo, las señales (por ejemplo, imágenes) pueden recopilarse antes de llenar el dispositivo microfluídico con reactivo o muestra. Las señales también pueden recopilarse durante el llenado del dispositivo microfluídico con reactivo o muestra. Alternativamente o, además, las señales pueden recopilarse después de llenar el dispositivo microfluídico con reactivo o muestra. Por ejemplo, pueden recopilarse señales para verificar la partición del reactivo o la muestra. Las señales también pueden recopilarse durante una reacción (por ejemplo, una reacción de amplificación de ácido nucleico) para controlar los productos (por ejemplo, productos de amplificación) de la reacción. De manera similar, las señales pueden recopilarse durante el calentamiento controlado del dispositivo o un subconjunto de la pluralidad de particiones del mismo (por ejemplo, durante un análisis de fusión de alta resolución). Las señales pueden recopilarse a intervalos específicos, tal como en puntos de tiempo específicos. Alternativamente, o, además, se puede tomar un video del dispositivo microfluídico o un subconjunto de la pluralidad de particiones del mismo. Los intervalos especificados pueden incluir recopilar una señal (por ejemplo, tomar una imagen) al menos cada 300 segundos, al menos cada 240 segundos, al menos cada 180 segundos, al menos cada 120 segundos, al menos cada 90 segundos, al menos cada 60 segundos, al menos cada 30 segundos, al menos cada 15 segundos, al menos cada 10 segundos, al menos cada 5 segundos, al menos cada 4 segundos, al menos cada 3 segundos, al menos cada 2 segundos, al menos cada 1 segundo, o más frecuentemente durante una reacción. Las señales también pueden recopilarse en respuesta a las instrucciones de un procesador, como se describe en la presente descripción.

Los métodos descritos en la presente descripción que implican el uso de un dispositivo microfluídico pueden comprender la amplificación de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico de una muestra. El dispositivo microfluídico puede llenarse con uno o más reactivos de amplificación, tal como moléculas de ácido nucleico, componentes necesarios para una reacción de amplificación (por ejemplo, cebadores, polimerasas y desoxirribonucleótidos), una molécula indicadora y una sonda de amplificación. Las reacciones de amplificación pueden implicar ciclos térmicos de la pluralidad de microcámaras o un subconjunto de las mismas, como se describe en la presente descripción. La detección de la amplificación de ácidos nucleicos puede realizarse mediante la recopilación de señales (por ejemplo, formación de imágenes) de la pluralidad de microcámaras del dispositivo microfluídico o un subconjunto del mismo. Las moléculas de ácido nucleico pueden cuantificarse contando las microcámaras en las que las moléculas de ácido nucleico se amplifican con éxito y aplicando estadísticas de Poisson. Las moléculas de ácido nucleico también pueden cuantificarse mediante el procesamiento de señales recopiladas en diferentes momentos a lo largo de una reacción de amplificación. Por ejemplo, pueden recopilarse una o más señales durante cada ciclo térmico (por ejemplo, cada ciclo de amplificación) de una reacción de amplificación de ácido nucleico y las señales pueden usarse para determinar una velocidad de amplificación como, por ejemplo, en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (PCR en tiempo real o qPCR). La amplificación y cuantificación de ácidos nucleicos puede realizarse en una sola unidad integrada, por ejemplo, dentro de una partición dada o un subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo.

50 Pueden usar una variedad de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos para amplificar la molécula de ácido nucleico en una muestra para generar un producto amplificado. La amplificación de un ácido nucleico diana puede ser lineal, exponencial o una combinación de las mismas. Los ejemplos no limitantes de métodos de amplificación de ácido nucleico incluyen la extensión de cebador, la reacción en cadena de la polimerasa, la transcripción inversa, la amplificación isotérmica, la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación dependiente de helicasa, la amplificación asimétrica, la amplificación de círculo rodante y la amplificación de desplazamiento múltiple. El producto de amplificación de una reacción de amplificación puede ser ADN o ARN. Para muestras que incluyen moléculas de ADN, puede emplearse cualquier método de amplificación de ADN. Los métodos de amplificación de ADN incluyen, pero no se limitan a, PCR, PCR en tiempo real, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, PCR digital, PCR de marcación, PCR dependiente de helicasa, PCR anidada, PCR de inicio en caliente, PCR inversa, PCR con metilación específica, PCR con minicebador, PCR multiplex, PCR de superposición y extensión, PCR termoasimétrica entrelazada, PCR de contacto y reacción en cadena de la ligasa. La amplificación de ADN puede ser lineal, exponencial o cualquier combinación de las mismas. La amplificación de ADN también puede lograrse con PCR digital (dPCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) o PCR digital cuantitativa (qdPCR), como se describe en la presente descripción.

65 Los reactivos necesarios para la amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir enzimas polimerizantes, cebadores inversos, cebadores directos y sondas de amplificación. Los ejemplos de enzimas polimerizantes incluyen, sin limitación,

ácido nucleico polimerasa, transcriptasa o ligasa (es decir, enzimas que catalizan la formación de un enlace). La enzima polimerizante puede ser natural o sintetizada. Los ejemplos de polimerasas incluyen una polimerasa de ADN y polimerasa de ARN, una polimerasa termoestable, una polimerasa de tipo salvaje, una polimerasa modificada, ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa de bacteriófago T4 Φ 29 (phi29) ADN polimerasa, Taq polimerasa, Tth polimerasa, Tli polimerasa, Pfu polimerasa Pwo polimerasa, VENT polimerasa, DEEPVENT polimerasa, Ex-Taq polimerasa, LA-Taw polimerasa, Sso polimerasa Pcc polimerasa, Pab polimerasa, Mth polimerasa ES4 polimerasa, Tru polimerasa, Tac polimerasa, Tne polimerasa, Tma polimerasa, Tca polimerasa, Tih polimerasa, Tfi polimerasa, Platinum Taq polimerasas, Tbr polimerasa, Tfl polimerasa, Pfu tubo polimerasa, Pyrobest polimerasa, KOD polimerasa, Bst polimerasa, Sac polimerasa, fragmento de polimerasa Klenow con actividad de exonucleasa de 3' a 5', y variantes, productos modificados y derivados de los mismos. Para una polimerasa de inicio en caliente, puede ser necesaria una etapa de desnaturalización a una temperatura de aproximadamente 92 °C a 95 °C durante un período de tiempo de aproximadamente 2 minutos a 10 minutos.

Una reacción de amplificación de ácido nucleico puede implicar una sonda de amplificación. Una sonda de amplificación puede ser una sonda de oligonucleótidos específica de secuencia. La sonda de amplificación puede ser ópticamente activa cuando se hibrida con un producto de amplificación. Es posible que la sonda de amplificación solo sea detectable a medida que avanza la amplificación del ácido nucleico. La intensidad de una señal recopilada de una pluralidad de particiones que incluyen moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, señal óptica) puede ser proporcional a la cantidad de producto amplificado incluido en las particiones. Por ejemplo, la señal recolectada de una partición en particular puede ser proporcional a la cantidad de producto amplificado en esa partición en particular. Una sonda puede unirse a cualquiera de los restos detectables ópticamente activos (por ejemplo, colorantes) descritos en la presente descripción y también puede incluir un inhibidor capaz de bloquear la actividad óptica de un colorante asociado. Los ejemplos no limitativos de sondas que pueden ser útiles como restos detectables incluyen sondas TaqMan, sondas TaqMan Tamara, sondas TaqMan MGB, sondas Lion, sondas de ácido nucleico bloqueadas o balizas moleculares. Los ejemplos no limitativos de inactivadores que pueden ser útiles para bloquear la actividad óptica de la sonda incluyen los inactivadores Black Hole (BHQ), los inactivadores Iowa Black FQ y RQ o los inactivadores ZEN internos. Alternativamente o, además, la sonda o el inhibidor puede ser cualquier sonda conocida que sea útil en el contexto de los métodos de la presente descripción.

La sonda de amplificación puede ser una sonda fluorescente doblemente marcada. La sonda doblemente marcada puede incluir un informador fluorescente y un inactivador de fluorescencia vinculado con un ácido nucleico. El informador fluorescente y el inactivador fluorescente pueden colocarse muy cerca uno del otro. La proximidad del informador fluorescente y el inactivador fluorescente puede bloquear la actividad óptica del informador fluorescente. La sonda doblemente marcada puede unirse a la molécula de ácido nucleico que se va a amplificar. Durante la amplificación, la actividad exonucleasa de la polimerasa puede escindir el informador fluorescente y el inactivador fluorescente. Separar el informador fluorescente y el inactivador de la sonda de amplificación puede hacer que el informador fluorescente recupere su actividad óptica y permita la detección. La sonda fluorescente de doble marca puede incluir un informador fluorescente de 5' con una longitud de onda de excitación máxima de aproximadamente 450 nanómetros (nm), 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm, o superior y una longitud de onda de emisión máxima de aproximadamente 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm o superior. La sonda fluorescente doblemente marcada también puede incluir un inactivador fluorescente 3'. El inactivador fluorescente puede inactivar longitudes de onda de emisión fluorescente entre aproximadamente 380 nm y 550 nm, 390 nm y 625 nm, 470 nm y 560 nm, 480 nm y 580 nm, 550 nm y 650 nm, 550 nm y 750 nm, o 620 nm y 730 nm.

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos llevadas a cabo dentro de las microcámaras del dispositivo pueden comprender ciclos térmicos de las microcámaras del dispositivo microfluídico, o un subconjunto de las mismas. Los ciclos térmicos pueden incluir el control de la temperatura del dispositivo microfluídico aplicando calor o enfriamiento al dispositivo microfluídico. Los métodos de calentamiento o enfriamiento pueden incluir calentamiento o enfriamiento resistivo, calentamiento o enfriamiento por radiación, calentamiento o enfriamiento por conducción, calentamiento o enfriamiento por convección, o cualquier combinación de los mismos. Los ciclos térmicos pueden incluir ciclos de incubación de las microcámaras a una temperatura suficientemente alta para desnaturalizar las moléculas de ácido nucleico durante un período de tiempo seguido de la incubación de las microcámaras a una temperatura de extensión durante un período de extensión. Los ciclos térmicos también pueden incluir ciclos de incubación de las microcámaras a una temperatura suficiente para hibridar un cebador con una molécula de ácido nucleico a una temperatura de hibridación durante un tiempo de hibridación. Las temperaturas de desnaturalización pueden variar según, por ejemplo, la muestra de ácidos nucleicos particular, los reactivos usados y las condiciones de reacción deseadas. Una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 80 °C a aproximadamente 110 °C. Una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 85 °C a aproximadamente 105 °C. Una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 100 °C. Una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 98 °C. Una temperatura de desnaturalización puede ser de aproximadamente 92 °C a aproximadamente 95 °C. Una temperatura de desnaturalización puede ser de al menos aproximadamente 80 °C, al menos aproximadamente 81 °C, al menos aproximadamente 82 °C, al menos aproximadamente 83 °C, al menos aproximadamente 84 °C, al menos aproximadamente 85 °C, al menos aproximadamente 86 °C, al menos aproximadamente 87 °C, al menos aproximadamente 88 °C, al menos aproximadamente 89 °C, al menos aproximadamente 90 °C, al menos aproximadamente 91 °C, al menos aproximadamente 92 °C, al menos aproximadamente 93 °C, al menos aproximadamente 94 °C, al menos

aproximadamente 95 °C, al menos aproximadamente 96 °C, al menos aproximadamente 97 °C, al menos aproximadamente 98 °C, al menos aproximadamente 99 °C, al menos aproximadamente 100 °C, o superior.

5 La duración de la desnaturalización puede variar según, por ejemplo, la muestra de ácidos nucleicos particular, los reactivos usados y las condiciones de reacción deseadas. La duración de la desnaturalización puede ser menor o igual a aproximadamente 300 segundos, 240 segundos, 180 segundos, 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo. Alternativamente, la duración de la desnaturalización no puede ser superior a 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo.

15 Las temperaturas de extensión pueden variar según, por ejemplo, la muestra de ácidos nucleicos particular, los reactivos usados y las condiciones de reacción deseadas. Una temperatura de extensión puede ser de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C. Una temperatura de extensión puede ser de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 75 °C. Una temperatura de extensión puede ser de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C. Una temperatura de extensión puede ser de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. Una temperatura de extensión puede ser de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C. Una temperatura de extensión puede ser al menos aproximadamente 35 °C, al menos aproximadamente 36 °C, al menos aproximadamente 37 °C, al menos aproximadamente 38 °C, al menos aproximadamente 39 °C, al menos aproximadamente 40 °C, al menos aproximadamente 41 °C, al menos aproximadamente 42 °C, al menos aproximadamente 43 °C, al menos aproximadamente 44 °C, al menos aproximadamente 45 °C, al menos aproximadamente 46 °C, al menos aproximadamente 47 °C, al menos aproximadamente 48 °C, al menos aproximadamente 49 °C, al menos aproximadamente 50 °C, al menos aproximadamente 51 °C, al menos aproximadamente 52 °C, al menos aproximadamente 53 °C, al menos aproximadamente 54 °C, al menos aproximadamente 55 °C, al menos aproximadamente 56 °C, al menos aproximadamente 57 °C, al menos aproximadamente 58 °C, al menos aproximadamente 59 °C, al menos aproximadamente 60 °C, al menos aproximadamente 61 °C, al menos aproximadamente 62 °C, al menos aproximadamente 63 °C, al menos aproximadamente 64 °C, al menos aproximadamente 65 °C, al menos aproximadamente 66 °C, al menos aproximadamente 67 °C, al menos aproximadamente 68 °C, al menos aproximadamente 69 °C, al menos aproximadamente 70 °C, al menos aproximadamente 71 °C, al menos aproximadamente 72 °C, al menos aproximadamente 73 °C, al menos aproximadamente 74 °C, al menos aproximadamente 75 °C, al menos aproximadamente 76 °C, al menos aproximadamente 77 °C, al menos aproximadamente 78 °C, al menos aproximadamente 79 °C, o al menos aproximadamente 80 °C.

35 El tiempo de extensión puede variar según, por ejemplo, la muestra de ácidos nucleicos particular, los reactivos usados y las condiciones de reacción deseadas. La duración de la extensión puede ser menor o igual a aproximadamente 300 segundos, 240 segundos, 180 segundos, 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo. Alternativamente, la duración de la extensión no puede ser más de aproximadamente 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo.

45 Las temperaturas de hibridación pueden variar según, por ejemplo, la muestra de ácidos nucleicos particular, los reactivos usados y las condiciones de reacción deseadas. Una temperatura de hibridación puede ser de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C. Una temperatura de hibridación puede ser de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 75 °C. Una temperatura de hibridación puede ser de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C. Una temperatura de hibridación puede ser de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 65 °C. Una temperatura de hibridación puede ser de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C. Una temperatura de hibridación puede ser al menos aproximadamente 35 °C, al menos aproximadamente 36 °C, al menos aproximadamente 37 °C, al menos aproximadamente 38 °C, al menos aproximadamente 39 °C, al menos aproximadamente 40 °C, al menos aproximadamente 41 °C, al menos aproximadamente 42 °C, al menos aproximadamente 43 °C, al menos aproximadamente 44 °C, al menos aproximadamente 45 °C, al menos aproximadamente 46 °C, al menos aproximadamente 47 °C, al menos aproximadamente 48 °C, al menos aproximadamente 49 °C, al menos aproximadamente 50 °C, al menos aproximadamente 51 °C, al menos aproximadamente 52 °C, al menos aproximadamente 53 °C, al menos aproximadamente 54 °C, al menos aproximadamente 55 °C, al menos aproximadamente 56 °C, al menos aproximadamente 57 °C, al menos aproximadamente 58 °C, al menos aproximadamente 59 °C, al menos aproximadamente 60 °C, al menos aproximadamente 61 °C, al menos aproximadamente 62 °C, al menos aproximadamente 63 °C, al menos aproximadamente 64 °C, al menos aproximadamente 65 °C, al menos aproximadamente 66 °C, al menos aproximadamente 67 °C, al menos aproximadamente 68 °C, al menos aproximadamente 69 °C, al menos aproximadamente 70 °C, al menos aproximadamente 71 °C, al menos aproximadamente 72 °C, al menos aproximadamente 73 °C, al menos aproximadamente 74 °C, al menos aproximadamente 75 °C, al menos aproximadamente 76 °C, al menos aproximadamente 77 °C, al menos aproximadamente 78 °C, al menos aproximadamente 79 °C o al menos aproximadamente 80 °C.

65

El tiempo de hibridación puede variar según, por ejemplo, la muestra de ácidos nucleicos particular, los reactivos usados y las condiciones de reacción deseadas. La duración de la hibridación puede ser menor o igual a aproximadamente 300 segundos, 240 segundos, 180 segundos, 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo. Alternativamente, la duración de la hibridación no puede ser superior a 120 segundos, 90 segundos, 60 segundos, 55 segundos, 50 segundos, 45 segundos, 40 segundos, 35 segundos, 30 segundos, 25 segundos, 20 segundos, 15 segundos, 10 segundos, 5 segundos, 2 segundos o 1 segundo.

La amplificación de ácidos nucleicos puede incluir múltiples ciclos de ciclos térmicos (por ejemplo, múltiples ciclos de amplificación). Puede realizarse cualquier número adecuado de ciclos. El número de ciclos realizados puede ser más de 5, más de 10, más de 15, más de 20, más de 30, más de 40, más de 50, más de 60, más de 70, más de 80, más de 90, más de 100 ciclos o más. El número de ciclos realizados puede depender del número de ciclos necesarios para obtener los productos de amplificación detectables. Por ejemplo, el número de ciclos necesarios para detectar la amplificación de ácidos nucleicos durante la PCR (por ejemplo, dPCR, qPCR o qdPCR) puede ser menor o igual a aproximadamente 100, menor o igual a aproximadamente 90, menor o igual a aproximadamente 80, menor o igual a aproximadamente 70, menor o igual a aproximadamente 60, menor o igual a aproximadamente 50, menor o igual a aproximadamente 40, menor o igual a aproximadamente 30, menor o igual a aproximadamente 20, menor o igual a aproximadamente 15, menor o igual a aproximadamente 10, menor o igual a aproximadamente 5 ciclos, o menor.

El tiempo para alcanzar una cantidad detectable de producto de amplificación puede variar según, por ejemplo, la muestra de ácidos nucleicos particular, los reactivos usados, la reacción de amplificación usada, el número de ciclos de amplificación usados y las condiciones de reacción deseadas. El tiempo para alcanzar una cantidad detectable de producto de amplificación puede ser de aproximadamente 120 minutos o menos, 90 minutos o menos, 60 minutos o menos, 50 minutos o menos, 40 minutos o menos, 30 minutos o menos, 20 minutos o menos, 10 minutos o menos o 5 minutos o menos.

La velocidad de rampa (es decir, la velocidad a la que la microcámara pasa de una temperatura a otra) es importante para la amplificación. Por ejemplo, la temperatura y el tiempo durante el cual una reacción de amplificación produce una cantidad detectable de producto amplificado puede variar dependiendo de la velocidad de rampa. La velocidad de rampa puede afectar el tiempo o las temperaturas, o tanto el tiempo como la temperatura usados durante la amplificación. La velocidad de rampa puede ser constante entre ciclos o puede variar entre ciclos. La velocidad de rampa puede ajustarse en función de la muestra que se esté procesando. Por ejemplo, pueden seleccionarse velocidades de rampa óptimas para proporcionar un método de amplificación robusto y eficiente.

La **Figura 5** ilustra un proceso de PCR digital para ser empleado con el dispositivo microfluídico descrito anteriormente. En la etapa **501**, el reactivo se reparte como se muestra en las **Figuras 3A-3D**. En la etapa **502**, el reactivo se somete a ciclos térmicos para ejecutar la reacción de PCR en el reactivo en las microcámaras. Esta etapa puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de un termociclador de bloque plano. En la etapa **503**, se realiza la adquisición de imágenes para determinar qué microcámaras han llevado a cabo con éxito la reacción de PCR. La adquisición de imágenes puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de una unidad de detección de sonda de tres colores. En la etapa **504**, se aplican estadísticas de Poisson al recuento de microcámaras determinado en la etapa **503** para convertir el número bruto de cámaras positivas en una concentración de ácido nucleico.

Un método para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico puede comprender proporcionar un dispositivo que comprenda una pluralidad de particiones como se describe en la presente descripción. Al menos un subconjunto de la pluralidad de particiones puede incluir una pluralidad de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico). Cada partición del subconjunto de la pluralidad de particiones puede configurarse para permitir el flujo de gas desde las particiones a un medio externo a las particiones a través de al menos una barrera que separa las particiones del medio externo. El subconjunto de la pluralidad de particiones puede entonces someterse a condiciones suficientes para realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos mediante el uso de la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos para generar productos de amplificación a partir de al menos un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos. Mientras que el subconjunto de la pluralidad de particiones está sujeto a estas condiciones, las señales pueden recopilarse del subconjunto de la pluralidad de particiones en una pluralidad de puntos de tiempo. Las señales recopiladas de la pluralidad de particiones pueden luego procesarse para determinar un número de moléculas de ácido nucleico en el subconjunto de la pluralidad de particiones. El procesamiento de la señal puede tener lugar mientras las reacciones de amplificación están en curso o después de que se hayan completado las reacciones de amplificación.

Someter el subconjunto de la pluralidad de particiones a condiciones suficientes para realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos puede comprender ciclos térmicos, como se describe en la presente descripción. El ciclo térmico puede comprender una fase de desnaturalización, una fase de extensión y una fase de hibridación y puede implicar cualquier combinación útil de temperatura y duraciones. Puede realizarse cualquier número útil de ciclos térmicos. Por ejemplo, si la señal está siendo procesada mientras las reacciones de amplificación están en curso, un procesador que controla el proceso de ciclo térmico puede alcanzar un umbral después del cual el ciclo térmico está programado para cesar. Alternativamente, un usuario puede interactuar con un sistema que lleva a cabo los procesos de amplificación y recopilación de señales y seleccionar finalizar el ciclo térmico después de un número determinado de ciclos. Los ciclos térmicos pueden realizarse mediante el uso de un termociclador de bloque plano o cualquier otro dispositivo de control de temperatura útil.

La recopilación de señales del subconjunto de la pluralidad de particiones puede implicar la recopilación de más de una señal por partición por ciclo térmico. Por ejemplo, la señal puede recopilarse durante cada fase de hibridación, durante cada fase de extensión, durante cada fase de desnaturalización o cualquier combinación de las mismas.

5 Alternativamente, un sistema que lleva a cabo el método puede programarse para recopilar la señal en una pluralidad de puntos de tiempo previamente determinados. Estos puntos de tiempo pueden estar espaciados uniformemente (por ejemplo, cada 5 segundos) o de acuerdo con un patrón previamente determinado (por ejemplo, cada 5 segundos durante los primeros 100 segundos seguidos de cada 20 segundos, o cualquier otro patrón útil). Como se describe en la presente descripción, la recopilación de señales puede comprender la formación de

10 imágenes. Puede configurarse un detector para generar imágenes de todo el subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo simultáneamente. Un detector para la formación de imágenes puede detectar la emisión de fluorescencia en dos o más longitudes de onda. Tal detector puede ser capaz de medir los productos de amplificación de ácidos nucleicos correspondientes a diferentes moléculas de ácido nucleico de partida (por ejemplo, plantillas). Por ejemplo, una muestra que incluye dos moléculas de ácido nucleico diferentes puede exponerse a dos cebadores diferentes, cada uno de los cuales incluye un marcador detectable diferente (por

15 ejemplo, un colorante o una sonda fluorescente) y es específico para una molécula de ácido nucleico diferente. Las diferentes etiquetas detectables pueden emitir una señal de fluorescencia a diferentes longitudes de onda, cada una de las cuales puede ser detectable por el mismo detector. Determinar un número de moléculas de ácido nucleico en el subconjunto de la pluralidad de particiones puede implicar determinar una intensidad óptica para cada partición que sea proporcional a la cantidad de productos de amplificación en cada partición.

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos pueden implicar uno o más reactivos, como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, pueden usarse reactivos tales como cebadores, desoxirribonucleótidos, tampones, cofactores, colorantes intercalantes y polimerasas. Estos reactivos pueden cargarse en el dispositivo antes, después

25 o al mismo tiempo que se carga la muestra en el dispositivo. La pluralidad de moléculas de ácido nucleico puede cargarse en la pluralidad de particiones del dispositivo mediante el uso de un flujo de fluido controlado (p. ej., como se describe con respecto a las **Figuras 3A-3D**). El gas en el subconjunto de la pluralidad de particiones puede estar sujeto a fluir desde las particiones hacia el medio externo. Por ejemplo, cargar el dispositivo o un subconjunto de la pluralidad de particiones del mismo con una muestra que incluya moléculas de ácido nucleico puede provocar la

30 desgasificación de las particiones a través de la barrera, como se describe en la presente descripción.

El dispositivo usado en un método de análisis de moléculas de ácido nucleico puede tener cualquiera de las características descritas en la presente descripción. La barrera del dispositivo puede comprender un material polimérico, tal como un material termoplástico, y puede ser una película delgada. La barrera puede ser sustancialmente ópticamente transparente.

35 La barrera puede tener un grosor de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 200 μm (por ejemplo, aproximadamente 50 μm , 100 μm , 150 μm o 200 μm). El dispositivo puede comprender al menos un microcanal que comprende al menos una entrada y al menos una salida y una pluralidad de aberturas de sifón. El subconjunto de la pluralidad de particiones puede estar en comunicación fluida con el microcanal por la pluralidad de aberturas de sifón. La pluralidad de particiones puede incluir desde aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 20 000 particiones (por ejemplo, al menos aproximadamente

40 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 10 000, 15 000 o 20 000 particiones).

La **Figura 11** ilustra un proceso de PCR digital cuantitativo para ser empleado con el dispositivo microfluídico descrito anteriormente. La **Figura 11A** muestra una representación de un subconjunto de particiones de un dispositivo microfluídico ilustrativo. En ciertas particiones, no están presentes plantillas de ácido nucleico; en otras particiones,

45 están presentes una o más plantillas. La **Figura 11B** ilustra la dinámica de amplificación de las muestras en cada partición del dispositivo ilustrativo. Como se ilustra en la **Figura 11B**, las particiones con diferentes números de plantillas de ácido nucleico presentes exhiben diferentes dinámicas de amplificación. Las particiones sin plantillas no se amplifican. De lo contrario, las particiones se amplifican más rápido si tienen más plantillas presentes en comparación con otras particiones. Cada línea vertical discontinua representa un solo ciclo de amplificación para un total de cinco ciclos de amplificación. Aunque se ilustran cinco ciclos, puede realizarse cualquier número de ciclos, dependiendo de las características específicas del método y/o la configuración del sistema. Por ejemplo, la cantidad de moléculas de ácido nucleico que pueden estar potencialmente presentes en cualquier partición dada, los reactivos usados y otras condiciones de reacción pueden afectar la cantidad requerida de ciclos, ya que es posible que se requieran más ciclos para proporcionar una cuantificación absoluta cuando un intervalo más amplio del número de

50 plantillas está potencialmente presente en cualquier partición dada. La **Figura 11C** ilustra los resultados de un proceso de qdPCR aplicado a la dinámica de amplificación que se muestra en la **Figura 11B**. Específicamente, la **Figura 11C** ilustra el número de plantillas de ácido nucleico que se calcula que existen en cada partición en función de la dinámica de amplificación medida durante los cinco ciclos de amplificación por PCR que se muestran en la **Figura 11B**.

La **Figura 16** ilustra un método para realizar la qdPCR mediante el uso de un dispositivo descrito en la presente memoria. En la etapa **1601**, la pluralidad de particiones del dispositivo, o un subconjunto del mismo, se cargan con uno o más reactivos. La carga de reactivos y/o muestra puede realizarse, por ejemplo, como se describe en la presente descripción. En algunos casos, los reactivos pueden colocarse en las particiones o en otra parte del dispositivo (por ejemplo, mediante un proceso mecánico automatizado) antes de colocar una película delgada sobre las particiones

65 (por ejemplo, sellar el dispositivo). Por ejemplo, un paquete de reactivo, un blíster, un gel u otro componente similar

puede depositarse en una partición antes de sellar el dispositivo. También puede adicionarse una muestra que incluya una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, como se describe en la presente descripción.

5 En la etapa **1602**, el dispositivo puede cargarse en un sistema para realizar la qdPCR. Por ejemplo, el dispositivo puede colocarse físicamente en una unidad térmica tal como un bloque de calentamiento y sujetarse en su lugar con un dispositivo de sujeción neumático o colocarse en una ranura, surco o depresión en una carcasa de un sistema analítico. Las marcas de registro y/o las llaves mecánicas pueden facilitar la colocación del dispositivo. El dispositivo puede cargarse en una unidad de carga mecánica que pone en cola los dispositivos para su colocación y análisis en un orden serializado. En algunos casos, la etapa **1602** se realiza antes de la etapa **1601** y el reactivo se carga en el
10 dispositivo después de que el dispositivo se haya colocado dentro de un sistema analítico. Tal sistema puede comprender una unidad de flujo de fluidos y/u otros componentes mecánicos y de fluidos que incluyen depósitos, bombas, válvulas y medidores, como se describe en la presente descripción, para cargar un dispositivo con reactivo.

15 En la etapa **1603**, las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos se realizan mediante el uso de la pluralidad de ácidos nucleicos cargados en un subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo, o un subconjunto del mismo. Las reacciones de amplificación pueden implicar uno o más ciclos térmicos, tal como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, una reacción de amplificación por PCR puede incluir una fase de desnaturalización, una fase de hibridación y una fase de extensión. Un ciclo de amplificación puede durar entre 60 y 180 segundos (por ejemplo, aproximadamente 150 segundos, con 30 segundos a una temperatura de desnaturalización y 120 segundos a una
20 temperatura de hibridación/extensión). También pueden emplearse etapas adicionales y/o diferentes duraciones.

En la etapa **1604**, se recopilan señales de cada partición en el subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo. Por ejemplo, pueden tomarse imágenes de las particiones y medir la señal óptica. La generación de imágenes puede realizarse, por ejemplo, moviendo una unidad óptica para escanear la unidad térmica, moviendo la unidad térmica para
25 escanear la unidad óptica o moviendo tanto la unidad óptica como la térmica para permitir la generación de imágenes del dispositivo o un subconjunto de la pluralidad de particiones de los mismos. La señal de todo el dispositivo puede recopilarse a la vez (por ejemplo, mediante el uso de uno o más detectores, tal como una o más cámaras, o mediante el uso de un solo detector configurado para recopilar la señal de todo el dispositivo a la vez) o la señal puede recopilarse solo de una parte del dispositivo a la vez (por ejemplo, correspondiente a un subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo). En el primer caso, puede que no sea necesario escanear una unidad térmica y/o un detector. Las señales pueden recopilarse una o más veces durante la amplificación para, por ejemplo, proporcionar una estimación de la
30 dinámica de amplificación durante cada ciclo. En algunos casos, la señal solo puede recopilarse una vez después de cada ciclo de amplificación para determinar la cantidad de amplificación que ha tenido lugar después de completar el ciclo de amplificación. La recopilación de señales puede comprender la formación de imágenes de un subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo. La obtención de imágenes puede realizarse mediante el uso de un colorante fluorescente que se intercala con ácidos nucleicos de doble cadena, o empleando sondas de ADN inactivadas que emiten fluorescencia solo después de reaccionar con una secuencia complementaria. En cualquier caso, la formación de imágenes puede realizarse iluminando las particiones con una fuente de luz de excitación adecuada para las sondas fluorescentes y determinando qué particiones emiten fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia. En algunos casos,
35 las etapas **1603** y **1604** pueden realizarse en paralelo, recopilándose las señales (p. ej., formación de imágenes) durante las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos (p. ej., ciclos térmicos).

En la etapa **1605** se determina la dinámica de amplificación en cada partición del subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo en base a las señales recopiladas en las etapas **1604**. Determinando una velocidad de
45 amplificación, puede estimarse el número original de moléculas de ácido nucleico incluidas en cada partición del subconjunto de la pluralidad de particiones. Por ejemplo, en la **Figura 11B**, se muestra la dinámica de amplificación para una matriz de particiones correspondiente a cinco ciclos de amplificación. El número de moléculas de ácido nucleico correspondientes a cada partición en la matriz se muestra en la **Figura 11C** y puede determinarse, por ejemplo, midiendo una cantidad de fluorescencia sobre un nivel de fondo y relacionándola con varias moléculas de ácido nucleico (p. ej., plantillas). En tal ejemplo, una partición que originalmente incluía más moléculas de ácido nucleico se amplificará más rápidamente y, por lo tanto, producirá una fluorescencia detectable antes. Cuanto antes sea el momento (por ejemplo, el ciclo de amplificación) en el que la fluorescencia se vuelve detectable, más plantillas estaban presentes originalmente en la partición. En consecuencia, el número de moléculas de ácido nucleico presentes puede determinarse por el número de ciclos completados o restantes cuando la fluorescencia se vuelve detectable por primera vez. También pueden
50 aplicarse otros métodos para determinar la dinámica de amplificación. En cada uno, la determinación final es una cantidad de plantillas originalmente presentes en cada partición en función de la cantidad de señal recopilada, el tiempo en el que se detecta la señal y/o la velocidad de aumento de la producción de la señal.

En la etapa **1606**, se determina un número total de moléculas de ácido nucleico presentes en un subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo sumando el número de moléculas de ácido nucleico originalmente presentes en cada partición del subconjunto de la pluralidad de particiones.
60

En la etapa **1607**, el dispositivo se descarga del sistema para realizar la qdPCR. Descargar (p. ej., retirar) el dispositivo puede comprender un espejo del procedimiento de carga de la etapa **1601** o un procedimiento diferente. Por ejemplo, un dispositivo cargado manualmente puede descargarse automáticamente mediante una unidad de
65

carga mecánica, o puede descargarse de otras formas (por ejemplo, mediante un sistema de recogida y colocación por vacío). El proceso puede entonces repetirse con otro dispositivo.

Métodos para el análisis termodinámico de una muestra de ácido nucleico

5 La presente descripción proporciona los métodos para el análisis termodinámico de una muestra. Por ejemplo, un dispositivo descrito en la presente descripción puede usarse para un análisis de fusión de alta resolución (HRM). Un método para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico puede comprender proporcionar un dispositivo que comprenda una pluralidad de particiones como se describe en la presente descripción. Al menos un subconjunto de la pluralidad de particiones puede incluir una pluralidad de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido desoxirribonucleico o ácido ribonucleico). Cada partición del subconjunto de la pluralidad de particiones puede configurarse para permitir el flujo de gas desde las particiones a un medio externo a las particiones a través de al menos una barrera que separa las particiones del medio externo. El subconjunto de la pluralidad de particiones puede entonces someterse a un calentamiento controlado. Mientras que el subconjunto de la pluralidad de particiones está sujeto a estas condiciones, pueden recopilarse señales del subconjunto de la pluralidad de particiones, por ejemplo, en una pluralidad de puntos de tiempo. Las señales recopiladas de la pluralidad de particiones pueden luego procesarse para producir datos indicativos de un punto de fusión de al menos un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en el subconjunto de la pluralidad de particiones. El procesamiento de la señal puede tener lugar mientras el calentamiento controlado está en curso o después de que se haya completado el calentamiento controlado.

20 El método puede comprender además realizar reacciones de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, como se describe en la presente descripción) en una muestra de ácidos nucleicos en condiciones suficientes para producir la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos como productos de amplificación de la muestra de ácidos nucleicos. Las reacciones de amplificación pueden realizarse en el subconjunto de la pluralidad de particiones. Por ejemplo, la muestra que incluye las moléculas de ácido nucleico puede cargarse en el subconjunto de la pluralidad de particiones antes de realizar las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Realizar una reacción de amplificación puede comprender calentar el subconjunto de la pluralidad de particiones mediante el uso de la misma unidad térmica (por ejemplo, un calentador) usada para realizar el calentamiento controlado del subconjunto de la pluralidad de particiones. Las reacciones de amplificación pueden implicar uno o más reactivos, tal como uno o más cebadores, desoxirribonucleótidos, tampones, cofactores, colorantes intercalantes y polimerasas, o cualquier combinación de los mismos. Un reactivo puede incluir un marcador detectable tal como un fluoróforo o un marcador fluorescente. En algunos casos, puede ser útil poner en contacto al menos un subconjunto de las moléculas de ácido nucleico de la muestra de ácidos nucleicos con un colorante intercalante antes de realizar las reacciones de amplificación.

35 El calentamiento controlado de un subconjunto de la pluralidad de particiones de un dispositivo puede realizarse a cualquier velocidad útil y en cualquier intervalo de temperatura útil. Por ejemplo, el calentamiento controlado puede realizarse desde una temperatura más baja de al menos aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C, aproximadamente 90 °C o aproximadamente 95 °C o más. El calentamiento controlado puede realizarse a una temperatura superior de al menos aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C, aproximadamente 90 °C, aproximadamente 91 °C, aproximadamente 92 °C, aproximadamente 93 °C, aproximadamente 94 °C, aproximadamente 95 °C, aproximadamente 96 °C, aproximadamente 97 °C, aproximadamente 98 °C, aproximadamente 99 °C o aproximadamente 100 °C o más. La temperatura puede aumentarse en cualquier incremento útil. Por ejemplo, la temperatura puede aumentarse en al menos aproximadamente 0,01 °C, aproximadamente 0,05 °C, aproximadamente 0,1 °C, aproximadamente 0,2 °C, aproximadamente 0,3 °C, aproximadamente 0,4 °C, aproximadamente 0,5 °C, aproximadamente 1 °C, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C o aproximadamente 10 °C o más. El calentamiento controlado también puede ocurrir en incrementos de temperatura desigualmente espaciados. Por ejemplo, la temperatura puede aumentarse en aproximadamente 0,1 °C en un intervalo en el que se espera una fusión significativa de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, medición de grano fino) y en aproximadamente 1 °C en un intervalo en el que no se espera una fusión significativa de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, medición de grano grueso). El calentamiento controlado puede realizarse a cualquier velocidad útil, tal como por lo menos aproximadamente 0,0001 °C/segundo, aproximadamente 0,0002 °C/segundo, aproximadamente 0,0003 °C/segundo, aproximadamente 0,0004 °C/segundo, aproximadamente 0,0005 °C/segundo, aproximadamente 0,0006 °C/segundo, aproximadamente 0,0007 °C/segundo, aproximadamente 0,0008 °C/segundo, aproximadamente 0,0009 °C/segundo, aproximadamente 0,001 °C/segundo, aproximadamente 0,002 °C/segundo, aproximadamente 0,003 °C/segundo, aproximadamente 0,004 °C/segundo, aproximadamente 0,005 °C/segundo, aproximadamente 0,006 °C/segundo, aproximadamente 0,007 °C/segundo, aproximadamente 0,008 °C/segundo, aproximadamente 0,009 °C/segundo, aproximadamente 0,01 °C/segundo, aproximadamente 0,02 °C /segundo, aproximadamente 0,03 °C/segundo, aproximadamente 0,04 °C/segundo, aproximadamente 0,05 °C/segundo, aproximadamente 0,06 °C/segundo, aproximadamente 0,07 °C/segundo, aproximadamente 0,08 °C/segundo, aproximadamente 0,09 °C/segundo, aproximadamente 0,1 °C/segundo,

aproximadamente 0,2 °C/segundo, aproximadamente 0,3 °C/segundo, aproximadamente 0,4 °C/segundo, aproximadamente 0,5 °C/segundo, aproximadamente 0,6 °C/segundo, aproximadamente 0,7 °C/segundo, aproximadamente 0,8 °C/segundo, aproximadamente 0,9 °C/segundo, aproximadamente 1 °C/segundo, aproximadamente 2 °C/segundo, aproximadamente 3 °C/segundo, aproximadamente 4 °C/segundo y aproximadamente 5 °C/segundo o más. Una unidad térmica (por ejemplo, un calentador) que lleva a cabo el proceso de calentamiento controlado puede mantener una temperatura determinada durante cualquier duración útil. Por ejemplo, una temperatura determinada puede mantenerse durante al menos 1 segundo, 2 segundos, 3 segundos, 4 segundos, 5 segundos, 6 segundos, 7 segundos, 8 segundos, 9 segundos, aproximadamente 10 segundos, aproximadamente 15 segundos, aproximadamente 20 segundos, aproximadamente 25 segundos, aproximadamente 30 segundos, aproximadamente 45 segundos, aproximadamente 60 segundos, aproximadamente 70 segundos, aproximadamente 80 segundos, aproximadamente 90 segundos, aproximadamente 100 segundos, aproximadamente 110 segundos, aproximadamente 120 segundos, aproximadamente 130 segundos, aproximadamente 140 segundos, aproximadamente 150 segundos, aproximadamente 160 segundos, aproximadamente 170 segundos, aproximadamente 180 segundos, aproximadamente 190 segundos, aproximadamente 200 segundos, aproximadamente 210 segundos, aproximadamente 220 segundos, aproximadamente 230 segundos, aproximadamente 240 segundos, aproximadamente 250 segundos o aproximadamente 300 segundos o más.

Las señales pueden recopilarse del subconjunto de la pluralidad de particiones en cualquier punto de tiempo deseado. Por ejemplo, la señal puede recopilarse al menos aproximadamente cada 1 segundo, aproximadamente cada 2 segundos, aproximadamente cada 3 segundos, aproximadamente cada 4 segundos, aproximadamente cada 5 segundos, aproximadamente cada 6 segundos, aproximadamente cada 7 segundos, aproximadamente cada 8 segundos, aproximadamente cada 9 segundos, aproximadamente cada 10 segundos, aproximadamente cada 20 segundos, aproximadamente cada 30 segundos, aproximadamente cada 45 segundos, aproximadamente cada 60 segundos, aproximadamente cada 70 segundos, aproximadamente cada 80 segundos, aproximadamente cada 90 segundos, aproximadamente cada 100 segundos, aproximadamente cada 110 segundos, aproximadamente cada 120 segundos, aproximadamente cada 130 segundos, aproximadamente cada 140 segundos, aproximadamente cada 150 segundos, aproximadamente cada 160 segundos, aproximadamente cada 170 segundos, aproximadamente cada 180 segundos, aproximadamente cada 190 segundos, aproximadamente cada 200 segundos, aproximadamente cada 210 segundos, aproximadamente cada 220 segundos, aproximadamente cada 230 segundos, aproximadamente cada 240 segundos, aproximadamente cada 250 segundos, aproximadamente cada 300 segundos o más. La señal puede recopilarse una o más de una vez por intervalo de temperatura. Por ejemplo, puede recopilarse una señal al final de un intervalo de temperatura antes de elevar la temperatura al siguiente intervalo de temperatura. La recopilación de la señal puede comprender la formación de imágenes, tal como se describe en la presente descripción. El procesamiento de señales recopiladas puede comprender usar las señales para generar datos de señal frente a temperatura para el subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en el subconjunto de la pluralidad de particiones.

La pluralidad de moléculas de ácido nucleico analizadas en el método puede derivar de una muestra que contiene o se sospecha que contiene un patógeno. El patógeno puede ser al menos una bacteria. La bacteria puede seleccionarse del grupo que consiste de, pero que no se limita a, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus polymexa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringensis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosum*, *Propionibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Betaproteobacteria*, *Chlamydiae*, *Epsilonproteobacteria*, *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Spirochaetales* y *Tenericutes*. El método puede implicar una etapa de procesamiento adicional para aislar o extraer las moléculas de ácido nucleico de la bacteria. La realización de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en la muestra de ácidos nucleicos puede comprender la amplificación de al menos una parte de una región espaciadora transcrita interna de un subconjunto de moléculas de ácidos nucleicos de la muestra de ácidos nucleicos. Alternativamente o, además, puede ocurrir la amplificación de un ARN ribosómico (por ejemplo, 16S).

Una muestra para uso en los métodos descritos en la presente descripción puede ser una muestra biológica. Una muestra biológica puede comprender un fluido corporal seleccionado del grupo que consiste en sangre, orina, semen, mucosidad, saliva y cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, la muestra puede ser una muestra ambiental, tal como se describe en la presente descripción.

El método puede comprender además cargar la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en la pluralidad de particiones del dispositivo, donde durante la carga, el gas en el subconjunto de la pluralidad de particiones que incluye la pluralidad de moléculas de ácido nucleico se somete a flujo desde el subconjunto de la pluralidad de particiones al medio externo.

El dispositivo usado en un método de análisis de moléculas de ácido nucleico puede tener cualquiera de las características descritas en la presente descripción. La barrera del dispositivo puede comprender un material polimérico, tal como un material termoplástico, y puede ser una película delgada. La barrera puede ser sustancialmente ópticamente transparente. La barrera puede tener un grosor de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 200 µm (por ejemplo, aproximadamente 50 µm, 100 µm, 150 µm o 200 µm). El dispositivo puede comprender al menos un microcanal que comprende al menos una entrada y al menos una salida y una pluralidad de aberturas de sifón. El subconjunto de la pluralidad de particiones puede estar en comunicación fluida con el microcanal por la pluralidad de aberturas de sifón. La

pluralidad de particiones puede incluir desde aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 20 000 particiones (por ejemplo, aproximadamente 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 10 000, 15 000 o 20 000 particiones).

Las **Figuras 22A - 22B** ilustran esquemáticamente un análisis de fusión de alta resolución (HRM). La **Figura 22A** ilustra las diferencias entre los análisis de HRM digitales y masivos. Como se muestra en el panel superior, en el análisis HRM digital, cada partición incluye como máximo 1 molécula de ADN diana y se resuelven las curvas de fusión de diferentes bacterias. El panel inferior muestra el análisis de HRM en masa, en el que se mide una única curva de fusión no diferenciable a partir de una muestra heterogénea. La **Figura 22B** muestra las curvas de HRM para una muestra mixta que incluye múltiples especies bacterianas diferentes. En el panel superior se muestran las distintas curvas de helicidad de *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. acnes*, mientras que el panel inferior muestra su uso para determinar la ocupación de particiones mediante el uso de las estadísticas de Poisson.

Las **Figuras 23A - 23E** muestran los datos de HRM para varias especies bacterianas. La **Figura 23A** muestra las curvas de HRM derivadas compuestas de 16S y el espaciador transcrito interno (ITS) para 89 bacterias diferentes. En particular, las curvas de fusión correspondientes a las regiones ITS de las moléculas de ácido nucleico bacteriano muestran un intervalo de temperatura más amplio y una mayor diversidad de curvas que las curvas de fusión correspondientes al ARN ribosomal 16S. La **Figura 23B** muestra las curvas de HRM para 7 especies diferentes del género *Bacillus*, mientras que la **Figura 23C** muestra las curvas de HRM para 9 especies diferentes del género *Staphylococcus* y la **Figura 23D** muestra las curvas de ITS HRM para 5 especies diferentes de *S. pneumoniae*. La **Figura 23E** muestra un mapa de calor de la homología de secuencia ITS para 153 especies bacterianas diferentes organizadas por filo.

Las **Figuras 24A - 24B** ilustran esquemáticamente un análisis de HRM. La **Figura 24A** ilustra la partición de ADN de una muestra amplificada con una reacción de PCR en masa que incluye una pluralidad de moléculas de ADN proviral de HIV y ADN humano. La muestra se divide de manera que haya un promedio de aproximadamente 3 billones de pares de bases de ADN humano por partición y el ADN proviral del HIV no se altera. La **Figura 24B** muestra un análisis de HRM hipotético para las particiones en las que se ha producido la PCR. Cada panel muestra una señal fluorescente dependiente de la temperatura correspondiente a las diferentes poblaciones de partición teóricas. El panel más izquierdo ilustra una señal hipotética para una partición que incluye los 5 amplicones siguientes: el panel central ilustra una señal hipotética para una partición que incluye solo los amplicones 1, 2 y 4; y el panel más derecho ilustra una señal hipotética para una partición que incluye solo los amplicones 2 y 5.

Sistema para analizar una muestra

En un aspecto, la presente descripción proporciona un sistema para usar un dispositivo microfluídico (por ejemplo, como se describe en la presente descripción) para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. El sistema puede comprender una unidad de soporte configurada para aceptar un dispositivo que comprende una pluralidad de particiones. Cada partición de un subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo se configura para permitir el flujo de gas desde las particiones a un medio externo a las particiones a través de al menos una barrera que separa el subconjunto de la pluralidad de particiones del medio externo. El sistema también puede comprender un detector configurado para recopilar las señales del subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo en una pluralidad de puntos de tiempo. El sistema también puede incluir uno o más procesadores informáticos acoplados operativamente al detector. El uno o más procesadores informáticos pueden programarse individual o colectivamente para someter al subconjunto de la pluralidad de particiones a condiciones suficientes para realizar las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, como se describe en la presente descripción, mediante el uso de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico para generar los productos de amplificación a partir de al menos un subconjunto de la pluralidad de moléculas de ácido nucleico. El uno o más procesadores informáticos también pueden programarse para recibir, mientras las reacciones de amplificación están en curso, las señales recopiladas del subconjunto de la pluralidad de particiones por el detector en la pluralidad de puntos de tiempo. Las señales pueden recopilarse y almacenarse en el detector y enviarse a los procesadores en un momento dado o pueden proporcionarse a los procesadores a medida que se recopilan las señales. El uno o más procesadores informáticos pueden programarse para dirigir la recopilación de señales del subconjunto de la pluralidad de particiones. También pueden programarse para procesar las señales recopiladas para determinar un número de moléculas de ácido nucleico en el subconjunto de la pluralidad de particiones. El sistema puede comprender además una unidad de flujo de fluido (por ejemplo, una unidad neumática) que se configura para dirigir la pluralidad de moléculas de ácido nucleico a la pluralidad de particiones. El uno o más procesadores informáticos pueden programarse individual o colectivamente para dirigir la unidad de flujo de fluido para cargar la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en la pluralidad de particiones.

La presente descripción también proporciona un sistema para usar un dispositivo microfluídico (por ejemplo, como se describe en la presente descripción) para analizar una muestra que contiene o se sospecha que contiene una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. Dicho análisis puede implicar una evaluación termodinámica de las características de disociación de una molécula de ácido nucleico, tal como el ADN en la muestra. La evaluación termodinámica puede incluir la determinación del punto de fusión del ADN y la fuerza de unión de las hebras individuales de la molécula de ADN.

El sistema puede comprender una unidad de soporte y un detector, como se ha descrito anteriormente. El sistema puede comprender además una unidad térmica configurada para someter al subconjunto de la pluralidad de particiones a un calentamiento controlado. El sistema también puede incluir uno o más procesadores informáticos acoplados operativamente al detector. El uno o más procesadores informáticos pueden programarse individual o colectivamente para dirigir la unidad

- térmica para someter al subconjunto de la pluralidad de particiones a calentamiento controlado. El uno o más procesadores informáticos también pueden programarse para recibir las señales recopiladas del subconjunto de la pluralidad de particiones por el detector mientras el subconjunto de la pluralidad de particiones se somete a calentamiento controlado. También pueden programarse para procesar las señales recopiladas para producir los datos indicativos de un punto de fusión del subconjunto de la pluralidad de particiones. El sistema puede comprender además una unidad de flujo de fluido (por ejemplo, una unidad neumática) que se configura para dirigir la pluralidad de moléculas de ácido nucleico a la pluralidad de particiones. El uno o más procesadores informáticos pueden programarse individual o colectivamente para dirigir la unidad de flujo de fluido para cargar la pluralidad de moléculas de ácido nucleico en la pluralidad de particiones.
- 5 El sistema puede comprender una unidad de soporte, tal como una etapa de transferencia, una plataforma, una ranura o una ranura configurada para contener uno o más dispositivos microfluídicos. Los dispositivos microfluídicos pueden comprender un microcanal con una entrada y una salida, una pluralidad de microcámaras conectadas al microcanal por una pluralidad de aberturas de sifón y una película delgada (por ejemplo, una película delgada termoplástica) que tapa o cubre el dispositivo microfluídico. El aparato puede comprender una unidad neumática en comunicación fluida con el dispositivo microfluídico. La unidad neumática puede cargar el reactivo en el dispositivo microfluídico y repartir el reactivo en las microcámaras. El sistema puede comprender una unidad térmica en comunicación térmica con la pluralidad de microcámaras. La unidad térmica puede controlar la temperatura de las microcámaras y el ciclo térmico de las microcámaras. El sistema puede comprender un detector para recopilar las señales de las microcámaras del dispositivo, o un subconjunto del mismo. El detector puede ser una unidad óptica capaz de formar imágenes de la pluralidad de microcámaras. El sistema también puede comprender uno o más procesadores informáticos acoplados a la unidad de soporte, la unidad neumática, la unidad térmica y el detector (por ejemplo, la unidad óptica). El uno o más procesadores informáticos pueden programarse para (i) dirigir la unidad neumática para que cargue el reactivo en el dispositivo microfluídico y dividir el reactivo en la pluralidad de microcámaras, (ii) dirigir la unidad térmica para que cicle térmicamente la pluralidad de microcámaras, y (iii) dirigir el detector (por ejemplo, unidad óptica) para recopilar señales de (por ejemplo, imagen) la pluralidad de microcámaras.
- 10 15 20 25
- La unidad de soporte puede configurarse como entrada al dispositivo microfluídico, sujetar el dispositivo microfluídico y sacar el dispositivo microfluídico. La unidad de soporte puede estar estacionaria en una o más coordenadas. Alternativamente, o, además, la unidad de soporte puede ser capaz de moverse en la dirección X, dirección Y, dirección Z o cualquier combinación de las mismas. La unidad de soporte puede ser capaz de contener un único dispositivo microfluídico. Alternativamente, o, además, la etapa de transferencia puede contener al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, o más dispositivos microfluídico.
- 30 35
- La unidad neumática puede estar configurada para estar en comunicación fluida con las entradas y salidas del dispositivo microfluídico. La unidad neumática puede tener múltiples puntos de conexión capaces de conectarse a múltiples entradas y múltiples salidas. La unidad neumática puede ser capaz de llenar, rellenar y particionar una única matriz de microcámaras a la vez o múltiples matrices de microcámaras en tándem. La unidad neumática puede comprender además una unidad de vacío. La unidad neumática puede proporcionar una mayor presión al dispositivo microfluídico o proporcionar vacío al dispositivo microfluídico.
- 40 45
- La unidad térmica puede configurarse para estar en comunicación térmica con las microcámaras de los dispositivos microfluídicos. La unidad térmica puede estar configurada para controlar la temperatura de una única matriz de microcámaras o para controlar la temperatura de múltiples matrices de microcámaras. La unidad de control térmico puede realizar el mismo programa térmico en todas las matrices de microcámaras o puede realizar diferentes programas térmicos con diferentes matrices de microcámaras. La unidad térmica puede configurarse para realizar los ciclos térmicos y calentamiento controlado. Alternativamente, un sistema puede incluir varias unidades térmicas, cada una de las cuales se configura para llevar a cabo un proceso térmico independiente, tal como ciclos térmicos y calentamiento controlado.
- 50 55 60 65
- El detector puede configurarse para recopilar las señales de todas o de un subconjunto de la pluralidad de particiones del dispositivo. Por ejemplo, el detector puede recopilar las señales ópticas, de impedancia o cualquier otro tipo de señal útil. El detector puede ser una unidad óptica. La unidad óptica puede configurarse para emitir y detectar múltiples longitudes de onda de luz. Las longitudes de onda de emisión pueden corresponder a las longitudes de onda de excitación de las sondas indicadoras y de amplificación usadas. La luz emitida puede incluir longitudes de onda con una intensidad máxima de aproximadamente 450 nm, 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm o cualquier combinación de las mismas. La luz detectada puede incluir longitudes de onda con una intensidad máxima de aproximadamente 500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm, 600 nm, 625 nm, 650 nm, 675 nm, 700 nm o cualquier combinación de las mismas. La unidad óptica puede configurarse para emitir una, dos, tres, cuatro o más longitudes de onda de luz. La unidad óptica puede configurarse para detectar una, dos, tres, cuatro o más longitudes de onda de luz. La longitud de onda de la luz emitida puede corresponder a la longitud de onda de excitación de la molécula indicadora. Otra longitud de onda de luz emitida puede corresponder a la longitud de onda de excitación de la sonda de amplificación. Una longitud de onda de luz detectada puede corresponder a la longitud de onda de emisión de una molécula indicadora. Otra longitud de onda de luz detectada puede corresponder a una sonda de amplificación utilizada para detectar una reacción dentro de las microcámaras. La unidad óptica puede configurarse para generar imágenes de subconjuntos de microcámaras o secciones de una matriz de microcámaras. Alternativamente, o, además, la unidad óptica puede generar imágenes de una matriz completa de microcámaras en una sola imagen.

La **Figura 6** ilustra una máquina **600** para realizar el proceso de la **Figura 5** en una sola máquina. La máquina **600** incluye una unidad neumática **601**, que contiene bombas y colectores y se puede mover en dirección Z, operable para realizar la aplicación de presión como se describe en las **Figuras 3A-3D**. La máquina **600** también incluye una unidad térmica **602**, tal como un ciclador térmico de bloque plano, para ciclar térmicamente el dispositivo microfluídico y, por lo tanto, hacer que se lleve a cabo la reacción en cadena de la polimerasa. La máquina **600** incluye además una unidad óptica **603**, tal como una unidad óptica epifluorescente, que puede determinar ópticamente qué microcámaras en el dispositivo microfluídico han llevado a cabo con éxito la reacción de PCR. La unidad óptica **603** puede enviar esta información a un procesador **604**, que usa estadísticas de Poisson para convertir el recuento bruto de microcámaras exitosas en una concentración de ácido nucleico. Puede usarse una unidad de soporte **605** (p. ej., una etapa de transferencia) para mover un dispositivo microfluídico dado entre las diversas unidades y para manejar múltiples dispositivos microfluídicos simultáneamente. El dispositivo microfluídico descrito anteriormente, combinado con la incorporación de esta funcionalidad en una sola máquina, reduce el costo, la complejidad del flujo de trabajo y los requisitos de espacio para la dPCR en comparación con otras implementaciones de dPCR.

La **Figura 12A** ilustra un dispositivo según una realización de la presente descripción. El dispositivo que se ilustra contiene ocho matrices de reacción independientes, cada una de las cuales puede llenarse de forma independiente con reactivo. Cada matriz de reacción contiene 20 000 particiones individuales. La **Figura 12B** ilustra una disposición de una parte de las particiones dentro de una matriz de reacción del dispositivo. Esta ilustración muestra una vista de primer plano de la trayectoria serpenteante del conducto de carga y las particiones que se cargarán saliendo del conducto de carga. Cada forma circular representa una partición individual que se puede cargar con reactivo que contiene cero, una o más plantillas de ácido nucleico, y que se amplificará y analizará individualmente como se describe en la presente descripción.

La **Figura 13** ilustra una representación esquemática de un dispositivo junto con una unidad neumática para uso en el control de fluidos del dispositivo. Cada puerto proporciona una interfaz de fluido en una de las ocho matrices de reacción (en esta realización) en el dispositivo **1300**. Como se describe en la presente descripción, una secuencia de presiones altas y bajas aplicadas en la entrada y la salida de cada matriz de reacción carga el reactivo en las particiones dentro de la matriz de reacción. La unidad neumática **1301** controla la aplicación de estas presiones e incluye un regulador de presión electrónico **1302** y al menos dos válvulas **1303** y **1304**. Pueden incorporarse más válvulas (por ejemplo, para proporcionar una carga separada de cada matriz de reacción individual). El dispositivo puede incluir teclas mecánicas para ayudar en la orientación y el registro (como la lengüeta **1305** en la parte superior del dispositivo) dentro de un sistema de la presente descripción, o puede incluir características visuales como marcas de registro (no mostradas).

La **Figura 14A** ilustra una unidad de ciclo térmico de bloque plano para uso en realizaciones de la presente descripción. La unidad de ciclo térmico de bloque plano proporciona control térmico para permitir los ciclos de amplificación por PCR de acuerdo con las modalidades de la presente descripción. El bloque plano incluye orificios roscados (no mostrados) de manera que pueda montarse una abrazadera neumática directamente en el bloque plano. Esto permite sujetar un dispositivo, por ejemplo, como se describe en la presente descripción, al bloque plano para el ciclo térmico de la muestra y reactivos contenidos dentro del dispositivo.

La **Figura 4B** ilustra la unidad de ciclo térmico de bloque plano **1401** de la **Figura 4A** con la adición de una abrazadera neumática **1402**, con la abrazadera abierta de manera que un dispositivo **1403** tal como el dispositivo de la **Figura 12A** puede cargarse en la unidad térmica. En la ilustración, el dispositivo **1403** se está cargando en el sistema combinado de unidad térmica/abrazadera para un ciclo de amplificación de PCR. Después de cargar el dispositivo **1403** en la unidad térmica/sistema de abrazadera, puede aplicarse presión neumática a través de un accionamiento neumático para apretar con la abrazadera neumática **1402** y mantener el dispositivo en su lugar. El accionamiento neumático puede estar integrado con la unidad neumática descrita anteriormente con respecto a la **Figura 13** o puede ser un sistema neumático separado. En sistemas en los que la unidad neumática está integrada, puede colocarse un dispositivo vacío en la unidad de ciclos y el dispositivo puede cargarse con reactivo mientras permanece en su lugar en el bloque. La carga de reactivos y/o muestras también puede llevarse a cabo con una unidad neumática separada antes de que el dispositivo cargado de reactivos/muestras se cargue en el sistema, por ejemplo, para la amplificación.

La **Figura 15** ilustra un sistema completo de qdPCR **1500** para uso en las realizaciones de la presente descripción. El sistema **1500** incluye la unidad térmica **1501**, la unidad óptica **1502** (que incluye los componentes **1502A**, **1502B** y **1502C**), la unidad neumática **1503** y la unidad mecánica **1504**. Cada unidad coopera con las demás para realizar el proceso de qdPCR de acuerdo con las modalidades de la presente descripción.

La unidad térmica **1501** proporciona ciclos térmicos y/o calentamiento controlado del dispositivo cargado con reactivo y/o muestra o un subconjunto de la pluralidad de particiones del mismo. La unidad térmica **1501** proporciona la capacidad de someter el dispositivo a un ciclo térmico y/o calentamiento controlado. Como se describe en la presente descripción, un ciclo térmico puede incluir una fase de desnaturalización, una fase de hibridación y una fase de extensión. Un solo ciclo de amplificación por PCR puede ocurrir durante un período de, por ejemplo, entre aproximadamente 60 y 120 segundos. También pueden emplearse otros perfiles de temperatura en uso con modalidades de acuerdo con la presente descripción. Por ejemplo, la unidad térmica **1501** puede configurarse para calentar el dispositivo a una temperatura de mantenimiento que permita el almacenamiento de los productos de la reacción de amplificación por PCR sin más cambios. La unidad térmica **1501** también puede configurarse para realizar un calentamiento controlado para, p. ej., un análisis de fusión de alta resolución, como se describe en la presente memoria. La unidad térmica **1501** puede incluir

componentes tales como una unidad de control de temperatura, una sonda de temperatura, circuitos y cualquier otro componente útil. La unidad térmica **1501** puede incluir una unidad de soporte para soportar el dispositivo y puede incorporar una abrazadera neumática **1505** para sujetar el dispositivo a la unidad térmica **1501**.

5 La unidad óptica **1502** proporciona imágenes del dispositivo, o un subconjunto de la pluralidad de particiones del mismo durante, antes y/o después de un proceso de amplificación o calentamiento controlado. La unidad óptica **1502** puede configurarse para generar imágenes de cada partición, p. ej., al menos una vez por ciclo de amplificación. Pueden generarse imágenes de cada partición con más frecuencia (por ejemplo, dos veces por ciclo de amplificación o diez veces por ciclo de amplificación), como se describe en la presente descripción. La unidad óptica **1502** también puede configurarse para generar
10 imágenes de cada partición en una pluralidad de puntos de tiempo durante un proceso de calentamiento controlado.

La unidad óptica **1502** puede obtener imágenes del dispositivo en sección (p. ej., imágenes de una cuadrícula de 5 x 5 de particiones en cada imagen), en su conjunto, o en base por matriz (p. ej., imágenes de las 20.000 particiones en una matriz determinada en una sola imagen). Mover la unidad óptica **1502** puede no ser necesario si la unidad óptica **1502** es capaz de obtener imágenes de todo el dispositivo en un solo disparo. Para la formación de imágenes en sección, la unidad óptica **1502** puede configurarse para orientarse hacia el dispositivo (p. ej., mediante el uso de una llave mecánica o marcas de registro) y después escanear a través de las particiones del dispositivo. Alternativamente, la unidad óptica **1502** puede fijarse en su lugar y la unidad térmica **1501** puede moverse para permitir que la unidad óptica **1502** visualice cada partición o grupo de particiones. La unidad óptica **1502** puede configurarse para orientarse mediante el uso de las marcas de registro impresas en el dispositivo. La unidad óptica **1502** puede orientarse por la posición de la unidad térmica **1501** o por el posicionamiento de la unidad óptica **1502**, la unidad térmica **1501** y cualquier unidad de manipulación relacionada. La unidad óptica **1502** incluye la fuente de luz **1502A**, el filtro de excitación **1502B**, el espejo dicróico **1502C**, el filtro de emisión **1502D**, la lente de enfoque **1502E** y el sensor de imagen **1502F**, como se describe en la presente memoria.

25 La unidad neumática **1503** proporciona la funcionalidad para el manejo de fluidos y/o sujeción del dispositivo. La misma unidad neumática **1503** puede proporcionar las capacidades de manejo de fluidos/carga de reactivos al dispositivo y funcionalidad de sujeción neumática para la abrazadera neumática **1505** montada en la unidad térmica **1501**. Alternativamente, la unidad neumática **1503** solo puede proporcionar funcionalidad de sujeción para la abrazadera neumática **1505**, y una unidad neumática separada (no mostrada) proporciona carga de reactivo para el dispositivo.

30 La unidad mecánica **1504** proporciona la manipulación mecánica y movimiento de los diversos componentes. En la realización ilustrada, la unidad mecánica **1504** proporciona la capacidad de escanear la unidad óptica **1502** a través de las particiones del dispositivo. En esta realización, la unidad mecánica **1504** mueve la unidad óptica **1502** a la siguiente posición de formación de imágenes, le permite generar imágenes y después repite el proceso hasta que se han generado imágenes de todas las particiones. Este proceso puede repetirse tantas veces como sea necesario, en dependencia del número de ciclos de amplificación y del número de imágenes por ciclo que se deseen y/o del proceso de calentamiento controlado de interés. La unidad mecánica **1504** puede mover la unidad térmica **1501** en lugar de la unidad óptica **1502**. Por ejemplo, la unidad mecánica **1504** puede mover la unidad térmica **1501** a una posición de imagen para que la unidad óptica **1502** pueda tomar una imagen, y después la unidad térmica **1501** puede moverse de nuevo para permitir la imagen de una nueva posición de imagen. Este proceso puede repetirse según sea necesario. La unidad mecánica **1504** puede proporcionar una funcionalidad adicional, tal como el manejo mecánico del dispositivo para cargarlo en la unidad térmica **1501** antes de la realización del proceso de qdPCR o para descargarlo automáticamente de la unidad térmica **1501** después de que se complete el proceso de qdPCR.

45 Un sistema de la presente descripción puede incluir las múltiples instancias de una o más de la unidad térmica **1501**, la unidad óptica **1502**, la unidad neumática **1503** y la unidad mecánica **1504** pueden incorporarse en el mismo sistema para proporcionar un sistema automático que puede procesar múltiples dispositivos al mismo tiempo, o que puede permitir la realización de diferentes etapas en diferentes dispositivos en secuencia. Además, el sistema puede incorporar un procesador para implementar el análisis de la dinámica de amplificación detectada por la unidad óptica **1502** o para otra funcionalidad analítica como se describe anteriormente con respecto a la presente descripción.

50 Las Figuras **17A-17B** muestran un sistema de ejemplo para procesar una molécula de ácido nucleico. La Figura **17A** muestra el sistema de ejemplo completo para procesar una molécula de ácido nucleico que incluye la interfaz de usuario **1701** acoplada al procesador de computadora **1702**, la unidad térmica **1703** y la cámara **1704**. La Figura **17B** muestra una imagen de primer plano que ilustra la cámara **1704**, el emisor de LED/disipador de calor **1705**, el cubo de filtro **1706** y el obturador **1707** sobre el dispositivo **1708**.

60 El alcance de la presente descripción no debe limitarse a las modalidades específicas descritas en la presente descripción. De hecho, otras diversas modalidades y modificaciones de la presente descripción, además de las descritas en la presente descripción, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y los dibujos adjuntos.

65 Por ejemplo, mientras se describe en el contexto de una aplicación de dPCR, otros dispositivos microfluidicos que pueden requerir varias microcámaras aisladas llenas de un líquido, que se aíslan a través de un gas u otro fluido, pueden beneficiarse del uso de una película termoplástica delgada para permitir la desgasificación para evitar el ensuciamiento por gas al mismo tiempo que proporciona una ventaja con respecto a la capacidad de fabricación y el costo. Además de la PCR, pueden adaptarse otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos, tal como la amplificación isotérmica

mediada por bucle, para realizar la detección digital de secuencias de ácidos nucleicos específicas de acuerdo con las modalidades de la presente descripción. Las microcámaras también pueden usarse para aislar celdas individuales con las aberturas de sifón diseñadas para estar cerca del diámetro de las celdas que van a aislarse. Cuando las aberturas de sifón son mucho más pequeñas que el tamaño de las células sanguíneas, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse, por ejemplo, para separar el plasma sanguíneo de la sangre completa.

Sistemas informáticos para analizar una muestra de ácido nucleico

La presente descripción proporciona los sistemas de control informático que están programados para implementar los métodos de la descripción. La **Figura 7** muestra un sistema informático **701** que puede programarse o configurarse de cualquier otra manera para el procesamiento y análisis de muestras de ácidos nucleicos, que incluye la partición, amplificación y detección de muestras. El sistema informático **701** puede regular varios aspectos de los métodos y sistemas de la presente descripción. El sistema informático **701** puede ser un dispositivo electrónico de un usuario o un sistema informático que puede ubicarse de forma remota con respecto al dispositivo electrónico. El dispositivo electrónico puede ser un dispositivo electrónico móvil.

El sistema informático **701** incluye una unidad de procesamiento central (CPU, también “procesador” y “procesador de computadora” en la presente memoria) **705**, que puede ser un procesador de un solo núcleo o de múltiples núcleos, o una pluralidad de procesadores para procesamiento en paralelo. El sistema informático **701** también incluye memoria o ubicación de memoria **710** (p. ej., memoria de acceso aleatorio, memoria de solo lectura, memoria flash), unidad de almacenamiento electrónico **715** (p. ej., disco duro), interfaz de comunicación **720** (p. ej., adaptador de red) para comunicarse con uno o más sistemas y dispositivos periféricos **725**, tales como memoria caché, otra memoria, almacenamiento de datos y/o adaptadores de visualización electrónica. La memoria **710**, la unidad de almacenamiento **715**, la interfaz **720** y los dispositivos periféricos **725** están en comunicación con la CPU **705** a través de un bus de comunicación (líneas sólidas), tal como una placa madre. La unidad de almacenamiento **715** puede ser una unidad de almacenamiento de datos (o depósito de datos) para almacenar datos. El sistema informático **701** puede acoplarse operativamente a una red informática (“red”) **730** con la ayuda de la interfaz de comunicación **720**. La red **730** puede ser internet, una internet y/o extranet, o una intranet y/o extranet que puede estar en comunicación con internet. La red **730** en algunos casos puede ser una red de telecomunicaciones y/o datos. La red **730** puede incluir uno o más servidores informáticos, que pueden habilitar la computación distribuida, tal como la computación en la nube. La red **730**, en algunos casos con la ayuda del sistema informático **701**, puede implementar una red de iguales, que puede permitir que los dispositivos acoplados al sistema informático **701** se comporten como un cliente o un servidor.

La CPU **705** puede ejecutar una secuencia de instrucciones legibles por máquina, que pueden incorporarse en un programa o software. Las instrucciones pueden almacenarse en una ubicación de memoria, tal como la memoria **710**. Las instrucciones pueden dirigirse a la CPU **705**, que posteriormente puede programar o configurar de otra manera la CPU **705** para implementar los métodos de la presente descripción. Los ejemplos de operaciones realizadas por la CPU **705** pueden incluir la obtención, la decodificación, la ejecución y la reescritura.

La CPU **705** puede ser parte de un circuito, tal como un circuito integrado. Uno o más componentes del sistema **701** pueden incluirse en el circuito. En algunos casos, el circuito es un circuito integrado de aplicación específica (ASIC).

La unidad de almacenamiento **715** puede almacenar archivos, tales como controladores, bibliotecas y programas guardados. La unidad de almacenamiento **715** puede almacenar datos de usuario, p. ej., preferencias de usuario y programas de usuario. El sistema informático **701** en algunos casos puede incluir una o más unidades de almacenamiento de datos adicionales que son externas al sistema informático **701**, tal como las ubicadas en un servidor remoto que está en comunicación con el sistema informático **701** a través de una intranet o Internet.

El sistema informático **701** puede comunicarse con uno o más sistemas informáticos remotos a través de la red **730**. Por ejemplo, el sistema informático **701** puede comunicarse con un sistema informático remoto de un usuario (p. ej., un proveedor de servicios). Los ejemplos de sistemas informáticos remotos incluyen computadoras personales (por ejemplo, PC portátil), pizarras o tabletas (p. ej., Apple® iPad, Samsung® Galaxy Tab), teléfonos, teléfonos inteligentes (p. ej., Apple® iPhone, dispositivos con Android, BlackBerry®) o asistentes digitales personales. El usuario puede acceder al sistema informático **701** a través de la red **730**.

Los métodos descritos en la presente descripción pueden implementarse por medio de un código ejecutable de máquina (p. ej., un procesador de computadora) almacenado en una ubicación de almacenamiento electrónico del sistema informático **701**, tal como, por ejemplo, en la memoria **710** o la unidad de almacenamiento electrónico **715**. El código ejecutable por máquina o legible por máquina puede proporcionarse en forma de software. Durante el uso, el código puede ser ejecutado por el procesador **705**. En algunos casos, el código puede recuperarse de la unidad de almacenamiento **715** y almacenarse en la memoria **710** para que el procesador **705** pueda acceder fácilmente a él. En algunas situaciones, la unidad de almacenamiento electrónico **715** puede excluirse y las instrucciones ejecutables por máquina se almacenan en la memoria **710**.

El código puede precompilarse y configurarse para su uso con una máquina que tenga un procesador adaptado para ejecutar el código, o puede compilarse durante el tiempo de ejecución. El código puede suministrarse en un lenguaje de programación que puede seleccionarse para permitir que el código se ejecute de forma precompilada o compilada.

5 En un aspecto, la presente descripción proporciona un medio legible por computadora no transitorio que comprende un código ejecutable por máquina que, al ser ejecutado por uno o más procesadores de computadora, implementa un método para formar un dispositivo microfluídico para amplificar y cuantificar una muestra de ácidos nucleicos. El método puede comprender: moldear por inyección el termoplástico para crear una estructura microfluídica que comprende al menos un microcanal, una pluralidad de microcámaras y una pluralidad de aberturas de sifón, en donde la pluralidad de microcámaras se conecta a al menos un microcanal mediante la pluralidad de aberturas de sifón; formar al menos una entrada y al menos una salida, en donde la al menos una entrada y la al menos una salida están en comunicación fluida con el al menos un microcanal; y aplicar una película delgada termoplástica para cubrir la estructura microfluídica, en donde la película delgada termoplástica es al menos parcialmente permeable al gas a una diferencia de presión se aplica a través de la película delgada termoplástica.

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un medio legible por computadora no transitorio que comprende un código ejecutable por máquina que, al ser ejecutado por uno o más procesadores de computadora, implementa un método para analizar y cuantificar una muestra de ácidos nucleicos. El método puede comprender uno o más de los siguientes: proporcionar el dispositivo microfluídico que comprende una pluralidad de microcámaras; llenar el dispositivo microfluídico con muestra y/o uno o más reactivos, como se describe en la presente memoria (p. ej., usando una unidad neumática o de flujo fluido y una serie de diferenciales de presión); calentar la pluralidad de microcámaras del dispositivo, o un subconjunto de las mismas, ya sea cíclicamente (p. ej., ciclos térmicos para reacciones de amplificación) y/o en un aumento controlado (p. ej., para fusión de alta resolución u otro análisis termodinámico); recopilar señales de la pluralidad de microcámaras, o un subconjunto de las mismas, mientras que las reacciones de amplificación o calentamiento controlado o en curso o después de estos procesos se han completado; y procesar señales recopiladas de la pluralidad de microcámaras para determinar un número de moléculas de ácido nucleico en el subconjunto de la pluralidad de particiones y/o para producir datos indicativos de un punto de fusión correspondiente a la pluralidad de moléculas de ácido nucleico, o un subconjunto de los mismos, en el subconjunto de la pluralidad de particiones. El uno o más procesadores también puede programarse para implementar un método de llenado de las microcámaras de un dispositivo, o un subconjunto del mismo, con muestra y/o reactivo. El método puede comprender: proporcionar el dispositivo microfluídico que comprende al menos un microcanal, en donde el al menos un microcanal comprende al menos una entrada y al menos una salida, y en donde el dispositivo microfluídico comprende además una pluralidad de microcámaras conectadas al microcanal mediante una pluralidad de aberturas de sifón, y una película delgada termoplástica dispuesta adyacente a una superficie del dispositivo microfluídico de manera que la película delgada termoplástica cubra el microcanal, la pluralidad de microcámaras y la pluralidad de aberturas de sifón; proporcionar un reactivo a la al menos una entrada o la al menos una salida; llenar el dispositivo microfluídico proporcionando un primer diferencial de presión entre la muestra y/o el reactivo y el dispositivo microfluídico, en donde el primer diferencial de presión hace que la muestra y/o el reactivo fluyan hacia el dispositivo microfluídico; aplicar un segundo diferencial de presión entre el microcanal y la pluralidad de microcámaras para mover la muestra y/o reactivo en la pluralidad de microcámaras y para forzar el gas dentro de la pluralidad de microcámaras a pasar a través de la película delgada termoplástica al tapar o cubrir la pluralidad de microcámaras, la pluralidad de aberturas de sifón y el microcanal, en donde el segundo diferencial de presión es mayor que el primer diferencial de presión; y aplicar un tercer diferencial de presión entre la al menos una entrada y la al menos una salida para introducir un fluido en el microcanal sin introducir el fluido en las microcámaras, en donde el tercer diferencial de presión es menor que el segundo diferencial de presión.

45 Los aspectos de los sistemas y métodos proporcionados en la presente memoria, tal como el sistema informático **701**, pueden incorporarse en la programación. Varios aspectos de la tecnología pueden considerarse como “productos” o “artículos de fabricación”, normalmente en forma de código ejecutable por máquina (o procesador) y/o datos asociados que se transportan o incorporan en un tipo de medio legible por máquina. El código ejecutable por máquina puede almacenarse en una unidad de almacenamiento electrónico, tal como una memoria (por ejemplo, memoria de solo lectura, memoria de acceso aleatorio, memoria flash) o un disco duro. Los medios de tipo “almacenamiento” pueden incluir parte o la totalidad de la memoria tangible de las computadoras, procesadores o similares, o unidades o módulos asociados de los mismos, tal como varias memorias de semiconductores, unidades de cinta, unidades de disco y similares, que pueden proporcionar almacenamiento no transitorio en cualquier momento para la programación del software. En ocasiones, todo el software o partes del mismo pueden comunicarse a través de Internet o de otras redes de telecomunicaciones. Tales comunicaciones, por ejemplo, pueden permitir la carga del software desde un ordenador o procesador a otro, por ejemplo, desde un servidor de gestión o un ordenador central a la plataforma informática de un servidor de aplicaciones. Por lo tanto, otro tipo de medios que pueden soportar los elementos de software incluyen ondas ópticas, eléctricas y electromagnéticas, tal como las que se utilizan a través de interfaces físicas entre dispositivos locales, a través de redes fijas alámbricas y ópticas y a través de varios enlaces aéreos. Los elementos físicos que transportan dichas ondas, tales como enlaces alámbricos o inalámbricos, enlaces ópticos o similares, también pueden considerarse como soportes del software. Tal como se usa en la presente descripción, a menos que se limite a medios de “almacenamiento” tangibles y no transitorios, los términos como “medio legible” por computadora o máquina se refieren a cualquier medio que participe en proporcionar instrucciones a un procesador para su ejecución.

65 Por lo tanto, un medio legible por una máquina, como un código ejecutable por computadora, puede tomar muchas formas, que incluyen, entre otras, un medio de almacenamiento tangible, un medio de onda portadora o un medio de

transmisión física. Los medios de almacenamiento no volátiles incluyen, por ejemplo, discos ópticos o magnéticos, tal como cualquiera de los dispositivos de almacenamiento en cualquier computadora o similar, tal como los que pueden usarse para implementar las bases de datos, etc., que se muestran en los dibujos. Los medios de almacenamiento volátiles incluyen la memoria dinámica, tal como la memoria principal de dicha plataforma informática. Los medios de transmisión tangibles incluyen cables coaxiales cable de cobre y fibra óptica, que incluyen los cables que componen un bus dentro de un sistema informático. Los medios de transmisión de ondas portadoras pueden adoptar la forma de señales eléctricas o electromagnéticas, u ondas acústicas o luminosas tal como las generadas durante las comunicaciones de datos por radiofrecuencia (RF) e infrarrojo (IR). Por lo tanto, las formas comunes de medios legibles por computadora incluyen, por ejemplo: un disquete, un disco flexible, un disco duro, una cinta magnética, cualquier otro medio magnético, un CD-ROM, DVD o DVD-ROM, cualquier otro medio óptico, cinta de papel de tarjetas perforadas, cualquier otro medio de almacenamiento físico con patrones de agujeros, una RAM, una ROM, una PROM y una EPROM, una FLASH-EPROM, cualquier otro chip o cartucho de memoria, una onda portadora que transporta datos o instrucciones, cables o enlaces que transportan dicha onda portadora, o cualquier otro medio desde el cual una computadora pueda leer código de programación y/o datos. Muchas de estas formas de medios legibles por computadora pueden estar involucradas en llevar una o más secuencias de una o más instrucciones a un procesador para su ejecución.

El sistema informático **701** puede incluir o estar en comunicación con una pantalla electrónica **735** que comprende una interfaz de usuario (UI) **740** para proporcionar, por ejemplo, el perfil de profundidad de un tejido epitelial. Los ejemplos de UI incluyen, sin limitación, una interfaz gráfica de usuario (GUI) y una interfaz de usuario basada en web.

Los métodos y sistemas de la presente descripción pueden implementarse mediante uno o más algoritmos. Puede implementarse un algoritmo por medio de software tras la ejecución por parte del procesador central **705**. El algoritmo puede, por ejemplo, regular sistemas o implementar métodos proporcionados en la presente descripción.

Aunque las modalidades preferidas de la presente descripción se han mostrado y descrito en la presente descripción, será obvio para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan solo a modo de ejemplo. Numerosas variaciones, cambios, y sustituciones se les ocurrirán ahora a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención descrita en la presente descripción. Debe entenderse que en la práctica de la invención pueden emplearse diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente descripción. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que se cubran métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes.

Ejemplo 1: Demostración de partición de reactivo

La partición de reactivos se demuestra mediante el uso de un dispositivo microfluídico fabricado mediante el uso de dimensiones de portaobjetos de microscopio estándar. Las dimensiones totales del dispositivo microfluídico son 1 pulgada de ancho, 3 pulgadas de largo y 0,6 pulgadas de grosor. El dispositivo contiene cuatro diseños diferentes de matrices de microcámaras y un total de ocho matrices diferentes de microcámaras. La **Figura 8A** muestra el dispositivo de ocho unidades y una perspectiva ampliada de uno de los cuatro diseños de matriz. El dispositivo microfluídico se moldea a partir de un polímero de cicloolefina (COP), Zeonor 790R (Zeon Chemicals, Japón) y se sella mediante unión térmica con una película delgada de COP de 100 μm , Zeonox ZF14 (Zeon Chemicals, Japón). El segmento microfluídico ampliado que se muestra tiene un microcanal serpenteante conectado a microcámaras por aberturas de sifón. Las microcámaras están en una configuración cuadrículada. Las microcámaras y el microcanal tienen una profundidad de 40 μm , las aberturas del sifón tienen una profundidad de 10 μm . Cada segmento microfluídico aislado tiene un canal de entrada y uno de salida. Los canales de entrada y salida se perforan mecánicamente antes de que la película se una térmicamente a la base del dispositivo microfluídico. Los canales de entrada y salida tienen un diámetro de 1,6 mm.

La **Figura 8B** muestra las imágenes fluorescentes de carga de reactivos, relleno de microcámaras y partición. Antes de cargar el dispositivo microfluídico, se pipetea 2 microlitros (μl) de dextrano conjugado con fluoresceína de 4 kiloDalton (kDa) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en la entrada. A continuación, el dispositivo microfluídico se pone en contacto con un controlador neumático. El controlador neumático carga el microcanal del dispositivo microfluídico aplicando 4 psi de presión a la entrada durante 3 minutos. Las microcámaras se llenan presurizando tanto la entrada como la salida a 10 psi durante 20 minutos. Luego, el reactivo se reparte haciendo fluir aire a 4 psi desde la entrada del dispositivo microfluídico para eliminar el reactivo del microcanal.

La **Figura 20A** muestra las imágenes correspondientes a la carga viral diferencial de una serie de dispositivos. Los paneles incluyen las imágenes de las particiones que incluyen 5, 0,5, 0,05 y 0,005 copias de ácido nucleico por partición. Estas imágenes se tomaron después del ciclo térmico y se tomaron imágenes mediante el uso de un generador de imágenes fluorescente para fluoróforos FAM y ROX. La **Figura 20B** muestra el análisis de Poisson correspondiente de las imágenes de la **Figura 20A** mediante el uso del software Image J y R. De manera similar, la **Figura 21** muestra las imágenes correspondientes a la carga diferencial de una serie de dispositivos. Los paneles incluyen las imágenes de las particiones que incluyen 10, 1,0, 0,1 y 0,01 copias de ácido nucleico por partición. Los paneles más a la derecha muestran la densidad correspondiente y la ocupación de partición correspondiente a cada dispositivo.

Ejemplo 2: Flujo de trabajo de un solo instrumento para dPCR

Los métodos para la amplificación y cuantificación de ácidos nucleicos en el dispositivo microfluídico pueden realizarse en un solo instrumento. El instrumento puede ser capaz de particionar reactivos, ciclos térmicos, adquisición de imágenes y análisis de datos. La **Figura 9** muestra un instrumento prototipo capaz de un flujo de trabajo de un solo instrumento. El instrumento está diseñado para acomodar hasta cuatro dispositivos a la vez y permitir la adquisición de imágenes y ciclos térmicos simultáneos. El instrumento contiene una unidad neumática para la partición de reactivos, una unidad térmica para control de temperatura y ciclos térmicos, una unidad óptica para imágenes y una unidad de escaneo. La unidad óptica tiene dos capacidades de imágenes fluorescentes y puede detectar emisiones fluorescentes de aproximadamente 520 nm y 600 nm, que corresponden a las longitudes de onda de emisión de los fluoróforos FAM y ROX, respectivamente. La unidad óptica tiene un campo de visión de 25 mm por 25 mm y una apertura numérica (NA) de 0,14.

El flujo de trabajo de un solo instrumento puede probarse con un ensayo de qPCR bien establecido que utiliza una sonda TaqMan como informador. Brevemente, una muestra de ácidos nucleicos se mezcla con los reactivos de PCR. Los reactivos de PCR incluyen cebadores directos, cebadores inversos, sondas TaqMan y un indicador ROX. La secuencia del cebador directo es 5' - GCC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A - 3'. La secuencia del cebador inverso es 5' - GGG GCG CAC TGC TAG AGA - 3'. La secuencia de la sonda TaqMan es 5' - [FAM] - CCA GAG TCA CAC AAC AGA CGG GCA CA - [BHQ1] - 3'. La muestra de ácidos nucleicos y los reactivos de PCR se cargan y reparten dentro del dispositivo microfluídico siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. La amplificación por PCR se realiza aumentando la temperatura de las microcámaras a 95 °C y manteniendo la temperatura durante 10 minutos, seguido de cuarenta ciclos aumentando la temperatura de las microcámaras de 95 °C a 59 °C a una velocidad de 2,4 °C por segundo con una retención de 1 minuto a 59 °C antes de regresar la temperatura a 95 °C. Las **Figuras 10A-10D** muestran las imágenes fluorescentes de las muestras que contienen aproximadamente una copia de plantilla de ácido nucleico por partición y particiones que contienen cero copias de plantilla de ácido nucleico por partición (sin plantilla control o NTC) después de la amplificación por PCR y gráficas de intensidad de fluorescencia de muestras que contienen aproximadamente una copia de ácido nucleico por partición y particiones NTC después de la amplificación por PCR. La **Figura 10A** muestra una imagen fluorescente de la muestra dividida que no contiene plantilla de ácido nucleico y cada punto gris representa una única microcámara que contiene los reactivos de PCR. La imagen se toma al excitar el indicador ROX dentro de cada microcámara con una luz de aproximadamente 575 nm y obtener imágenes del espectro de emisión, que tiene una emisión máxima de aproximadamente 600 nm. La **Figura 10B** muestra la muestra dividida que contiene aproximadamente una copia de la plantilla de ácido nucleico por partición después de la amplificación por PCR. Después de la amplificación por PCR, las imágenes muestran las microcámaras que contienen el indicador ROX y las microcámaras que contienen tanto el indicador ROX como la emisión de la sonda FAM. La sonda FAM tiene una longitud de onda de excitación de aproximadamente 495 nm y una longitud de onda de emisión máxima de aproximadamente 520 nm. Las microcámaras individuales contienen el indicador ROX, la sonda FAM y el extintor BHQ-1. Al igual que con la **Figura 10A** cada punto gris representa una microcámara que contiene la muestra dividida sin plantilla de ácido nucleico. Los puntos blancos representan las microcámaras que contienen muestras de ácido nucleico que se han amplificado con éxito. Tras una amplificación por PCR satisfactoria, el fluoróforo FAM y el extintor de BHQ-1 pueden separarse de la sonda TaqMan, lo que da como resultado una señal fluorescente detectable. Las **Figuras 10C y 10D** muestran un diagrama de dispersión bidimensional de la intensidad fluorescente FAM en función de la intensidad fluorescente ROX para cada microcámara para el dispositivo microfluídico dividido y amplificado, respectivamente. La **Figura 10C** muestra una muestra que contiene cero plantillas de ácido nucleico por partición, lo que da como resultado una intensidad fluorescente FAM que es predominantemente constante en un intervalo de intensidades fluorescentes ROX. La **Figura 10D** muestra una muestra que contiene aproximadamente una copia de plantilla de ácido nucleico por partición, lo que da como resultado una intensidad fluorescente FAM que varía en función de la intensidad fluorescente ROX debido a la presencia de señales de amplificación dentro de la partición.

Ejemplo 3: qdPCR

Se usó un kit de reactivos de PCR conocido para preparar dos mezclas de reactivos, la primera con diez veces la cantidad de diana de la segunda. Los reactivos se cargaron en dos unidades adyacentes del dispositivo y se prepararon neumáticamente mediante el uso de un controlador comercial y una plantilla de interfaz personalizada. A continuación, el dispositivo (**1708**) se retiró y se colocó dentro del sistema de las **Figuras 17A-17B**. El dispositivo **1708** se mantuvo en un ciclador térmico de bloque plano estándar **1703** mediante una pieza de vidrio para lograr un buen contacto térmico. El dispositivo **1708** se sometió a ciclos térmicos 40 veces mediante el uso de un protocolo de PCR estándar de 96-61 °C x 40. Durante la etapa de baja temperatura (61 °C) de cada ciclo (ciclos 11-40), se tomó automáticamente una imagen mediante el uso de la cámara **1704**. Las imágenes se muestran en la **Figura 18**, en la que las imágenes de la primera columna se tomaron a los 20 ciclos, las imágenes de la segunda columna se tomaron a los 30 ciclos y las imágenes de la tercera columna se tomaron a los 40 ciclos. La fila superior de imágenes corresponde a la carga a una velocidad de 10 copias por partición, mientras que la fila inferior corresponde a 1 copia por partición. Se usó un complemento ImageJ personalizado para extraer datos de intensidad promedio para 53 puntos seleccionados de la imagen de 10 veces establecido en cada una de las imágenes de 30 ciclos. Estos datos se representan en la **Figura 19** y están normalizados para la variación de fondo.

Ejemplo 4: Análisis de HRM

Se usó un kit de reactivos conocido para preparar dos mezclas de reactivos, la primera con diez veces la cantidad de diana de la segunda. Los reactivos se cargaron en dos unidades adyacentes del dispositivo y se prepararon neumáticamente mediante el uso de un controlador comercial y una plantilla de interfaz personalizada. Después, el dispositivo (**1708**) se retiró y se colocó dentro del sistema de las **Figuras 17A-17B**. El dispositivo **1708** se mantuvo en un ciclador térmico de bloque

plano estándar **1703** mediante una pieza de vidrio para lograr un buen contacto térmico. El dispositivo **1708** se sometió a ciclos térmicos 40 veces mediante el uso de un protocolo de PCR estándar de 96-61 °Cx40 para completar la etapa de dPCR. La cámara **1704** tomó imágenes de los dispositivos cada 5 segundos de forma continua a medida que la unidad térmica **1703** aumentaba la temperatura a una velocidad de aproximadamente 0.1 °C/s de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 90 °C. Las imágenes se muestran en la **Figura 25**, en la que las imágenes de la primera columna se tomaron a aproximadamente 70 °C, las imágenes de la primera columna se tomaron a aproximadamente 80 °C y las imágenes de la tercera columna se tomaron a aproximadamente 90 °C. La fila superior de imágenes corresponde a cargar a velocidad de 10 copias por partición, mientras que la fila inferior corresponde a 1 copia por partición. Se usó un complemento ImageJ personalizado para extraer los datos de intensidad promedio para 54 puntos seleccionados en cada imagen del conjunto de imágenes de 10 veces. Estos datos se representan en la **Figura 26**.

Aunque las modalidades preferidas de la presente invención se han mostrado y descrito en la presente descripción, será obvio para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionan sólo a modo de ejemplo. No se pretende que la invención esté limitada por los ejemplos específicos proporcionados dentro de la memoria descriptiva. Si bien la invención se ha descrito con referencia a la memoria descriptiva mencionada anteriormente, las descripciones e ilustraciones de las realizaciones en la presente memoria no pretenden interpretarse en un sentido limitante. Numerosas variaciones, cambios, y sustituciones se les ocurrirán ahora a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Además, se entenderá que todos los aspectos de la invención no se limitan a las representaciones, configuraciones o proporciones relativas específicas expuestas en la presente memoria que dependen de una variedad de condiciones y variables. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente descripción en la práctica de la invención. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que se cubran métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, que comprende:

5 un dispositivo microfluídico que comprende una pluralidad de particiones, en donde dicha pluralidad de particiones se configura cada una para permitir el flujo de gas a través de al menos una barrera a un entorno externo a dicha pluralidad de particiones, en donde dicha pluralidad de particiones se configura cada una para contener una solución que comprende dichas moléculas de ácido nucleico;

10 una unidad de soporte configurada para sujetar dicho dispositivo;

un detector configurado para detectar una o más señales de dicha solución contenida en cada una de dicha pluralidad de particiones; y

un sistema informático que incluye,

15 uno o más procesadores informáticos acoplados operativamente a dicho detector, y

una memoria que tiene instrucciones almacenadas en la misma que, cuando son ejecutadas por dicho uno o más procesadores informáticos, hacen que dicho uno o más procesadores informáticos individual o colectivamente realicen funciones que incluyen,

20 recibir dicha una o más señales recopiladas por dicho detector de cada una de dicha pluralidad de particiones, en donde dicha una o más señales se recopilan mientras dichas moléculas de ácido nucleico se someten a una reacción de amplificación de ácido nucleico, y

procesar dicha una o más señales para producir datos indicativos de un número de dichas moléculas de ácido nucleico.

2. Un sistema para analizar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, que comprende:

30 un dispositivo microfluídico que comprende una pluralidad de particiones, en donde dicha pluralidad de particiones se configura cada una para permitir el flujo de gas a través de al menos una barrera a un entorno externo a dicha pluralidad de particiones, en donde dicha pluralidad de particiones se configura cada una para contener una solución que comprende dichas moléculas de ácido nucleico, y;

una unidad de soporte configurada para sujetar dicho dispositivo microfluídico;

35 una unidad térmica en comunicación térmica con dicha pluralidad de particiones, en donde dicha unidad térmica se configura para someter dicha solución a calentamiento;

un detector configurado para detectar una o más señales de dicha solución contenida en cada una de dicha pluralidad de particiones; y

un sistema informático que incluye,

40 uno o más procesadores informáticos acoplados operativamente a dicho detector y dicha unidad térmica, y

una memoria que tiene instrucciones almacenadas en la misma que, cuando son ejecutadas por dicho uno o más procesadores informáticos, hacen que dicho uno o más procesadores informáticos individual o colectivamente realicen funciones que incluyen,

45 recibir dicha una o más señales recopiladas por dicho detector de cada una de dicha pluralidad de particiones, en donde dicha una o más señales se recopilan mientras dichas moléculas de ácido nucleico se someten a una reacción de amplificación de ácido nucleico; y

50 procesar dichas una o más señales para producir datos indicativos de un punto de fusión de dichas moléculas de ácido nucleico.

3. El sistema de la reivindicación 1 o 2, que comprende además:

55 una unidad de flujo de fluido configurada para dirigir una muestra de ácido nucleico o dicha pluralidad de moléculas de ácido nucleico a dicha pluralidad de particiones, en donde dichas funciones incluyen además dirigir dicha unidad de flujo de fluido para cargar dichas moléculas de ácido nucleico en dicha pluralidad de particiones, en donde durante dicha carga, el gas en dicha pluralidad de particiones se somete a flujo desde cada una de dicha pluralidad de particiones a dicho entorno externo a cada una de dicha pluralidad de particiones.

4. El sistema de la reivindicación 3, en donde dicha unidad de flujo de fluido se configura para aplicar un diferencial de presión a través de dicha al menos una barrera al gas objeto en cada una de dicha pluralidad de particiones para fluir a través de dicha al menos una barrera a dicho entorno externo.

5. El sistema de la reivindicación 2, en donde dichas funciones incluyen además dirigir dicha unidad térmica para realizar reacciones de amplificación de ácido nucleico en una muestra de ácido nucleico bajo

condiciones suficientes para producir dicha molécula de ácido nucleico como un productos de amplificación de dicha muestra de ácidos nucleicos.

- 5 6. El sistema de la reivindicación 5, en donde realizar dichas reacciones de amplificación de ácidos nucleicos en dicha muestra de ácidos nucleicos comprende amplificar al menos una parte de una región espaciadora transcrita interna de al menos un subconjunto de las moléculas de ácido nucleico de dicha muestra de ácidos nucleicos.
7. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde
- 10 dicho detector recopila dichas una o más señales mediante la obtención de imágenes de dicha partición,
dicho uno o más procesadores informáticos se programan individual o colectivamente para dirigir dicho detector para obtener imágenes de dicha partición para detectar dichas una o más señales, y
- 15 dichas funciones incluyen además determinar una intensidad óptica para cada una de dicha pluralidad de particiones, siendo dicha intensidad óptica proporcional a una cantidad de productos de amplificación en una respectiva de dicha pluralidad de particiones.
8. El sistema de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 7, en donde
- 20 dicho detector recopila dicha una o más señales al detectar emisiones de fluorescencia en dos o más longitudes de onda,
dicho uno o más procesadores informáticos se programan individual o colectivamente para dirigir dicho detector para detectar dichas emisiones de fluorescencia en dichas dos o más longitudes de
- 25 onda.
9. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde dichas funciones incluyen además usar dicha una o más señales para generar datos de señal frente a temperatura para dichas moléculas de ácido nucleico en cada una de dicha pluralidad de particiones.
- 30 10. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha al menos una barrera comprende un material polimérico.
11. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha al menos una barrera es sustancialmente ópticamente transparente.
- 35 12. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha al menos una barrera tiene un espesor de aproximadamente 50 μm a aproximadamente 200 μm .
13. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde
- 40 dicho dispositivo o dicho microdispositivo comprende además al menos un microcanal que incluye al menos una entrada, al menos una salida y una pluralidad de aberturas de sifón, en donde dicha pluralidad de particiones está en comunicación fluida con al menos un microcanal por dicha pluralidad de aberturas de sifón, y
- 45 dicha al menos una barrera se configura para cubrir dicha pluralidad de particiones, dicha pluralidad de aberturas de sifón y dicho al menos un microcanal.
14. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha pluralidad de particiones comprende de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20.000 particiones.
- 50 15. El sistema de la reivindicación 1 o 2, en donde dicha al menos una barrera es (i) sustancialmente impermeable a los gases si se aplica un primer diferencial de presión a través de dicha al menos una barrera y (ii) sustancialmente permeable a los gases si se aplica un segundo diferencial de presión mayor que dicho primer diferencial de presión a través de dicha al menos una barrera.

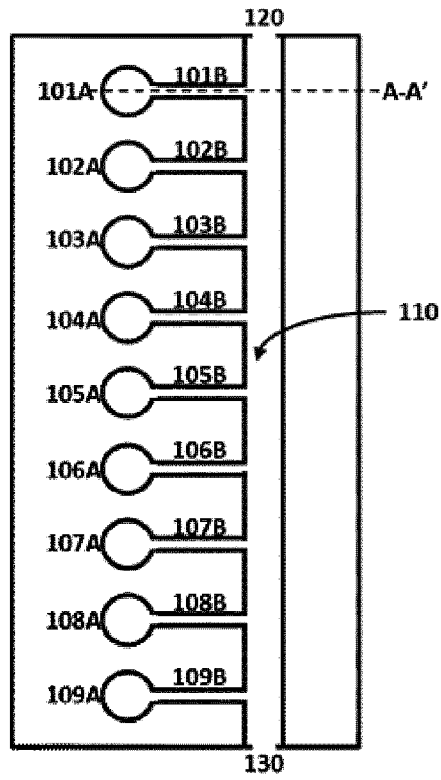


Figura 1A

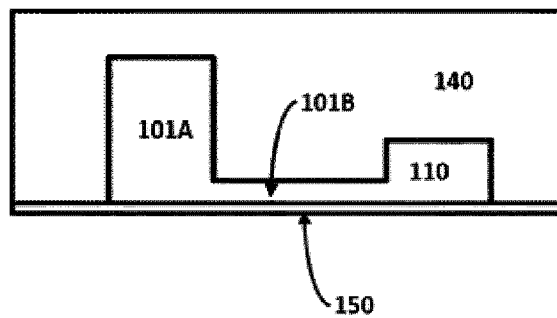


Figura 1B

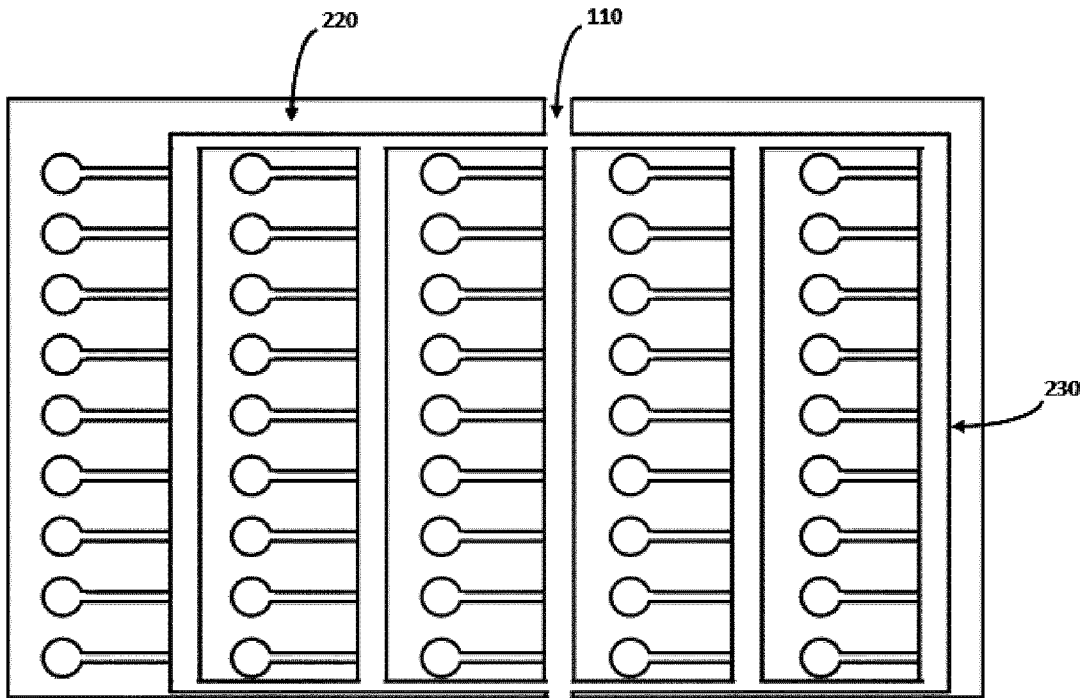


Figura 2A

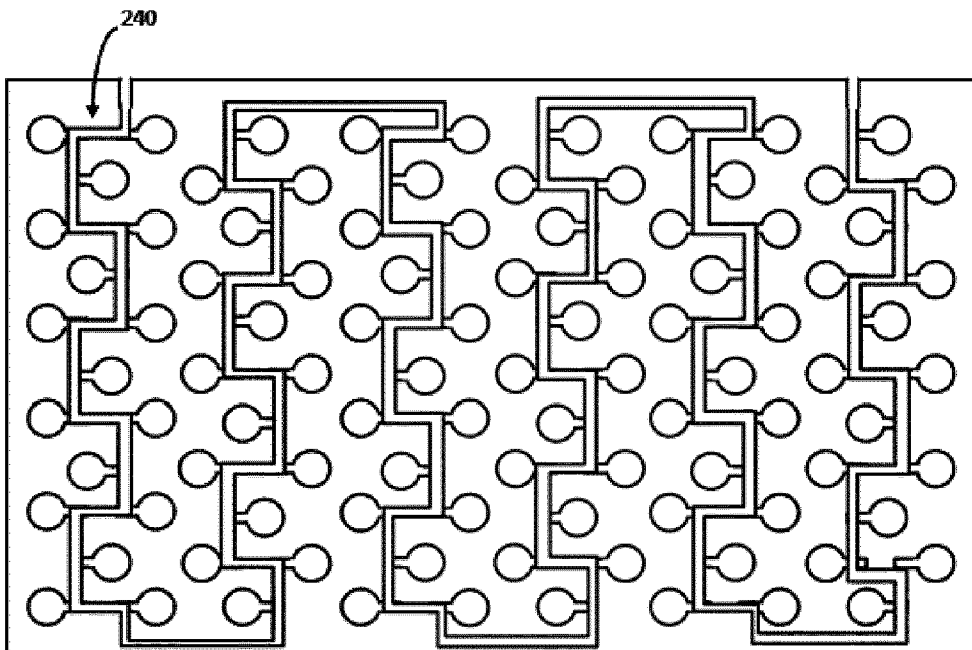


Figura 2B

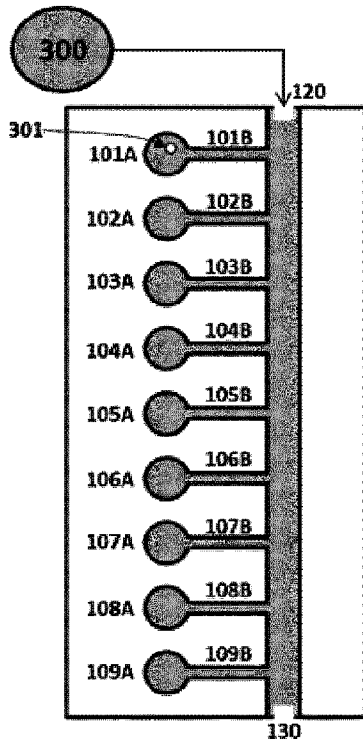


Figura 3A

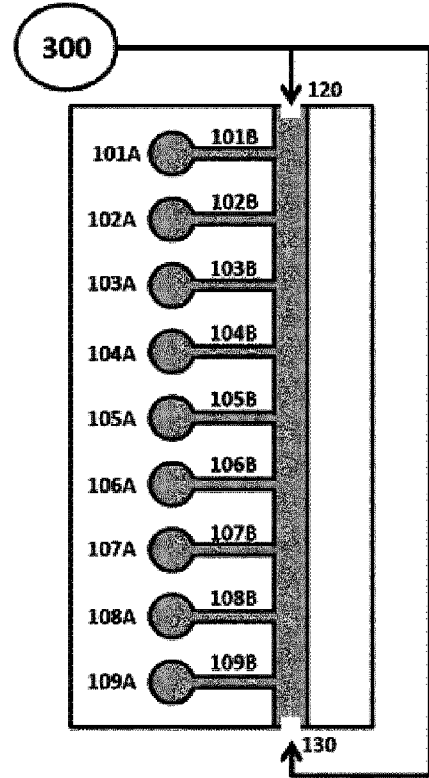


Figura 3B

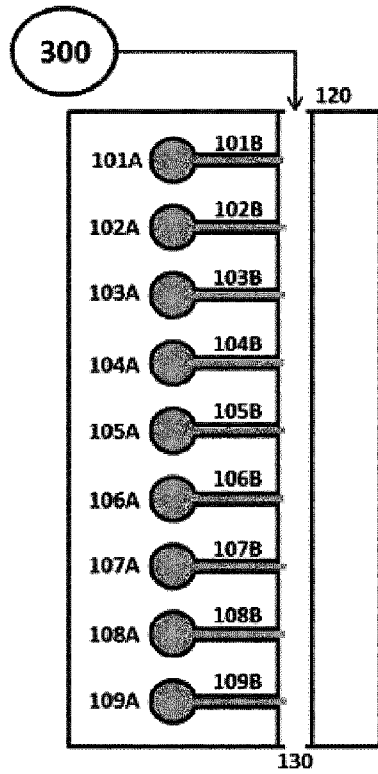


Figura 3C

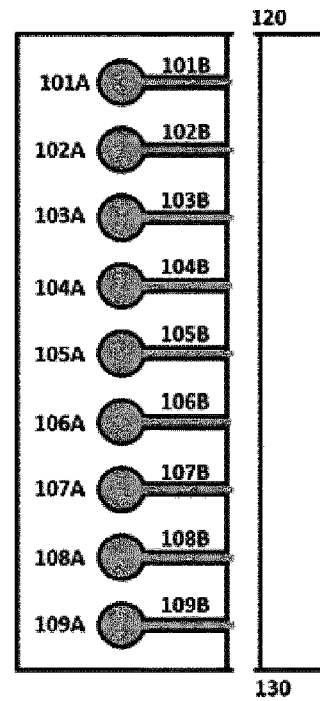


Figura 3D

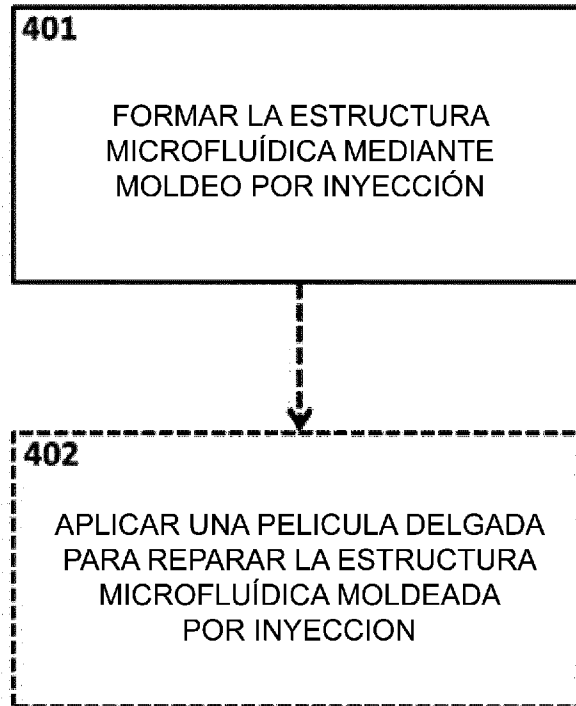


Figura 4

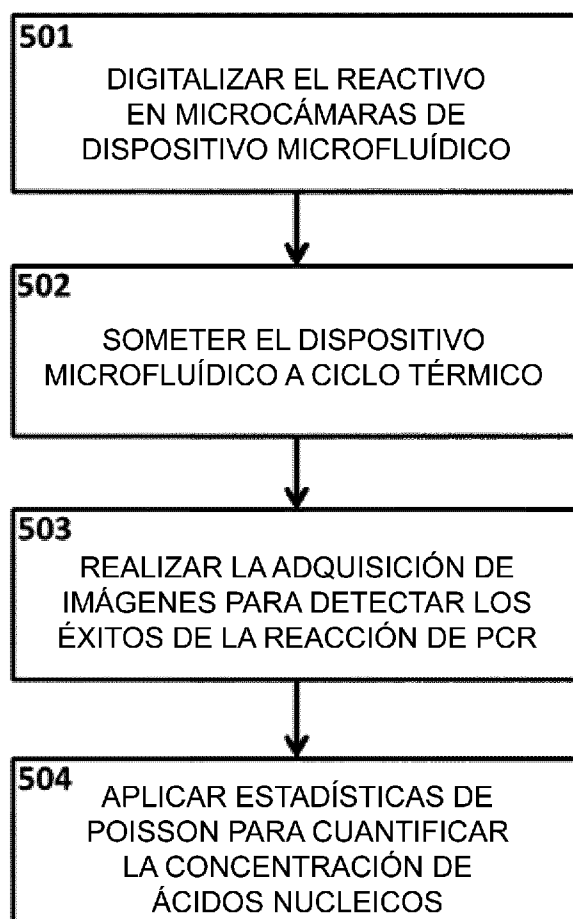


Figura 5

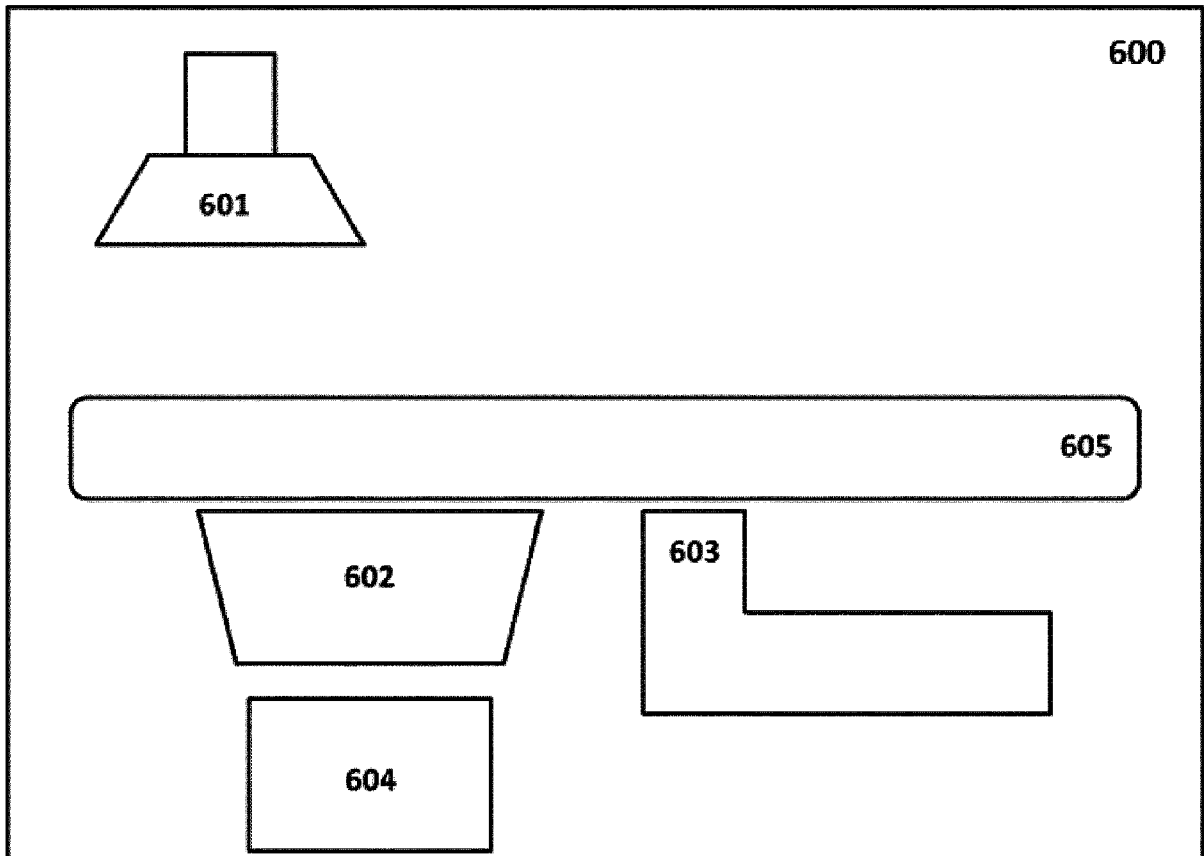


Figura 6

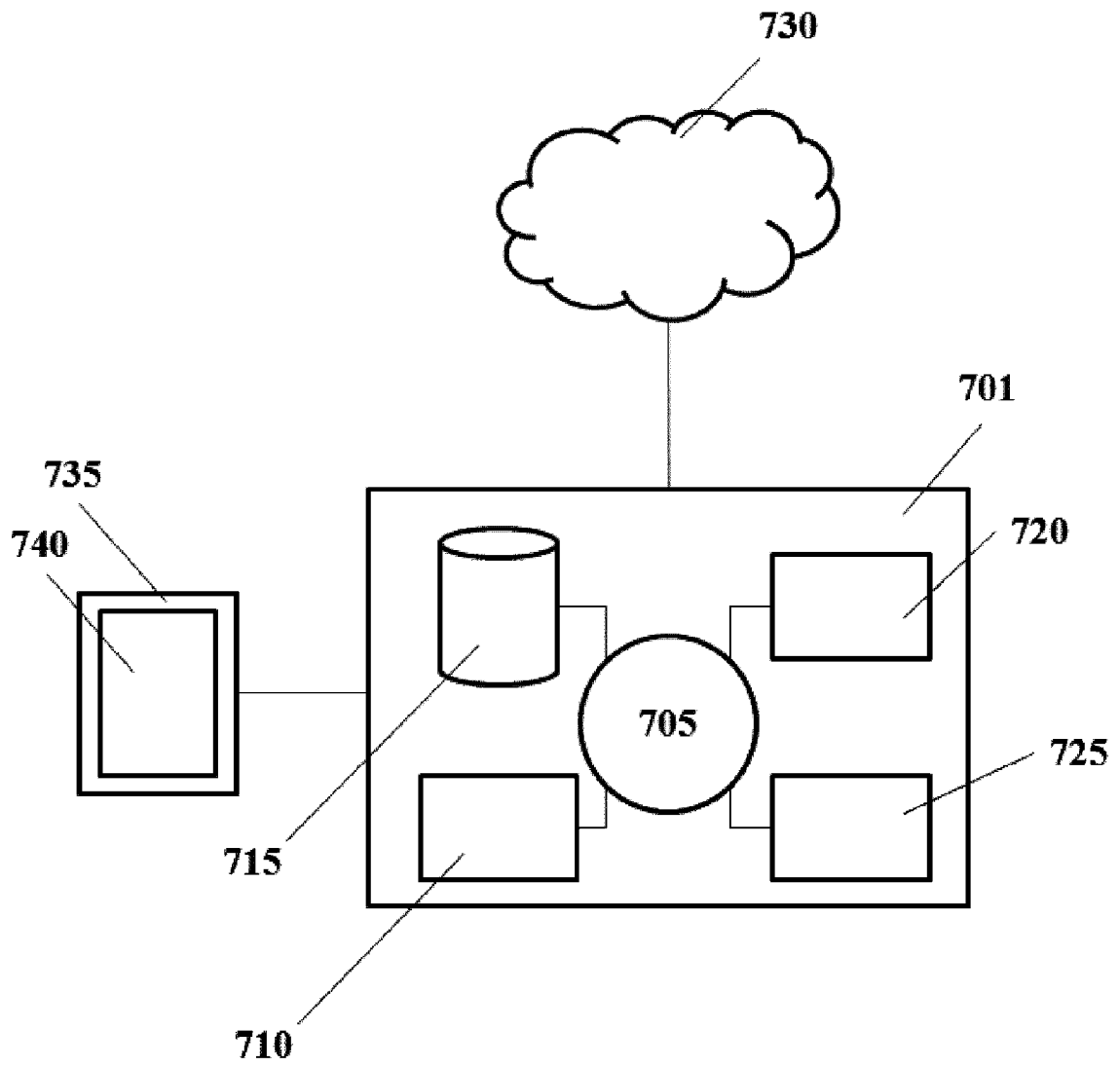


Figura 7

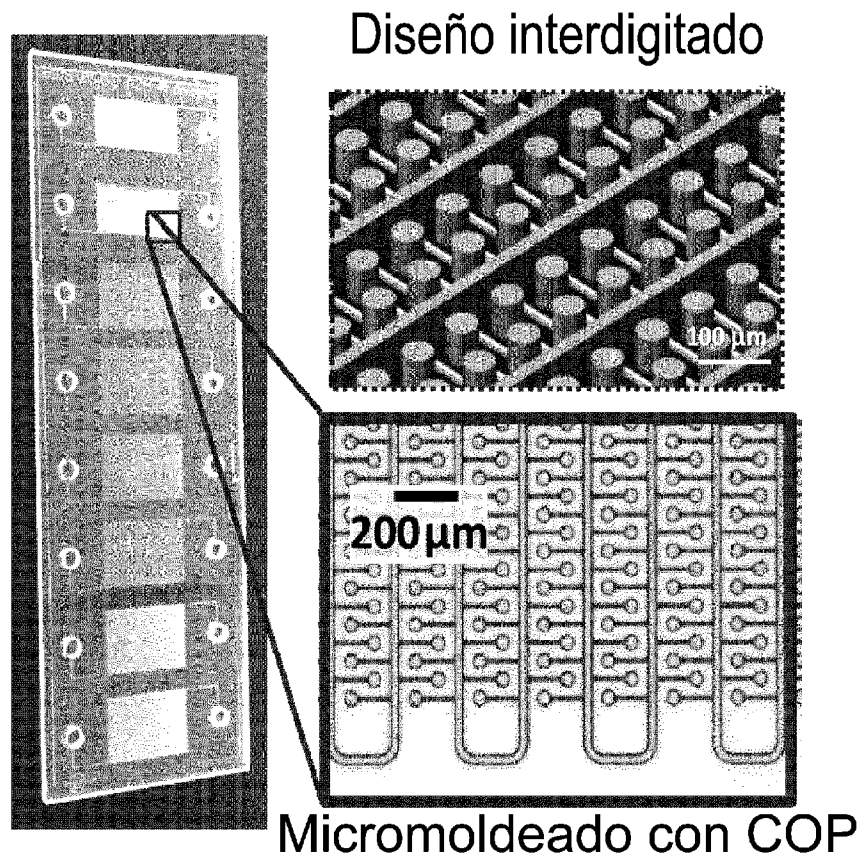


Figura 8A

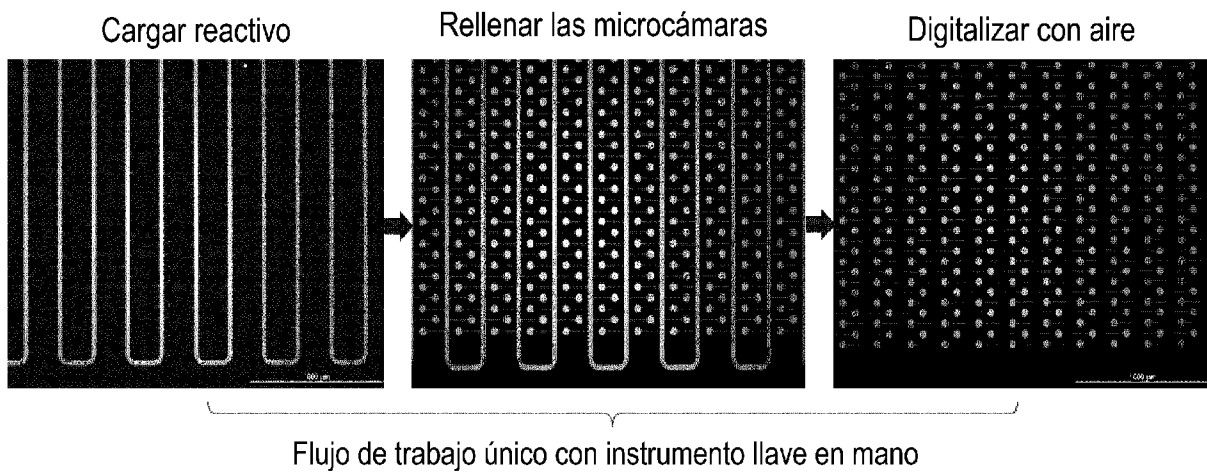


Figura 8B

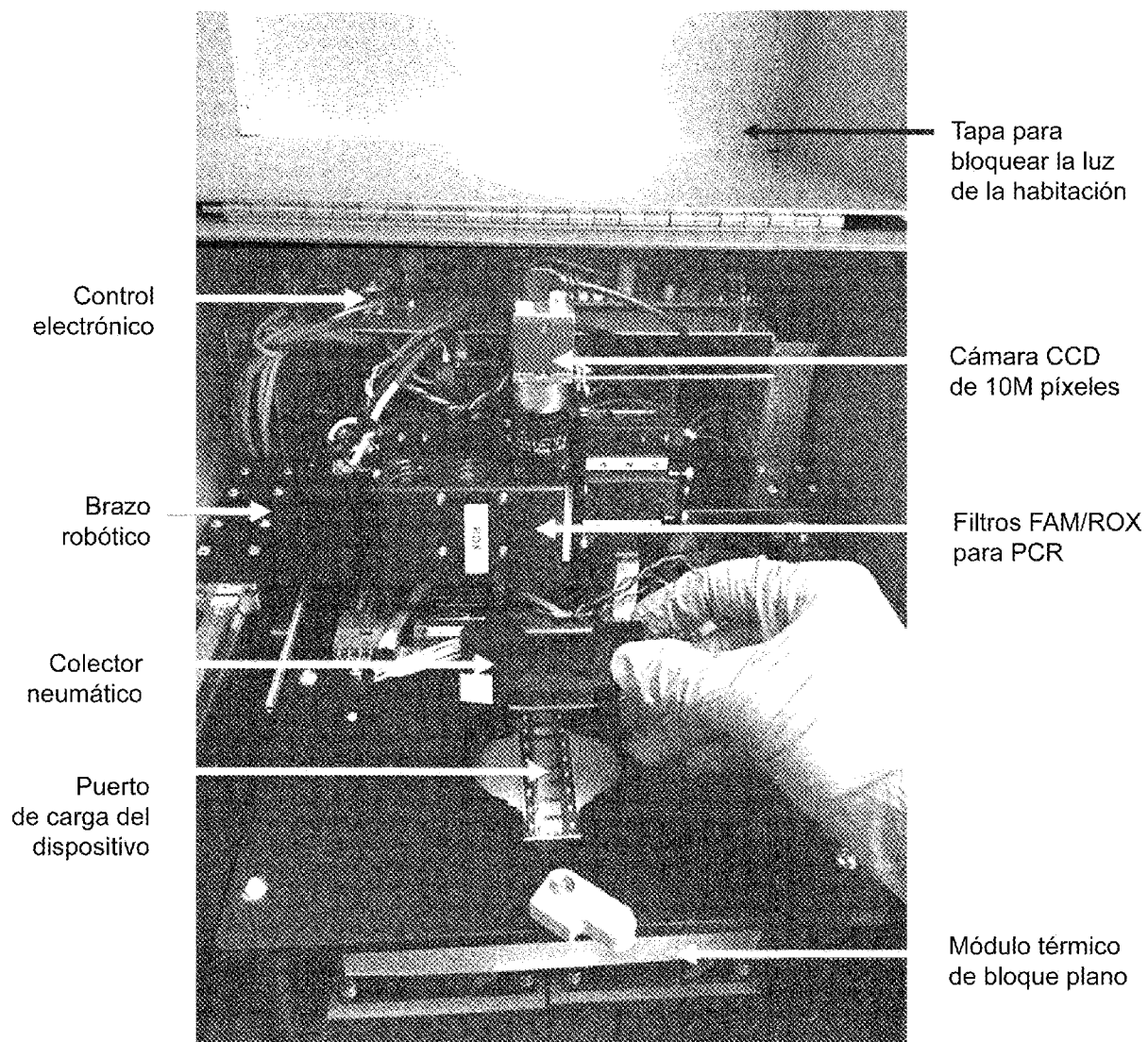
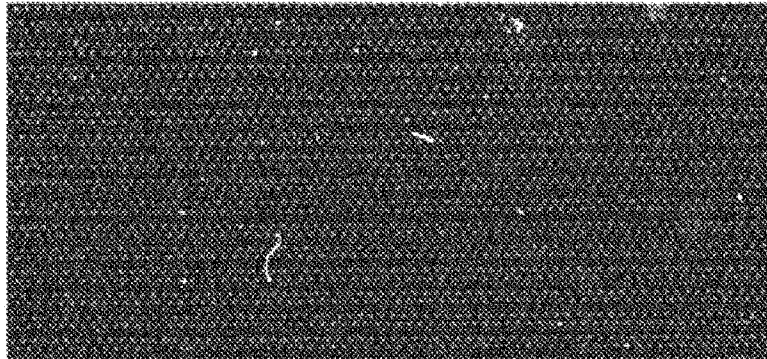
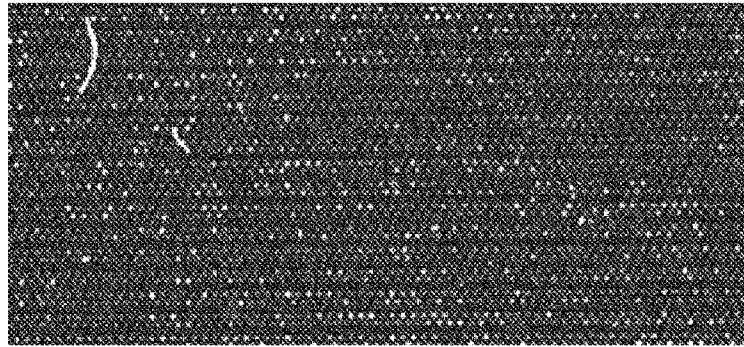


Figura 9



Sin plantilla control

Figura 10A



~1 copia/partición

Figura 10B

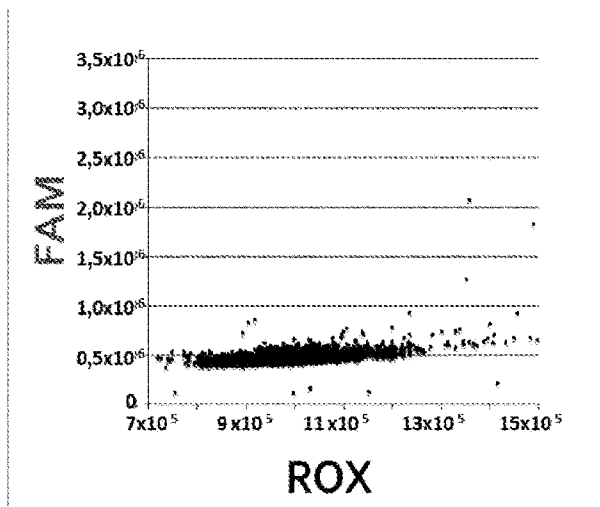


Figura 10C

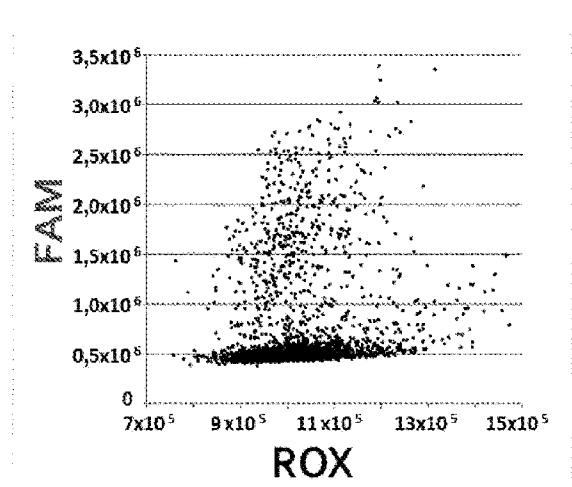


Figura 10D










			
			
	 		
			 

Figura 11A

1	0	0	2
0	0	1	0
0	2	1	0
1	0	0	3

Figura 11C

















			
			
			
			

Figura 11B

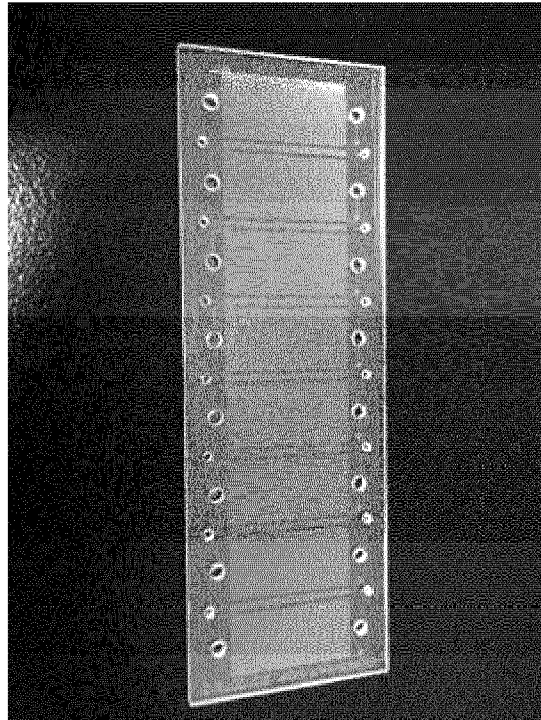


Figura 12A

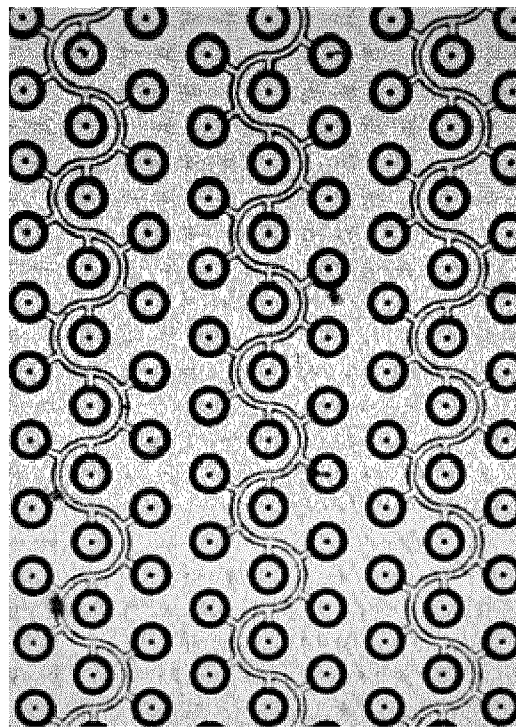


Figura 12B

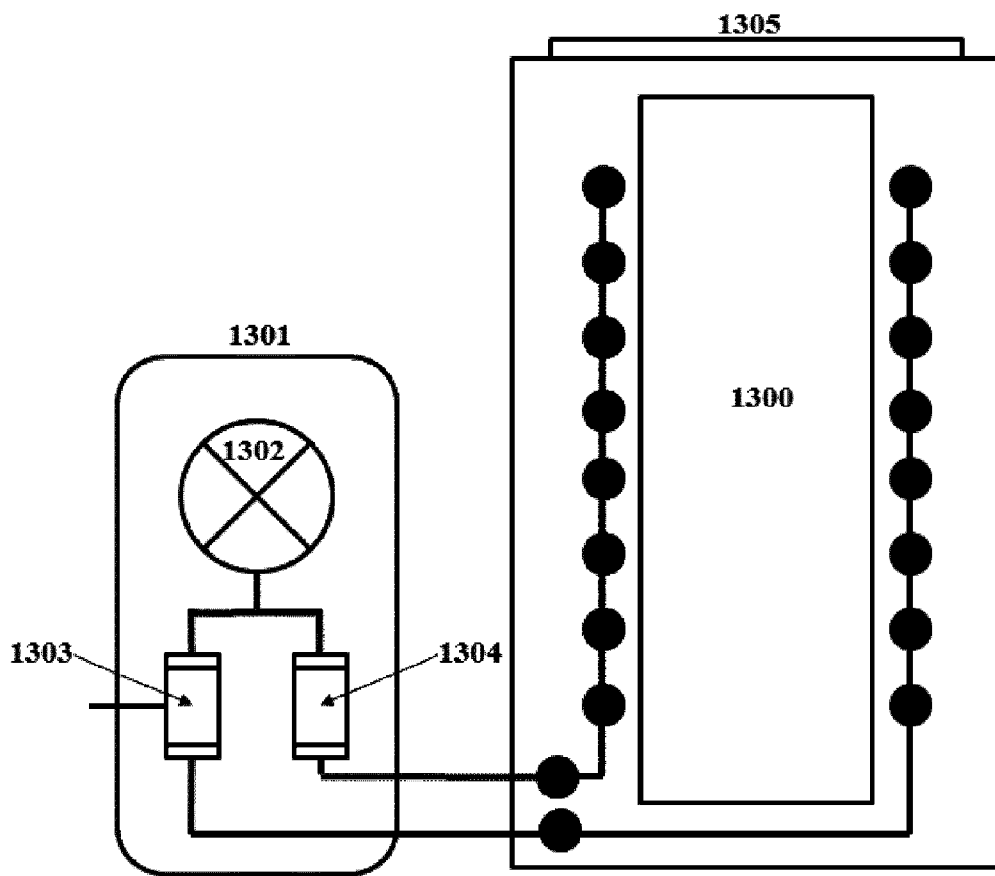


Figura 13

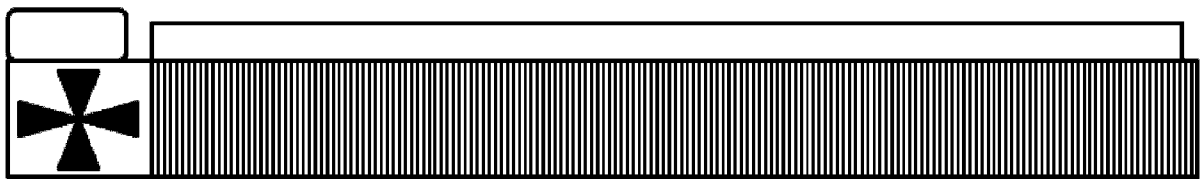


Figura 14A

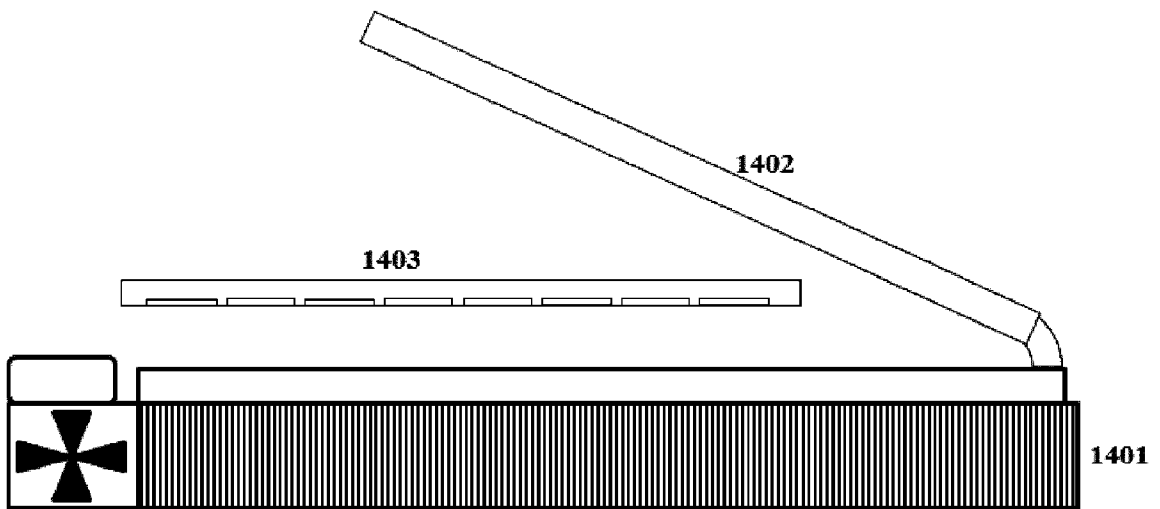
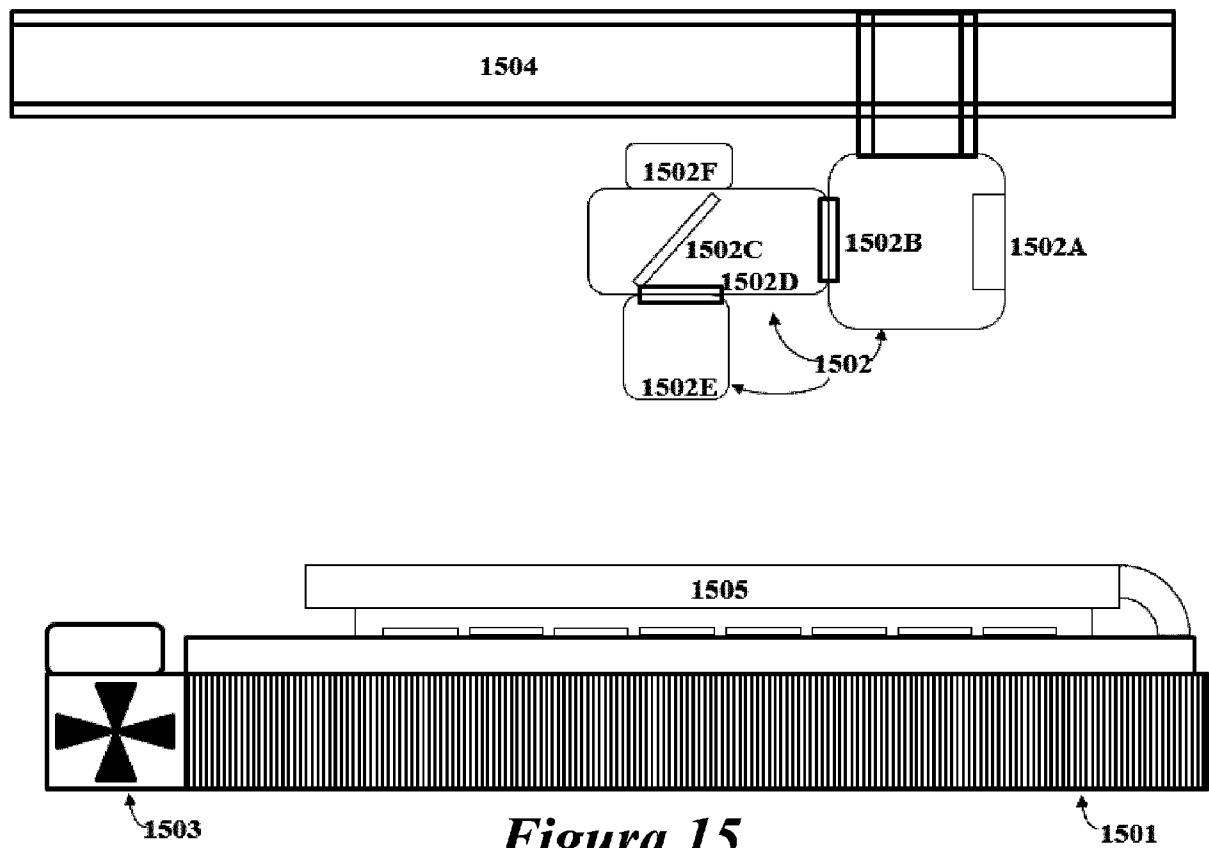


Figura 14B



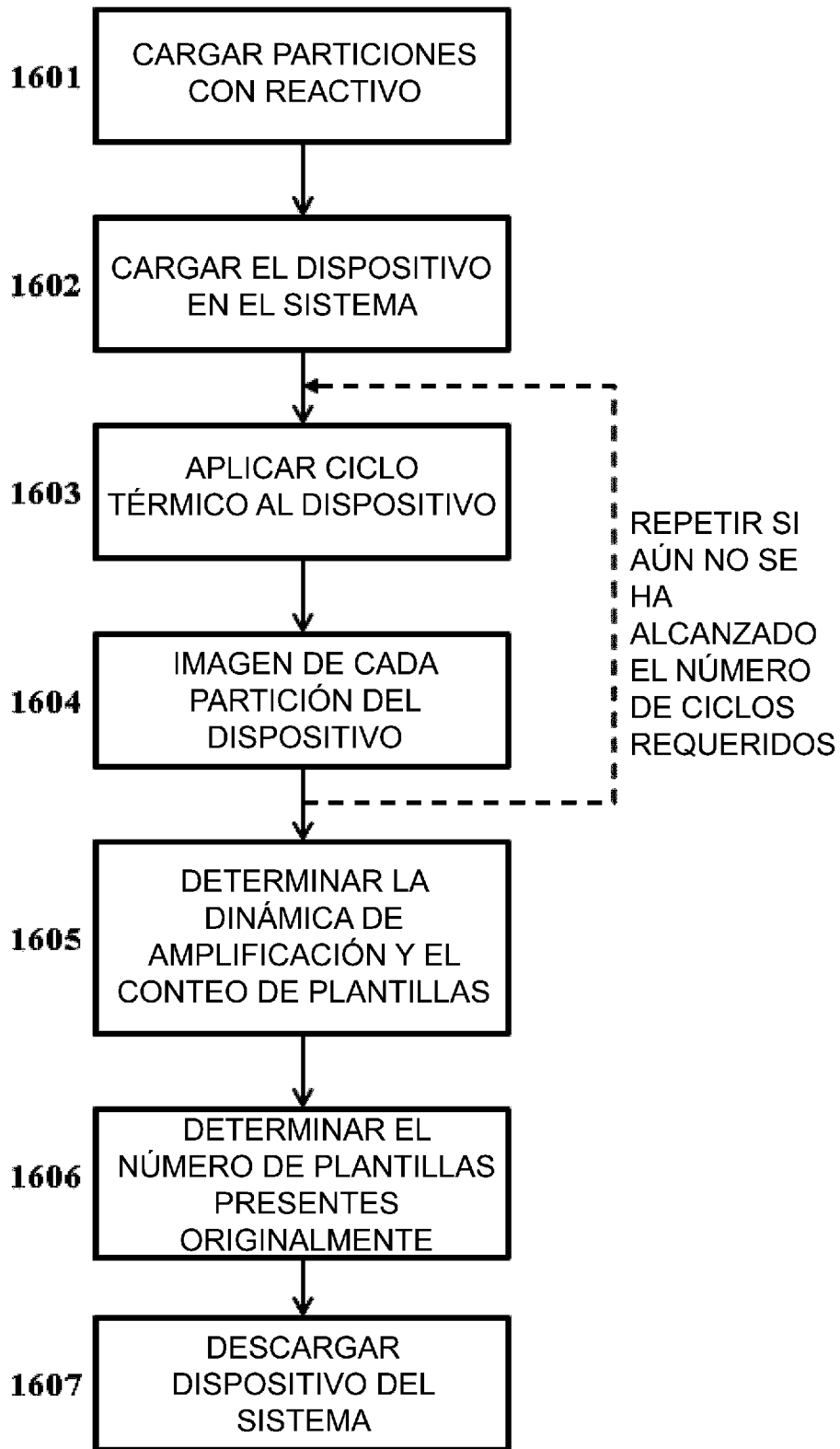


Figura 16

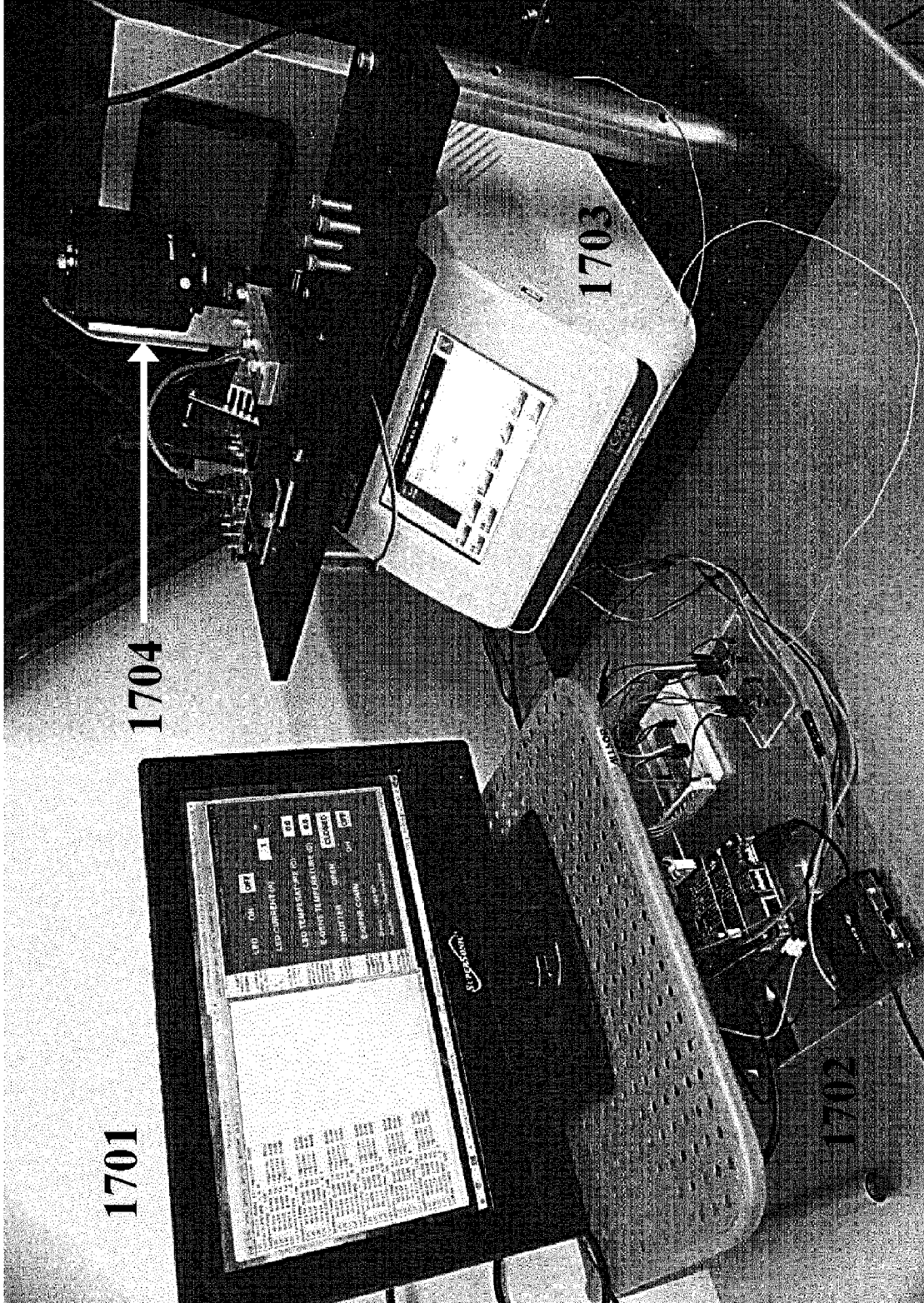


Figura 17A

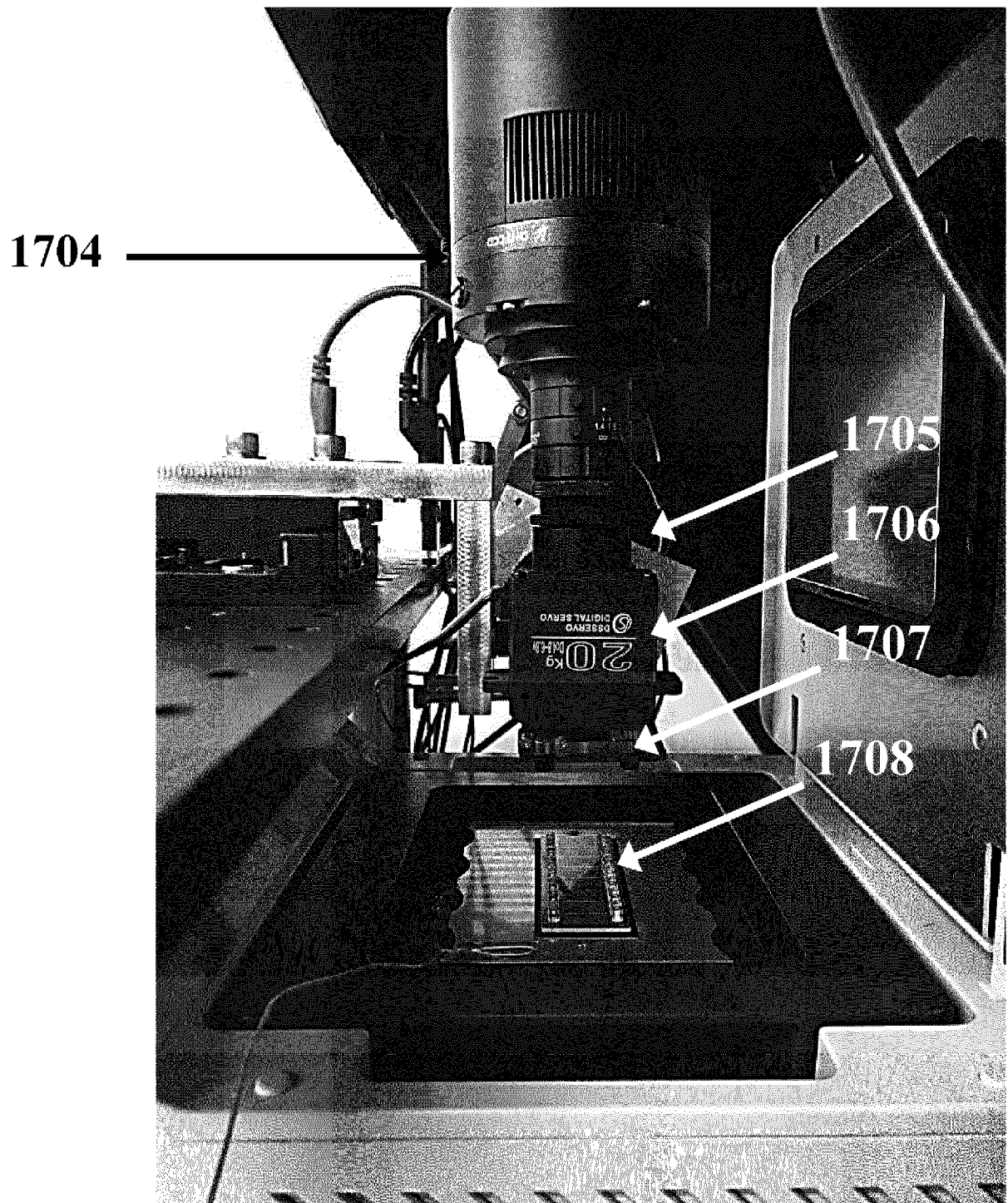


Figura 17B

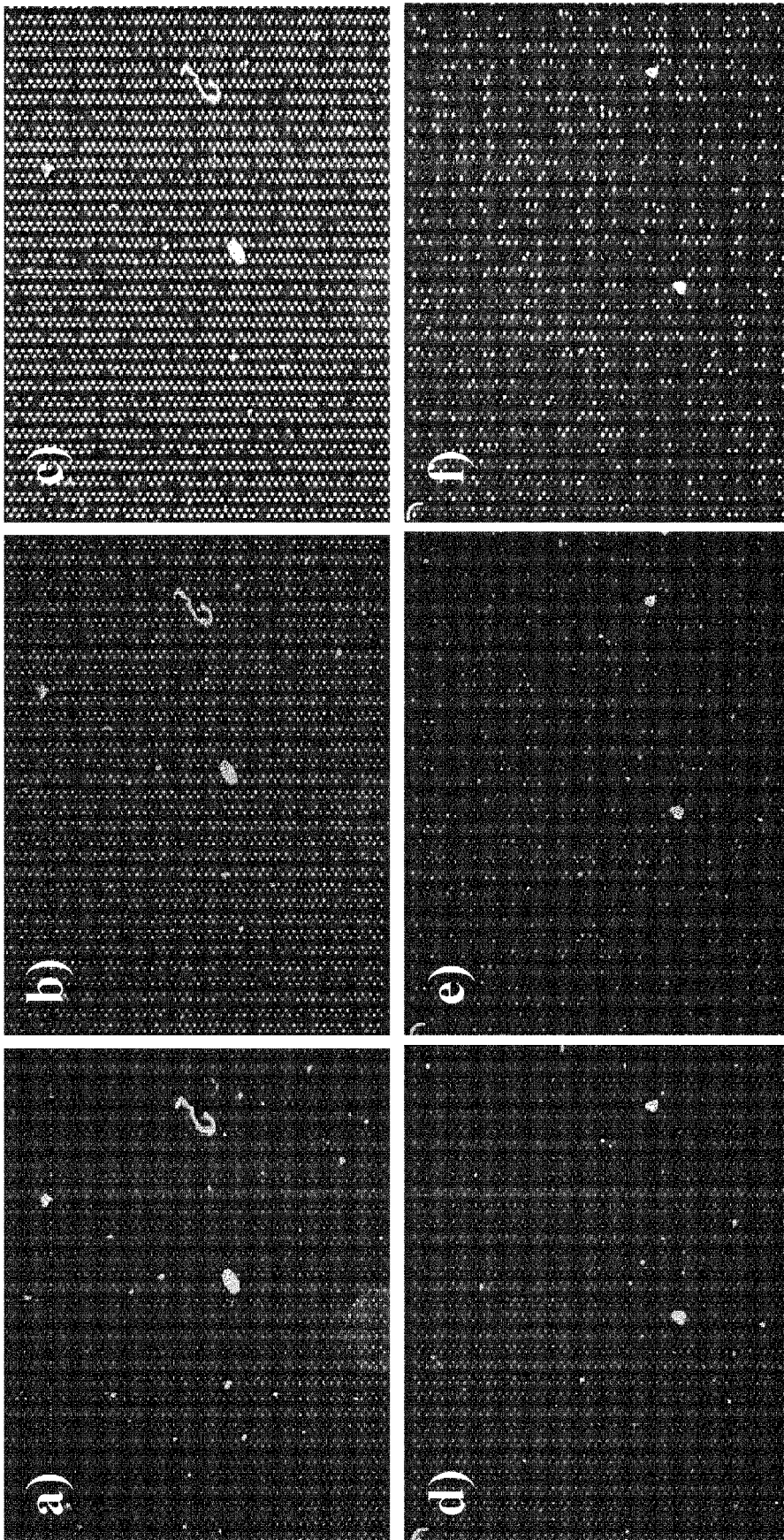


Figura 18

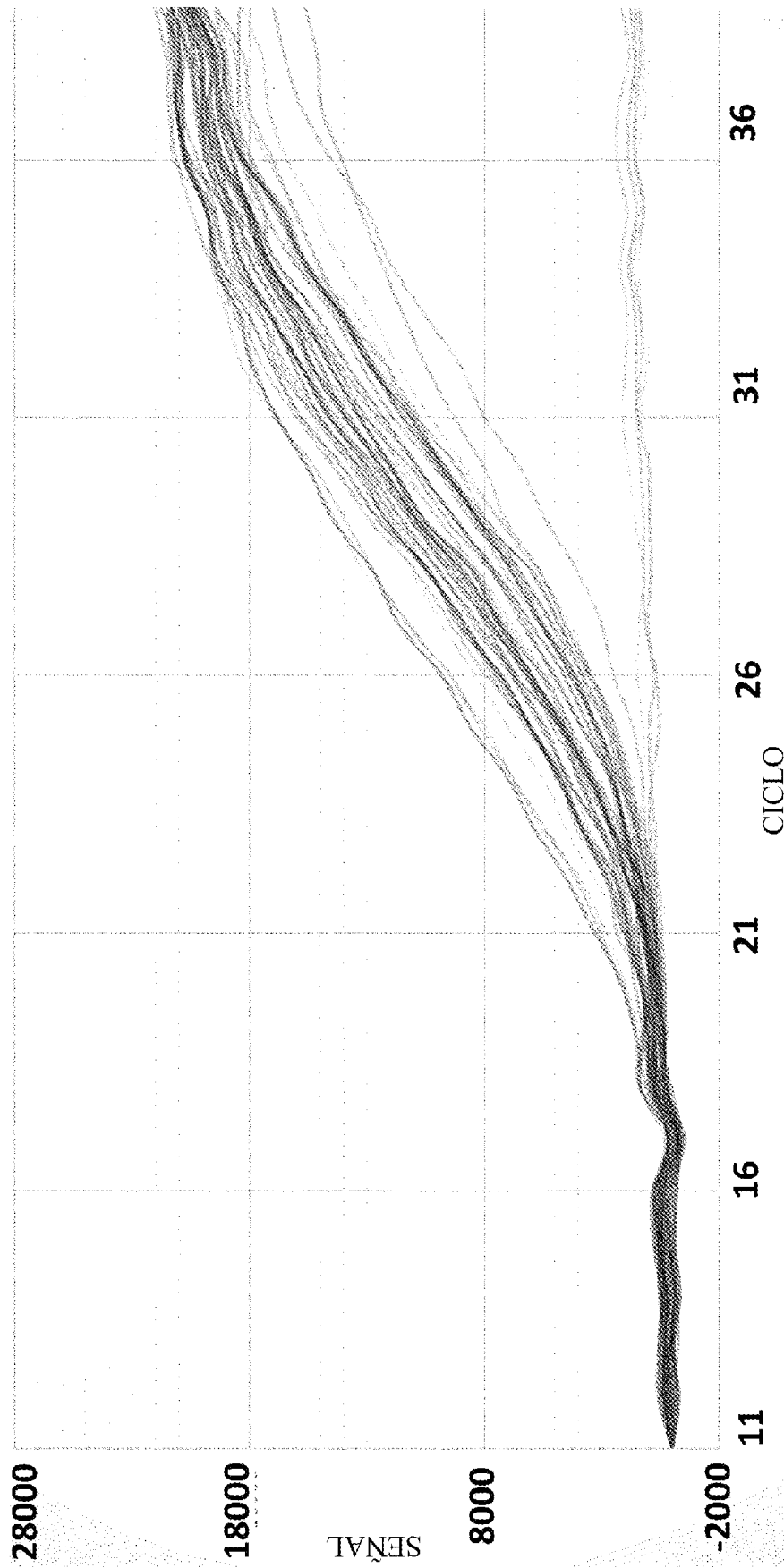


Figura 19

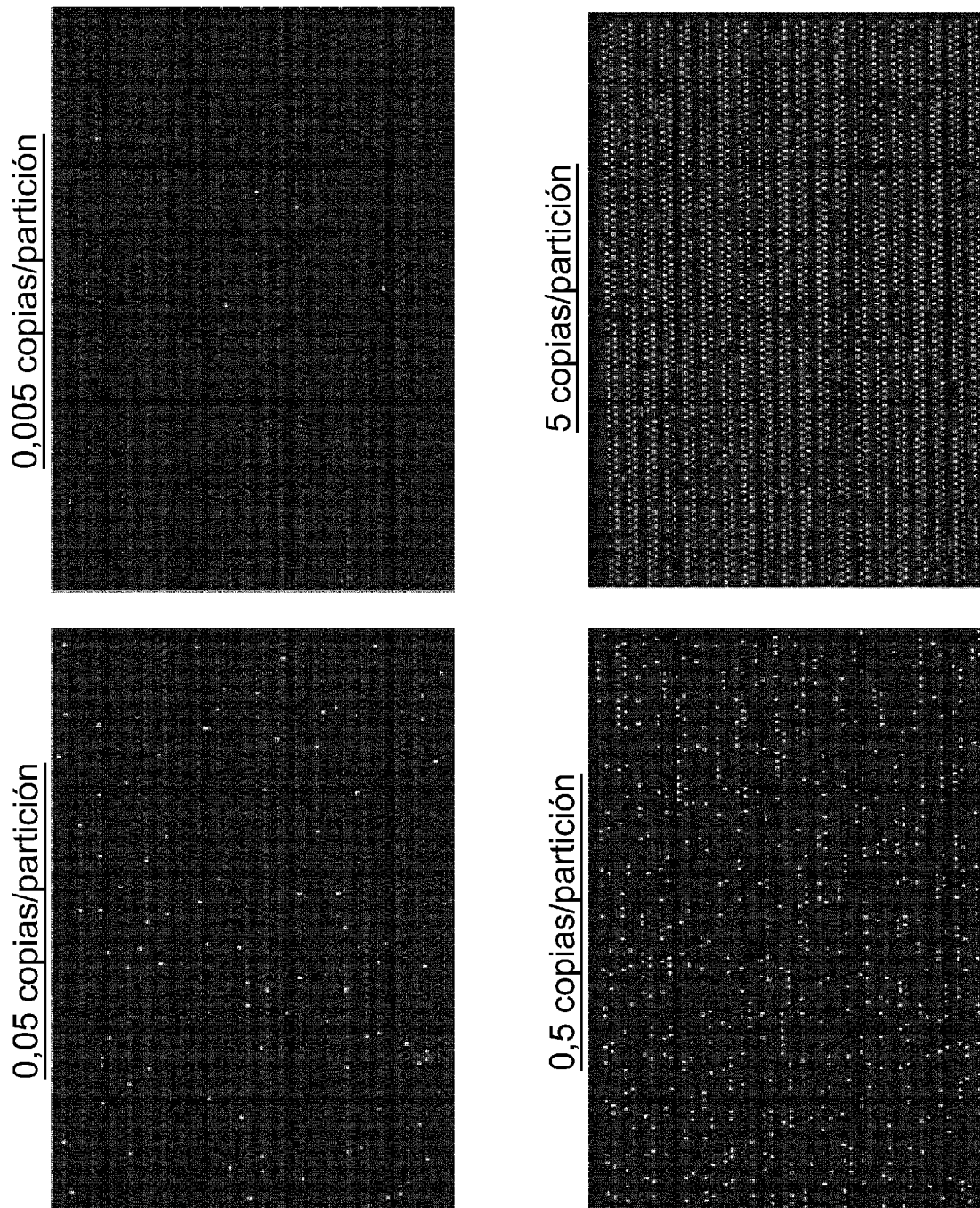


Figura 20A

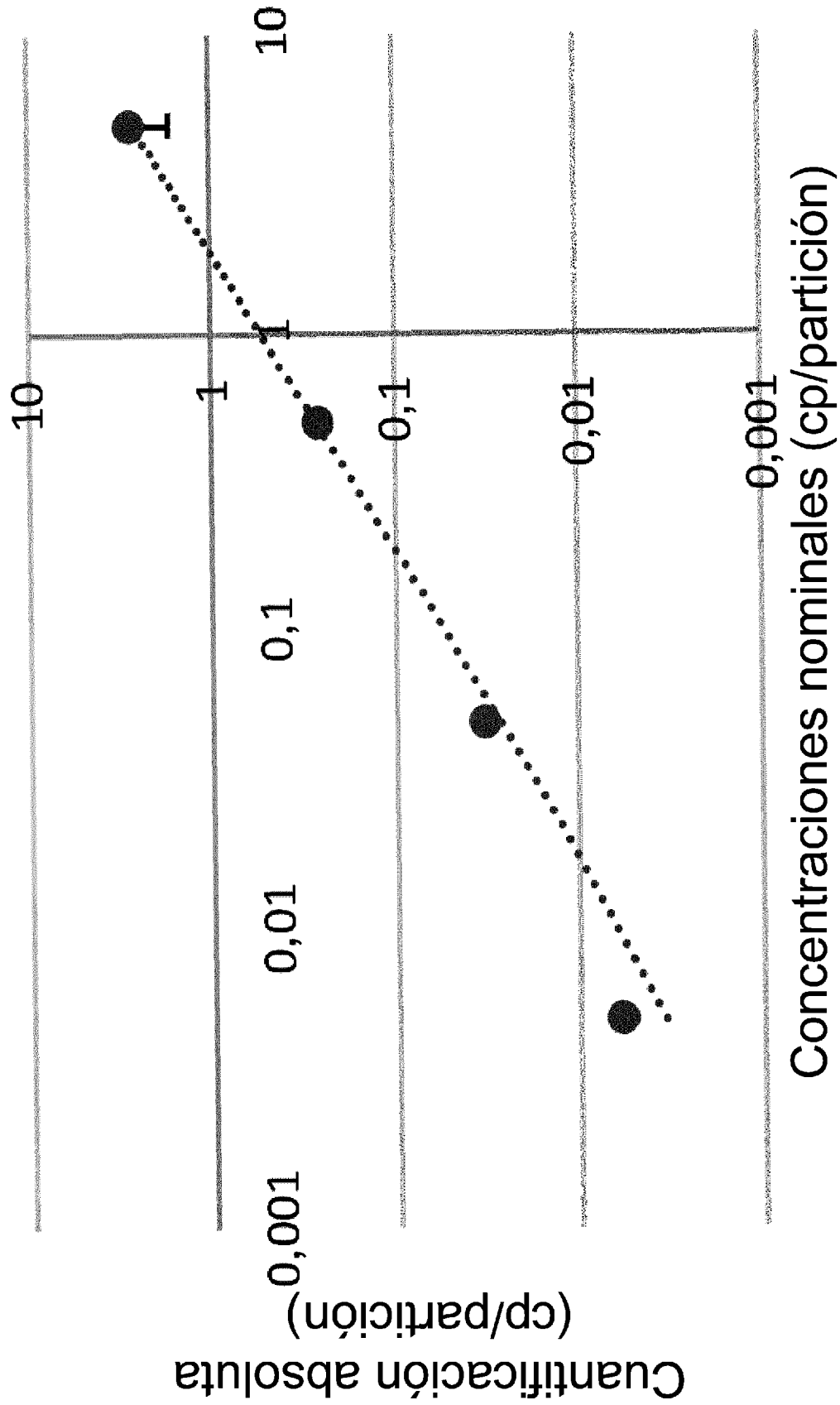


Figura 20B

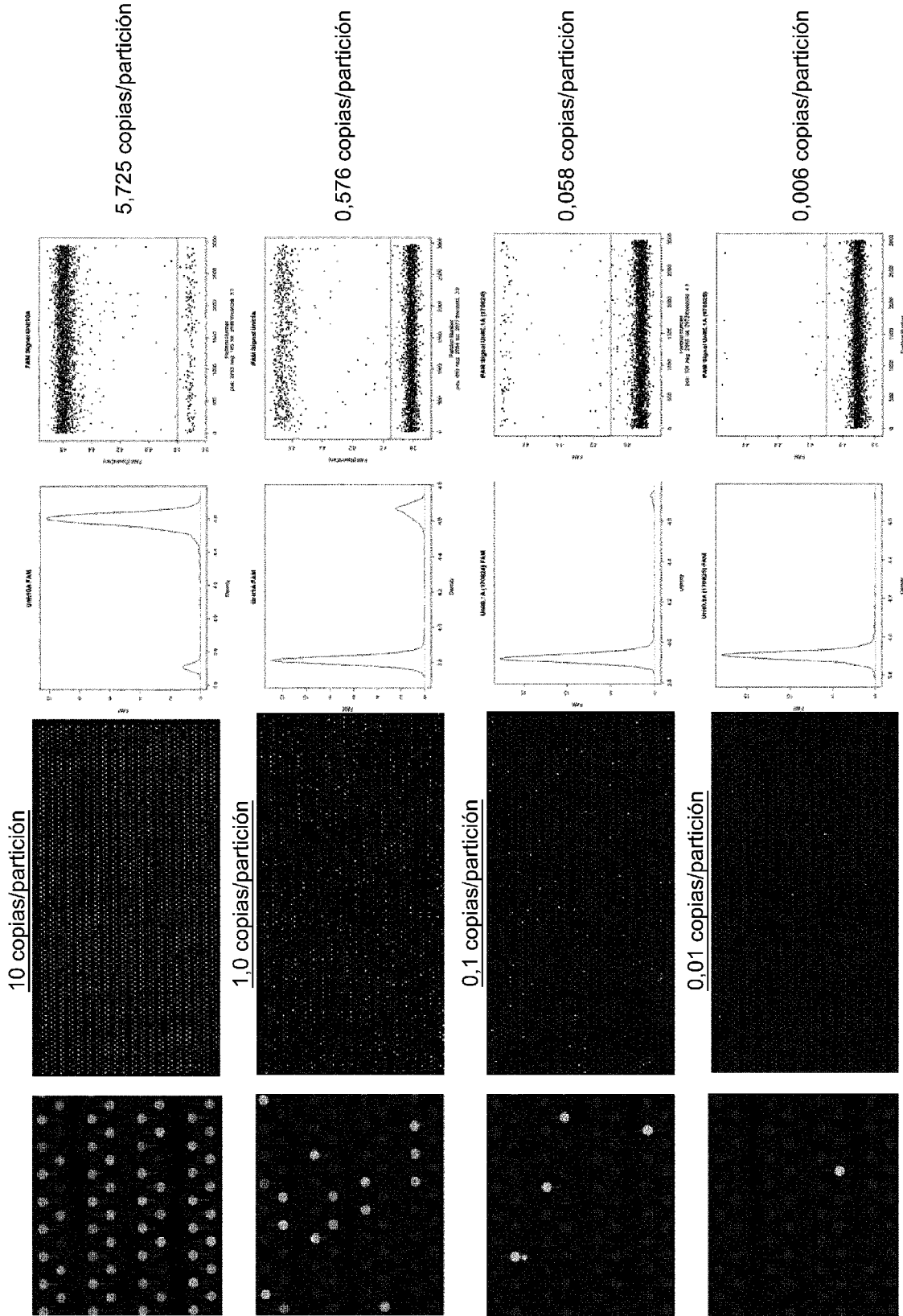


Figura 21

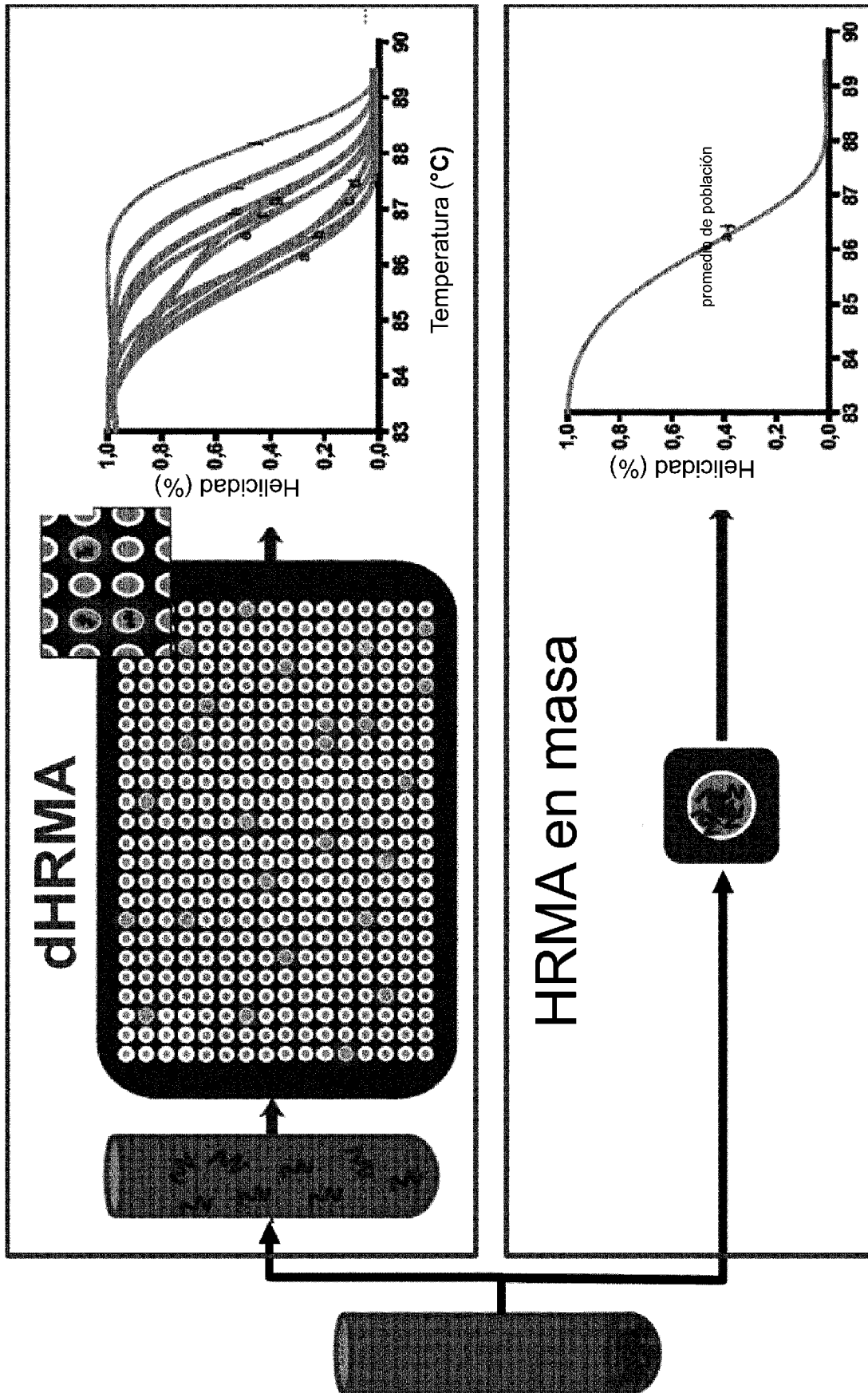


Figura 22A

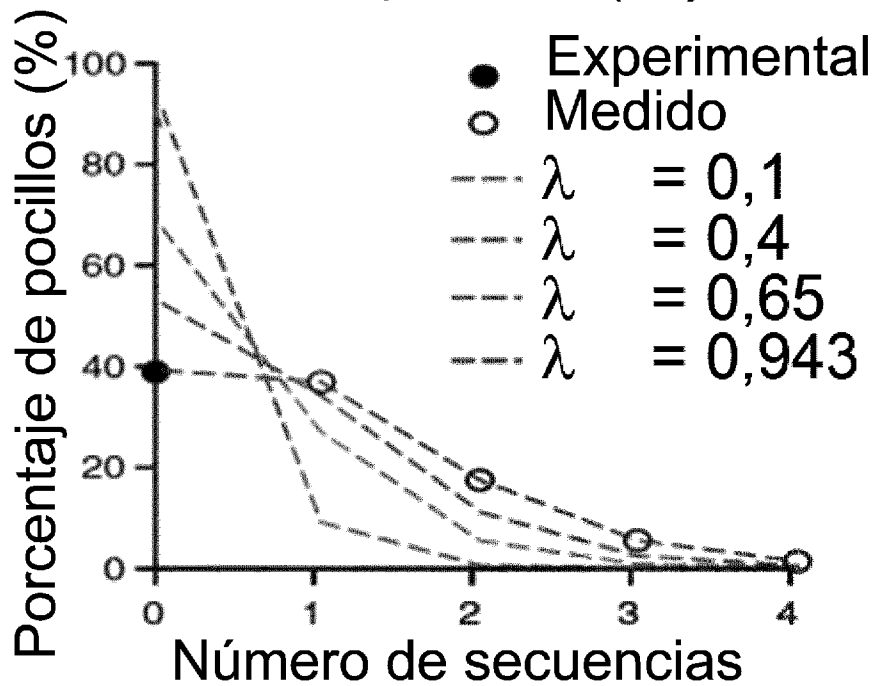
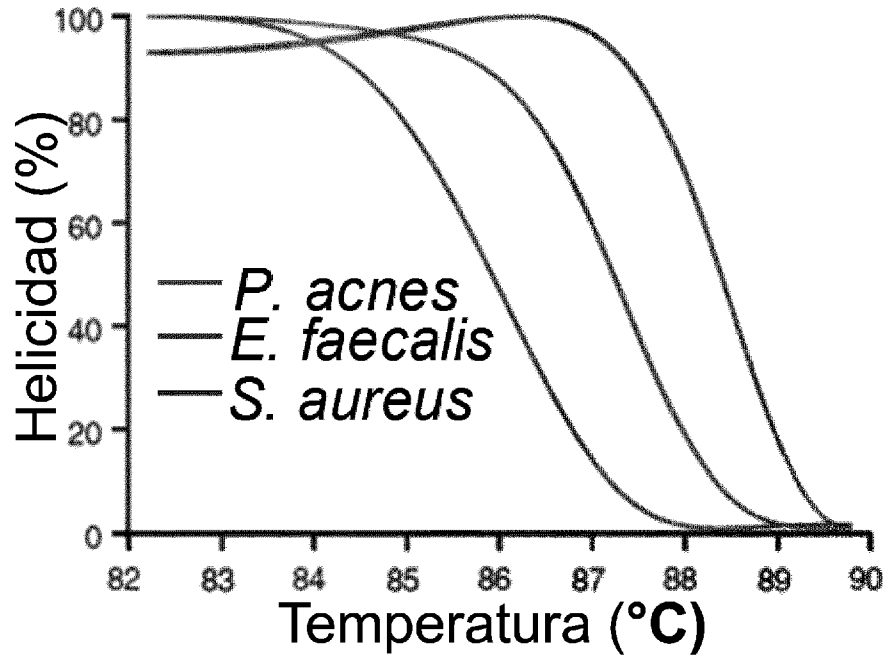


Figura 22B

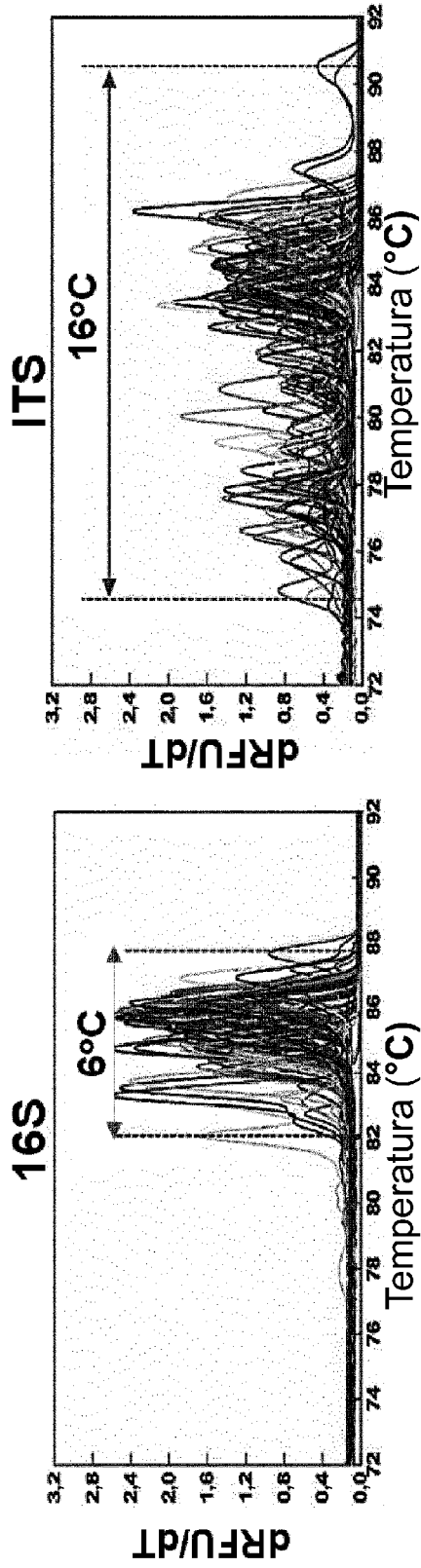


Figura 23A

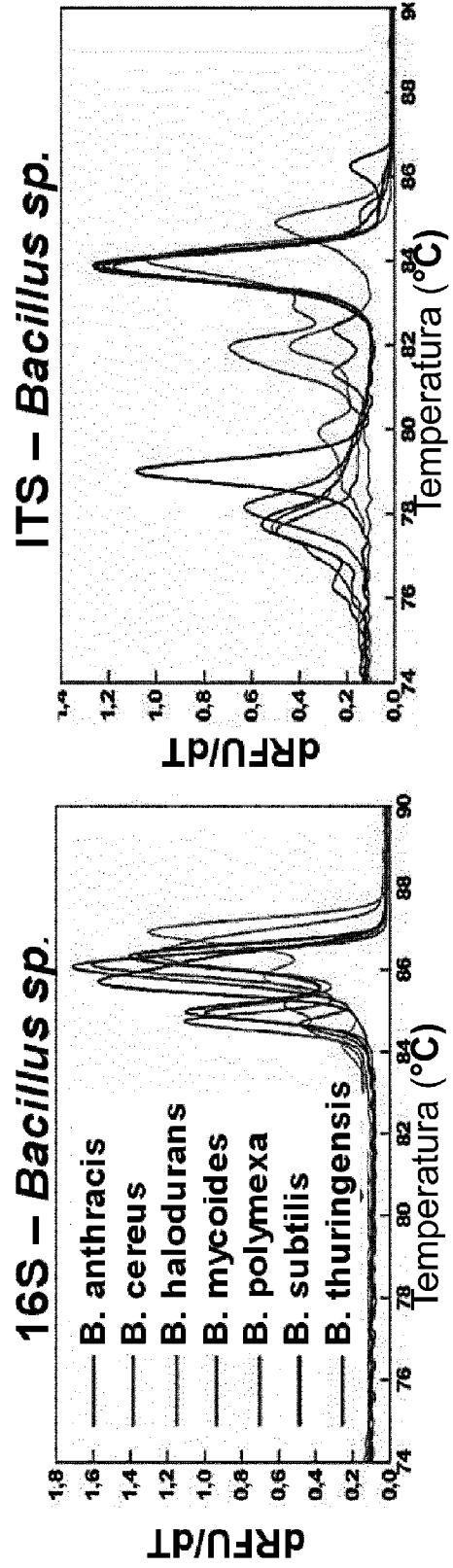


Figura 23B

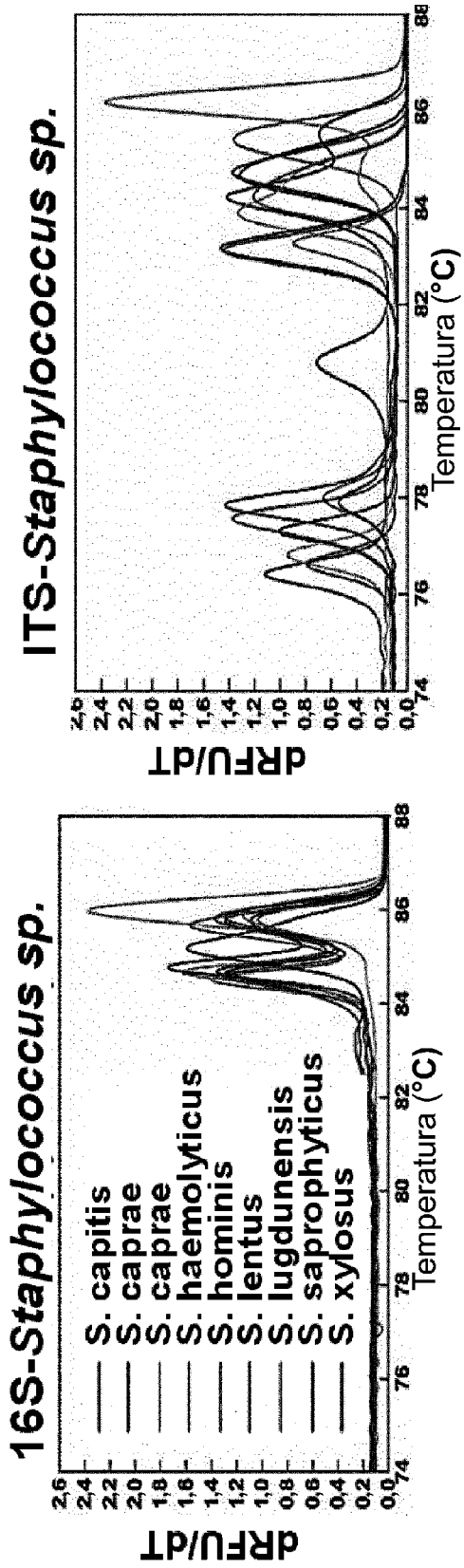


Figura 23C

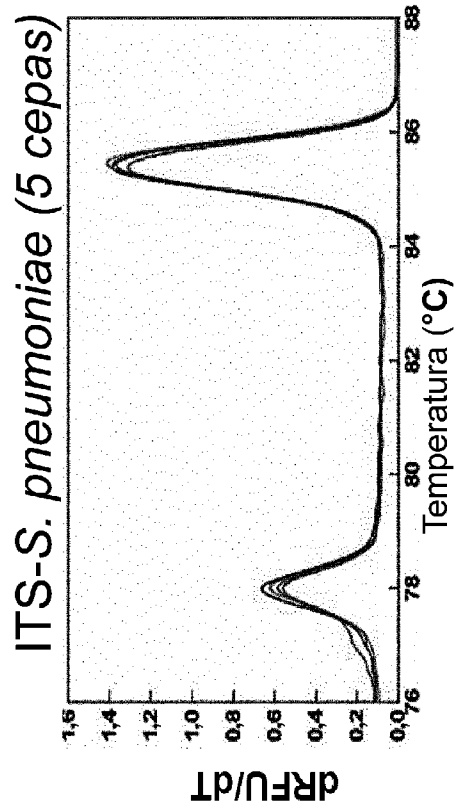


Figura 23D

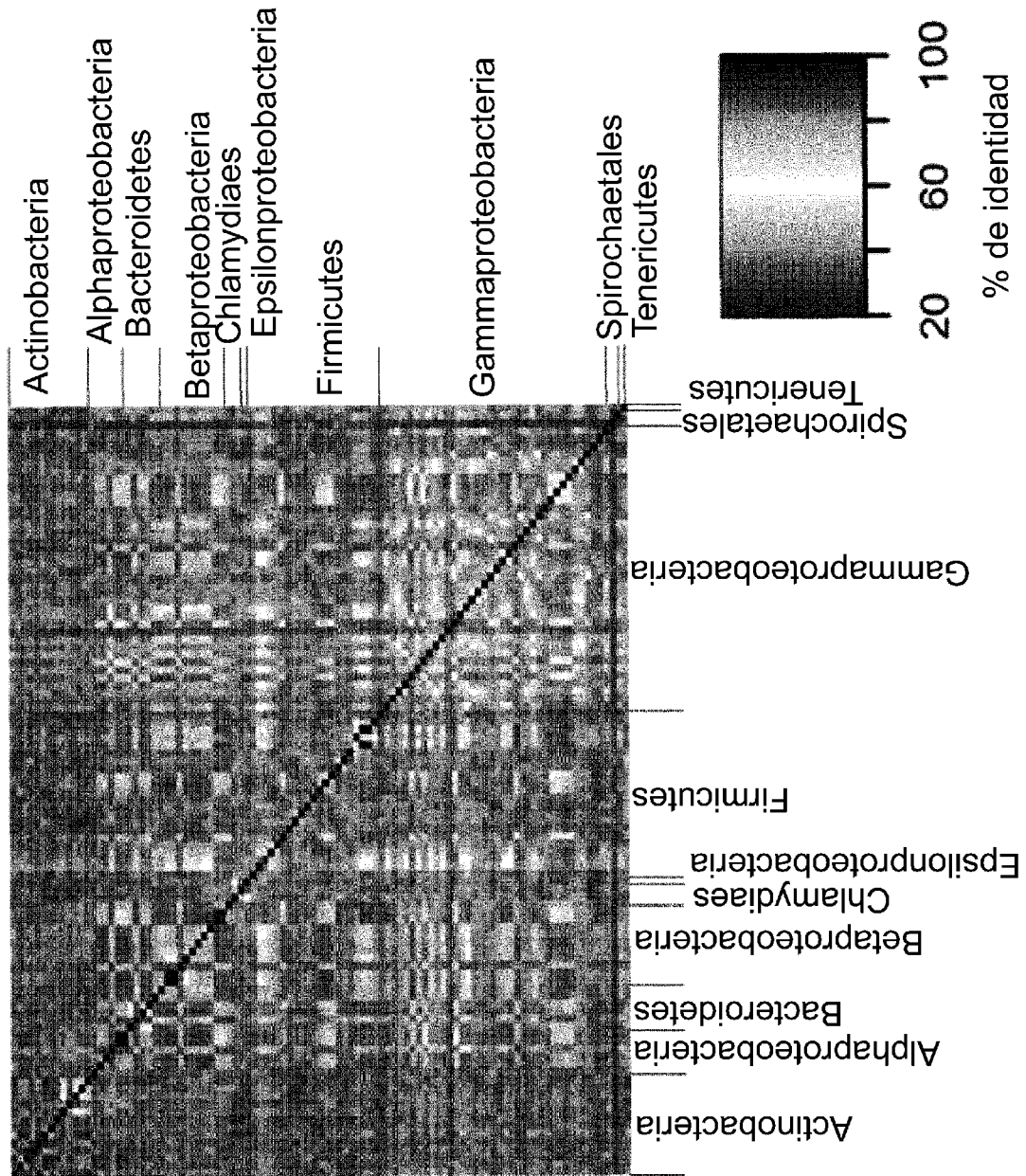


Figura 23E

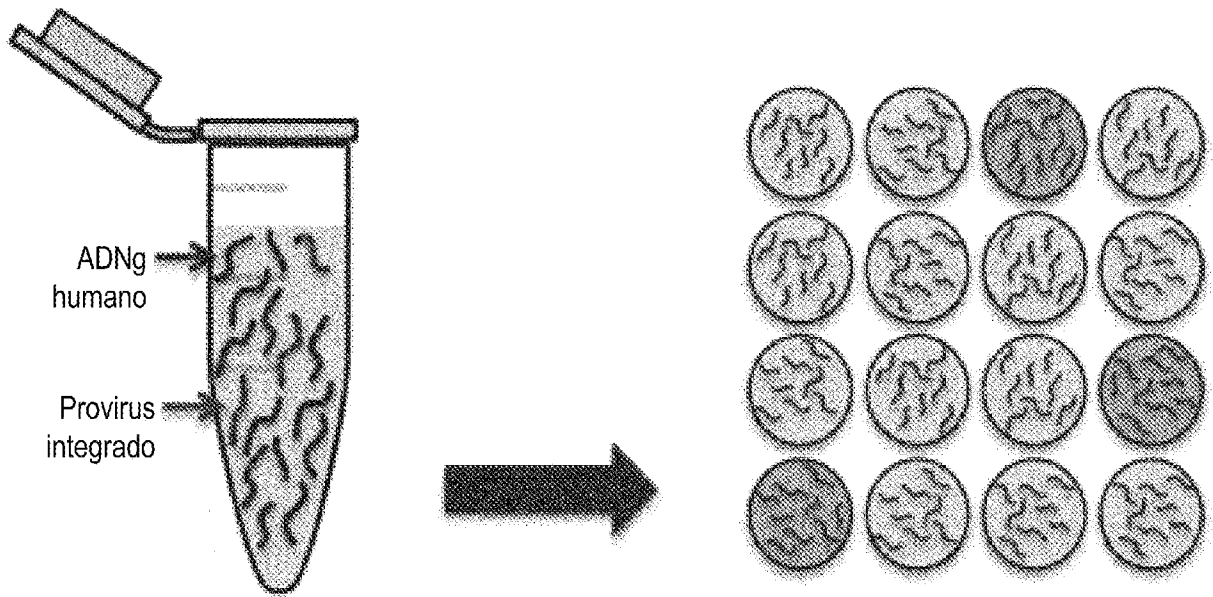


Figura 24A

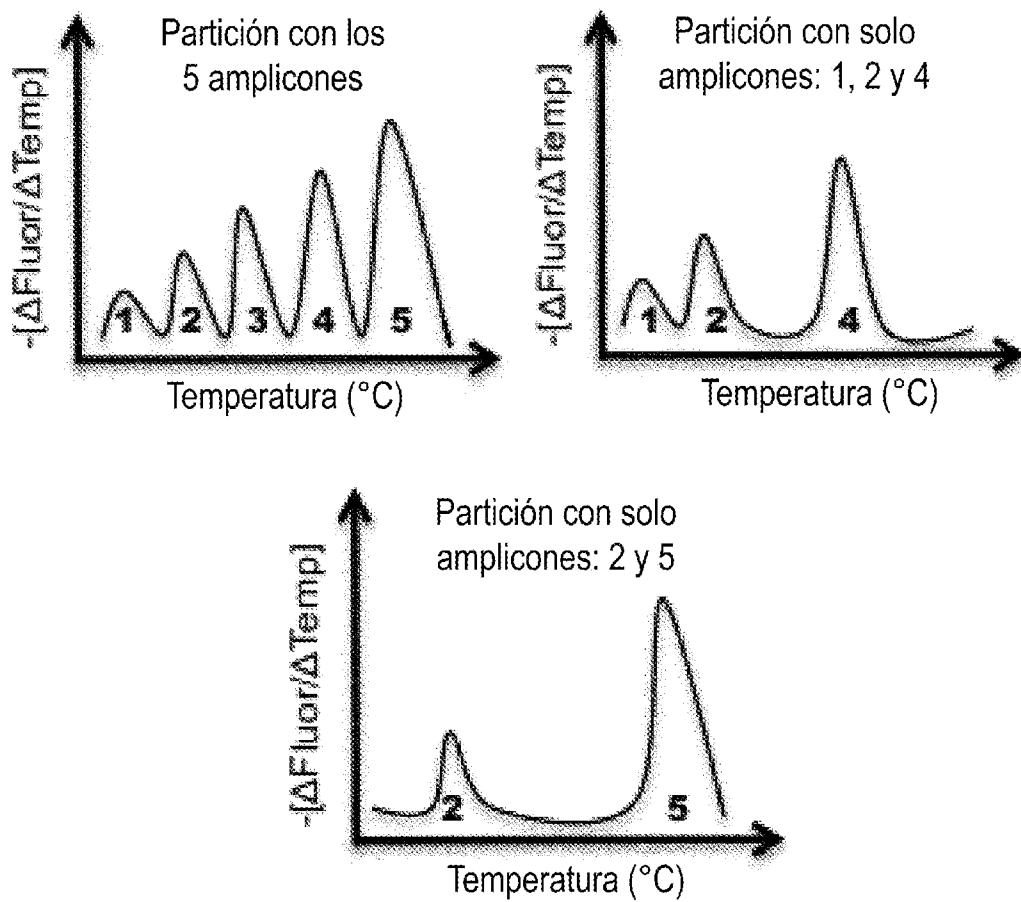


Figura 24B

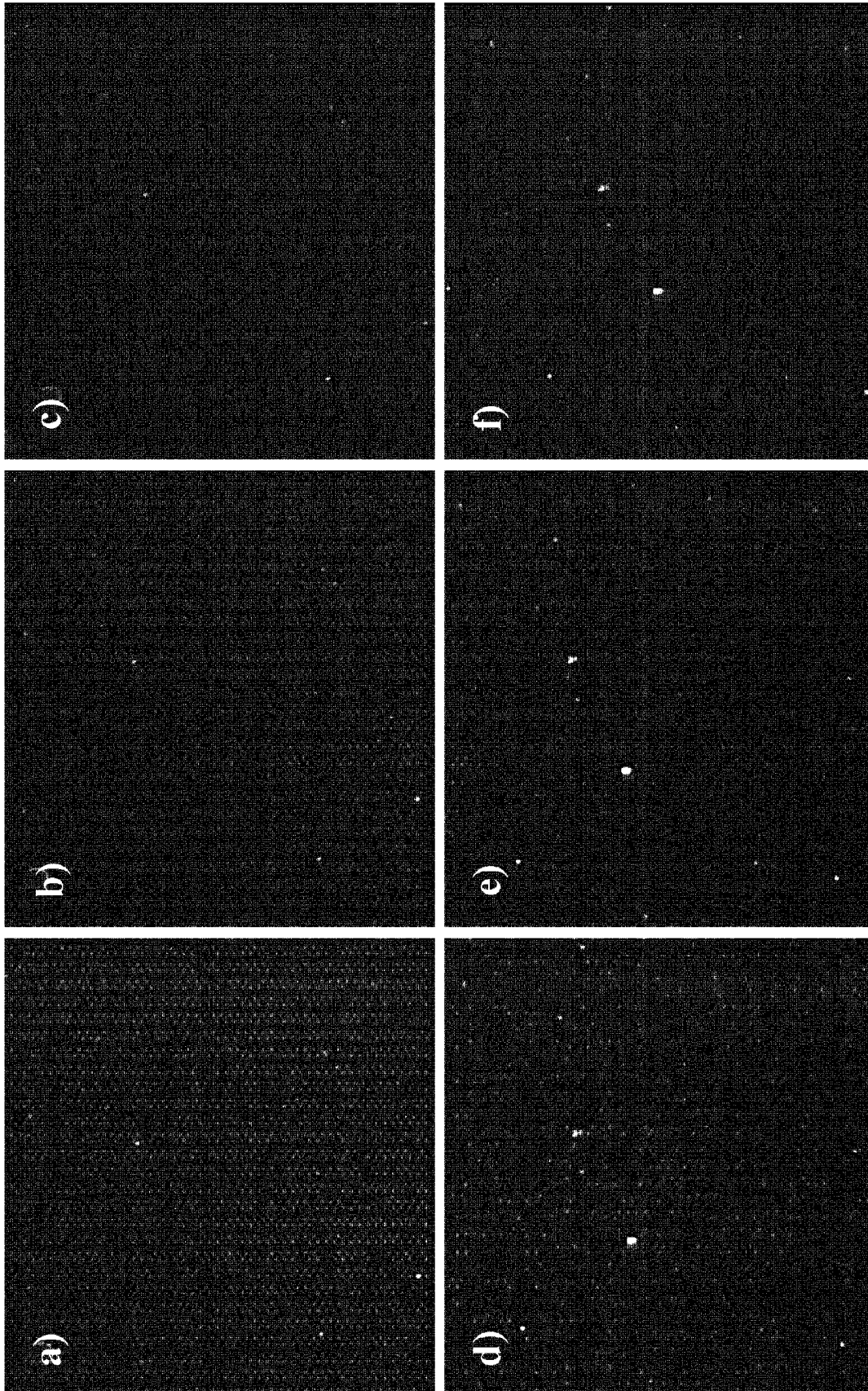


Figura 25

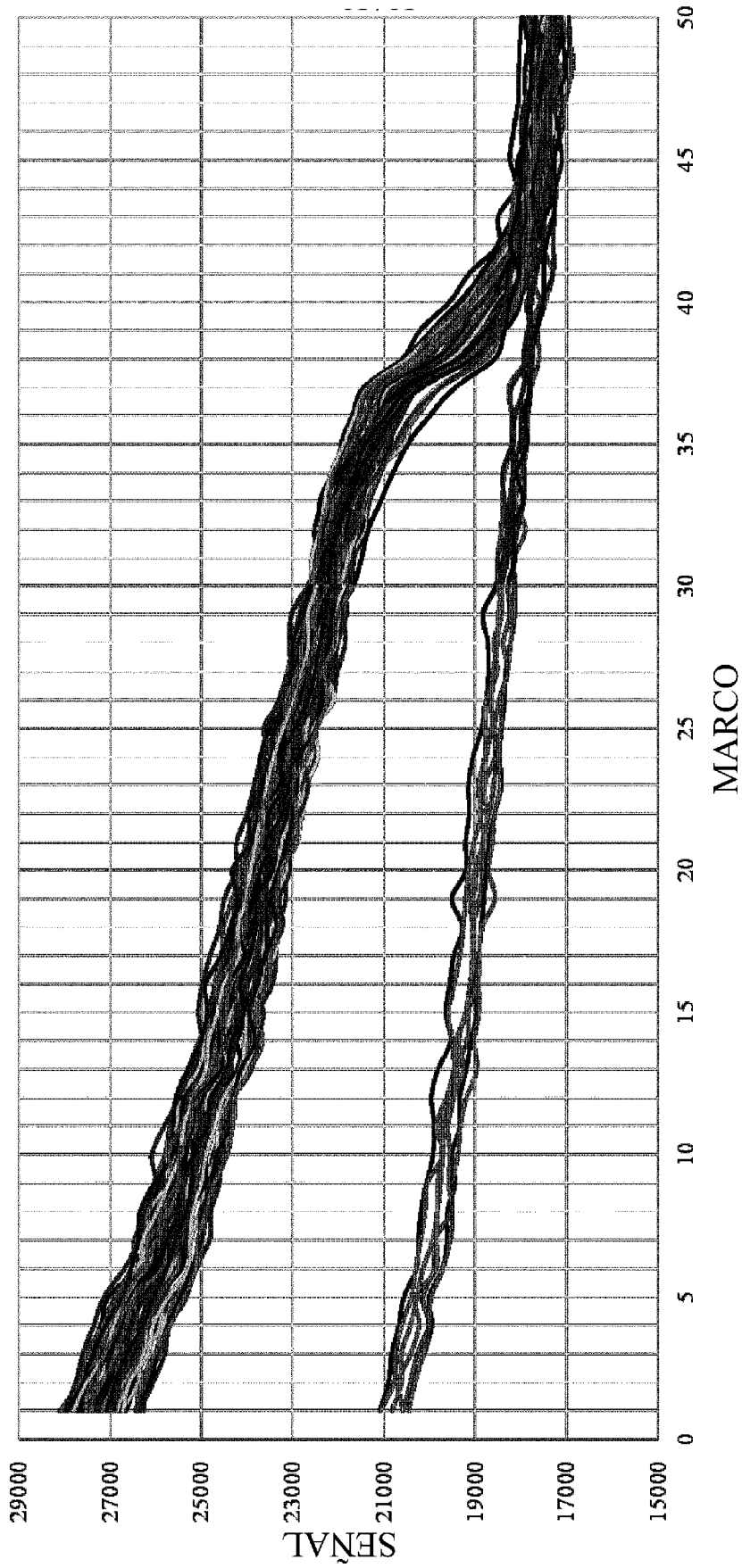


FIG. 26