

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 580**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12Q 1/6874 (2008.01)

G01N 15/10 (2006.01)

G01N 15/14 (2006.01)

C12Q 1/6869 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2018 PCT/US2018/013379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2018 WO18132610**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2018 E 18703112 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3568234**

54 Título: **Revestimiento hidrófilo de canales de fluidos**

30 Prioridad:

13.01.2017 US 201762446223 P

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

12.03.2024

73 Titular/es:

**CELLULAR RESEARCH, INC. (100.0%)
4040 Campbell Avenue, Suite 110
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**SPUHLER, PHILIPP y
LI, SIXING**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 961 580 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

Revestimiento hidrófilo de canales de fluidos

5 **Antecedentes**

Campo

La presente descripción se refiere en general al campo de los canales fluídicos.

10

Descripción de la técnica relacionada

Los métodos y técnicas tales como la codificación de barras son útiles para el análisis de células individuales, en particular para descifrar los perfiles de expresión génica para determinar los estados de células individuales utilizando, por ejemplo, transcripción inversa, amplificación de reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction - PCR) y secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing - NGS). Los métodos y técnicas requieren una carga eficiente de partículas, tales como perlas que contienen código de barras y células en una celda de flujo con una matriz de micropocillos en su parte inferior. Una celda de flujo de este tipo puede utilizarse para descifrar los perfiles de expresión génica de células individuales mediante la introducción de perlas individuales y células individuales en micropocillos de la matriz de micropocillos.

15

20

US 2016/289669 A1 se refiere a dispositivos y sistemas que comprenden un sustrato que comprende al menos 100 micropocillos y una pluralidad de perlas, en donde una pluralidad de los al menos 100 micropocillos contiene cada uno una única perla, y en donde la relación entre el diámetro promedio de los micropocillos y el diámetro de las perlas varía de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,8; y una celda de flujo en comunicación de fluidos con el sustrato; y c) al menos una vía de entrada y al menos una vía de salida, en donde la al menos una vía de entrada y al menos una vía de salida son capaces de dirigir un flujo de un fluido a través de la celda de flujo, poniendo en contacto de este modo los micropocillos con el fluido.

25

30

US 2009/035759 A1 se refiere a un método que comprende cargar una porción de muestra en una cámara de muestra que comprende medios para minimizar la difusión de la porción de muestra, someter la porción de muestra a una etapa de amplificación, y determinar si la porción de muestra contiene al menos una molécula de un ácido nucleico objetivo.

35

US 2016/145683 A1 se refiere a métodos, composiciones y kits para el análisis de ácidos nucleicos múltiplex de células individuales. Los métodos, composiciones y sistemas pueden utilizarse para secuenciación de células individuales masivamente paralelas. Los métodos, composiciones y sistemas pueden utilizarse para analizar miles de células simultáneamente. Los miles de células pueden comprender una población mixta de células (p. ej., células de diferentes tipos o subtipos, diferentes tamaños).

40

Resumen

1. En la presente memoria se describe un dispositivo para la codificación de barras (p. ej., codificación de barras estocástica). El dispositivo comprende una celda de flujo que comprende un canal fluídico, una vía de entrada y una vía de salida, en donde el canal fluídico comprende un techo, una primera pared lateral y una parte inferior del canal fluídico, en donde el techo y la primera pared lateral forman un borde de primera pared lateral de techo, y en donde la parte inferior y la primera pared lateral forman un borde de primera pared lateral de parte inferior, en donde la parte inferior del canal fluídico comprende un sustrato que comprende una pluralidad de micropocillos, y en donde la vía de entrada y la vía de salida están en comunicación de fluidos con la celda de flujo a través del canal fluídico, en donde el techo comprende una parte central que está desplazada del borde de la primera pared lateral de techo, formando de este modo un desplazamiento del borde de la primera pared lateral de techo, en donde la parte central es más hidrófila que el desplazamiento.

50

El canal fluídico puede tener una sección transversal no circular o una sección transversal aproximadamente rectangular. El canal fluídico tiene una anchura de al menos 2 mm, aproximadamente 4 mm, o aproximadamente 7 mm. El canal fluídico puede tener al menos 0,8 mm de altura, aproximadamente 1,2 mm de altura.

55

El sustrato puede formar la parte inferior del canal fluídico, o el sustrato puede estar en la parte inferior del canal fluídico. El sustrato puede comprender silicio, sílice fundida, vidrio, un polímero, un metal, un elastómero, polidimetilsiloxano, agarosa, un hidrogel o una combinación de los mismos.

60

La celda de flujo puede comprender silicio, sílice fundida, vidrio, polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), poliimida, polímeros de olefina cíclica (COP), copolímeros de olefina cíclica (COC), tereftalato de polietileno (PET), resina epoxi, metal o una combinación de los mismos. Los polímeros de olefina cíclica (COP) pueden comprender Zeonor 1020R o Zeonor 1060R.

65

El techo puede ser hidrófilo. El ángulo de contacto del techo corresponde a un promedio de ángulos de contacto de una pluralidad de ubicaciones en el techo. El ángulo de contacto del techo puede ser 0-80 grados, 0-60 grados, o como máximo

10 grados. El ángulo de contacto del techo puede ser de al menos 30 grados o al menos 50 grados más pequeño que el ángulo de contacto de la primera pared lateral.

5 El ángulo de contacto de la primera pared lateral puede corresponder a un promedio de ángulos de contacto de una pluralidad de ubicaciones en la primera pared lateral. El ángulo de contacto de la primera pared lateral puede ser de aproximadamente 88 grados. El ángulo de contacto del techo puede ser suficientemente más pequeño que el ángulo de contacto de la primera pared lateral para permitir el flujo no laminar dentro del canal fluido. La primera pared lateral puede tener un ángulo de incidencia positivo de 1-15 grados.

10 El flujo no laminar dentro del canal fluido permite la agitación de una partícula en la superficie del sustrato mediante un flujo dentro del canal fluido. Una velocidad del flujo en un límite entre el flujo y la parte inferior puede ser distinta de cero. La velocidad de flujo relativa de un flujo a través de una sección transversal del canal fluido puede ser constante o aproximadamente constante. El flujo no laminar puede ser un flujo de tipo pistón.

15 El flujo no laminar puede ser aproximadamente un flujo de pistón. El flujo de pistón puede ser un flujo de pistón aproximadamente horizontal. El flujo de pistón horizontal puede ser un flujo de pistón horizontal asistido por capilar. El flujo de pistón puede no depender de la flotabilidad de un gas tal como aire, CO₂, o N₂. El flujo de pistón puede no depender de la inclinación del dispositivo. El flujo de pistón puede estar en una interfaz de amortiguador-gas.

20 El techo comprende un recubrimiento hidrófilo. El recubrimiento hidrófilo puede ser un recubrimiento superhidrófilo. El recubrimiento hidrófilo puede comprender polietilenglicol (PEG), poli-Hema, ácido plurónico F68, ácido plurónico F108, ácido plurónico F127, polisorbato 20, dióxido de silicio (SiO₂), nitruro de silicio, o cualquier combinación de los mismos. El recubrimiento hidrófilo tiene un ángulo de contacto de 0-80 grados, 0-60 grados, o como máximo 23 grados. El techo puede recubrirse con el recubrimiento hidrófilo mediante pulverización catódica, crecimiento térmico, adsorción, unión covalente o cualquier combinación de los mismos. El recubrimiento hidrófilo está desplazado del borde formado por el techo y la primera pared lateral por, por ejemplo, 100-1000 micrómetros o 1 % -25 % del ancho del techo.

25 El dispositivo puede comprender una pluralidad de partículas que residen en la pluralidad de micropocillos del sustrato, y en donde al menos 25 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula. Al menos 50 % o 75 % de la pluralidad de micropocillos puede contener cada uno una única partícula. La partícula puede comprender una perla o una célula. La perla puede comprender una pluralidad de códigos de barras (p. ej., códigos de barras estocásticos). Cada uno de la pluralidad de códigos de barras puede comprender una etiqueta molecular seleccionada de un grupo que comprende al menos 100 o 1000 etiquetas moleculares con secuencias únicas. Diferentes códigos de barras de la pluralidad de códigos de barras pueden tener la misma etiqueta de célula. La pluralidad de micropocillos puede comprender al menos 100 micropocillos, por ejemplo, 1000-5000000 micropocillos.

30 Un micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener un volumen de 1 femtolitro-1 microlitro o 1 picolitro-1 nanolitro. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener una sección transversal no circular en un plano del sustrato, y la sección transversal no circular en el plano del sustrato puede ser cuadrada o hexagonal. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener 25-100 micrómetros de profundidad, tal como 50 micrómetros de profundidad. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener un ancho de 25-100 micrómetros, tal como 50 micrómetros. Una relación de aspecto entre la anchura del micropocillo y la profundidad del micropocillo puede ser de 0,1-2. Una dimensión del micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede permitir que el micropocillo contenga como máximo una perla. Una relación entre la anchura del micropocillo y un diámetro de la como máximo una perla puede ser de 1,2-1,8. Un porcentaje de la pluralidad de micropocillos que puede contener una única perla es al menos 90 %.

35 El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede comprender un recubrimiento de polietilenglicol (PEG), poli-Hema, ácido plurónico F68, ácido plurónico F108, ácido plurónico F127, polisorbato 20, dióxido de silicio (SiO₂), nitruro de silicio, o una combinación de los mismos. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede comprender una superficie tratada con plasma.

40 La vía de entrada y la vía de salida son capaces de dirigir un flujo de un fluido a través del canal fluido, poniendo en contacto de este modo los micropocillos con el fluido. El dispositivo puede comprender una interfaz de punta de pipeta para cargar o retirar una muestra celular, un reactivo de ensayo, una suspensión de perlas, desechos del dispositivo o una combinación de los mismos. El dispositivo puede comprender la muestra celular, el reactivo de ensayo, la suspensión de perlas o una combinación de los mismos.

45 En la presente memoria se describe un método para la carga de muestras. El método comprende:

60 (a) proporcionar un dispositivo que comprende una celda de flujo que comprende un canal fluido, una vía de entrada y una vía de salida, en donde el canal fluido comprende un techo, una primera pared lateral y una parte inferior del canal fluido, en donde el techo y la primera pared lateral forman un borde de pared lateral de techo, y en donde la parte inferior y la primera pared lateral forman un borde de primera pared lateral de parte inferior, en donde la parte inferior del canal fluido comprende un sustrato que comprende una pluralidad de micropocillos, y en donde la vía de entrada y la vía de salida están en comunicación de fluidos con la celda de flujo a través del canal fluido, en donde el techo comprende una

parte central que está desplazada del borde de la primera pared lateral de techo, formando de este modo un desplazamiento del borde de la primera pared lateral de techo, en donde la parte central es más hidrófila que el desplazamiento;

(b) introducir un gas tal como aire, CO₂, o N₂ en el canal fluido a través de la vía de entrada; y

(c) introducir una primera muestra que comprende una primera pluralidad de partículas en el canal fluido a través de la vía de entrada, en donde al menos 25 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula de la primera pluralidad de partículas. Al menos 50 % o 75 % de la pluralidad de micropocillos puede contener cada uno una única partícula de la primera pluralidad de partículas. El canal fluido puede comprender una segunda pared lateral, en donde el techo y la segunda pared lateral forman una segunda pared lateral de techo y en donde la parte inferior y la segunda pared lateral para una segunda pared lateral de parte inferior.

El método puede comprender (d) introducir un gas tal como aire, CO₂, o N₂ en el canal fluido a través de la vía de entrada; y (e) introducir una segunda muestra en el canal fluido a través de la vía de entrada después de introducir la primera muestra en el canal fluido, en donde la segunda muestra comprende una segunda pluralidad de partículas, y donde al menos 25 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula de la segunda pluralidad de partículas. Al menos 50 % o 75 % de la pluralidad de micropocillos puede contener cada uno una única partícula de la segunda pluralidad de partículas.

Después de introducir la segunda muestra en el canal fluido a través de la vía de entrada en (e), al menos 25 % o 50 % de la pluralidad de micropocillos puede contener cada uno una única partícula de la primera pluralidad de partículas y una única partícula de la segunda pluralidad de partículas.

La primera pluralidad de partículas puede comprender una pluralidad de perlas, y una perla de la pluralidad de perlas puede comprender una pluralidad de códigos de barras (p. ej., códigos de barras estocásticos). La segunda pluralidad de partículas comprende una pluralidad de células. La primera pluralidad de partículas comprende una pluralidad de células. La segunda pluralidad de partículas puede comprender una pluralidad de perlas, y en donde una perla de la pluralidad de perlas comprende una pluralidad de códigos de barras (p. ej., códigos de barras estocásticos).

La pluralidad de células de la primera pluralidad de partículas o la pluralidad de células de la segunda pluralidad de partículas puede comprender células madre, células cancerosas, células sanguíneas, células mononucleares de sangre periférica, células tumorales circulantes, células de cáncer de mama, células en una fase de ciclo celular del deseo, o una combinación de las mismas. La primera muestra o la segunda muestra pueden comprender una muestra biológica, una muestra clínica, una muestra ambiental o una combinación de las mismas. La primera muestra o la segunda muestra pueden comprender uno o más de un fluido biológico, tejido y célula de un paciente. La primera muestra o la segunda muestra comprende sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido amniótico, semen, saliva, médula ósea, una muestra de biopsia o una combinación de los mismos.

La introducción del gas en el canal fluido a través de la vía de entrada en (b) puede comprender inyectar el gas en el canal fluido a través de la vía de entrada. La introducción de la primera muestra en el canal fluido a través de la vía de entrada puede comprender inyectar la primera muestra en el canal fluido a través de la vía de entrada. La introducción del gas en el canal fluido a través de la vía de entrada en (d) puede comprender inyectar el gas en el canal fluido a través de la vía de entrada.

Antes de introducir el gas u otro gas en el canal fluido a través de la vía de entrada en (d), puede introducirse un primer amortiguador en el canal fluido a través de la vía de entrada para eliminar la primera pluralidad de partículas que están en la parte inferior y no están contenidas en ninguna de la pluralidad de micropocillos. Después de introducir la segunda muestra en el canal fluido a través de la vía de entrada en (e), puede introducirse un segundo amortiguador en el canal fluido a través de la vía de entrada para eliminar la segunda pluralidad de partículas que están en la parte inferior y no están contenidas en ninguna de la pluralidad de micropocillos.

El canal fluido puede tener una anchura de al menos 2 mm, aproximadamente 7 mm, o aproximadamente 4 mm. El canal fluido puede tener al menos 0,8 mm de altura, aproximadamente 1,2 mm de altura.

El sustrato puede formar la parte inferior del canal fluido, o el sustrato puede estar en la parte inferior del canal fluido. El sustrato puede comprender silicio, sílice fundida, vidrio, un polímero, un metal, un elastómero, polidimetilsiloxano, agarosa, un hidrogel o una combinación de los mismos.

La celda de flujo puede comprender silicio, sílice fundida, vidrio, polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), poliimida, polímeros de olefina cíclica (COP), copolímeros de olefina cíclica (COC), tereftalato de polietileno (PET), resina epoxi, metal o una combinación de los mismos. Los polímeros de olefina cíclica (COP) pueden comprender Zeonor 1020R o Zeonor 1060R.

El techo puede ser hidrófilo. El ángulo de contacto del techo corresponde a un promedio de ángulos de contacto de una pluralidad de ubicaciones en el techo. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto del techo es de 0-80 grados, 0-60

grados, o como máximo 10 grados. El ángulo de contacto del techo puede ser de al menos 30 grados o al menos 50 grados más pequeño que el ángulo de contacto de la primera pared lateral.

5 El ángulo de contacto de la primera pared lateral puede corresponder a un promedio de ángulos de contacto de una pluralidad de ubicaciones en la primera pared lateral. El ángulo de contacto de la primera pared lateral puede ser de aproximadamente 88 grados. El ángulo de contacto del techo puede ser suficientemente más pequeño que el ángulo de contacto de la primera pared lateral para permitir el flujo no laminar dentro del canal fluido. La primera pared lateral tiene un ángulo de incidencia positivo de 1-15 grados.

10 El flujo no laminar dentro del canal fluido permite la agitación de una partícula en la superficie del sustrato mediante un flujo dentro del canal fluido. Una velocidad del flujo en un límite entre el flujo y la parte inferior puede ser distinta de cero. La velocidad de flujo relativa de un flujo a través de una sección transversal del canal fluido puede ser constante o aproximadamente constante. El flujo no laminar puede ser un flujo de tipo pistón.

15 El flujo no laminar puede ser aproximadamente un flujo de pistón. El flujo de pistón puede ser un flujo de pistón aproximadamente horizontal. El flujo de pistón horizontal puede ser un flujo de pistón horizontal asistido por capilar. El flujo de pistón puede no depender de la flotabilidad del gas. El flujo de pistón puede no depender de la inclinación del dispositivo. El flujo de pistón puede estar en una interfaz de amortiguador-gas.

20 El techo puede comprender un recubrimiento hidrófilo. El recubrimiento hidrófilo puede ser un recubrimiento superhidrófilo. El recubrimiento hidrófilo puede comprender polietilenglicol (PEG), poli-Hema, ácido plurónico F68, ácido plurónico F108, ácido plurónico F127, polisorbato 20, dióxido de silicio (SiO₂), nitruro de silicio, o cualquier combinación de los mismos. El recubrimiento hidrófilo tiene un ángulo de contacto de 0-80 grados, 0-60 grados, o como máximo 23 grados. El techo puede recubrirse con el recubrimiento hidrófilo mediante pulverización catódica, crecimiento térmico, adsorción, unión covalente o cualquier combinación de los mismos. El recubrimiento hidrófilo está desplazado del borde formado por el techo y la primera pared lateral por, por ejemplo, 100-1000 micrómetros o 1 % -25 % del ancho del techo.

25 El sustrato puede comprender una pluralidad de partículas, y en donde al menos 25 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula. Al menos 50 % o 75 % de la pluralidad de micropocillos puede contener cada uno una única partícula. La partícula puede comprender una perla o una célula. La perla puede comprender un material de polidimetilsiloxano (PDMS), poliestireno, vidrio, polipropileno, agarosa, gelatina, hidrogel, paramagnético, cerámica, plástico, vidrio, metilmetacrilato, polímero acrílico, titanio, látex, sefrosa, celulosa, nailon, silicona o cualquier combinación de los mismos. La perla puede comprender una pluralidad de códigos de barras (p. ej., códigos de barras estocásticos). Cada uno de la pluralidad de códigos de barras puede comprender una etiqueta molecular seleccionada de un grupo que comprende al menos 100 o 1000 etiquetas moleculares con secuencias únicas. Diferentes códigos de barras de la pluralidad de códigos de barras pueden tener la misma etiqueta de célula. La pluralidad de micropocillos puede comprender al menos 100 micropocillos, por ejemplo, 1000-5000000 micropocillos.

30 Un micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener un volumen de 1 femtolitro-1 microlitro o 1 picolitro-1 nanolitro. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener una sección transversal no circular en un plano del sustrato, y la sección transversal no circular en el plano del sustrato puede ser cuadrada o hexagonal. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener 25-100 micrómetros de profundidad, tal como 50 micrómetros de profundidad. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede tener un ancho de 25-100 micrómetros, tal como 50 micrómetros. Una relación de aspecto entre la anchura del micropocillo y la profundidad del micropocillo puede ser de 0,1-2. Una dimensión del micropocillo de la pluralidad de micropocillos permite que el micropocillo contenga como máximo una perla. Una relación entre la anchura del micropocillo y un diámetro de la como máximo una perla puede ser de 1,2-1,8. Un porcentaje de la pluralidad de micropocillos que contienen una única perla puede ser de al menos 90 %.

35 El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede comprender un recubrimiento de polietilenglicol (PEG), poli-Hema, ácido plurónico F68, ácido plurónico F108, ácido plurónico F127, polisorbato 20, dióxido de silicio (SiO₂), nitruro de silicio, o una combinación de los mismos. El micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede comprender una superficie tratada con plasma.

40 La vía de entrada y la vía de salida son capaces de dirigir un flujo de un fluido a través del canal fluido, poniendo en contacto de este modo los micropocillos con el fluido. El dispositivo puede comprender una interfaz de punta de pipeta para cargar o retirar una muestra celular, un reactivo de ensayo, una suspensión de perlas, desechos del dispositivo o una combinación de los mismos. El dispositivo puede comprender la muestra celular, el reactivo de ensayo, la suspensión de perlas o una combinación de los mismos.

45 **Breve descripción de las figuras**

50 La Fig. 1 ilustra un código de barras estocástico ilustrativo no limitativo.

55 La Fig. 2 muestra un flujo de trabajo ilustrativo no limitativo de la codificación de barras estocástica y el recuento digital.

60

La Fig. 3 es una ilustración esquemática que muestra un proceso ilustrativo no limitativo para generar una biblioteca indexada de los objetivos codificados estocásticamente con código de barras a partir una pluralidad de objetivos.

5 Las Figs. 4A-4B son ilustraciones esquemáticas que muestran perfiles de velocidad relativa del flujo laminar y flujo de pistón a lo largo de la dirección del flujo.

Las Figs. 5A-5B muestran ilustraciones esquemáticas del uso de flotabilidad para el flujo de pistón de amortiguación de gas y el uso de flujo asistido por capilar para flujo de pistón horizontal.

10 Las Figs. 6A-6B son ilustraciones esquemáticas que muestran direcciones de flujo capilar y flujo accionado por presión cuando todo el techo del canal fluídico está recubierto con un recubrimiento hidrófilo (no según la invención) o cuando el techo del canal fluídico, excepto el borde del techo del canal fluídico, está recubierto con un recubrimiento hidrófilo.

15 La Fig. 7A muestra una vista despiezada de un cartucho ilustrativo para la codificación de barras. La Fig. 7B muestra una vista en sección transversal del cartucho ilustrativo mostrado en la Fig. 7A.

La Fig. 8 muestra una vista en sección transversal de un canal ilustrativo de un cartucho para la codificación de barras como se muestra en la Fig. 7B.

20 Las Figs. 9A-9H son ilustraciones esquemáticas de vistas en sección transversal de canales de fluidos ilustrativos no limitativos con techo de canal fluídico revestido, paredes laterales y/o parte inferior.

25 Las Figs. 10A-10B son imágenes de una matriz de micropocillos que muestran agregaciones de perlas sustanciales en los límites del canal fluídico. La matriz de micropocillos estaba en la parte inferior de un canal fluídico en una celda de flujo. La parte inferior del canal fluídico de la celda de flujo tenía un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio, pero ni el techo ni las paredes laterales del canal fluídico de la celda de flujo tenían un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio. Las agregaciones de perlas fueron sustanciales en los límites del canal fluídico.

30 La Fig. 11A muestra una imagen de una matriz de micropocillos. La matriz de micropocillos estaba ubicada en la parte inferior de un canal fluídico de una celda de flujo. El techo y las paredes laterales del canal fluídico de la celda de flujo tenían recubrimientos hidrófilos de dióxido de silicio sobre sus superficies. La parte inferior del canal fluídico no tenía un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio. Las regiones de la matriz de micropocillos etiquetadas 1 y 9 corresponden a las regiones más cercanas a la entrada y a la salida de la celda de flujo respectivamente.

35 Las Figs. 11B-11C son imágenes que muestran que los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos con dobletes de perlas fueron similares en el centro y el límite del canal fluídico para la región 1 de la matriz de micropocillos (que estaba más cerca de la entrada de la celda de flujo). Las Figs. 11D-11E son imágenes que muestran que el porcentaje de micropocillos de la matriz de micropocillos con dobletes de perlas fue menor en el centro en comparación con el límite del canal fluídico para la región 9 de la matriz de micropocillos (que estaba más cerca de la salida de la celda de flujo). Las Figs. 11F-11I son gráficos que muestran los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos sin perla, perlas individuales o dobletes de perlas a lo largo de la dirección del flujo.

45 Las Figs. 12A-12C son imágenes de una matriz de micropocillos que muestra que las agregaciones de perlas se redujeron significativamente en los límites de las celdas de flujo. La matriz de micropocillos se encuentra en la parte inferior de una celda de flujo. El techo, pero no las paredes laterales ni la parte inferior, del canal fluídico de la celda de flujo tenía un recubrimiento hidrófilo. Las agregaciones de perlas se redujeron significativamente en los límites de las celdas de flujo. Se observó poca variación espacial de la uniformidad o consistencia de la carga de las perlas. Las Figs. 12B y 12C son imágenes ampliadas de una parte de límite y una parte central del canal fluídico, respectivamente, de la Fig. 12A.

50 Las Figs. 13A1-13C2 son imágenes de una matriz de micropocillos con un recubrimiento hidrófilo únicamente en el techo del canal fluídico (Fig. 13A1-13A2), únicamente en las partes centrales del techo del canal fluídico (Fig. 13B1-13B2 y 13C1-13C2), que muestran más reducciones en las agregaciones de perlas en los límites de la celda de flujo

Las Figs. 10A-13A2 no son según la presente invención.

55 Las Figs. 14A-14G muestran que se logró una agregación mínima de perlas en los límites de la celda de flujo (Fig. 14C) y poca variación en la uniformidad o consistencia de la carga de las perlas (Figs. 14B-G) con un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio en la parte central del techo del canal fluídico que están desplazados de los bordes formados por el techo del canal fluídico y las paredes laterales. La Fig. 14A es una imagen de una matriz de micropocillos de una celda de flujo de un cartucho en forma de U para un experimento de carga. Las Figs. 14B-14C son imágenes ampliadas de partes de la Fig. 14A que muestran que los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos con dobletes de perlas fueron similares en el centro y el límite del canal fluídico para la matriz de micropocillos. Las Figs. 14D-14G son gráficos para dos experimentos de carga que no muestran ningún efecto de borde con respecto a los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos sin perla, perlas individuales o dobletes de perlas a lo largo de la dirección de flujo.

65

Las Figs. 15A1-15J2 son, cada una, una imagen de una matriz de micropocillos, o una parte de la misma, con un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio en la parte central del techo del canal fluídico, que muestra una buena eficiencia de carga, una agregación mínima de perlas en los límites de la celda de flujo y poca variación en la uniformidad o consistencia de la carga de las perlas. Cada una de las Figs. 15A2, 15B2, 15C2, 15D2, 15E2, 15F2, 15G2, 15H2, 15I2, 15J2 es una imagen ampliada de una parte de las Figs. 15A1, 15B1, 15C1, 15D1, 15E1, 15F1, 15G1, 15H1, 15I1, 15J1, respectivamente.

Las Figs. 16A-16D muestran que tener un recubrimiento hidrófilo en la parte central del techo del canal fluídico con desviaciones de los bordes formados por el techo del canal fluídico y las paredes laterales puede mejorar la eficiencia de carga.

Descripción detallada

En la siguiente descripción detallada, se hace referencia a las figuras adjuntas, que forman parte de la misma. En las figuras, símbolos similares típicamente identifican componentes similares, a menos que el contexto indique lo contrario. Las realizaciones ilustrativas descritas en la descripción detallada, figuras y reivindicaciones no pretenden ser limitativas. Se entenderá fácilmente que los aspectos de la presente descripción, como se describe generalmente en la presente memoria, y se ilustra en las Figuras, pueden disponerse, sustituirse, combinarse, separarse y diseñarse en una amplia variedad de configuraciones diferentes, todas las cuales se contemplan explícitamente en la presente memoria y forman parte de la descripción de la presente memoria.

Se describen métodos y sistemas para la codificación de barras. En algunas realizaciones, un dispositivo comprende: una celda de flujo que comprende un canal fluídico, una vía de entrada y una vía de salida, en donde el canal fluídico comprende un techo, una primera pared lateral y una parte inferior, en donde el ángulo de contacto del techo es al menos 10 grados más pequeño que el ángulo de contacto de la primera pared lateral, en donde la parte inferior del canal fluídico comprende un sustrato que comprende una pluralidad de micropocillos, y en donde la vía de entrada y la vía de salida están en comunicación de fluidos con la celda de flujo a través del canal fluídico. El canal fluídico puede comprender una segunda pared lateral. El recubrimiento hidrófilo está desplazado del borde formado por el techo y la primera pared lateral por, por ejemplo, 100-1000 micrómetros o 1 % -25 % del ancho del techo. Un dispositivo de este tipo puede utilizarse para crear flujo de pistón a través del ancho de la cámara de celda de flujo. El flujo de pistón puede permitir una carga y recuperación eficiente de partículas tales como perlas y células dentro y desde los micropocillos de una matriz de micropocillos en la parte inferior de la cámara de celda de flujo.

Puede utilizarse un recubrimiento o tratamiento superhidrófilo de la pared superior (también denominado techo, techo de canal fluídico o techo de canal fluídico) dentro del canal fluídico de una celda de flujo para introducir pistones de gas y pistones de amortiguación a una celda de flujo con flujo de trabajo horizontal no inclinado (es decir, sin inclinar la celda de flujo). El recubrimiento superhidrófilo proporciona un flujo asistido por capilar para un frente de fluido uniforme del gas y el pistón de amortiguación sin el uso de flotabilidad para lograr el desplazamiento de gas por medio de un amortiguador o para lograr el desplazamiento del amortiguador por el gas. Por lo tanto, puede eliminarse el requisito de utilizar flotabilidad para desplazar el gas con amortiguador o para desplazar el amortiguador con el gas. A su vez, puede eliminarse el requisito de flujo de trabajo de inclinación no horizontal de la celda de flujo. En algunas realizaciones, los recubrimientos hidrófilos e hidrófobos estructurados pueden utilizarse en un techo de canal fluídico o un techo de canal fluídico para adaptar el perfil de un frente de fluido amortiguador de gas en una celda de flujo. El recubrimiento selectivo (también denominado funcionalización) del límite del canal fluídico (también denominado límite de celda de flujo) influye en la dirección del flujo capilar dentro de partes específicas de la celda de flujo para controlar el perfil del perfil frontal de fluido amortiguador de gas. El flujo asistido por capilar puede utilizarse para el funcionamiento horizontal de una celda de flujo con un flujo de pistón de amortiguación de gas para evitar la ruptura de los pistones de amortiguación y de gas. Además, el flujo de pistón puede utilizarse para lograr velocidades de flujo elevadas en los límites de celda de flujo. Una finalidad de esto puede ser eliminar el exceso de perlas en la superficie de una matriz de micropocillos dentro de la celda de flujo.

En la presente memoria se describen métodos para la carga de muestras. En algunas realizaciones, un método comprende: (a) proporcionar un dispositivo que comprende: una celda de flujo que comprende un canal fluídico, una vía de entrada y una vía de salida, en donde el canal fluídico comprende un techo del canal fluídico, una primera pared lateral y una parte inferior en donde el ángulo de contacto del techo del canal fluídico es al menos 10 grados más pequeño que el ángulo de contacto de la primera pared lateral, en donde la parte inferior comprende un sustrato que comprende una pluralidad de micropocillos, en donde la pluralidad de micropocillos comprende al menos 100 micropocillos, y en donde la vía de entrada y la vía de salida están en comunicación de fluidos con la celda de flujo a través del canal fluídico; (b) introducir un gas en el canal fluídico a través de la vía de entrada; y (c) introducir una primera muestra en el canal fluídico a través de la vía de entrada, en donde la primera muestra comprende una primera pluralidad de partículas, y en donde, después de introducir la muestra en el canal fluídico a través de la vía de entrada, al menos 25 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula de la primera pluralidad de partículas. En algunas realizaciones, al menos 50 % o 75 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula de la primera pluralidad de partículas. El canal fluídico puede comprender una segunda pared lateral.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Véase, p. ej., Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2^a ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 1994); Sambrook y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989). Para los fines de la presente descripción, los siguientes términos se definen a continuación.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “adaptador” puede significar una secuencia para facilitar la amplificación o secuenciación de ácidos nucleicos asociados. Los ácidos nucleicos asociados pueden comprender ácidos nucleicos objetivo. Los ácidos nucleicos asociados pueden comprender uno o más de etiquetas espaciales, etiquetas objetivo, etiquetas de muestras, etiqueta de indexación, códigos de barras, códigos de barras estocásticos o etiquetas moleculares. Los adaptadores pueden ser lineales. Los adaptadores pueden ser adaptadores preadenilados. Los adaptadores pueden ser bicatenarios o monocatenarios. Uno o más adaptadores pueden ubicarse en el extremo 5' o 3' de un ácido nucleico. Cuando los adaptadores comprenden secuencias conocidas en los extremos 5' y 3', las secuencias conocidas pueden ser secuencias iguales o diferentes. Un adaptador ubicado en los extremos 5' y/o 3' de un polinucleótido puede ser capaz de hibridar con uno o más oligonucleótidos inmovilizados sobre una superficie. Un adaptador puede, en algunas realizaciones, comprender una secuencia universal. Una secuencia universal puede ser una región de secuencia de nucleótidos que es común a dos o más moléculas de ácido nucleico. Las dos o más moléculas de ácido nucleico pueden tener regiones de diferente secuencia. Así, por ejemplo, los adaptadores 5' pueden comprender secuencias de ácido nucleico idénticas y/o universales y los adaptadores 3' pueden comprender secuencias idénticas y/o universales. Una secuencia universal que puede estar presente en diferentes miembros de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico puede permitir la replicación o amplificación de múltiples secuencias diferentes utilizando un único cebador universal que es complementario a la secuencia universal. De forma similar, al menos una, dos (p. ej., un par) o más secuencias universales que pueden estar presentes en diferentes miembros de una colección de moléculas de ácido nucleico pueden permitir la replicación o amplificación de múltiples secuencias diferentes utilizando al menos uno, dos (p. ej., un par) o más cebadores universales individuales que son complementarios a las secuencias universales. Por lo tanto, un cebador universal incluye una secuencia que puede hibridar con dicha secuencia universal. Las moléculas portadoras de secuencias de ácido nucleico objetivo pueden modificarse para unir adaptadores universales (p. ej., secuencias de ácido nucleico no objetivo) a uno o ambos extremos de las diferentes secuencias de ácido nucleico objetivo. Los uno o más cebadores universales unidos al ácido nucleico objetivo pueden proporcionar sitios para la hibridación de cebadores universales. Los uno o más cebadores universales unidos al ácido nucleico objetivo pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “asociado” o “asociado con” puede significar que dos o más especies son identificables como colocalizadas en un momento determinado. Una asociación puede significar que dos o más especies están o estuvieron dentro de un recipiente similar. Una asociación puede ser una asociación informática, donde, por ejemplo, se almacena información digital con respecto a dos o más especies y puede utilizarse para determinar que una o más de las especies se colocalizaron en un momento determinado. Una asociación puede ser una asociación física. En algunas realizaciones, dos o más especies asociadas están “ancladas”, “unidas” o “inmovilizadas” entre sí o a una superficie sólida o semisólida común. Una asociación puede referirse a medios covalentes o no covalentes para unir etiquetas a soportes sólidos o semisólidos tales como perlas. Una asociación puede ser un enlace covalente entre un objetivo y una etiqueta.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “complementario” puede referirse a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una posición determinada de un ácido nucleico es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido de otro ácido nucleico, entonces los dos ácidos nucleicos se consideran complementarios entre sí en esa posición. La complementariedad entre dos moléculas de ácido nucleico monocatenario puede ser “parcial” en la que únicamente algunos de los nucleótidos se unen, o puede ser completa cuando existe la complementariedad total entre las moléculas monocatenarias. Puede decirse que una primera secuencia de nucleótidos es el “complemento” de una segunda secuencia si la primera secuencia de nucleótidos es complementaria a la segunda secuencia de nucleótidos. Puede decirse que una primera secuencia de nucleótidos es el “complemento inverso” de una segunda secuencia, si la primera secuencia de nucleótidos es complementaria a una secuencia que es la inversa (es decir, el orden de los nucleótidos se invierte) de la segunda secuencia. Como se utiliza en la presente memoria, los términos “complemento”, “complementario” y “complemento inverso” pueden utilizarse indistintamente. Se entiende a partir de la descripción que si una molécula puede hibridar con otra molécula puede ser el complemento de la molécula que está hibridando.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “recuento digital” puede referirse a un método para estimar un número de moléculas objetivo en una muestra. El recuento digital puede incluir la etapa de determinar un número de etiquetas únicas que se han asociado con objetivos en una muestra. Esta metodología transforma el problema de contar moléculas de uno de localización e identificación de moléculas idénticas a una serie de preguntas digitales de sí/no con respecto a la detección de un conjunto de etiquetas predefinidas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “etiqueta” o “etiquetas” puede referirse a códigos de ácido nucleico asociados con un objetivo dentro de una muestra. Una etiqueta puede ser, por ejemplo, una etiqueta de ácido nucleico. Una etiqueta puede ser una etiqueta completa o parcialmente amplificable. Una etiqueta puede ser una etiqueta total o parcialmente secuenciable. Una etiqueta puede ser una porción de un ácido nucleico nativo que es identificable como distinto. Una etiqueta puede ser una secuencia conocida. Una etiqueta puede comprender una unión de secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, una unión de una secuencia nativa y no nativa. Como se utiliza en la presente memoria, el término

“etiqueta” puede utilizarse indistintamente con los términos “índice”, “marcador” o “marcador-etiqueta”. Las etiquetas pueden transmitir información. Por ejemplo, en diversas realizaciones, las etiquetas pueden utilizarse para determinar una identidad de una muestra, una fuente de una muestra, una identidad de una célula y/o un objetivo.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “ácido nucleico” se refiere a una secuencia polinucleotídica o fragmento de la misma. Un ácido nucleico puede comprender nucleótidos. Un ácido nucleico puede ser exógeno o endógeno a una célula. Un ácido nucleico puede existir en un entorno libre de células. Un ácido nucleico puede ser un gen o fragmento del mismo. Un ácido nucleico puede ser ADN. Un ácido nucleico puede ser ARN. Un ácido nucleico puede comprender uno o más análogos (p. ej., cadena principal alterada, azúcar o nucleobase). Algunos ejemplos no limitativos de análogos incluyen:
 10 5-bromouracilo, ácido nucleico peptídico, ácido xenonucleico, morfolin, ácidos nucleicos bloqueados, ácidos nucleicos de glicol, ácidos nucleicos de treosa, didesoxinucleótidos, cordicepina, 7-deaza-GTP, fluoróforos (p. ej., rodamina o fluoresceína unida al azúcar), nucleótidos que contienen tior, nucleótidos unidos a biotina, análogos de base fluorescente, islas de CpG, metil-7-guanosina, nucleótidos metilados, inosina, tiouridina, pseudouridina, dihidrouridina, queuosina y wyosina. “Ácido nucleico”, “polinucleótido”, “polinucleótido objetivo” y “ácido nucleico objetivo” pueden utilizarse indistintamente.

15 Un ácido nucleico puede comprender una o más modificaciones (p. ej., una modificación de base, una modificación de la cadena principal), para proporcionar el ácido nucleico con una característica nueva o mejorada (p. ej., estabilidad mejorada). Un ácido nucleico puede comprender un marcador de afinidad de ácido nucleico. Un nucleósido puede ser una combinación de base y azúcar. La porción de base del nucleósido puede ser una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos pueden ser nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse al resto hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de ácidos nucleicos, los grupos fosfato pueden unir covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto polimérico lineal pueden unirse adicionalmente para formar un compuesto circular; sin embargo, generalmente son adecuados compuestos lineales. Además, los compuestos lineales pueden tener una complementariedad interna de la base de nucleótidos y, por lo tanto, pueden plegarse de modo que produzcan un compuesto total o parcialmente bicatenario. Dentro de los ácidos nucleicos, puede decirse comúnmente que los grupos fosfato forman la cadena principal internucleosídica del ácido nucleico. El enlace o cadena principal puede ser un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

20 Un ácido nucleico puede comprender una cadena principal modificada y/o enlaces internucleosídicos modificados. Las cadenas principales modificadas pueden incluir aquellas que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellas que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Las cadenas principales de ácido nucleico modificadas adecuadas que contienen un átomo de fósforo en la misma pueden incluir, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquil fosfotriésteres, metilo y otros alquilfosfonatos tales como 3'-alquileo fosfonatos, 5'-alquileo fosfonatos, fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquil fosforamidatos, fosforodiamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos a 2'-5', y aquellos que tienen polaridad invertida en donde uno o más enlaces internucleotídicos son un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'.

25 Un ácido nucleico puede comprender cadenas principales de polinucleótidos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos pueden incluir aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales riboacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metileneimino y metilenhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂.

30 Un ácido nucleico puede comprender un mimético de ácido nucleico. El término “mimético” puede estar destinado a incluir polinucleótidos en donde únicamente el anillo de furanosa o tanto el anillo de furanosa como el enlace internucleotídico se reemplazan con grupos no furanosos; el reemplazo de únicamente el anillo de furanosa puede denominarse como un sustituto de azúcar. El resto de base heterocíclica o un resto de base heterocíclica modificado puede mantenerse para la hibridación con un ácido nucleico objetivo apropiado. Uno de dichos ácidos nucleicos puede ser un ácido nucleico peptídico (PNA). En un PNA, la cadena principal de azúcar de un polinucleótido puede reemplazarse con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Los nucleótidos pueden retenerse y unirse directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. La cadena principal en los compuestos de PNA puede comprender dos o más unidades de aminoetilglicina unidas, lo que proporciona al PNA una cadena principal que contiene amida. Los restos de base heterocíclica pueden unirse directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal.

35 Un ácido nucleico puede comprender una estructura de cadena principal de morfolino. Por ejemplo, un ácido nucleico puede comprender un anillo de morfolino de 6 miembros en lugar de un anillo de ribosa. En algunas de estas realizaciones, un fosforodiamidato u otro enlace internucleosídico no fosfodiéster puede reemplazar a un enlace fosfodiéster.

65

Un ácido nucleico puede comprender unidades de morfolino unidas (es decir, ácido nucleico de morfolino) que tienen bases heterocíclicas unidas al anillo de morfolino. Los grupos de enlace pueden unir las unidades monoméricas de morfolino en un ácido morfolino nucleico. Los compuestos oligoméricos basados en morfolino no iónicos pueden tener menos interacciones no deseadas con proteínas celulares. Los polinucleótidos basados en morfolino pueden ser imitadores no iónicos de ácidos nucleicos. Una variedad de compuestos dentro de la clase morfolino puede unirse mediante el uso de diferentes grupos de enlace. Una clase adicional de mimético de polinucleótido puede denominarse ácidos nucleicos de ciclohexenilo (Cyclohexenyl Nucleic Acids - CeNA). El anillo de furanosa normalmente presente en una molécula de ácido nucleico puede reemplazarse con un anillo de ciclohexenilo. Los monómeros de fosoramidita protegidos por DMT de CeNA pueden prepararse y utilizarse para la síntesis de compuestos oligoméricos mediante el uso de química de fosoramidita. La incorporación de monómeros de CeNA en una cadena de ácido nucleico puede aumentar la estabilidad de un híbrido de ADN/ARN. Los oligoadenilados de CeNA pueden formar complejos con complementos de ácido nucleico con una estabilidad similar a los complejos nativos. Una modificación adicional puede incluir ácidos nucleicos bloqueados (Locked Nucleic Acids - LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar formando de este modo un enlace 2'-C, 4'-C-oximetileno formando de este modo un resto de azúcar bicíclico. El enlace puede ser un metileno (-CH₂-), grupo que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en donde n es 1 o 2. Los LNA y análogos de LNA pueden mostrar estabilidades térmicas dúplex muy altas con ácido nucleico complementario (T_m=+3 a +10 °C), estabilidad hacia la degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad.

Un ácido nucleico también puede incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas simplemente como "base"). Como se utiliza en la presente memoria, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" pueden incluir las bases de purina, (p. ej., adenina (A) y guanina (G)) y las bases de pirimidina (p. ej., timina (T), citosina (C) y uracilo (U)). Las nucleobases modificadas pueden incluir otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C=C-CH₃) uracilo y citosina y otros derivados alquílicos de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Las nucleobases modificadas pueden incluir pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas de G tales como fenoxazina citidina sustituida (p. ej., 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido(5,4-(b)(1,4)benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas de G tales como una fenoxazina citidina sustituida (p. ej., 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido(5,4-(b)(1,4)benzoxazin-2(3H)ona), carbazol citidina (2H-pirimido(4,5-b)indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido(3',2':4,5)pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" puede referirse a una composición que comprende objetivos. Las muestras adecuadas para el análisis por los métodos, dispositivos y sistemas descritos incluyen células, tejidos, órganos u organismos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "dispositivo de muestreo" o "dispositivo" puede referirse a un dispositivo que puede tomar una sección de una muestra y/o colocar la sección sobre un sustrato. Un dispositivo de muestra puede referirse, por ejemplo, a una máquina de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), una máquina de clasificación de células, una aguja de biopsia, un dispositivo de biopsia, un dispositivo de seccionamiento de tejido, un dispositivo de microfluidos, una rejilla de cuchillas y/o un microtomo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "soporte sólido" puede referirse a superficies sólidas o semisólidas discretas a las que puede unirse una pluralidad de códigos de barras (p. ej., códigos de barras estocásticos). Un soporte sólido puede abarcar cualquier tipo de esfera sólida, porosa o hueca, bola, cojinete, cilindro u otra configuración similar compuesta de plástico, cerámica, metal o material polimérico (p. ej., hidrogel) sobre el que puede inmovilizarse un ácido nucleico (p. ej., de forma covalente o no covalente). Un soporte sólido puede comprender una partícula discreta que puede ser esférica (p. ej., microesferas) o tener una forma no esférica o irregular, tal como cúbica, cuboide, piramidal, cilíndrica, cónica, oblonga o en forma de disco, y similares. Una pluralidad de soportes sólidos separados en una matriz puede no comprender un sustrato. Un soporte sólido puede utilizarse indistintamente con el término "perla".

Un soporte sólido puede referirse a un "sustrato". Un sustrato puede ser un tipo de soporte sólido. Un sustrato puede referirse a una superficie sólida o semisólida continua sobre la que pueden realizarse los métodos de la descripción. Un sustrato puede referirse a una matriz, un cartucho, un chip, un dispositivo y un portaobjetos, por ejemplo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "código de barras" puede referirse a una secuencia de polinucleótidos que comprende etiquetas. Un código de barras puede ser una secuencia de polinucleótidos que puede utilizarse para la codificación de barras. Los códigos de barras, tales como códigos de barras estocásticos, pueden utilizarse para cuantificar objetivos dentro de una muestra. Los códigos de barras pueden utilizarse para controlar errores que pueden producirse después de que una etiqueta esté asociada con un objetivo. Por ejemplo, puede utilizarse un código de barras para evaluar errores de amplificación o secuenciación. Un código de barras asociado con un objetivo puede denominarse objetivo de código de barras u objetivo de marcador de código de barras.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “código de barras específico del gen” puede referirse a una secuencia polinucleotídica que comprende etiquetas y una región de unión al objetivo que es específica del gen.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término “codificación de barras” puede referirse al etiquetaje aleatorio (p. ej., codificación de barras estocástica) de ácidos nucleicos. La codificación de barras puede utilizar una estrategia recursiva de Poisson para asociar y cuantificar las etiquetas asociadas con los objetivos. Como se utiliza en la presente memoria, el término “codificación de barras” puede utilizarse indistintamente con “codificación de barras específica del gen”.

10 Como se utiliza aquí, el término “objetivo” puede referirse a una composición que puede asociarse con un código de barras estocástico. Los objetivos adecuados ilustrativos para el análisis mediante los métodos, dispositivos y sistemas descritos incluyen oligonucleótidos, ADN, ARN, ARNm, microARN, ARNt y similares. Los objetivos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. En algunas realizaciones, los objetivos pueden ser proteínas. En algunas realizaciones, los objetivos son lípidos.

15 Como se utiliza en la presente memoria, el término “transcriptasas inversas” puede referirse a un grupo de enzimas que tienen actividad de transcriptasa inversa (es decir, que catalizan la síntesis de ADN a partir de una plantilla de ARN). En general, dichas enzimas incluyen, aunque no de forma limitativa, transcriptasa inversa retroviral, transcriptasa inversa de retrotransposón, transcriptasas inversas retroplasmídicas, transcriptasas inversas de retrón, transcriptasas inversas bacterianas, transcriptasa inversa derivada del intrón del grupo II, y mutantes, variantes o derivados de los mismos. Las
20 transcriptasas inversas no retrovirales incluyen transcriptasas inversas de retrotransposón no LTR, transcriptasas inversas retroplasmídicas, transcriptasas inversas de retrón y transcriptasas inversas del intrón del grupo II. Ejemplos de transcriptasas inversas del intrón del grupo II incluyen la transcriptasa inversa del intrón LI.LtrB de *Lactococcus lactis*, la transcriptasa inversa del intrón Tel4c de *Thermosynechococcus elongates*, la transcriptasa inversa del intrón Gsl-IIIC de *Geobacillus stearothermophilus*. Otras clases de transcriptasas inversas pueden incluir muchas clases de transcriptasas
25 inversas no retrovirales (es decir, retrones, intrones del grupo II y retroelementos generadores de diversidad entre otros).

En la presente memoria se describen métodos y sistemas para detectar y/o corregir errores producidos durante la PCR y/o secuenciación. Los tipos de errores pueden variar, por ejemplo, incluyen, aunque no de forma limitativa, errores de sustitución (una o más bases) y errores no de sustitución. Entre los errores de sustitución, los errores de sustitución de una base pueden producirse con mucha más frecuencia que aquellos separados por más de una base. Los métodos y sistemas
30 pueden utilizarse, por ejemplo, para proporcionar un recuento preciso de objetivos moleculares mediante codificación de barras estocástica.

Códigos de barras

35 La codificación de barras, tal como la codificación de barras estocástica, se ha descrito, por ejemplo, en US20150299784, WO2015031691 y Fu y col., Proc Natl Acad Sci EE. UU. 31 de mayo de 2011;108(22):9026-31. En algunas realizaciones, el código de barras descrito en la presente memoria puede ser un código de barras estocástico que puede ser una secuencia polinucleotídica que puede utilizarse para etiquetar estocásticamente (p. ej., código de barras, marcador) un objetivo. Los
40 códigos de barras pueden denominarse códigos de barras estocásticos si la relación entre el número de diferentes secuencias de código de barras de los códigos de barras estocásticos y el número de aparición de cualquiera de los objetivos a etiquetar puede ser, o aproximadamente, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. Un objetivo puede ser una especie de ARNm que comprende moléculas de ARNm con secuencias idénticas o casi idénticas. Los códigos de barras pueden denominarse códigos de barras estocásticos si la relación entre el número
45 de diferentes secuencias de código de barras de los códigos de barras estocásticos y el número de aparición de cualquiera de los objetivos a etiquetar es al menos, o como máximo, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 90:1 o 100:1. Las secuencias de código de barras de los códigos de barras estocásticos pueden denominarse etiquetas moleculares.

50 Un código de barras, por ejemplo un código de barras estocástico, puede comprender una o más etiquetas. Las etiquetas ilustrativas pueden incluir una etiqueta universal, una etiqueta celular, una secuencia de código de barras (p. ej., una etiqueta molecular), una etiqueta de muestra, una etiqueta de placa, una etiqueta espacial y/o una etiqueta preespacial. La Fig. 1 ilustra un código de barras 104 ilustrativo con una etiqueta espacial. El código de barras 104 puede comprender una amina
55 5' que puede unir el código de barras a un soporte 105 sólido. El código de barras puede comprender una etiqueta universal, una etiqueta de dimensión, una etiqueta espacial, una etiqueta celular y/o una etiqueta molecular. El orden de las diferentes etiquetas (que incluyen, aunque no de forma limitativa, la etiqueta universal, la etiqueta de dimensión, la etiqueta espacial, la etiqueta celular y la etiqueta molecular) en el código de barras pueden variar. Por ejemplo, como se muestra en la Fig. 1, la etiqueta universal puede ser la etiqueta situada más en 5', y la etiqueta molecular puede ser la etiqueta situada más en 3'.
60 La etiqueta espacial, la etiqueta de dimensión y la etiqueta celular pueden estar en cualquier orden. En algunas realizaciones, la etiqueta universal, la etiqueta espacial, la etiqueta de dimensión, la etiqueta celular y la etiqueta molecular están en cualquier orden. El código de barras puede comprender una región de unión al objetivo. La región de unión al objetivo puede interactuar con un objetivo (p. ej., ácido nucleico objetivo, ARN, ARNm, ADN) en una muestra. Por ejemplo, una región de
65 unión al objetivo puede comprender una secuencia oligo(dT) que puede interactuar con las colas poli(A) de los ARNm. En algunos casos, las etiquetas del código de barras (p. ej., etiqueta universal, etiqueta de dimensión, etiqueta espacial, etiqueta

celular y secuencia de código de barras) pueden estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más nucleótidos.

Una etiqueta, por ejemplo, la etiqueta celular, puede comprender un conjunto único de subsecuencias de ácido nucleico de longitud definida, p. ej., siete nucleótidos cada uno (equivalente al número de bits utilizados en algunos códigos de corrección de errores de Hamming), que pueden diseñarse para proporcionar capacidad de corrección de errores. El conjunto de subsecuencias de corrección de errores comprende siete secuencias de nucleótidos que pueden diseñarse de modo que cualquier combinación por pares de secuencias en el conjunto muestre una "distancia genética" definida (o un número de bases no coincidentes), por ejemplo, un conjunto de subsecuencias de corrección de errores puede diseñarse para mostrar una distancia genética de tres nucleótidos. En este caso, la revisión de las secuencias de corrección de errores en el conjunto de datos de secuencia para moléculas de ácido nucleico objetivo etiquetadas (descritas más completamente a continuación) puede permitir detectar o corregir errores de amplificación o secuenciación. En algunas realizaciones, la longitud de las subsecuencias de ácido nucleico utilizadas para crear códigos de corrección de errores puede variar, por ejemplo, pueden tener, o tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 31, 40, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las subsecuencias de ácido nucleico de otras longitudes pueden utilizarse para crear códigos de corrección de errores.

Los códigos de barras estocásticos pueden provenir de unos "depósitos sin agotamiento", un conjunto de códigos de barras estocásticos compuesto por muchas etiquetas diferentes. Un depósito sin agotamiento puede comprender grandes cantidades de códigos de barras estocásticos diferentes de modo que cuando el depósito sin agotamiento esté asociado con un grupo de objetivos, cada objetivo es probable que esté asociado con un código de barras estocástico único. La singularidad de cada molécula objetivo etiquetada puede determinarse por las estadísticas de elección aleatoria y depende del número de copias de moléculas objetivo idénticas en la colección en comparación con la diversidad de etiquetas. El tamaño del conjunto resultante de moléculas objetivo etiquetadas puede determinarse por la naturaleza estocástica del proceso de codificación de barras, y el análisis del número de códigos de barras estocásticos detectados entonces permite el cálculo del número de moléculas objetivo presentes en la colección o muestra original. Cuando la relación entre el número de copias de una molécula objetivo presente y el número de códigos de barras estocásticos únicos es baja, las moléculas objetivo etiquetadas son altamente únicas (es decir, hay una probabilidad muy baja de que más de una molécula objetivo haya sido etiquetada con una etiqueta dada).

El código de barras puede comprender una región de unión al objetivo. La región de unión al objetivo puede interactuar con un objetivo en una muestra. El objetivo puede ser, o comprender, ácidos ribonucleicos (ARN), ARN mensajeros (ARNm), microARN, ARN interferentes pequeños (ARNip), productos de degradación de ARN, ARN que comprenden cada uno una cola poli(A) o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la pluralidad de objetivos puede incluir ácidos desoxirribonucleicos (ADN).

En algunas realizaciones, una región de unión al objetivo puede comprender una secuencia oligo(dT) que puede interactuar con las colas poli(A) de los ARNm. Una o más de las etiquetas del código de barras (p. ej., la etiqueta universal, la etiqueta de dimensión, la etiqueta espacial, la etiqueta celular y la secuencia de código de barras [p. ej., una etiqueta molecular]) pueden separarse por un espaciador de otra o dos de las etiquetas restantes del código de barras. El espaciador puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, ninguna de las etiquetas del código de barras está separada por un espaciador.

Etiquetas universales

Un código de barras puede comprender una o más etiquetas universales. En algunas realizaciones, las una o más etiquetas universales pueden ser las mismas para todos los códigos de barras en el conjunto de códigos de barras unidos a un soporte sólido determinado. En algunas realizaciones, las una o más etiquetas universales pueden ser las mismas para todos los códigos de barras unidos a una pluralidad de perlas. En algunas realizaciones, una etiqueta universal puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridar con un cebador de secuenciación. Los cebadores de secuenciación pueden utilizarse para secuenciar códigos de barras que comprenden una etiqueta universal. Los cebadores de secuenciación (p. ej., cebadores de secuenciación universales) pueden comprender cebadores de secuenciación asociados con plataformas de secuenciación de alto rendimiento. En algunas realizaciones, una etiqueta universal puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridar con un cebador de PCR. En algunas realizaciones, la etiqueta universal puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridar con un cebador de PCR. La secuencia de ácido nucleico de la etiqueta universal que es capaz de hibridar con una secuenciación o cebador de PCR puede denominarse sitio de unión al cebador. Una etiqueta universal puede comprender una secuencia que puede utilizarse para iniciar la transcripción del código de barras. Una etiqueta universal puede comprender una secuencia que puede utilizarse para la extensión del código de barras o una región dentro del código de barras. Una etiqueta universal puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Por ejemplo, una etiqueta universal puede comprender al menos aproximadamente 10 nucleótidos. Una etiqueta universal puede tener al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200 o 300 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un enlazador escindible o nucleótido modificado puede ser parte de la secuencia de la etiqueta universal para permitir que el código de barras se escinda del soporte.

Etiquetas de dimensión

Un código de barras puede comprender una o más etiquetas de dimensión. En algunas realizaciones, una etiqueta de dimensión puede comprender una secuencia de ácido nucleico que proporciona información sobre una dimensión en la que se produjo el etiquetaje (p. ej., etiquetaje estocástico). Por ejemplo, una etiqueta de dimensión puede proporcionar información acerca del tiempo en el que un objetivo se marcó con un código de barras estocásticamente. Una etiqueta de dimensión puede asociarse con un tiempo de codificación de barras (p. ej., codificación de barras estocástica) en una muestra. Puede activarse una etiqueta de dimensión en el momento del etiquetaje. Pueden activarse diferentes etiquetas de dimensión en diferentes momentos. La etiqueta de dimensión proporciona información sobre el orden en el que los objetivos, grupos de objetivos y/o muestras se marcaron con códigos de barras estocásticamente. Por ejemplo, una población de células puede marcarse con códigos de barras estocásticamente en la fase G0 del ciclo celular. Las células pueden ser pulsadas de nuevo con códigos de barras (p. ej., códigos de barras estocásticos) en la fase G1 del ciclo celular. Las células pueden ser pulsadas de nuevo con códigos de barras en la fase S del ciclo celular, y así sucesivamente. Los códigos de barras en cada pulso (p. ej., cada fase del ciclo celular) pueden comprender etiquetas de dimensiones diferentes. De este modo, la etiqueta de dimensión proporciona información sobre qué objetivos se etiquetaron en qué fase del ciclo celular. Las etiquetas de dimensión pueden interrogar muchos tiempos biológicos diferentes. Los tiempos biológicos ilustrativos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, el ciclo celular, la transcripción (p. ej., el inicio de la transcripción) y la degradación del transcrito. En otro ejemplo, una muestra (p. ej., una célula, una población de células) puede etiquetarse estocásticamente antes y/o después del tratamiento con un fármaco y/o terapia. Los cambios en el número de copias de objetivos distintos pueden ser indicativos de la respuesta de la muestra al fármaco y/o terapia.

Una etiqueta de dimensión puede ser activable. Una etiqueta de dimensión activable puede activarse en un punto de tiempo específico. La etiqueta activable puede activarse, por ejemplo, constitutivamente (p. ej., no apagarse). La etiqueta de dimensión activable puede activarse, por ejemplo, de forma reversible (p. ej., la etiqueta de dimensión activable puede encenderse y apagarse). La etiqueta de dimensión puede ser, por ejemplo, activable de forma reversible al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces. La etiqueta de dimensión puede ser activable de forma reversible, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces. En algunas realizaciones, la etiqueta de dimensión puede activarse con fluorescencia, luz, un evento químico (p. ej., escisión, ligación de otra molécula, adición de modificaciones (p. ej., pegilado, sumoilado, acetilado, metilado, desacetilado, desmetilado), un evento fotoquímico (p. ej., enjaulamiento fotoquímico [photocaging]) y la introducción de un nucleótido no natural.

La etiqueta de dimensión puede, en algunas realizaciones, ser idéntica para todos los códigos de barras (p. ej., códigos de barras estocásticos) unidos a un soporte sólido determinado (p. ej., perla), pero diferente para diferentes soportes sólidos (p. ej., perlas). En algunas realizaciones, al menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 % de los códigos de barras en el mismo soporte sólido pueden comprender la misma etiqueta de dimensión. En algunas realizaciones, al menos 60 % de los códigos de barras en el mismo soporte sólido puede comprender la misma etiqueta de dimensión. En algunas realizaciones, al menos 95 % de los códigos de barras en el mismo soporte sólido puede comprender la misma etiqueta de dimensión.

Puede haber hasta 10^6 o más secuencias de etiquetas de dimensión única representadas en una pluralidad de soportes sólidos (p. ej., perlas). Una etiqueta de dimensión puede tener, o tener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Una etiqueta de dimensión puede tener al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200 o 300 nucleótidos de longitud. Una etiqueta de dimensión puede comprender entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 nucleótidos. Una etiqueta de dimensión puede comprender entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 nucleótidos. Una etiqueta de dimensión puede comprender entre aproximadamente 20 y aproximadamente 125 nucleótidos de longitud.

Etiquetas espaciales

Un código de barras puede comprender una o más etiquetas espaciales. En algunas realizaciones, una etiqueta espacial puede comprender una secuencia de ácido nucleico que proporciona información sobre la orientación espacial de una molécula objetivo que está asociada con el código de barras. Una etiqueta espacial puede asociarse con una coordenada en una muestra. La coordenada puede ser una coordenada fija. Por ejemplo, una coordenada puede fijarse en referencia a un sustrato. Una etiqueta espacial puede ser en referencia a una red bidimensional o tridimensional. Una coordenada puede fijarse en referencia a un punto de referencia. El punto de referencia puede ser identificable en el espacio. Un punto de referencia puede ser una estructura de la que pueden formarse imágenes. Un punto de referencia puede ser una estructura biológica, por ejemplo, un punto de referencia anatómica. Un punto de referencia puede ser un punto de referencia celular, por ejemplo un orgánulo. Un punto de referencia puede ser un punto de referencia no natural tal como una estructura con un identificador identificable tal como un código de color, un código de barras, una propiedad magnética, fluorescentes, radiactividad o un tamaño o forma único. Una etiqueta espacial puede asociarse con una partición física (p. ej., un pocillo, un contenedor o una gotícula). En algunas realizaciones, se utilizan múltiples etiquetas espaciales juntas para codificar una o más posiciones en el espacio.

La etiqueta espacial puede ser idéntica para todos los códigos de barras unidos a un soporte sólido determinado (p. ej., perla), pero diferente para diferentes soportes sólidos (p. ej., perlas). En algunas realizaciones, el porcentaje de códigos de barras en el mismo soporte sólido que comprende la misma etiqueta espacial puede ser, o ser aproximadamente, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %.

70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, 100 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el porcentaje de códigos de barras en el mismo soporte sólido que comprende la misma etiqueta espacial puede ser al menos, o como máximo, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %. En algunas realizaciones, al menos 60 % de los códigos de barras en el mismo soporte sólido puede comprender la misma etiqueta espacial. En algunas realizaciones, al menos 95 % de códigos de barras en el mismo soporte sólido puede comprender la misma etiqueta espacial.

Puede haber hasta 10^6 o más secuencias de etiquetas espaciales únicas representadas en una pluralidad de soportes sólidos (p. ej., perlas). Una etiqueta espacial puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Una etiqueta espacial puede tener al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200 o 300 nucleótidos de longitud. Una etiqueta espacial puede comprender entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 nucleótidos. Una etiqueta espacial puede comprender entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 nucleótidos. Una etiqueta espacial puede comprender entre aproximadamente 20 y aproximadamente 125 nucleótidos de longitud.

Etiquetas celulares

Un código de barras puede comprender una o más etiquetas celulares. En algunas realizaciones, una etiqueta celular puede comprender una secuencia de ácido nucleico que proporciona información para determinar qué ácido nucleico objetivo se originó a partir de qué célula. En algunas realizaciones, la etiqueta celular es idéntica para todos los códigos de barras unidos a un soporte sólido determinado (p. ej., perla), pero diferente para diferentes soportes sólidos (p. ej., perlas). En algunas realizaciones, el porcentaje de códigos de barras en el mismo soporte sólido que comprende la misma etiqueta celular puede ser, o ser aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, 100 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el porcentaje de códigos de barras en el mismo soporte sólido que comprende la misma etiqueta celular puede ser, o ser aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %. Por ejemplo, al menos 60 % de los códigos de barras en el mismo soporte sólido puede comprender la misma etiqueta celular. Como otro ejemplo, al menos 95 % de los códigos de barras en el mismo soporte sólido puede comprender la misma etiqueta celular.

Puede haber hasta 10^6 o más secuencias de etiquetas de células únicas representadas en una pluralidad de soportes sólidos (p. ej., perlas). Una etiqueta celular puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Una etiqueta celular puede tener al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200 o 300 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, una etiqueta celular puede comprender entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200 nucleótidos. Como otro ejemplo, una etiqueta celular puede comprender entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150 nucleótidos. Como otro ejemplo más, una etiqueta celular puede comprender entre aproximadamente 20 y aproximadamente 125 nucleótidos de longitud.

Secuencias de código de barras

Un código de barras puede comprender una o más secuencias de código de barras. En algunas realizaciones, una secuencia de código de barras puede comprender una secuencia de ácido nucleico que proporciona información de identificación para el tipo específico de especies de ácido nucleico objetivo hibridadas con el código de barras. Una secuencia de código de barras puede comprender una secuencia de ácido nucleico que proporciona un contador (p. ej., que proporciona una aproximación aproximada) para la aparición específica de la especie de ácido nucleico objetivo hibridada con el código de barras (p. ej., región de unión al objetivo).

En algunas realizaciones, un conjunto diverso de secuencias de código de barras se une a un soporte sólido determinado (p. ej., perla). En algunas realizaciones, puede haber, o haber aproximadamente, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, secuencias únicas de etiquetas moleculares. Por ejemplo, una pluralidad de códigos de barras puede comprender aproximadamente 6561 secuencias de código de barras con secuencias distintas. Como otro ejemplo, una pluralidad de códigos de barras puede comprender aproximadamente 65536 secuencias de código de barras con secuencias distintas. En algunas realizaciones, puede haber al menos, o como máximo, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o 10^9 , secuencias de código de barras únicas. Las secuencias únicas de etiquetas moleculares pueden unirse a un soporte sólido determinado (p. ej., perla).

Un código de barras puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Un código de barras puede tener al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200 o 300 nucleótidos de longitud.

Etiquetas moleculares

Un código de barras estocástico puede comprender una o más etiquetas moleculares. Las etiquetas moleculares pueden incluir secuencias de código de barras. En algunas realizaciones, una etiqueta molecular puede comprender una secuencia de ácido nucleico que proporciona información de identificación para el tipo específico de especies de ácido nucleico objetivo hibridadas con el código de barras estocástico. Una etiqueta molecular puede comprender una secuencia de ácido nucleico

que proporciona un contador para la aparición específica de la especie de ácido nucleico objetivo hibridada con el código de barras estocástico (p. ej., región de unión al objetivo).

5 En algunas realizaciones, un conjunto diverso de etiquetas moleculares se une a un soporte sólido determinado (p. ej., perla). En algunas realizaciones, puede haber, o haber aproximadamente, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 o un número o un intervalo de secuencias únicas de etiquetas moleculares. Por ejemplo, una pluralidad de códigos de barras estocásticos puede comprender aproximadamente 6561 etiquetas moleculares con secuencias distintas. Como otro ejemplo, una pluralidad de códigos de barras estocásticos puede comprender aproximadamente 65536 etiquetas moleculares con secuencias distintas. En algunas realizaciones, puede haber al menos, o como máximo, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 o 10^9 , secuencias únicas de etiquetas moleculares. Los códigos de barras estocásticos con las secuencias únicas de etiquetas moleculares pueden unirse a un soporte sólido determinado (p. ej., perla).

15 Para la codificación de barras estocástica mediante el uso de una pluralidad de códigos de barras estocásticos, la relación entre el número de diferentes secuencias de etiquetas moleculares y el número de aparición de cualquiera de los objetivos puede ser, o aproximadamente, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1, 100:1, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. Un objetivo puede ser una especie de ARNm que comprende moléculas de ARNm con secuencias idénticas o casi idénticas. En algunas realizaciones, la relación entre el número de diferentes secuencias de etiquetas moleculares y el número de aparición de cualquiera de los objetivos es al menos, o como máximo, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 20 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1, 70:1, 80:1, 90:1 o 100:1.

Una etiqueta molecular puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Una etiqueta molecular puede tener al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200 o 300 nucleótidos de longitud.

25 Región de unión a objetivo

Un código de barras puede comprender una o más regiones de unión a objetivo, tales como sondas de captura. En algunas realizaciones, una región de unión al objetivo puede hibridar con un objetivo de interés. En algunas realizaciones, las regiones de unión al objetivo pueden comprender una secuencia de ácido nucleico que hibrida específicamente con un objetivo (p. ej., ácido nucleico objetivo, molécula objetivo, p. ej., un ácido nucleico celular a analizar), por ejemplo, con una secuencia génica específica. En algunas realizaciones, una región de unión al objetivo puede comprender una secuencia de ácido nucleico que puede unirse (p. ej., hibridar) con una ubicación específica de un ácido nucleico objetivo específico. En algunas realizaciones, la región de unión al objetivo puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es capaz de hibridación específica con un sitio saliente de enzima de restricción (p. ej., un saliente de extremo adherente EcoRI). El código de barras puede entonces ligarse a cualquier molécula de ácido nucleico que comprenda una secuencia complementaria al sitio saliente de restricción.

40 En algunas realizaciones, una región de unión al objetivo puede comprender una secuencia de ácido nucleico objetivo no específica. Una secuencia de ácido nucleico objetivo no específica puede referirse a una secuencia que puede unirse a múltiples ácidos nucleicos objetivo, independientemente de la secuencia específica del ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, la región de unión al objetivo puede comprender una secuencia de multímero aleatoria, o una secuencia oligo(dT) que hibrida con la cola poli(A) en moléculas de ARNm. Una secuencia de multímeros aleatorios puede ser, por ejemplo, un dímero aleatorio, trímero, cuatrímero, pentámero, hexámero, septámero, octámero, nonámero, decámero o una secuencia de multímero superior de cualquier longitud. En algunas realizaciones, la región de unión al objetivo es la misma para todos los códigos de barras unidos a una perla determinada. En algunas realizaciones, las regiones de unión al objetivo para la pluralidad de códigos de barras unidos a una perla determinada pueden comprender dos o más secuencias de unión al objetivo diferentes. Una región de unión al objetivo puede tener, o tener aproximadamente, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Una región de unión al objetivo puede tener como máximo aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos de longitud.

55 En algunas realizaciones, una región de unión al objetivo puede comprender un oligo(dT) que puede hibridar con los ARNm que comprenden extremos poliadenilados. Una región de unión al objetivo puede ser específica de genes. Por ejemplo, una región de unión al objetivo puede configurarse para hibridar con una región específica de un objetivo. Una región de unión al objetivo puede tener, o tener aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos de longitud. Una región de unión al objetivo puede tener al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. Una región de unión al objetivo puede tener aproximadamente 5-30 nucleótidos de longitud. Cuando un código de barras comprende una región de unión al objetivo específica del gen, el código de barras puede denominarse en la presente memoria código de barras específico de gen.

60 Propiedad de orientación

Un código de barras puede comprender una o más propiedades de orientación que pueden utilizarse para orientar (p. ej., alinear) los códigos de barras. Un código de barras puede comprender un resto para el enfoque isoelectrónico. Diferentes códigos de barras pueden comprender diferentes puntos de enfoque isoelectrónico. Cuando estos códigos de barras se

introducen en una muestra, la muestra puede someterse a enfoque isoelectrico para orientar los códigos de barras en una forma conocida. De este modo, la propiedad de orientación puede utilizarse para desarrollar una asignación conocida de códigos de barras en una muestra. Las propiedades de orientación ilustrativas pueden incluir movilidad electroforética (p. ej., basada en el tamaño del código de barras), punto isoelectrico, espín, conductividad y/o autoensamblaje. Por ejemplo, los

5 códigos de barras con una propiedad de orientación del autoensamblaje, pueden autoensamblarse en una orientación específica (p. ej., nanoestructura de ácido nucleico) tras la activación.

Propiedad de afinidad

10 Un código de barras puede comprender una o más propiedades de afinidad. Por ejemplo, una etiqueta espacial puede comprender una propiedad de afinidad. Una propiedad de afinidad puede incluir un resto químico y/o biológico que puede facilitar la unión del código de barras a otra entidad (p. ej., receptor celular). Por ejemplo, una propiedad de afinidad puede comprender un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo específico para un resto específico (p. ej., receptor) en una muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede guiar el código de barras a un tipo o molécula de célula específica. Los

15 objetivos en y/o cerca del tipo o molécula específica de célula pueden etiquetarse estocásticamente. La propiedad de afinidad puede, en algunas realizaciones, proporcionar información espacial además de la secuencia de nucleótidos de la etiqueta espacial porque el anticuerpo puede guiar el código de barras a una ubicación específica. El anticuerpo puede ser un anticuerpo terapéutico, por ejemplo un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede ser humanizado o quimérico. El anticuerpo puede ser un anticuerpo desprotegido o un anticuerpo de fusión.

20 El anticuerpo puede ser una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formado mediante procesos recombinatorios de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) (p. ej., un anticuerpo IgG) o una porción inmunológicamente activa (es decir, unión específica) de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo.

25 El fragmento de anticuerpo puede ser, por ejemplo, una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, sFv y similares. En algunas realizaciones, el fragmento de anticuerpo puede unirse con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo de longitud completa. El fragmento de anticuerpo puede incluir fragmentos aislados que consisten en las regiones variables de anticuerpos, tales como los fragmentos "Fv" que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y las moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes en las que las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un enlazador peptídico ("proteínas scFv"). Los anticuerpos ilustrativos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, anticuerpos para células cancerosas, anticuerpos para virus, anticuerpos que se unen a receptores de la superficie celular (CD8, CD34, CD45) y anticuerpos terapéuticos.

35 Soportes sólidos

Los códigos de barras, tales como códigos de barras estocásticos, descritos en la presente memoria, pueden, en algunas realizaciones, estar asociados a un soporte sólido. El soporte sólido puede ser, por ejemplo, una partícula sintética. En algunas realizaciones, parte o la totalidad de la secuencia de código de barras, tal como etiquetas moleculares para códigos de barras estocásticos (p. ej., las primeras secuencias de código de barras) de una pluralidad de códigos de barras (p. ej., la primera pluralidad de códigos de barras) en un soporte sólido difieren en al menos un nucleótido. Las etiquetas celulares de los códigos de barras en el mismo soporte sólido pueden ser las mismas. Las etiquetas celulares de los códigos de barras en diferentes soportes sólidos pueden diferir en al menos un nucleótido. Por ejemplo, las primeras etiquetas celulares de una primera pluralidad de códigos de barras en un primer soporte sólido pueden tener la misma secuencia, y las segundas etiquetas celulares de una segunda pluralidad de códigos de barras en un segundo soporte sólido pueden tener la misma secuencia. Las primeras etiquetas celulares de la primera pluralidad de códigos de barras en el primer soporte sólido y las segundas etiquetas celulares de la segunda pluralidad de códigos de barras en el segundo soporte sólido pueden diferir en al menos un nucleótido. Una etiqueta celular puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5-20 nucleótidos de longitud. Una secuencia de código de barras puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5-20 nucleótidos de longitud. La partícula sintética puede ser, por ejemplo, una perla.

La perla puede ser, por ejemplo, una perla de gel de sílice, una perla de vidrio de poro controlado, una perla magnética, una perla Dynabead, una perla Sephadex/Sepharose, una perla de celulosa, una perla de poliestireno o cualquier combinación de las mismas. La perla puede comprender un material tal como poldimetilsiloxano (PDMS), poliestireno, vidrio, polipropileno, agarosa, gelatina, hidrogel, paramagnético, cerámica, plástico, vidrio, metilestireno, polímero acrílico.

En algunas realizaciones, la perla puede ser una perla polimérica, por ejemplo, una perla deformable o una perla de gel, funcionalizada con códigos de barras o códigos de barras estocásticos (tales como perlas de gel de 10 x Genomics (San Francisco, CA). En alguna implementación, una perla de gel puede comprender un gel basado en polímero. Las perlas de gel pueden generarse, por ejemplo, encapsulando uno o más precursores poliméricos en gotículas. Tras la exposición de los precursores poliméricos a un acelerador (p. ej., tetrametiletilendiamina [TEMED]), puede generarse una perla de gel.

En algunas realizaciones, la partícula puede ser degradable. Por ejemplo, la perla polimérica puede disolverse, fundirse o degradarse, por ejemplo, en una condición deseada. La condición deseada puede incluir una condición ambiental. La condición deseada puede resultar en la disolución de la perla polimérica, fusión o degradación de una forma controlada. Una

perla de gel puede disolverse, fundirse o degradarse debido a un estímulo químico, un estímulo físico, un estímulo biológico, un estímulo térmico, un estímulo magnético, un estímulo eléctrico, un estímulo de luz o cualquier combinación de los mismos.

Los analitos y/o reactivos, tales como códigos de barras de oligonucleótidos, por ejemplo, pueden acoplarse/inmovilizarse en la superficie interior de una perla de gel (p. ej., el interior accesible a través de la difusión de un código de barras de oligonucleótidos y/o materiales utilizados para generar un código de barras de oligonucleótido) y/o la superficie exterior de una perla de gel o cualquier otra microcápsula descrita en la presente memoria. El acoplamiento/inmovilización puede ser a través de cualquier forma de unión química (p. ej., enlace covalente, enlace iónico) o fenómenos físicos (p. ej., fuerzas de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, etc.). En algunas realizaciones, el acoplamiento/inmovilización de un reactivo a una perla de gel o cualquier otra microcápsula descrita en la presente memoria puede ser reversible, tal como, por ejemplo, a través de un resto lábil (p. ej., a través de un reticulante químico, incluidos los reticulantes químicos descritos en la presente memoria). Tras la aplicación de un estímulo, el resto lábil puede escindirse y el conjunto de reactivos inmovilizados puede liberarse. En algunas realizaciones, el resto lábil es un enlace disulfuro. Por ejemplo, en el caso donde un código de barras oligonucleótido se inmoviliza en una perla de gel mediante un enlace disulfuro, la exposición del enlace disulfuro a un agente reductor puede escindir el enlace disulfuro y liberar el código de barras de oligonucleótido de la perla. El resto lábil puede incluirse como parte de una perla o microcápsula de gel, como parte de un enlazador químico que une un reactivo o analito a una perla o microcápsula de gel, y/o como parte de un reactivo o analito. En algunas realizaciones, al menos un código de barras de la pluralidad de códigos de barras puede inmovilizarse sobre la partícula, inmovilizarse parcialmente sobre la partícula, encerrarse en la partícula, encerrarse parcialmente en la partícula, o cualquier combinación de las mismas.

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

Pueden utilizarse numerosos estímulos químicos para desencadenar la alteración, disolución o degradación de las perlas. Ejemplos de estos cambios químicos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, cambios mediados por el pH en la pared de la perla, desintegración de la pared de la perla mediante escisión química de enlaces de reticulación, despolimerización desencadenada de la pared de la perla y reacciones de conmutación de la pared de las perlas. Los cambios masivos también pueden utilizarse para desencadenar la alteración de las perlas.

Los cambios masivos o físicos en la microcápsula a través de diversos estímulos también ofrecen muchas ventajas en el diseño de cápsulas para liberar reactivos. Los cambios masivos o físicos se producen en una escala macroscópica, en la que la ruptura de la perla es el resultado de las fuerzas mecano-físicas inducidas por un estímulo. Estos procesos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, ruptura inducida por presión, fusión de pared de perlas o cambios en la porosidad de la pared de la perla.

Los estímulos biológicos también pueden utilizarse para desencadenar la alteración, la disolución o la degradación de las perlas. Generalmente, los activadores biológicos se parecen a los activadores químicos, pero muchos ejemplos utilizan biomoléculas, o moléculas comúnmente encontradas en sistemas vivos tales como enzimas, péptidos, sacáridos, ácidos grasos, ácidos nucleicos y similares. Por ejemplo, las perlas pueden comprender polímeros con enlaces cruzados peptídicos que son sensibles a la escisión por proteasas específicas. Más específicamente, un ejemplo puede comprender una microcápsula que comprende enlaces cruzados de péptido GFLGK. Tras la adición de un activador biológico tal como la proteasa catepsina B, los enlaces cruzados peptídicos del pocillo de la cubierta se escinden y se libera el contenido de las perlas. En otros casos, las proteasas pueden activarse térmicamente. En otro ejemplo, las perlas comprenden una pared de cubierta que comprende celulosa. La adición de la enzima hidrolítica quitosano sirve como activador biológico para la escisión de las uniones celulósicas, la despolimerización de la pared de la cubierta y la liberación de su contenido interno.

Las perlas también pueden inducirse para liberar su contenido tras la aplicación de un estímulo térmico. Un cambio de temperatura puede causar diversos cambios en las perlas. Un cambio de calor puede causar la fusión de una perla de modo que la pared de la perla se desintegra. En otros casos, el calor puede aumentar la presión interna de los componentes internos de la perla de modo que la perla se rompe o explota. En otros casos más, el calor puede transformar la perla en un estado encogido y deshidratado. El calor también puede actuar sobre polímeros sensibles al calor dentro de la pared de una perla para causar la alteración de la perla.

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

Una perla también puede alterarse, disolverse o degradarse como resultado de la estimulación eléctrica. De modo similar a las partículas magnéticas descritas en la sección anterior, las perlas sensibles eléctricamente pueden permitir tanto la ruptura desencadenada de las perlas como otras funciones tales como la alineación en un campo eléctrico, conductividad eléctrica o reacciones redox. En un ejemplo, las perlas que contienen material eléctricamente sensible se alinean en un campo eléctrico de modo que pueda controlarse la liberación de reactivos internos. En otros ejemplos, los campos eléctricos pueden inducir reacciones redox dentro de la propia pared de la perla que pueden aumentar la porosidad.

También puede utilizarse un estímulo de luz para alterar las perlas. Numerosos activadores de luz son posibles y pueden incluir sistemas que utilizan diversas moléculas tales como nanopartículas y cromóforos capaces de absorber fotones de intervalos específicos de longitudes de onda. Por ejemplo, los recubrimientos de óxido metálico pueden utilizarse como activadores de cápsulas. La irradiación UV de cápsulas polielectrolíticas recubiertas con SiO₂ puede resultar en la desintegración de la pared de la perla. En otro ejemplo más, pueden incorporarse materiales fotoconmutables tales como grupos azobenceno en la pared de la perla. Tras la aplicación de luz UV o visible, los productos químicos tales como estos experimentan una isomerización reversible *cis* a *trans* tras la absorción de fotones. En este aspecto, la incorporación de interruptores de fotones da como resultado una pared de la perla que puede desintegrarse o volverse más porosa tras la aplicación de un activador de luz.

Por ejemplo, en un ejemplo no limitativo de codificación de barras (p. ej., codificación de barras estocástica) ilustrado en la Fig. 2, después de introducir células tales como células individuales en una pluralidad de micropocillos de una matriz de micropocillos en el bloque 208, pueden introducirse perlas en la pluralidad de micropocillos de la matriz de micropocillos en el bloque 212. Cada micropocillo puede comprender una perla. Las perlas pueden comprender una pluralidad de códigos de barras. Un código de barras puede comprender una región de amina 5' unida a una perla. El código de barras puede comprender una etiqueta universal, una secuencia de código de barras (p. ej., una etiqueta molecular), una región de unión al objetivo o cualquier combinación de los mismos.

Los códigos de barras descritos en la presente memoria pueden asociarse con (p. ej., unirse a) un soporte sólido (p. ej., una perla). Los códigos de barras asociados con un soporte sólido pueden comprender cada uno una secuencia de código de barras seleccionada de un grupo que comprende al menos 100 o 1000 secuencias de código de barras con secuencias únicas. En algunas realizaciones, diferentes códigos de barras asociados con un soporte sólido pueden comprender secuencias de código de barras de diferentes secuencias. En algunas realizaciones, un porcentaje de códigos de barras asociados con un soporte sólido comprende la misma etiqueta de célula. Por ejemplo, el porcentaje puede ser, o ser aproximadamente 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 %, 100 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. Como otro ejemplo, el porcentaje puede ser al menos, o como máximo 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % o 100 %. En algunas realizaciones, los códigos de barras asociados con un soporte sólido pueden tener la misma etiqueta de célula. Los códigos de barras asociados con diferentes soportes sólidos pueden tener diferentes etiquetas celulares seleccionadas de un grupo que comprende al menos 100 o 1000 etiquetas celulares con secuencias únicas.

Los códigos de barras descritos en la presente memoria pueden asociarse a (p. ej., unirse a) un soporte sólido (p. ej., una perla). En algunas realizaciones, la codificación de barras estocástica de la pluralidad de objetivos en la muestra puede realizarse con un soporte sólido que incluya una pluralidad de partículas sintéticas asociadas con la pluralidad de códigos de barras. En algunas realizaciones, el soporte sólido puede incluir una pluralidad de partículas sintéticas asociadas con la pluralidad de códigos de barras. Las etiquetas espaciales de la pluralidad de códigos de barras en diferentes soportes sólidos pueden diferir en al menos un nucleótido. El soporte sólido puede, por ejemplo, incluir la pluralidad de códigos de barras en dos dimensiones o tres dimensiones. Las partículas sintéticas pueden ser perlas. Las perlas pueden ser perlas de gel de sílice, perlas de vidrio de poro controlado, perlas magnéticas, perlas Dynabead, perlas Sephadex/Sepharose, perlas de celulosa, perlas de poliestireno o cualquier combinación de las mismas. El soporte sólido puede incluir un polímero, una matriz, un hidrogel, un dispositivo de matriz de agujas, un anticuerpo o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, los soportes sólidos pueden flotar libremente. En algunas realizaciones, los soportes sólidos pueden incrustarse en una matriz semisólida o sólida. Los códigos de barras pueden no estar asociados con soportes sólidos. Los códigos de barras pueden ser nucleótidos individuales. Los códigos de barras pueden asociarse con un sustrato.

Como se utiliza en la presente memoria, los términos “anclado”, “unido” e “inmovilizado” se utilizan indistintamente, y pueden referirse a medios covalentes o no covalentes para unir códigos de barras a un soporte sólido. Puede utilizarse cualquiera de una variedad de soportes sólidos diferentes como soportes sólidos para unir códigos de barras sintetizados previamente o para la síntesis *in situ* en fase sólida de códigos de barras.

En algunas realizaciones, el soporte sólido es una perla. La perla puede comprender uno o más tipos de esfera sólida, porosa o hueca, bola, cojinete, cilindro u otra configuración similar a la que pueda inmovilizarse un ácido nucleico (p. ej., de forma covalente o no covalente). La perla puede estar, por ejemplo, compuesta de plástico, cerámica, metal, material polimérico o cualquier combinación de los mismos. Una perla puede ser, o comprender, una partícula discreta que es esférica (p. ej., microesferas) o tiene una forma no esférica o irregular, tal como cúbica, cuboide, piramidal, cilíndrica, cónica, oblonga o en forma de disco, y similares. En algunas realizaciones, una perla puede tener forma no esférica.

Las perlas pueden comprender una variedad de materiales que incluyen, aunque no de forma limitativa, materiales paramagnéticos (p. ej., magnesio, molibdeno, litio y tantalio), materiales superparamagnéticos (p. ej., ferrita (Fe₃O₄;

magnetita) nanopartículas), materiales ferromagnéticos (p. ej., hierro, níquel, cobalto, algunas aleaciones de los mismos y algunos compuestos de metales de tierra escasos), cerámica, plástico, vidrio, poliestireno, sílice, metilestireno, polímeros acrílicos, titanio, látex, Sepharose, agarosa, hidrogel, polímero, celulosa, nailon o cualquier combinación de los mismos.

5 En algunas realizaciones, la perla (p. ej., la perla a la que están unidas las etiquetas) es una perla de hidrogel. En algunas realizaciones, la perla comprende hidrogel.

10 El tamaño de una partícula puede variar. Por ejemplo, el diámetro de la partícula puede variar de 0,1 micrómetros a 50 micrómetros. En algunas realizaciones, los diámetros de las partículas pueden ser, o ser aproximadamente, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores.

15 El diámetro de la partícula puede estar relacionado con el diámetro de los pocillos del sustrato. En algunas realizaciones, el diámetro de la partícula puede ser, o ser aproximadamente, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, más largo o más corto que el diámetro del pocillo. En algunas realizaciones, el diámetro de la partícula puede ser, o ser aproximadamente, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 250 %, 300 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, más largo o más corto que el diámetro de la célula.

20 Una partícula puede unirse y/o incorporarse en un sustrato. Una partícula puede unirse y/o incorporarse en un gel, hidrogel, polímero y/o matriz. La posición espacial de una partícula dentro de un sustrato (p. ej., gel, matriz, estructura base o polímero) puede identificarse utilizando la etiqueta espacial presente en el código de barras en la partícula que puede servir como dirección de ubicación.

25 Ejemplos de partículas pueden incluir, aunque no de forma limitativa, perlas de estreptavidina, perlas de agarosa, perlas magnéticas, perlas Dynabead®, microperlas MACS®, perlas conjugadas con anticuerpos (p. ej., microperlas anti-inmunoglobulina), perlas conjugadas con proteína A, perlas conjugadas con proteína G, perlas conjugadas con proteína A/G, perlas conjugadas con proteína L, perlas conjugadas con oligo(dT), perlas de sílice, perlas similares a sílice, microperlas anti-biotina, microperlas anti-fluorocromo y perlas magnéticas BcMag™ terminadas en carboxilo.

30 Una partícula puede asociarse con (p. ej., impregnarse con) puntos cuánticos o colorantes fluorescentes para hacerla fluorescente en un canal óptico de fluorescencia o múltiples canales ópticos. Una partícula puede asociarse con óxido de hierro u óxido de cromo para volverla paramagnética o ferromagnética. Las partículas pueden ser identificables. Por ejemplo, pueden formarse imágenes de una partícula utilizando una cámara. Una partícula puede tener un código detectable asociado con la partícula. Por ejemplo, una partícula puede comprender un código de barras. Una partícula puede cambiar de tamaño, por ejemplo, debido al hinchamiento en una solución orgánica o inorgánica. Una partícula puede ser hidrófoba. Una partícula puede ser hidrófila. Una partícula puede ser biocompatible.

35 Puede visualizarse un soporte sólido (p. ej., una partícula). El soporte sólido puede comprender un marcador de visualización (p. ej., colorante fluorescente). Un soporte sólido (p. ej., una partícula) puede grabarse con un identificador (p. ej., un número). El identificador puede visualizarse a través de imágenes de las partículas.

Sustratos y matrices de micropocillos

45 Como se utiliza en la presente memoria, un sustrato puede referirse a un tipo de soporte sólido. Un sustrato puede referirse a un soporte sólido que puede comprender códigos de barras estocásticos de la descripción. Un sustrato puede, por ejemplo, comprender una pluralidad de micropocillos. Por ejemplo, un sustrato puede ser una matriz de pocillos que comprende dos o más micropocillos. En algunas realizaciones, un micropocillo puede comprender una pequeña cámara de reacción de volumen definido. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar una o más células. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar solo una célula. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar uno o más soportes sólidos. En algunas realizaciones, un micropocillo puede atrapar solo un soporte sólido. En algunas realizaciones, un micropocillo atrapa una única célula y un único soporte sólido (p. ej., perla). En algunas realizaciones, un micropocillo puede contener una única partícula (p. ej., una célula o una perla). En algunas realizaciones, un micropocillo puede contener dos partículas diferentes (p. ej., una célula y una perla).

55 Formas de micropocillos

60 Los micropocillos pueden fabricarse en una variedad de formas. Las geometrías de pocillos ilustrativos no limitativos pueden incluir cilíndrica, cónica, semiesférica, rectangular o poliédrica (p. ej., geometrías tridimensionales compuestas por varias caras planas, por ejemplo, columnas hexagonales, columnas octogonales, pirámides triangulares invertidas, pirámides cuadradas invertidas, pirámides pentagonales invertidas, pirámides hexagonales invertidas o pirámides truncadas invertidas). Los micropocillos pueden comprender una forma que combine dos o más de estas geometrías. Por ejemplo, un micropocillo puede ser parcialmente cilíndrico, teniendo el resto la forma de un cono invertido. Un micropocillo puede incluir dos cilindros uno al lado del otro, uno de mayor diámetro (p. ej., que corresponde aproximadamente al diámetro de las perlas) que el otro (p. ej., que corresponde aproximadamente al diámetro de las células), que están conectados por un canal vertical (es decir, paralelo a los ejes de los cilindros) que se extiende toda la longitud (profundidad) de los cilindros. La ubicación de la abertura del micropocillo puede variar. Por ejemplo, la abertura del micropocillo puede estar en la superficie superior del

sustrato. Por ejemplo, la abertura del micropocillo puede estar en la superficie inferior del sustrato. La forma del extremo cercano, por ejemplo, la parte inferior del micropocillo puede variar. Por ejemplo, el extremo cerrado del micropocillo puede ser plano. Por ejemplo, el extremo cerrado del micropocillo puede tener una superficie curva (p. ej., convexa o cóncava). La forma y/o el tamaño del micropocillo pueden determinarse en función de los tipos de células o soportes sólidos que se van a atrapar dentro de los micropocillos. En algunas realizaciones, un micropocillo puede tener una sección transversal no circular (p. ej., cuadrada o hexagonal) en un plano del sustrato.

Tamaños de micropocillos

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

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

La profundidad del micropocillo puede variar, por ejemplo, para proporcionar una captura eficiente de gotículas, por ejemplo células y soportes sólidos, o para proporcionar un intercambio eficiente de amortiguadores de ensayo y otros reactivos contenidos dentro de los pocillos. La relación de diámetro a profundidad (es decir, relación de aspecto) puede variarse de modo que una vez que una célula y/o un soporte sólido se asienten dentro de un micropocillo, no se desplazarán por el movimiento de fluido por encima del micropocillo. En algunas realizaciones, la profundidad del micropocillo puede ser menor que el diámetro de la perla. Por ejemplo, la profundidad del micropocillo puede ser, o ser aproximadamente, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 %, 99,9 %, 100 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, del diámetro de la perla. Por ejemplo, la profundidad del micropocillo puede ser al menos, o como máximo, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 %, 99,9 %, 100 % del diámetro de la perla. En algunas realizaciones, las partículas sintéticas tales como perlas pueden sobresalir fuera de los micropocillos.

En algunas realizaciones, una dimensión de un micropocillo permite que el micropocillo contenga como máximo una perla. Una relación entre la anchura del micropocillo y un diámetro de la perla puede variar, en el intervalo de 1-1,9. En algunas realizaciones, la relación entre la anchura del micropocillo y el diámetro de la perla puede ser, o ser aproximadamente, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la relación entre la anchura del micropocillo y el diámetro de la perla puede ser al menos, o como máximo, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 o 1,9.

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

Una relación de aspecto entre la anchura del micropocillo y la profundidad del micropocillo puede variar, por ejemplo, en el intervalo de 0,1-2. En algunas realizaciones, la relación de aspecto entre la anchura del micropocillo y la profundidad del

micropocillo puede ser, o ser aproximadamente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la relación de aspecto entre la anchura del micropocillo y la profundidad del micropocillo puede ser al menos, o como máximo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2.

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

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

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

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

50 Disposiciones de micropocillos

Los micropocillos pueden disponerse en una matriz unidimensional, bidimensional o tridimensional. Se puede lograr una matriz tridimensional, por ejemplo, apilando una serie de dos o más matrices bidimensionales, por ejemplo apilando dos o más sustratos que comprendan matrices de micropocillos.

55 El patrón y la separación entre micropocillos pueden variar para optimizar la eficiencia de atrapar una única célula y un único soporte sólido (p. ej., perla) en cada pocillo, así como para maximizar el número de pocillos por unidad de área de la matriz. Los micropocillos pueden distribuirse según una variedad de patrones aleatorios o no aleatorios. Por ejemplo, pueden distribuirse de forma completamente aleatoria a través de la superficie del sustrato de matriz, o pueden disponerse en una rejilla cuadrada, rejilla rectangular, rejilla hexagonal o similares.

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

20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 micrómetros. En algunas realizaciones, la distancia centro a centro entre los pocillos puede ser aproximadamente 4890 micrómetros.

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

Densidad de micropocillos

15 Una matriz de micropocillos puede comprender micropocillos a densidades variables, por ejemplo, en el intervalo de 100 micropocillos por 6,45 cm² (pulgadas²) a 1000000 micropocillos por 6,45 cm² (pulgadas²). En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, micropocillos por 6,45 cm² (pulgadas²). En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser al menos, o como máximo 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, o 10000000 micropocillos por 6,45 cm (pulgadas²). En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser, o ser aproximadamente, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, micropocillos por cm². En algunas realizaciones, la densidad de la matriz de micropocillos puede ser al menos, o como máximo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, o 100000 micropocillos por cm².

35 El número total de micropocillos sobre un sustrato puede variar en función del patrón y la separación de los pocillos y las dimensiones generales de la matriz. El número de micropocillos en la matriz puede variar, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 96 a aproximadamente 1000000. En algunas realizaciones, el número de micropocillos en la micromatriz puede ser, o ser aproximadamente, 96, 384, 1536, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, o 10000000, 10⁸, 10⁹, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el número de micropocillos en la micromatriz puede ser al menos, o como máximo, 96, 384, 1536, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, o 10000000, 10⁸, 10⁹. En algunas realizaciones, el número de micropocillos en la matriz de micropocillos puede ser de aproximadamente 96. En algunas realizaciones, el número de micropocillos puede ser aproximadamente 150000.

45 Características superficiales de la matriz de micropocillos

50 Una matriz de micropocillos puede comprender características superficiales entre los micropocillos que están diseñados para ayudar a guiar las células y los soportes sólidos hacia el interior de los pocillos y/o para evitar que se asienten en las superficies entre los pocillos. Ejemplos no limitativos de características de superficie adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, características de superficie abovedada, estriada o en pico que rodean los pocillos o se extienden a ambos lados de la superficie entre los pocillos.

Técnicas de fabricación de sustrato

55 Se puede fabricar un micropocillo utilizando cualquiera de varias técnicas de fabricación. Ejemplos no limitativos de métodos de fabricación que pueden utilizarse incluyen técnicas de micromecanizado en masa tales como fotolitografía y grabado químico húmedo, grabado con plasma o grabado profundo con iones reactivos; micromoldeo y microestampado; micromecanización por láser; impresión 3D u otros procesos de fabricación directa de escritura que utilizan materiales curables; y técnicas similares.

60 Las matrices de micropocillos pueden fabricarse a partir de una variedad de materiales de sustrato. La elección del material puede depender de la elección de la técnica de fabricación, y viceversa. Ejemplos no limitativos de materiales adecuados incluyen sílice fundida, vidrio, polímeros (p. ej., agarosa, gelatina, hidrogeles, elastómero de polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), poliimida, polímeros de olefina cíclica (COP), copolímeros de olefina cíclica (COC), tereftalato de polietileno (PET), resinas epoxi, resinas basadas en tiol-eno, metales o películas metálicas (p. ej., aluminio, acero inoxidable, cobre, níquel, cromo y

titanio) y similares. Un material hidrófilo puede ser deseable para la fabricación de las matrices de micropocillos (p. ej., para mejorar la humectabilidad y minimizar la unión no específica de células y otro material biológico). Para la fabricación de las matrices de micropocillos, pueden utilizarse materiales hidrófobos que pueden tratarse o recubrirse (p. ej., mediante tratamiento con plasma de oxígeno o injerto de una capa superficial de óxido de polietileno). El uso de materiales hidrófilos porosos para la fabricación de la matriz de micropocillos puede ser deseable para facilitar la absorción/ventilación capilar de gas atrapado o burbujas de aire en el dispositivo. La matriz de micropocillos puede fabricarse a partir de un único material. La matriz de micropocillos puede comprender dos o más materiales diferentes que se han unido entre sí o se han unido mecánicamente.

10 Formas y tamaños de sustrato

Un sustrato puede tener una variedad de formas y tamaños. Por ejemplo, la forma (o huella) del sustrato dentro del cual se fabrican micropocillos puede ser cuadrada, rectangular, circular o irregular. El tamaño puede caracterizarse por su anchura, longitud y profundidad.

15 La anchura de un sustrato puede variar, en el intervalo de 0,254 cm a 25,4 cm (0,1 pulgadas a 10 pulgadas). En algunas realizaciones, la anchura del sustrato puede ser, o ser aproximadamente, 0,254, 0,508, 0,762, 1,016, 1,27, 1,524, 1,778, 2,032, 2,286, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 pulgadas), o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la anchura del sustrato puede ser al menos, o como máximo, 0,254, 0,508, 0,762, 1,016, 1,27, 1,524, 1,778, 2,032, 2,286, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pulgadas). La anchura del sustrato puede variar, en el intervalo de 0,2 centímetros a 20 centímetros. En algunas realizaciones, la anchura del sustrato puede ser, o ser aproximadamente, 0,2, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 centímetros, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la anchura del sustrato puede ser al menos, o como máximo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 20 centímetros.

30 La longitud de un sustrato puede variar, en el intervalo de 0,254 cm a 25,4 cm (0,1 pulgadas a 10 pulgadas). En algunas realizaciones, la longitud del sustrato puede ser, o ser aproximadamente, 0,254, 0,508, 0,762, 1,016, 1,27, 1,524, 1,778, 2,032, 2,286, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 pulgadas), o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la longitud del sustrato puede ser al menos, o como máximo, 0,254, 0,508, 0,762, 1,016, 1,27, 1,524, 1,778, 2,032, 2,286, 2,54, 5,08, 7,62, 10,16, 12,7, 15,24, 17,78, 20,32, 22,86, 25,4 cm (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pulgadas). La longitud del sustrato puede variar, en el intervalo de 0,2 centímetros a 20 centímetros. En algunas realizaciones, la longitud del sustrato puede ser, o ser aproximadamente, 0,2, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 centímetros, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la longitud del sustrato puede ser al menos, o como máximo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 20 centímetros.

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

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

55 Tratamientos superficiales de matriz de micropocillos

Puede utilizarse una variedad de tratamientos superficiales y técnicas de modificación de superficie para modificar las propiedades de las superficies de la matriz de micropocillos. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, tratamientos con plasma de oxígeno para hacer que las superficies de material hidrófobo sean más hidrófilas, el uso de técnicas de grabado húmedo o seco para alisar o hacer rugosas las superficies de vidrio y silicio, adsorción o injerto de óxido de polietileno u otras capas de polímero, por ejemplo, plurónico, o albúmina de suero bovino a superficies de sustrato para hacerlas más hidrófilas y menos propensas a la adsorción no específica de biomoléculas y células, el uso de reacciones de silano para injertar grupos funcionales químicamente reactivos en las superficies de silicio y vidrio de otro modo inertes, etc. Las técnicas de fotodesprotección pueden utilizarse para activar selectivamente grupos funcionales químicamente reactivos en ubicaciones específicas en la estructura de matriz, por ejemplo, la adición selectiva o la activación de grupos funcionales químicamente reactivos tales como las aminas primarias o los grupos carboxilo en las paredes internas de los micropocillos

puede utilizarse para acoplar covalentemente sondas de oligonucleótidos, péptidos, proteínas u otras biomoléculas a las paredes de los micropocillos. La elección del tratamiento de superficie o modificación de superficie utilizada puede depender del tipo de propiedad de superficie que se desee y/o del tipo de material a partir del cual se fabrica la matriz de micropocillos.

5 Sellado de micropocillos

Las aberturas de los micropocillos pueden sellarse, por ejemplo, durante las etapas de lisis celular para evitar la hibridación cruzada del ácido nucleico objetivo entre micropocillos adyacentes. Un micropocillo (o matriz de micropocillos) puede sellarse o taparse utilizando, por ejemplo, una membrana o lámina flexible de material sólido (es decir, una placa o plato) que sujeta
10 contra la superficie del sustrato de matriz de micropocillos, o una perla adecuada, donde el diámetro de la perla es mayor que el diámetro del micropocillo.

Un sello formado utilizando una membrana o lámina flexible de material sólido puede comprender, por ejemplo, membranas de nanoporos inorgánicas (p. ej., óxidos de aluminio), membranas de diálisis, portaobjetos de vidrio, cubreobjetos, películas elastoméricas (p. ej., PDMS) o películas de polímero hidrófilas (p. ej., una película de polímero recubierta con una película delgada de agarosa que se ha hidratado con amortiguador de lisis).
15

Los soportes sólidos (p. ej., perlas) utilizados para tapar los micropocillos pueden comprender cualquiera de los soportes sólidos (p. ej., perlas) de la descripción. En algunas realizaciones, los soportes sólidos son perlas de dextrano reticuladas (p. ej., Sephadex). El dextrano reticulado puede variar de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 80 micrómetros. En algunas realizaciones, las perlas de dextrano reticuladas utilizadas para la protección pueden ser, o ser aproximadamente, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, las perlas de dextrano reticuladas utilizadas para la protección pueden ser al menos, o como máximo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 u 80 micrómetros. Las perlas pueden ser más grandes que los diámetros de los micropocillos. En algunas realizaciones, las perlas pueden ser, o ser aproximadamente, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, más grandes que el diámetro de los micropocillos. En algunas realizaciones, las perlas pueden ser al menos, o como máximo, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 99 %, más grandes que el diámetro de los micropocillos.
20
25

El sello o tapa puede permitir que el amortiguador pase dentro y fuera de los micropocillos, mientras que evita que las macromoléculas (p. ej., ácidos nucleicos) migren fuera del pocillo. En algunas realizaciones, una macromolécula de o de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos puede bloquearse de migrar hacia o fuera del micropocillo por el sello o tapa. En algunas realizaciones, una macromolécula de al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos puede bloquearse de migrar hacia o fuera del micropocillo por el sello o tapa.
30
35

Manipulación de soporte sólido

Los soportes sólidos (p. ej., partículas sintéticas o perlas) pueden distribuirse entre un sustrato. Los soportes sólidos pueden distribuirse entre los pocillos del sustrato, retirarse de los pocillos del sustrato, o transportarse de otro modo a través de un dispositivo que comprende una o más matrices de micropocillos por medio de centrifugación u otros medios no magnéticos. Un micropocillo de un sustrato puede precargarse con un soporte sólido. Un micropocillo de un sustrato puede contener o puede contener aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 soportes sólidos. Un micropocillo de un sustrato puede contener al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 soportes sólidos. En algunas realizaciones, un micropocillo de un sustrato puede contener un soporte sólido.
40
45

Consumibles

Las matrices de micropocillos pueden ser un componente consumible del sistema de ensayo. Las matrices de micropocillos pueden ser reutilizables. Las matrices de micropocillos pueden configurarse para su uso como un dispositivo independiente para realizar ensayos manualmente, o pueden configurarse para comprender un componente fijo o extraíble de un sistema de instrumentos que proporciona la automatización completa o parcial del procedimiento de ensayo. En algunas realizaciones de los métodos descritos, las bibliotecas basadas en perlas de códigos de barras estocásticos pueden depositarse en los pocillos de la matriz de micropocillos como parte del procedimiento de ensayo. En algunas realizaciones, las perlas pueden precargarse en los pocillos de la matriz de micropocillos y proporcionarse al usuario como parte de, por ejemplo, un kit para realizar la codificación de barras estocástica y el recuento digital de objetivos de ácido nucleico.
50
55

Dos matrices de micropocillos acopladas

En algunas realizaciones, pueden proporcionarse dos matrices de micropocillos acoplados, uno precargado con perlas que se mantienen en su lugar mediante un primer imán, y el otro para su uso por parte del usuario al cargar células individuales. Después de la distribución de las células en la segunda matriz de micropocillos, las dos matrices pueden colocarse cara a cara y el primer imán se retira mientras que un segundo imán se utiliza para atraer las perlas de la primera matriz hacia los micropocillos correspondientes de la segunda matriz, asegurando de este modo que las perlas descansen por encima de las células en la segunda matriz de micropocillos y, por lo tanto, minimizando la pérdida por difusión de las moléculas objetivo
60
65

después de la lisis celular, al tiempo que se maximiza la unión eficiente de las moléculas objetivo a los códigos de barras estocásticos en la perla.

Sustratos sin micropocillos

5 En algunas realizaciones, un sustrato no incluye micropocillos. Por ejemplo, se pueden ensamblar perlas. Por ejemplo, las perlas pueden autoensamblarse. Las perlas pueden autoensamblarse formando una monocapa. La monocapa puede estar sobre una superficie plana del sustrato. La monocapa puede estar sobre una superficie curva del sustrato. La monocapa de perlas puede formarse por cualquier método, tal como evaporación de alcohol.

10 Las células individuales y las perlas pueden compartimentarse utilizando alternativas a micropocillos, por ejemplo, un único soporte sólido y una única célula podrían confinarse dentro de una única gotícula en una emulsión (p. ej., en un sistema de microfluidos digitales de gotículas).

15 Las células podrían estar confinadas dentro de perlas porosas que por sí mismas comprenden la pluralidad de códigos de barras estocásticos fijados. Las células individuales y los soportes sólidos pueden compartimentarse en cualquier tipo de recipiente, microrecipiente, cámara de reacción, recipiente de reacción o similares.

20 La codificación de barras estocástica de una única célula puede realizarse sin el uso de micropocillos. Pueden realizarse ensayos de codificación de barras estocástica de una única célula sin el uso de cualquier recipiente físico. Por ejemplo, la codificación de barras estocástica sin un recipiente físico puede realizarse incrustando células y perlas en proximidad cercana entre sí dentro de una capa de polímero o capa de gel para crear una barrera de difusión entre diferentes pares de células/perlas. Por ejemplo, la codificación de barras estocástica sin un recipiente físico puede realizarse *in situ*, *in vivo*, sobre un tejido sólido intacto, en una célula intacta y/o subcelularmente.

25 Métodos de codificación de barras

30 En la presente memoria se proporcionan métodos para estimar el número de objetivos distintos en diferentes ubicaciones en una muestra física (p. ej., tejido, órgano, tumor, célula). Los métodos pueden comprender colocar los códigos de barras estocásticos muy cerca de la muestra, lisar la muestra, asociar objetivos distintos con los códigos de barras estocásticos, amplificar los objetivos y/o contar digitalmente los objetivos. El método puede comprender además analizar y/o visualizar la información obtenida de las etiquetas espaciales en los códigos de barras estocásticos. En algunas realizaciones, el método comprende visualizar la pluralidad de objetivos en la muestra. Asignar la pluralidad de objetivos en la representación de la muestra puede incluir generar una representación bidimensional o una representación tridimensional de la muestra. La representación bidimensional y la representación tridimensional pueden generarse antes o después de la codificación de barras estocástica de la pluralidad de objetivos en la muestra. La visualización de la pluralidad de objetivos en la muestra puede incluir asignar la pluralidad de objetivos en una representación de la muestra. Asignar la pluralidad de objetivos en la representación de la muestra puede incluir generar una representación bidimensional o una representación tridimensional de la muestra. La representación bidimensional y la representación tridimensional pueden generarse antes o después de la codificación de barras estocástica de la pluralidad de objetivos en la muestra. En algunas realizaciones, la representación bidimensional y la representación tridimensional pueden generarse antes o después de lisar la muestra. La lisis de la muestra antes o después de generar la representación bidimensional o la representación tridimensional puede incluir calentar la muestra, poner en contacto la muestra con un detergente, cambiar el pH de la muestra, o cualquier combinación de los mismos.

45 En algunas realizaciones, la codificación de barras estocástica de la pluralidad de objetivos comprende hibridar una pluralidad de códigos de barras estocásticos con una pluralidad de objetivos para crear objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente. La codificación de barras estocásticamente de la pluralidad de objetivos puede comprender generar una biblioteca indexada de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente. Generar una biblioteca indexada de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente puede realizarse con un soporte sólido que comprende la pluralidad de códigos de barras estocásticos.

50 Poner en contacto una muestra y código(s) de barras estocástico(s)

55 La descripción proporciona métodos para poner en contacto una muestra (p. ej., células) con un sustrato de la descripción. Una muestra que comprende, por ejemplo, una célula, órgano o sección delgada de tejido, puede ponerse en contacto con códigos de barras estocásticos. Las células pueden ponerse en contacto, por ejemplo, mediante flujo por gravedad en donde las células pueden sedimentar y crear una monocapa. La muestra puede ser una sección delgada de tejido. La sección delgada puede colocarse sobre el sustrato. La muestra puede ser unidimensional (p. ej., formar una superficie plana). La muestra (p. ej., células) puede extenderse a través del sustrato, por ejemplo, haciendo crecer/cultivar las células sobre el sustrato.

65 Cuando los códigos de barras estocásticos están muy cerca de los objetivos, los objetivos pueden hibridar con el código de barras estocástico. Los códigos de barras estocásticos pueden ponerse en contacto con una relación no agotada de modo que cada objetivo distinto pueda asociarse con un código de barras estocástico distinto de la descripción. Para garantizar

una asociación eficiente entre el objetivo y el código de barras estocástico, los objetivos pueden reticularse con el código de barras estocástico.

Lisis celular

5 Después de la distribución de células y códigos de barras estocásticos, las células pueden lisarse para liberar las moléculas objetivo. La lisis celular puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de medios, por ejemplo, mediante medios químicos o bioquímicos, por choque osmótico, o por medio de lisis térmica, lisis mecánica o lisis óptica. Las células pueden
10 lisarse mediante la adición de un amortiguador de lisis celular que comprende un detergente (p. ej., SDS, dodecil sulfato de Li, Triton X-100, Tween-20 o NP-40), un disolvente orgánico (p. ej., metanol o acetona), o enzimas digestivas (p. ej., proteinasa K, pepsina o tripsina), o cualquier combinación de los mismos. Para aumentar la asociación de un objetivo y un código de barras estocástico, la tasa de difusión de las moléculas objetivo puede alterarse, por ejemplo, al reducir la temperatura y/o aumentar la viscosidad del lisado.

15 En algunas realizaciones, la muestra puede lisarse utilizando un papel de filtro. El papel de filtro puede empaparse con un amortiguador de lisis en la parte superior del papel de filtro. El papel de filtro puede aplicarse a la muestra con presión que puede facilitar la lisis de la muestra e hibridación de los objetivos de la muestra al sustrato.

20 En algunas realizaciones, la lisis puede realizarse mediante lisis mecánica, lisis térmica, lisis óptica y/o lisis química. La lisis química puede incluir el uso de enzimas digestivas tales como proteinasa K, pepsina y tripsina. La lisis puede realizarse mediante la adición de un amortiguador de lisis al sustrato. Un amortiguador de lisis puede comprender Tris HCl. Un amortiguador de lisis puede comprender al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 o 1 M o más de Tris HCl. Un amortiguador de lisis puede comprender como máximo aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 o 1 M o más de Tris HCL. Un
25 amortiguador de lisis puede comprender Tris HCl aproximadamente 0,1 M. El pH del amortiguador de lisis puede ser de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más. El pH del amortiguador de lisis puede ser como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más. En algunas realizaciones, el pH del amortiguador de lisis es de aproximadamente 7,5. El amortiguador de lisis puede comprender una sal (p. ej., LiCl). La concentración de sal en el amortiguador de lisis puede ser de al menos aproximadamente 0,1, 0,5 o 1 M o más. La concentración de sal en el
30 amortiguador de lisis puede ser como máximo aproximadamente 0,1, 0,5 o 1 M o más. En algunas realizaciones, la concentración de sal en el amortiguador de lisis es aproximadamente 0,5 M. El amortiguador de lisis puede comprender un detergente (p. ej., SDS, dodecil sulfato de Li, triton X, tween, NP-40). La concentración del detergente en el amortiguador de lisis puede ser al menos aproximadamente 0,0001 %, 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % o 7 % o más. La concentración del detergente en el amortiguador de lisis puede ser como máximo
35 aproximadamente 0,0001 %, 0,0005 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % o 7 % o más. En algunas realizaciones, la concentración del detergente en el amortiguador de lisis es aproximadamente 1 % de dodecil sulfato de Li. El tiempo utilizado en el método de lisis puede depender de la cantidad de detergente utilizada. En algunas realizaciones, cuanto más detergente utilizado, menos tiempo necesario para la lisis. El amortiguador de lisis puede comprender un agente quelante (p. ej., EDTA, EGTA). La concentración de un agente quelante en el amortiguador de lisis puede ser de al menos aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 mM o más. La concentración de un agente quelante en
40 el amortiguador de lisis puede ser como máximo aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25 o 30 mM o más. En algunas realizaciones, la concentración de agente quelante en el amortiguador de lisis es aproximadamente 10 mM. El amortiguador de lisis puede comprender un reactivo reductor (p. ej., beta-mercaptoetanol, DTT). La concentración del reactivo reductor en el amortiguador de lisis puede ser de al menos aproximadamente 1, 5, 10, 15 o 20 mM o más. La concentración del reactivo reductor en el amortiguador de lisis puede ser como máximo aproximadamente 1, 5, 10, 15 o 20 mM o más. En algunas
45 realizaciones, la concentración de reactivo reductor en el amortiguador de lisis es de aproximadamente 5 mM. En algunas realizaciones, un amortiguador de lisis puede comprender aproximadamente TrisHCl 0,1 M, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente LiCl 0,5 M, aproximadamente 1 % de dodecilsulfato de litio, aproximadamente EDTA 10 mM y aproximadamente DTT 5 mM.

50 La lisis puede realizarse a una temperatura de aproximadamente 4, 10, 15, 20, 25 o 30 °C. La lisis puede realizarse durante aproximadamente 1, 5, 10, 15 o 20 o más minutos. Una célula lisada puede comprender al menos aproximadamente 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000 o 700000 o más moléculas de ácido nucleico objetivo. Una célula lisada puede comprender como máximo aproximadamente 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000 o 700000 o más moléculas de ácido nucleico objetivo.

55 Unión de códigos de barras estocásticos con moléculas de ácido nucleico objetivo

Después de la lisis de las células y la liberación de moléculas de ácido nucleico de las mismas, las moléculas de ácido nucleico pueden asociarse aleatoriamente con los códigos de barras estocásticos del soporte sólido colocalizado. La
60 asociación puede comprender la hibridación de una región de reconocimiento objetivo de código de barras estocástico a una porción complementaria de la molécula de ácido nucleico objetivo (p. ej., oligo(dT) del código de barras estocástico puede interactuar con una cola poli(A) de un objetivo). Las condiciones de ensayo utilizadas para la hibridación (p. ej., pH del tampón, fuerza iónica, temperatura, etc.) pueden elegirse para promover la formación de híbridos específicos y estables. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico liberadas de las células lisadas pueden asociarse con la pluralidad
65 de sondas sobre el sustrato (p. ej., hibridar con las sondas en el sustrato). Cuando las sondas comprenden oligo(dT), las moléculas de ARNm pueden hibridar con las sondas y transcribirse inversamente. La porción oligo(dT) del oligonucleótido

5 puede actuar como un cebador para la síntesis de la primera cadena de la molécula de ADNc. Por ejemplo, en un ejemplo no limitativo de código de barras estocástico ilustrado en la Fig. 2, en 216, las moléculas de ARNm pueden hibridar con códigos de barras estocásticos en perlas. Por ejemplo, los fragmentos de nucleótidos monocatenarios pueden hibridar con las regiones de unión al objetivo de los códigos de barras estocásticos.

10 La unión puede comprender además la ligación de una región de reconocimiento objetivo de código de barras estocástica y una porción de la molécula de ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, la región de unión al objetivo puede comprender una secuencia de ácido nucleico que puede ser capaz de hibridación específica a un sitio saliente de restricción (p. ej., un saliente de extremo adherente EcoRI). El procedimiento de ensayo puede comprender además tratar los ácidos nucleicos objetivo con una enzima de restricción (p. ej., EcoRI) para crear un sitio saliente de restricción. El código de barras estocástico puede ligarse a cualquier molécula de ácido nucleico que comprenda una secuencia complementaria al sitio saliente de restricción. Puede utilizarse una ligasa (p. ej., ADN ligasa T4) para unir los dos fragmentos.

15 Por ejemplo, en un ejemplo no limitativo de codificación de barras estocástica ilustrado en la Fig. 2, en 220, los objetivos etiquetados de una pluralidad de células (o una pluralidad de muestras) (p. ej., moléculas objetivo de código de barras) pueden agruparse posteriormente, por ejemplo, en un tubo. Los objetivos etiquetados pueden agruparse, por ejemplo, recuperando los códigos de barras estocásticos y/o las perlas a las que se unen las moléculas objetivo de código de barras.

20 La recuperación de colecciones basadas en soporte sólido de moléculas objetivo de código de barras unidas puede implementarse mediante el uso de perlas magnéticas y un campo magnético aplicado externamente. Una vez que las moléculas objetivo de código de barras se han agrupado, todo el procesamiento puede realizarse en un único recipiente de reacción. El procesamiento adicional puede incluir, por ejemplo, reacciones de transcripción inversa, reacciones de amplificación, reacciones de escisión, reacciones de disociación y/o reacciones de extensión de ácido nucleico. Pueden realizarse reacciones de procesamiento adicionales dentro de los micropocillos, es decir, sin agrupar primero las moléculas de ácido nucleico objetivo etiquetados de una pluralidad de células.

Transcripción inversa

30 La descripción proporciona métodos para crear un conjugado estocástico diana-código de barras utilizando transcripción inversa (p. ej., en 224 de la Fig. 2). El conjugado estocástico diana-código de barras puede comprender el código de barras estocástico y una secuencia complementaria de todo o una porción del ácido nucleico diana (es decir, una molécula de ADNc marcada con código de barras estocásticamente). La transcripción inversa de la molécula de ARN asociada puede producirse mediante la adición de un cebador de transcripción inversa junto con la transcriptasa inversa. El cebador de transcripción inversa puede ser un cebador oligo(dT), un cebador de hexanucleótidos aleatorio o un cebador oligonucleotídico específico de diana. Los cebadores oligo(dT) pueden ser, o pueden tener aproximadamente, 12-18 nucleótidos de longitud y unirse a la cola de poli(A) endógena en el extremo 3' del ARNm de mamífero. Los cebadores de hexanucleótidos aleatorios pueden unirse al ARNm en una variedad de sitios complementarios. Los cebadores oligonucleotídicos específicos del objetivo típicamente ceban selectivamente el ARNm de interés.

40 En algunas realizaciones, la transcripción inversa de la molécula de ARN etiquetada puede producirse mediante la adición de un cebador de transcripción inversa. En algunas realizaciones, el cebador de transcripción inversa es un cebador oligo(dT), cebador de hexanucleótidos aleatorio o un cebador oligonucleotídico específico de diana. En general, los cebadores oligo(dT) tienen una longitud de 12-18 nucleótidos y se unen a la cola de poli(A) endógena en el extremo 3' del ARNm de mamífero. Los cebadores de hexanucleótidos aleatorios pueden unirse al ARNm en una variedad de sitios complementarios. Los cebadores oligonucleotídicos específicos del objetivo típicamente ceban selectivamente el ARNm de interés.

50 La transcripción inversa puede producirse repetidamente para producir múltiples moléculas de ADNc etiquetadas. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender realizar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reacciones de transcripción inversa. El método puede comprender realizar al menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 reacciones de transcripción inversa.

Amplificación

55 Pueden realizarse una o más reacciones de amplificación de ácido nucleico (p. ej., 228 de la Fig. 2) para crear múltiples copias de las moléculas de ácido nucleico diana etiquetadas. La amplificación puede realizarse de forma multiplexada, en donde se amplifican simultáneamente múltiples secuencias de ácido nucleico diana. La reacción de amplificación puede utilizarse para añadir adaptadores de secuenciación a las moléculas de ácido nucleico. Las reacciones de amplificación pueden comprender amplificar al menos una porción de una etiqueta de muestra, si está presente. Las reacciones de amplificación pueden comprender amplificar al menos una porción de la etiqueta celular y/o molecular. Las reacciones de amplificación pueden comprender amplificar al menos una porción de un marcador de muestra, una etiqueta celular, una etiqueta espacial, una etiqueta molecular, un ácido nucleico diana o una combinación de los mismos. Las reacciones de amplificación pueden comprender amplificar 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 100 % o un intervalo o un número entre dos cualesquiera de estos valores, de la pluralidad de ácidos nucleicos. El método puede comprender además

realizar una o más reacciones de síntesis de ADNc para producir una o más copias de ADNc de moléculas diana de código de barras que comprenden una etiqueta de muestra, una etiqueta celular, una etiqueta espacial y/o una etiqueta molecular.

5 En algunas realizaciones, la amplificación puede realizarse utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como se utiliza en la presente memoria, la PCR puede referirse a una reacción para la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas mediante la extensión de cebador simultánea de cadenas complementarias de ADN. Como se utiliza en la presente memoria, la PCR puede abarcar formas derivadas de la reacción, que incluyen, aunque no de forma limitativa, RT-PCR, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR múltiplex, PCR digital y PCR de ensamblaje.

10 La amplificación de los ácidos nucleicos etiquetados puede comprender métodos no basados en PCR. Ejemplos de métodos no basados en PCR incluyen, aunque no de forma limitativa, amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), SDA en tiempo real, amplificación por círculo rodante o amplificación de círculo a círculo. Otros métodos de amplificación no basados en PCR incluyen múltiples ciclos de amplificación de transcripción de ARN
15 dirigida por ARN polimerasa dependiente de ADN o síntesis de ADN dirigida a ARN y transcripción para amplificar objetivos de ADN o ARN, una reacción en cadena de la ligasa (LCR) y un método de Q β replicasa (Q β), uso de sondas palindrómicas, amplificación de desplazamiento de cadena, amplificación dirigida por oligonucleótidos mediante el uso de una endonucleasa de restricción, un método de amplificación en el que un cebador hibrida con una secuencia de ácido nucleico y el dúplex resultante se escinde antes de la reacción de extensión y amplificación, amplificación por desplazamiento de
20 cadena mediante el uso de una polimerasa de ácido nucleico que carece de actividad de exonucleasa 5', amplificación por círculo rodante y amplificación de extensión de ramificación (RAM). En algunas realizaciones, la amplificación no produce transcritos circularizados.

25 En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden además realizar una reacción en cadena de la polimerasa en el ácido nucleico etiquetado (p. ej., ARN etiquetado, ADN etiquetado, ADNc etiquetado) para producir un amplicón etiquetado estocásticamente. El amplicón etiquetado puede ser una molécula bicatenaria. La molécula bicatenaria puede comprender una molécula de ARN bicatenario, una molécula de ADN bicatenario o una molécula de ARN hibridada con una molécula de ADN. Una o ambas cadenas de la molécula bicatenaria pueden comprender una etiqueta de muestra, una etiqueta espacial, una etiqueta celular y/o una etiqueta molecular. El amplicón etiquetado estocásticamente
30 puede ser una molécula monocatenaria. La molécula monocatenaria puede comprender ADN, ARN o una combinación de los mismos. Los ácidos nucleicos de la descripción pueden comprender ácidos nucleicos sintéticos o alterados.

35 La amplificación puede comprender el uso de uno o más nucleótidos no naturales. Los nucleótidos no naturales pueden comprender nucleótidos fotolábiles o activables. Ejemplos de nucleótidos no naturales pueden incluir, aunque no de forma limitativa, ácido nucleico peptídico (PNA), morfolino y ácido nucleico bloqueado (LNA), así como ácido nucleico de glicol (GNA) y ácido nucleico de treosa (TNA). Los nucleótidos no naturales pueden añadirse a uno o más ciclos de una reacción de amplificación. La adición de los nucleótidos no naturales puede utilizarse para identificar productos como ciclos específicos o puntos de tiempo en la reacción de amplificación.

40 La realización de las una o más reacciones de amplificación puede comprender el uso de uno o más cebadores. Los uno o más cebadores pueden comprender, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o más nucleótidos. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 o más nucleótidos. Los uno o más cebadores pueden comprender menos de 12-15 nucleótidos. Los uno o más cebadores pueden hibridar con al menos una parte de la pluralidad de objetivos etiquetados estocásticamente. Los uno o más cebadores pueden hibridar con el
45 extremo 3' o el extremo 5' de la pluralidad de objetivos etiquetados estocásticamente. Los uno o más cebadores pueden hibridar con una región interna de la pluralidad de objetivos etiquetados estocásticamente. La región interna puede ser de al menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 o 1000 nucleótidos de los extremos 3' de la pluralidad de objetivos etiquetados estocásticamente. Los
50 uno o más cebadores pueden comprender un panel fijo de cebadores. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos uno o más cebadores personalizados. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos uno o más cebadores de control. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos uno o más cebadores específicos de genes.

55 Los uno o más cebadores pueden comprender un cebador universal. El cebador universal puede hibridar con un sitio de unión a cebador universal. Los uno o más cebadores personalizados pueden hibridar con una primera etiqueta de muestra, una segunda etiqueta de muestra, una etiqueta espacial, una etiqueta celular, una etiqueta molecular, un objetivo o cualquier combinación de los mismos. Los uno o más cebadores pueden comprender un cebador universal y un cebador personalizado. El cebador personalizado puede diseñarse para amplificar uno o más objetivos. Los objetivos pueden comprender un subconjunto de los ácidos nucleicos totales en una o más muestras. Los objetivos pueden comprender un
60 subconjunto de los objetivos totales etiquetados estocásticamente en una o más muestras. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos 96 o más cebadores personalizados. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos 960 o más cebadores personalizados. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos 9600 o más cebadores personalizados. Los uno o más cebadores personalizados pueden hibridar con dos o más ácidos nucleicos etiquetados diferentes. Los dos o más ácidos nucleicos etiquetados diferentes pueden corresponder a uno o más genes.

65

- 5 Puede utilizarse cualquier esquema de amplificación en los métodos de la presente descripción. Por ejemplo, en un esquema, la primera ronda de PCR puede amplificar moléculas unidas a la perla utilizando un cebador específico de gen y un cebador contra la secuencia del cebador 1 universal de secuenciación Illumina. La segunda ronda de PCR puede amplificar los primeros productos de PCR utilizando un cebador específico de gen anidado flanqueado por la secuencia del cebador 2 de secuenciación Illumina, y un cebador contra la secuencia del cebador 1 de secuenciación Illumina universal. La tercera ronda de PCR añade P5 y P7 y el índice de muestra para convertir los productos de PCR en una biblioteca de secuenciación Illumina. La secuenciación utilizando secuenciación de 150 pb x 2 puede revelar la etiqueta celular y la etiqueta molecular en la lectura 1, el gen en la lectura 2 y el índice de muestra en la lectura del índice 1.
- 10 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos pueden eliminarse del sustrato utilizando escisión química. Por ejemplo, un grupo químico o una base modificada presente en un ácido nucleico puede utilizarse para facilitar su eliminación de un soporte sólido. Por ejemplo, puede utilizarse una enzima para eliminar un ácido nucleico de un sustrato. Por ejemplo, un ácido nucleico puede eliminarse de un sustrato a través de una digestión con endonucleasa de restricción. Por ejemplo, el tratamiento de un ácido nucleico que contiene un dUTP o ddUTP con uracilo-d-glicosilasa (UDG) puede utilizarse para eliminar un ácido nucleico de un sustrato. Por ejemplo, un ácido nucleico puede eliminarse de un sustrato mediante el uso de una enzima que realiza la escisión de nucleótidos, tal como una enzima de reparación por escisión de base, tal como una endonucleasa apurínica/apirimidínica (AP). En algunas realizaciones, un ácido nucleico puede eliminarse de un sustrato mediante el uso de un grupo fotoescindible y la luz. En algunas realizaciones, puede utilizarse un enlazador escindible para eliminar un ácido nucleico del sustrato. Por ejemplo, el enlazador escindible puede comprender al menos uno de biotina/avidina, biotina/estreptavidina, biotina/neutravidina, proteína Ig A, un enlazador fotolábil, grupo enlazador lábil ácidos o bases, o un aptámero.
- 15 Cuando las sondas son específicas de gen, las moléculas pueden hibridar con las sondas y transcribirse inversamente y/o amplificarse. En algunas realizaciones, después de que se ha sintetizado el ácido nucleico (p. ej., transcrito inversamente), se puede amplificar. La amplificación puede realizarse de forma multiplexada, en donde se amplifican simultáneamente múltiples secuencias de ácido nucleico objetivo. La amplificación puede añadir adaptadores de secuenciación al ácido nucleico.
- 20 En algunas realizaciones, la amplificación puede realizarse sobre el sustrato, por ejemplo, con amplificación de puente. Los ADNc pueden tener colas de homopolímero para generar un extremo compatible para la amplificación de puente mediante el uso de sondas oligo(dT) sobre el sustrato. En la amplificación de puente, el cebador que es complementario al extremo 3' del ácido nucleico plantilla puede ser el primer cebador de cada par que está unido covalentemente a la partícula sólida. Cuando una muestra que contiene el ácido nucleico plantilla se pone en contacto con la partícula y se realiza un único ciclo térmico, la molécula plantilla puede hibridar con el primer cebador y el primer cebador se alarga en la dirección directa mediante la adición de nucleótidos para formar una molécula dúplex que consiste en la molécula plantilla y una cadena de ADN recién formada que es complementaria a la plantilla. En la etapa de calentamiento del siguiente ciclo, la molécula dúplex puede desnaturalizarse, liberando la molécula plantilla de la partícula y dejando la cadena complementaria de ADN unida a la partícula a través del primer cebador. En la etapa de hibridación de la etapa de hibridación y alargamiento que sigue, la cadena complementaria puede hibridar con el segundo cebador, que es complementaria a un segmento de la cadena complementaria en una ubicación eliminada del primer cebador. Esta hibridación puede causar que la cadena complementaria forme un puente entre los cebadores primero y segundo asegurados al primer cebador mediante un enlace covalente y al segundo cebador por hibridación. En la etapa de alargamiento, el segundo cebador puede alargarse en la dirección inversa mediante la adición de nucleótidos en la misma mezcla de reacción, convirtiendo de este modo el puente en un puente bicatenario. A continuación comienza el siguiente ciclo, y el puente bicatenario puede desnaturalizarse para producir dos moléculas de ácido nucleico monocatenario, cada una de las cuales tiene un extremo unido a la superficie de la partícula a través del primer y segundo cebadores, respectivamente, con el otro extremo de cada uno de los extremos no unidos. En la etapa de hibridación y alargamiento de este segundo ciclo, cada cadena puede hibridar con un cebador complementario adicional, previamente no utilizado, en la misma partícula, para formar nuevos puentes monocatenarios. Los dos cebadores previamente no utilizados ahora hibridados se alargan para convertir los dos nuevos puentes en puentes bicatenarios.
- 25 Las reacciones de amplificación pueden comprender amplificar al menos 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, o 100 % de la pluralidad de ácidos nucleicos.
- 30 La amplificación de los ácidos nucleicos etiquetados puede comprender métodos basados en PCR o métodos no basados en PCR. La amplificación de los ácidos nucleicos etiquetados puede comprender la amplificación exponencial de los ácidos nucleicos etiquetados. La amplificación de los ácidos nucleicos etiquetados puede comprender la amplificación lineal de los ácidos nucleicos etiquetados. La amplificación puede realizarse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR puede referirse a una reacción para la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas mediante la extensión de cebador simultánea de cadenas complementarias de ADN. La PCR puede abarcar formas derivadas de la reacción, que incluyen, aunque no de forma limitativa, RT-PCR, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR múltiple, PCR digital, PCR de supresión, PCR semisupresora y PCR de ensamblaje.
- 35 En algunas realizaciones, la amplificación de los ácidos nucleicos etiquetados comprende métodos no basados en PCR. Ejemplos de métodos no basados en PCR incluyen, aunque no de forma limitativa, amplificación por desplazamiento múltiple
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

(MDA), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), SDA en tiempo real, amplificación por círculo rodante o amplificación de círculo a círculo. Otros métodos de amplificación no basados en PCR incluyen múltiples ciclos de amplificación de transcripción de ARN dirigida por ARN polimerasa dependiente de ADN o síntesis de ADN dirigida a ARN y transcripción para amplificar objetivos de ADN o ARN, una reacción en cadena de la ligasa (LCR), una Q β replicasa (Q β), uso de sondas palindrómicas, amplificación por desplazamiento de cadena, amplificación dirigida por oligonucleótidos mediante el uso de una endonucleasa de restricción, un método de amplificación en el que un cebador se hibrida con una secuencia de ácido nucleico y el dúplex resultante se escinde antes de la reacción de extensión y amplificación, amplificación por desplazamiento de cadena mediante el uso de una polimerasa de ácido nucleico que carece de actividad de exonucleasa 5', amplificación por círculo rodante y amplificación de extensión de ramificación (RAM).

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria comprenden además realizar una reacción en cadena de la polimerasa anidada en el amplicón amplificado (p. ej., objetivo). El amplicón puede ser una molécula bicatenaria. La molécula bicatenaria puede comprender una molécula de ARN bicatenario, una molécula de ADN bicatenario o una molécula de ARN hibridada con una molécula de ADN. Una o ambas cadenas de la molécula bicatenaria pueden comprender un marcador de muestra o una etiqueta de identificador molecular. De forma alternativa, el amplicón puede ser una molécula monocatenaria. La molécula monocatenaria puede comprender ADN, ARN o una combinación de los mismos. Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden comprender ácidos nucleicos sintéticos o alterados.

En algunas realizaciones, el método comprende amplificar repetidamente el ácido nucleico etiquetado para producir múltiples amplicones. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender realizar al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reacciones de amplificación. De forma alternativa, el método comprende realizar al menos aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 reacciones de amplificación.

La amplificación puede comprender además añadir uno o más ácidos nucleicos de control a una o más muestras que comprenden una pluralidad de ácidos nucleicos. La amplificación puede comprender además añadir uno o más ácidos nucleicos de control a una pluralidad de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de control pueden comprender una etiqueta de control.

La amplificación puede comprender el uso de uno o más nucleótidos no naturales. Los nucleótidos no naturales pueden comprender nucleótidos fotolábiles y/o activables. Ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen, aunque no de forma limitativa, ácido nucleico peptídico (PNA), morfolino y ácido nucleico bloqueado (LNA), así como ácido nucleico de glicol (GNA) y ácido nucleico de treosa (TNA). Los nucleótidos no naturales pueden añadirse a uno o más ciclos de una reacción de amplificación. La adición de los nucleótidos no naturales puede utilizarse para identificar productos como ciclos específicos o puntos de tiempo en la reacción de amplificación.

La realización de las una o más reacciones de amplificación puede comprender el uso de uno o más cebadores. Los uno o más cebadores pueden comprender uno o más oligonucleótidos. Los uno o más oligonucleótidos pueden comprender al menos aproximadamente 7-9 nucleótidos. Los uno o más oligonucleótidos pueden comprender menos de 12-15 nucleótidos. Los uno o más cebadores pueden hibridar con al menos una parte de la pluralidad de ácidos nucleicos etiquetados. Los uno o más cebadores pueden hibridar con el extremo 3' y/o el extremo 5' de la pluralidad de ácidos nucleicos etiquetados. Los uno o más cebadores pueden hibridar con una región interna de la pluralidad de ácidos nucleicos etiquetados. La región interna puede ser de al menos aproximadamente 50, 100, 150, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 o 1000 nucleótidos de los extremos 3' de la pluralidad de ácidos nucleicos etiquetados. Los uno o más cebadores pueden comprender un panel fijo de cebadores. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos uno o más cebadores personalizados. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos uno o más cebadores de control. Los uno o más cebadores pueden comprender al menos uno o más cebadores del gen constitutivo. Los uno o más cebadores pueden comprender un cebador universal. El cebador universal puede hibridar con un sitio de unión a cebador universal. Los uno o más cebadores personalizados pueden hibridar con el primer marcador de muestra, el segundo marcador de muestra, la etiqueta de identificador molecular, el ácido nucleico o un producto del mismo. Los uno o más cebadores pueden comprender un cebador universal y un cebador personalizado. El cebador personalizado puede diseñarse para amplificar uno o más ácidos nucleicos diana. Los ácidos nucleicos diana pueden comprender un subconjunto de los ácidos nucleicos totales en una o más muestras. En algunas realizaciones, los cebadores son las sondas unidas a la matriz de la descripción.

En algunas realizaciones, la codificación de barras estocástica de la pluralidad de objetivos en la muestra comprende además generar una biblioteca indexada de los fragmentos marcados con códigos de barras estocásticamente. Las etiquetas moleculares de diferentes códigos de barras estocásticos pueden ser diferentes entre sí. Generar una biblioteca indexada de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente incluye generar una pluralidad de polinucleótidos indexados de la pluralidad de objetivos en la muestra. Por ejemplo, para una biblioteca indexada de objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente que comprende un primer objetivo indexado y un segundo objetivo indexado, la región de etiqueta del primer polinucleótido indexado puede diferir de la región de etiqueta del segundo polinucleótido indexado en, aproximadamente, al menos, o en, como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, nucleótidos. En algunas realizaciones, generar una biblioteca

indexada de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente incluye poner en contacto una pluralidad de objetivos, por ejemplo moléculas de ARNm, con una pluralidad de oligonucleótidos que incluyen una región poli(T) y una región de etiqueta; y llevar a cabo una primera síntesis de cadena utilizando una transcriptasa inversa para producir moléculas de ADNc etiquetadas monocatenarias que comprenden cada una una región de ADNc y una región de etiqueta, en donde la pluralidad de objetivos incluye al menos dos moléculas de ARNm de diferentes secuencias y la pluralidad de oligonucleótidos incluye al menos dos oligonucleótidos de diferentes secuencias. Generar una biblioteca indexada de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente puede comprender además amplificar las moléculas de ADNc etiquetadas monocatenarias para producir moléculas de ADNc etiquetadas bicatenarias; y realizar PCR anidada en las moléculas de ADNc etiquetadas bicatenarias para producir amplicones etiquetados. En algunas realizaciones, el método puede incluir generar un amplicón etiquetado con adaptador.

La codificación de barras estocástica puede utilizar códigos de barras o marcadores de ácido nucleico para etiquetar moléculas individuales de ácido nucleico (p. ej., ADN o ARN). En algunas realizaciones, implica añadir códigos de barras o marcadores de ADN a moléculas de ADNc a medida que se generan a partir de ARNm. La PCR anidada puede realizarse para minimizar el sesgo de amplificación por PCR. Los adaptadores pueden añadirse para secuenciación utilizando, por ejemplo, secuenciación de nueva generación (NGS). Los resultados de secuenciación pueden utilizarse para determinar etiquetas celulares, etiquetas moleculares y secuencias de fragmentos de nucleótidos de las una o más copias de los objetivos, por ejemplo, en 232 de la Fig. 2.

La Fig. 3 es una ilustración esquemática que muestra un proceso ilustrativo no limitativo de generar una biblioteca indexada de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente, por ejemplo, ARNm. Como se muestra en la etapa 1, el proceso de transcripción inversa puede codificar cada molécula de ARNm con una etiqueta molecular única, una etiqueta celular y un sitio de PCR universal. En particular, las moléculas 302 de ARN pueden transcribirse inversamente para producir moléculas 304 de ADNc etiquetadas, que incluyen una región 306 de ADNc, por la hibridación estocástica de un conjunto de etiquetas 310 de identificador molecular a la región 308 de cola de poli(A) de las moléculas 302 de ARN. Cada una de las etiquetas 310 de identificador molecular puede comprender una región de unión al objetivo, por ejemplo una región 312 de poli(dT), una región 314 de etiqueta y una región 316 de PCR universal.

En algunas realizaciones, la etiqueta celular puede incluir de 3 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la etiqueta molecular puede incluir de 3 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, cada uno de la pluralidad de códigos de barras estocásticos comprende además uno o más de una etiqueta universal y una etiqueta de célula, en donde las etiquetas universales son las mismas para la pluralidad de códigos de barras estocásticos en los soportes sólidos y las etiquetas celulares son las mismas para la pluralidad de códigos de barras estocásticos en el soporte sólido. En algunas realizaciones, la etiqueta universal puede incluir de 3 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, la etiqueta celular comprende de 3 a 20 nucleótidos.

En algunas realizaciones, la región 314 de etiqueta puede incluir una etiqueta 318 molecular y una etiqueta 320 celular. En algunas realizaciones, la región 314 de etiqueta puede incluir uno o más de una etiqueta universal, una etiqueta de dimensión y una etiqueta celular. La etiqueta 33-18 molecular puede tener, puede tener aproximadamente, puede tener al menos, o puede tener como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, de nucleótidos de longitud. La etiqueta 320 celular puede tener, puede tener aproximadamente, puede tener al menos, o puede tener como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, de nucleótidos de longitud. La etiqueta universal puede tener, puede tener aproximadamente, puede tener al menos, o puede tener como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, de nucleótidos de longitud. Las etiquetas universales pueden ser las mismas para la pluralidad de códigos de barras estocásticos en los soportes sólidos y las etiquetas celulares son las mismas para la pluralidad de códigos de barras estocásticos en el soporte sólido. La etiqueta de dimensión puede tener, puede tener aproximadamente, puede tener al menos, o puede tener como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o un número o un intervalo entre cualquiera de estos valores, de nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, la región 314 de etiqueta puede comprender, comprender aproximadamente, comprender al menos, o comprender como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, diferentes etiquetas, tales como una etiqueta 318 molecular y una etiqueta 320 celular. Cada etiqueta puede tener, puede tener aproximadamente, puede tener al menos, o puede tener como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, de nucleótidos de longitud. Un conjunto de etiquetas 310 de identificador molecular puede contener, contener aproximadamente, contener al menos, o puede tener como máximo, 10, 20, 40, 50, 70, 80, 90, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{20} , o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, etiquetas 310 de identificador molecular. Y el conjunto de etiquetas 310 de identificador molecular puede, por ejemplo, contener cada una región 314 de etiqueta única. Las moléculas 304 de ADNc etiquetadas pueden purificarse para eliminar las etiquetas 310 de identificador molecular en exceso. La purificación puede comprender purificación con perlas Ampure.

Como se muestra en la etapa 2, los productos del proceso de transcripción inversa en la etapa 1 pueden agruparse en 1 tubo y se amplifican por PCR con un 1^{er} grupo de cebadores de PCR y un 1^{er} cebador de PCR universal. La agrupación es

posible debido a la región 314 de etiqueta única. En particular, las moléculas 304 de ADNc etiquetadas pueden amplificarse para producir amplicones 322 etiquetados con PCR anidada. La amplificación puede comprender amplificación por PCR múltiplex. La amplificación puede comprender una amplificación por PCR múltiplex con 96 cebadores múltiplex en un único volumen de reacción. En algunas realizaciones, la amplificación por PCR múltiplex puede utilizar, utilizar aproximadamente, utilizar al menos, o utilizar como máximo, 10, 20, 40, 50, 70, 80, 90, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹, 10¹², 10¹³, 10¹⁴, 10¹⁵, 10²⁰, o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, cebadores múltiplex en un único volumen de reacción. La amplificación puede comprender un 1^{er} grupo 324 de cebadores de PCR de los cebadores 326A-C personalizados dirigido a genes específicos y un cebador 328 universal. Los cebadores 326 personalizados pueden hibridar con una región 306' dentro de la porción de ADNc de la molécula 304 de ADNc etiquetada. El cebador 328 universal puede hibridar con la región 316 de PCR universal de la molécula 304 de ADNc etiquetada.

Como se muestra en la etapa 3 de la Fig. 3, los productos de la amplificación por PCR en la etapa 2 pueden amplificarse con un grupo de cebadores de PCR anidada y un 2^o cebador de PCR universal. La PCR anidada puede minimizar el sesgo de amplificación por PCR. En particular, los amplicones 322 marcados con PCR anidada pueden amplificarse adicionalmente mediante PCR anidada. La PCR anidada puede comprender PCR múltiplex con un grupo 330 de cebadores de los cebadores 332a-c de PCR anidada y un 2^o cebador 328' universal de PCR en un único volumen de reacción. El conjunto de cebadores 3-328 de PCR anidado puede contener, contener aproximadamente, contener al menos, o contener como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, o un número o un intervalo entre cualesquiera de estos valores, diferentes cebadores 330 de PCR anidados. Los cebadores 332 de PCR anidados pueden contener un adaptador 334 e hibridar con una región 306'' dentro de la porción de ADNc del amplicón 322 marcado. El cebador 328' universal puede contener un adaptador 336 e hibridar con la región 316 de PCR universal del amplicón 322 etiquetado. Por lo tanto, la etapa 3 produce el amplicón 338 etiquetado con adaptador. En algunas realizaciones, los cebadores 332 de PCR anidados y el 2^o cebador 328' de PCR universal puede no contener los adaptadores 334 y 336. En su lugar, los adaptadores 334 y 336 pueden ligarse a los productos de PCR anidada para producir el amplicón 338 etiquetado con adaptador.

Como se muestra en la etapa 4, los productos de PCR de la etapa 3 pueden amplificarse por PCR para secuenciación utilizando cebadores de amplificación de biblioteca. En particular, los adaptadores 334 y 336 pueden utilizarse para llevar a cabo uno o más ensayos adicionales en el amplicón 338 etiquetado con adaptador. Los adaptadores 334 y 336 pueden hibridar con los cebadores 340 y 342. Los uno o más cebadores 340 y 342 pueden ser cebadores de amplificación por PCR. Los uno o más cebadores 340 y 342 pueden ser cebadores de secuenciación. Los uno o más adaptadores 334 y 336 pueden utilizarse para una amplificación adicional de los amplicones 338 etiquetada con adaptador. Los uno o más adaptadores 334 y 336 pueden utilizarse para secuenciar el amplicón 338 marcado con adaptador. El cebador 342 puede contener un índice 344 de placa de modo que los amplicones generados mediante el uso del mismo conjunto de etiquetas 318 de identificador molecular pueden secuenciarse en una reacción de secuenciación mediante el uso de secuenciación de nueva generación (NGS).

Secuenciación

En algunas realizaciones, estimar el número de objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente diferentes puede comprender determinar las secuencias de los objetivos etiquetados, la etiqueta espacial, la etiqueta molecular, la etiqueta de muestra, la etiqueta celular o cualquier producto de las mismas (p. ej., amplicones etiquetados, o moléculas de ADNc etiquetadas). Un objetivo amplificado puede someterse a secuenciación. La determinación de la secuencia del objetivo marcado con código de barras estocásticamente o cualquier producto de la misma puede comprender realizar una reacción de secuenciación para determinar la secuencia de al menos una porción de una etiqueta de muestra, una etiqueta espacial, una etiqueta celular, una etiqueta molecular, al menos una porción del objetivo etiquetado estocásticamente, un complemento de la misma, un complemento inverso de la misma o cualquier combinación de las mismas.

La determinación de la secuencia de un objetivo marcado con código de barras estocásticamente (p. ej., ácido nucleico amplificado, ácido nucleico marcado, copia de ADNc de un ácido nucleico marcado, etc.) puede realizarse mediante el uso de una variedad de métodos de secuenciación que incluyen, aunque no de forma limitativa, secuenciación por hibridación (SBH), secuenciación por ligamiento (SBL), secuenciación incremental cuantitativa por adición de nucleótidos fluorescente (QIFNAS), ligación gradual y escisión, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), balizas moleculares, digestión con sonda indicadora TaqMan, pirosecuenciación, secuenciación fluorescente in situ (FISSEQ), perlas de FISSEQ, secuenciación oscilante, secuenciación múltiplex, secuenciación de colonias polimerizadas (POLONY); secuenciación por círculo rodante nanogonid (ROLONY), ensayos de ligadura de oligo específicos de alelo (p. ej., ensayo de ligadura de oligo (OLA), OLA de molécula de plantilla única utilizando una sonda lineal ligada y una lectura de amplificación por círculo rodante (RCA), sondas de candado ligadas u OLA de molécula de plantilla única utilizando una sonda circular de candado ligada y una lectura de amplificación por círculo rodante (RCA)) y similares.

En algunas realizaciones, determinar la secuencia del objetivo marcado con código de barras estocásticamente o cualquier producto de la misma comprende secuenciación de extremos pareados, secuenciación de nanoporos, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación de escopeta, secuenciación con terminador de colorante, secuenciación de ADN de múltiples cebadores, desplazamiento con cebador, secuenciación de didesoxi de Sanger, secuenciación de Maxim-Gilbert, pirosecuenciación, secuenciación de única molécula verdadera o cualquier combinación de los mismos. De forma alternativa, la secuencia del objetivo marcado con código de barras estocásticamente o cualquier producto de la misma

puede determinarse mediante microscopía electrónica o una matriz de transistor de efecto de campo (chemFET) sensible a la sustancia química.

5 Pueden utilizarse métodos de secuenciación de alto rendimiento, tales como secuenciación de matriz cíclica utilizando plataformas tales como Roche 454, Illumina Solexa, ABI-SOLID, ION Torrent, Complete Genomics, Pacific Bioscience, Helicos, o la plataforma Polonator. En algunas realizaciones, la secuenciación puede comprender secuenciación MiSeq. En algunas realizaciones, la secuenciación puede comprender secuenciación HiSeq.

10 Los objetivos etiquetados estocásticamente pueden comprender ácidos nucleicos que representan de aproximadamente 0,01 % de los genes del genoma de un organismo a aproximadamente 100 % de los genes del genoma de un organismo. Por ejemplo, de aproximadamente 0,01 % de los genes del genoma de un organismo a aproximadamente 100 % de los genes del genoma de un organismo pueden secuenciarse utilizando una región complementaria diana que comprende una pluralidad de multímeros capturando los genes que contienen una secuencia complementaria de la muestra. En algunas realizaciones, los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente comprenden ácidos nucleicos que representan de aproximadamente 0,01 % de los transcritos del transcriptoma de un organismo a aproximadamente 100 % de los transcritos del transcriptoma de un organismo. Por ejemplo, de aproximadamente 0,501 % de los transcritos del transcriptoma de un organismo a aproximadamente 100 % de los transcritos del transcriptoma de un organismo pueden secuenciarse mediante el uso de una región complementaria diana que comprende una cola de poli(T) capturando los ARNm de la muestra.

20 La determinación de las secuencias de las etiquetas espaciales y las etiquetas moleculares de la pluralidad de códigos de barras estocásticos puede incluir la secuenciación de 0,00001 %, 0,0001 %, 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 %, 100 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, de la pluralidad de códigos de barras estocásticos. Determinar las secuencias de las etiquetas de la pluralidad de códigos de barras estocásticos, por ejemplo, las etiquetas de muestra, las etiquetas espaciales y las etiquetas moleculares, pueden incluir la secuenciación de 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰, 10¹¹, 10¹², 10¹³, 10¹⁴, 10¹⁵, 10¹⁶, 10¹⁷, 10¹⁸, 10¹⁹, 10²⁰, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, de la pluralidad de códigos de barras estocásticos. La secuenciación de parte o la totalidad de la pluralidad de códigos de barras estocásticos puede incluir generar secuencias con longitudes de lectura de, de aproximadamente, de al menos, o de como máximo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, de nucleótidos o bases.

35 La secuenciación puede comprender secuenciar al menos o al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos o pares de bases de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente. Por ejemplo, la secuenciación puede comprender generar datos de secuenciación con secuencias con longitudes de lectura de 50, 75 o 100, o más nucleótidos mediante la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la pluralidad de objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente. La secuenciación puede comprender secuenciar al menos o al menos aproximadamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más nucleótidos o pares de bases de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente. La secuenciación puede comprender secuenciar al menos o al menos aproximadamente 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 o más nucleótidos o pares de bases de los objetivos marcados con códigos de barras estocásticamente.

45 La secuenciación puede comprender al menos aproximadamente 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más lecturas de secuenciación por ejecución. En algunas realizaciones, la secuenciación comprende secuenciar al menos o al menos aproximadamente 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 o más lecturas de secuenciación por ejecución. La secuenciación puede comprender menos de o igual a aproximadamente 1.600000.000 de lecturas de secuenciación por ejecución. La secuenciación puede comprender menos de o igual a aproximadamente 200000.000 de lecturas por ejecución.

50 **Muestras**

En algunas realizaciones, la pluralidad de objetivos puede estar comprendida en una o más muestras. Una muestra puede comprender una o más células, o ácidos nucleicos de una o más células. Una muestra puede ser una única célula o ácidos nucleicos de una única célula. Las una o más células pueden ser de uno o más tipos de células. Al menos uno de los uno o más tipos de células puede ser célula cerebral, célula cardíaca, célula cancerosa, célula tumoral circulante, célula de órgano, célula epitelial, célula metastásica, célula benigna, célula primaria, célula circulatoria o cualquier combinación de las mismas.

60 Una muestra para su uso en el método de la descripción puede comprender una o más células. Una muestra puede referirse a una o más células. En algunas realizaciones, la pluralidad de células puede incluir uno o más tipos de células. Al menos uno de los uno o más tipos de células puede ser célula cerebral, célula cardíaca, célula cancerosa, célula tumoral circulante, célula de órgano, célula epitelial, célula metastásica, célula benigna, célula primaria, célula circulatoria o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, las células son células cancerosas extirpadas de un tejido canceroso, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cánceres de piel de melanoma y no melanoma, y similares. En algunas realizaciones, las células se derivan de un cáncer pero se recolectan de un fluido corporal (p. ej., células tumorales circulantes). Ejemplos no limitativos

de cánceres pueden incluir, adenoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, carcinoma de células pequeñas, carcinoma de células grandes indiferenciadas, condrosarcoma y fibrosarcoma. La muestra puede incluir un tejido, una monocapa de células, células fijas, una sección de tejido o cualquier combinación de los mismos. La muestra puede incluir una muestra biológica, una muestra clínica, una muestra ambiental, un fluido biológico, un tejido o una célula de un sujeto. La muestra puede obtenerse de un ser humano, un mamífero, un perro, una rata, un ratón, un pez, una mosca, un gusano, una planta, un hongo, una bacteria, un virus, un vertebrado o un invertebrado.

En algunas realizaciones, las células son células que se han infectado con virus y contienen oligonucleótidos virales. En algunas realizaciones, la infección vírica puede ser causada por un virus tal como virus de ADN monocatenario (cadena + o "sentido") (p. ej. parvovirus) o virus de ARN bicatenario (p. ej., reovirus). En algunas realizaciones, las células son bacterias. Estas pueden incluir bacterias grampositivas o gramnegativas. En algunas realizaciones, las células son hongos. En algunas realizaciones, las células son protozoarios u otros parásitos.

Como se utiliza en la presente memoria el término "célula" puede referirse a una o más células. En algunas realizaciones, las células son células normales, por ejemplo, células humanas en diferentes etapas de desarrollo, o células humanas de diferentes órganos o tipos de tejidos. En algunas realizaciones, las células son células no humanas, por ejemplo, otros tipos de células de mamíferos (p. ej., ratón, rata, cerdo, perro, vaca o caballo). En algunas realizaciones, las células son otros tipos de células animales o vegetales. En otras realizaciones, las células pueden ser cualquier célula procarionta o eucarionta.

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

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

Dispositivos

En la presente memoria se describen dispositivos para la codificación de barras estocástica. En algunas realizaciones, un dispositivo comprende: una celda de flujo que comprende un canal fluido, una vía de entrada y una vía de salida, en donde el canal fluido comprende un techo, una pared lateral del canal fluido y una parte inferior. Esta otra pared lateral del canal fluido forma un borde con el techo y otro borde con la parte inferior. El ángulo de contacto del techo puede ser al menos 10 grados más pequeño que el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluido. La parte inferior del canal fluido comprende un sustrato que comprende una pluralidad de micropocillos. La vía de entrada y la vía de salida están en comunicación de fluidos con la celda de flujo a través del canal fluido. El canal fluido puede comprender otra pared lateral del canal fluido. Esta otra pared lateral del canal fluido forma un borde con el techo y otro borde con la parte inferior. El techo comprende una parte central que está desplazada del borde de la primera pared lateral de techo, formando de este modo una desviación del borde de la primera pared lateral de techo, en donde la parte central es más hidrófila que la desviación.

Celdas de flujo

El sustrato de matriz de micropocillos puede empaquetarse dentro de una celda de flujo que proporciona una interconexión conveniente con el resto del sistema de manipulación de fluidos y facilita el intercambio de fluidos, por ejemplo, suspensiones de soporte de células y sólidos, amortiguadores de lisis, amortiguadores de enjuague, etc., que se administran a la matriz de micropocillos y/o gotícula de emulsión. Las funciones de diseño pueden incluir: (i) una o más vías de entrada para introducir muestras de células, suspensiones de soporte sólido u otros reactivos de ensayo, (ii) una o más cámaras de matriz de micropocillos diseñadas para proporcionar un llenado eficiente (p. ej., uniforme) y un intercambio de fluido mientras se minimiza los remolinos o zonas muertas, y (iii) una o más vías de salida para el suministro de fluidos a un punto de recolección de muestras o un depósito de desechos.

El diseño de la celda de flujo puede incluir una pluralidad de cámaras de micromatriz que interactúan con una pluralidad de matrices de micropocillos de modo que una o más muestras de células diferentes pueden procesarse en paralelo. El diseño de la celda de flujo puede incluir además características para crear perfiles de velocidad de flujo consistentes (p. ej., uniformes), es decir, "flujo de pistón", a través del ancho de la cámara de matriz para proporcionar un suministro más eficiente (p. ej., uniforme) de células y perlas a los micropocillos, por ejemplo, mediante el uso de una barrera porosa ubicada cerca de la entrada de la cámara y aguas arriba de la matriz de micropocillos como un "difusor de flujo", o al dividir cada cámara de matriz en varias subsecciones que cubren colectivamente la misma área de matriz total, pero a través de la cual fluye la corriente de fluido de entrada dividida en paralelo. En algunas realizaciones, la celda de flujo puede encerrar o incorporar más de un sustrato de matriz de micropocillos. En algunas realizaciones, la matriz de micropocillos integrados/conjunto de celdas de flujo puede constituir un componente fijo del sistema. En algunas realizaciones, la matriz de micropocillos/conjunto de celdas de flujo puede extraerse del instrumento.

En general, las dimensiones del canal o canales fluidicos y la cámara o cámaras de matriz en diseños de celdas de flujo se optimizarán para (i) proporcionar una administración eficiente (p. ej., uniforme) de células y perlas a la matriz de micropocillos, y (ii) para minimizar la muestra y el consumo de reactivo. El ancho de un canal fluidoico puede ser diferente en diferentes implementaciones, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 mm a 100 mm. En algunas realizaciones, el ancho puede ser, o ser aproximadamente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mm, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la anchura puede ser al menos, o como máximo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mm.

La altura de un canal fluidoico puede ser diferente en diferentes implementaciones, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 mm a 100 mm. En algunas realizaciones, la altura puede ser, o ser aproximadamente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mm, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la altura puede ser al menos, o como máximo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mm.

Las celdas de flujo pueden fabricarse mediante el uso de una variedad de técnicas y materiales conocidos por los expertos en la técnica. En general, una celda de flujo puede fabricarse como una pieza separada y posteriormente sujetarse mecánicamente o unirse permanentemente al sustrato de matriz de micropocillos. Ejemplos de técnicas de fabricación adecuadas incluyen mecanizado convencional, mecanizado CNC, moldeo por inyección, impresión 3D, alineación y laminación de una o más capas de películas de polímero con láser o troquelado, o cualquiera de una serie de técnicas de microfabricación tales como fotolitografía y grabado químico húmedo, grabado en seco, grabado profundo con iones reactivos o micromaquinado láser.

Una vez que se ha fabricado la pieza de celda de flujo, puede unirse al sustrato de matriz de micropocillos mecánicamente, por ejemplo, sujetándola contra el sustrato de matriz de micropocillos (con o sin el uso de una junta), o puede unirse directamente al sustrato de matriz de micropocillos utilizando cualquiera de una variedad de técnicas (dependiendo de la elección de materiales utilizados) conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de unión anódica, unión térmica o cualquiera de una variedad de adhesivos o películas adhesivas, incluidos adhesivos basados en epoxi, basados en acrílico, basados en silicona, curables por UV, basados en poliuretano o basados en cianoacrilato. En algunas realizaciones, el sustrato puede formar la parte inferior de canal fluidoico del canal fluidoico, o el sustrato puede estar en la parte inferior de canal fluidoico del canal fluidoico. En algunas realizaciones, el sustrato comprende silicio, sílice fundida, vidrio, un polímero, un metal, un elastómero, polidimetilsiloxano, agarosa, un hidrogel o una combinación de los mismos.

Las celda de flujo pueden fabricarse mediante el uso de una variedad de materiales conocidos por los expertos en la técnica. En general, la elección del material utilizado dependerá de la elección de la técnica de fabricación utilizada, y viceversa. Ejemplos de materiales adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, silicio, sílice fundida, vidrio, cualquiera de una variedad de polímeros, por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS; elastómero), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), poliimida, polímeros de olefina cíclica (COP), copolímeros de olefina cíclica (COC), tereftalato de polietileno (PET), resinas epoxi, metales (p. ej. aluminio, acero inoxidable, cobre, níquel, cromo y titanio), un material antiadherente tal como teflon (PTFE) o una combinación de estos materiales. Los polímeros de olefina cíclica (COP) pueden comprender Zeonor 1020R o Zeonor 1060R.

Flujo de pistón

En algunas realizaciones, el diseño de la celda de flujo puede incluir además características para crear perfiles de velocidad de flujo consistentes (p. ej., uniformes), es decir, “flujo de pistón”, a través del ancho de la cámara de micropocillos para proporcionar un suministro más eficiente (p. ej., uniforme) de células y perlas a los micropocillos, por ejemplo, mediante el uso de una barrera porosa ubicada cerca de la entrada de la cámara y aguas arriba de los micropocillos como un “difusor de flujo”, o al dividir cada cámara de micropocillos en varias subsecciones que cubren colectivamente la misma área de matriz total, pero a través de la cual fluye la corriente de fluido de entrada dividida en paralelo. El flujo de pistón puede utilizarse (1) para proporcionar una carga de célula y perla eficiente (p. ej., uniforme) en la celda de flujo; (2) para eliminar el flujo de las perlas y los amortiguadores celulares que se cargan en la celda de flujo, lo que aumenta la eficiencia de captura de las células y las perlas de la celda de flujo; y/o (3) para permitir la agitación de partículas pequeñas en la superficie de micropocillos, lo que puede eliminar los dobletes de las perlas.

La Fig. 4A es una ilustración esquemática que muestra el perfil de velocidad relativa del flujo laminar a lo largo de la dirección del flujo. Para el flujo laminar, el perfil de velocidad relativa puede ser parabólico. La velocidad máxima de flujo se produce en, o cerca de, el centro del canal fluidoico. La velocidad de flujo puede ser baja o acercarse a cero en los límites del canal fluidoico (también denominados límites de celda de flujo), los límites entre el flujo y las superficies del canal fluidoico, tales como la parte inferior y las paredes laterales del canal fluidoico. La baja velocidad de flujo en los límites del canal fluidoico puede dar como resultado una agitación baja o mínima de perlas o células en la superficie de la matriz de micropocillos o el sustrato que comprende los micropocillos.

La Fig. 4B es una ilustración esquemática que muestra el perfil de velocidad relativa del flujo no laminar, tal como el flujo de pistón, a lo largo de la dirección del flujo. En algunas realizaciones, con el flujo de pistón, la velocidad de flujo relativa puede ser constante a través de la sección transversal del canal fluidoico. El flujo de pistón puede permitir la agitación de perlas o

células en la superficie de la matriz de micropocillos o el sustrato que comprende los micropocillos. Con dicha agitación de perlas o células, cada micropocillo puede incluir una perla y/o una célula. Sin embargo, un desplazamiento no uniforme de un gas tal como aire, CO₂, o N₂ en los límites del canal fluídico puede dar como resultado un flujo de pistón no uniforme, con una velocidad de flujo relativa que se aproxima a cero en los límites del canal fluídico.

5 Puede utilizarse un recubrimiento hidrófilo o recubrimiento superhidrófilo o un tratamiento de la pared superior (también denominado techo, techo de canal fluídico o techo de canal fluídico) dentro del canal fluídico de una celda de flujo para introducir pistones de gas y pistones amortiguadores a una celda de flujo con flujo de trabajo horizontal sin inclinación (es decir, sin inclinar la celda de flujo). El recubrimiento superhidrófilo proporciona un flujo asistido por capilar para un frente de fluido uniforme del gas y el pistón de amortiguación sin el uso de flotabilidad para lograr el desplazamiento de gas por medio de un amortiguador o para lograr el desplazamiento del amortiguador por el gas. La Fig. 5A muestra una ilustración esquemática de uso de flotabilidad para flujo de pistón de amortiguación de gas. La flotabilidad puede utilizarse para lograr el flujo de pistón de amortiguación de gas y otras formas de flujo de pistón, tal como el flujo de pistón de aceite-agua, en el que la densidad de masa del pistón es diferente de la solución en masa. El desplazamiento del gas con un amortiguador requiere una inclinación ascendente de la celda de flujo. El desplazamiento del amortiguador con el gas requiere una inclinación hacia abajo de la celda de flujo. Por lo tanto, puede no ser posible un flujo de trabajo horizontal cuando se utiliza flotabilidad para el flujo de pistón de amortiguación de gas. Un requisito para lograr el flujo de pistón es que el líquido o gas no se mezcle con el amortiguador que se desplace desde la celda de flujo.

20 La Fig. 5B muestra una ilustración esquemática del uso de flujo asistido por capilar para el flujo de pistón horizontal. Una superficie hidrófila o superhidrófila puede facilitar un menisco uniforme y el movimiento del frente de fluido en la interfaz de tampón-gas, evitando de este modo la ruptura del pistón dentro de la célula de flujo sin el uso de flotabilidad. El uso de recubrimientos hidrófilos o superhidrófilos puede permitir el flujo de pistón dentro de una celda de flujo con un flujo de trabajo horizontal. Con recubrimientos hidrófilos o superhidrófilos, la velocidad del flujo en los límites entre el flujo y la parte inferior del canal fluídico puede ser distinta de cero. La velocidad de flujo relativa a través de la sección transversal del canal fluídico puede ser constante o aproximadamente constante. En algunas realizaciones, el flujo de pistón puede ser un flujo de pistón aproximadamente horizontal. El flujo de pistón horizontal puede ser un flujo de pistón horizontal asistido por capilar. En algunas realizaciones, el flujo de pistón puede no depender de la flotabilidad del gas. El flujo de pistón puede no depender de la inclinación del dispositivo. El flujo de pistón puede estar en una interfaz de amortiguador-gas u otras formas de flujo de pistón, tal como el flujo de pistón de aceite-agua.

Desplazamiento de recubrimiento

35 La Fig. 6A es una ilustración esquemática, no según la invención, que muestra direcciones de flujo capilar y flujo accionado por presión cuando todo el techo del canal fluídico está recubierto con un recubrimiento hidrófilo. Todo el techo de una celda de flujo está funcionalizado o recubierto con un recubrimiento hidrófilo. Un pistón de gas, tal como un pistón de aire, puede inyectarse en una celda de flujo llena con amortiguador acuoso. El perfil del frente de fluido amortiguador de gas es accionado por flujo capilar y flujo accionado por presión, donde el flujo capilar es opuesto en dirección al flujo accionado por presión del pistón de gas. El perfil de la interfaz gas-amortiguador puede ser circular, y la expansión del pistón de gas cerca de los límites del canal fluídico puede ser ortogonal a los límites del canal fluídico.

45 En algunas realizaciones, los recubrimientos hidrófilos e hidrófobos pueden utilizarse en un techo de canal fluídico o un techo de canal fluídico para adaptar el perfil de un frente de fluido amortiguador de gas en una celda de flujo. El recubrimiento selectivo (también denominado en la presente memoria funcionalización) de los límites del canal fluídico (también denominados en la presente memoria límites de celda de flujo) influye en la dirección del flujo capilar dentro de partes específicas de la celda de flujo para controlar el perfil del perfil frontal de fluido amortiguador de gas. La Fig. 6B es una ilustración esquemática que muestra las direcciones del flujo capilar y el flujo accionado por presión cuando el techo del canal fluídico, excepto el borde del techo del canal fluídico, está recubierto con un recubrimiento hidrófilo. En algunas realizaciones, el recubrimiento hidrófilo está desplazado de los límites del canal fluídico (uno o más bordes formados por el techo del canal fluídico y las paredes laterales). El desplazamiento da como resultado que el techo del canal fluídico en los límites del canal fluídico no esté recubierto con un recubrimiento hidrófilo (también denominado funcionalizado con un material hidrófobo). El resto del techo del canal fluídico puede funcionalizarse con un material hidrófilo o superhidrófilo. Como resultado de la propiedad hidrófoba del techo del canal fluídico en el borde del techo del canal fluídico, el flujo capilar puede reducirse o invertirse en esta región. Como resultado, el perfil de la interfaz de gas-amortiguador se modifica, y la expansión del pistón de gas cerca de los límites del canal fluídico puede ya no ser ortogonal al borde.

60 Los amortiguadores utilizados pueden ser diferentes en diferentes implementaciones. En algunas realizaciones, el amortiguador puede ser hidrófilo. Para el flujo de pistón de amortiguación de gas, el borde del techo puede funcionalizarse con un recubrimiento hidrófobo y el resto puede funcionalizarse con un recubrimiento hidrófilo. En algunas realizaciones, el amortiguador puede ser hidrófobo en lugar de hidrófilo. Para el flujo de pistón de amortiguación de gas, el borde del techo puede funcionalizarse con un recubrimiento hidrófilo y el resto puede funcionalizarse con un recubrimiento hidrófobo. Otros límites de celda de flujo, por ejemplo, las paredes laterales o la parte inferior, pueden funcionalizarse de un modo similar.

Carga de partículas en micropocillos

65

En algunas realizaciones, un canal fluídico comprende un sustrato en su parte inferior. El sustrato puede comprender una matriz de micropocillos con una pluralidad de micropocillos. En algunas realizaciones, un micropocillo puede contener una partícula (p. ej., una célula o una perla). El porcentaje de micropocillos de una matriz de micropocillos con una única partícula puede variar, por ejemplo, en el intervalo de 25 % a 90 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la matriz de micropocillos con una única partícula (p. ej., una única célula o una única perla) puede ser, o ser aproximadamente, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 99 % o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos que pueden comprender una única célula y una partícula sintética. En algunas realizaciones, el porcentaje de micropocillos de la matriz de micropocillos con una única partícula (p. ej., una única célula o una única perla) puede ser al menos, o como máximo, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 99 %.

Un micropocillo puede contener dos tipos diferentes de partículas (p. ej., una célula y una perla). El porcentaje de micropocillos de una matriz de micropocillos con una partícula de cada uno de dos tipos diferentes de partículas puede variar, por ejemplo, en el intervalo de 25 % a 90 %. En algunas realizaciones, el porcentaje de los micropocillos de la matriz de micropocillos con una partícula de cada uno de dos tipos diferentes de partículas (p. ej., una única célula y una única perla) puede ser, o ser aproximadamente, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 99 % o más de los micropocillos de la matriz de micropocillos que pueden comprender una única célula y una partícula sintética. En algunas realizaciones, el porcentaje de los micropocillos de la matriz de micropocillos con una partícula de cada uno de dos tipos diferentes de partículas (p. ej., una única célula o una única perla) puede ser al menos, o como máximo, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 99 %.

En algunas realizaciones, un micropocillo de la pluralidad de micropocillos comprende un recubrimiento. El recubrimiento puede comprender, o ser, polietilenglicol (PEG), poli-Hema, ácido plurónico F68, ácido plurónico F108, ácido plurónico F127, polisorbato 20, dióxido de silicio (SiO₂), nitruro de silicio, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un micropocillo de la pluralidad de micropocillos puede comprender una superficie tratada con plasma.

Cartuchos

En algunas realizaciones, la matriz de micropocillos y la celda de flujo, pueden empaquetarse dentro de un cartucho consumible que proporciona una interconexión conveniente con el resto del sistema de manipulación de fluidos. La celda de flujo puede facilitar el intercambio de fluidos, por ejemplo, suspensiones de células y perlas, amortiguadores de lisis, amortiguadores de enjuague, etc., que se administran a los micropocillos. En algunas realizaciones, la celda de flujo puede diseñarse para facilitar la distribución eficiente (p. ej., uniforme) de las células y las perlas a través de la pluralidad de micropocillos. Las características de diseño pueden incluir: (i) una o más vías de entrada para introducir muestras celulares, suspensiones de perlas u otros reactivos de ensayo, (ii) una o más cámaras de micropocillos diseñadas para proporcionar un llenado eficiente (p. ej., uniforme) y un intercambio eficiente de fluidos mientras se minimizan los remolinos o zonas muertas, y (iii) una o más vías de salida para el suministro de fluidos a un punto de recolección de muestras o un depósito de desechos. En algunas realizaciones, el diseño de la celda de flujo puede incluir una pluralidad de cámaras de micropocillos que interactúan con una pluralidad de matrices de micropocillos en un único sustrato, o con una pluralidad de sustratos de matriz de micropocillos, de modo que una o más muestras de células diferentes pueden procesarse en paralelo. En algunas realizaciones, el diseño de la celda de flujo, por ejemplo, el diseño de los canales y cámaras de fluido, puede ajustarse de modo que los fluidos puedan acceder a diferentes patrones de micropocillos (es decir, patrones de micromatriz configurables) en un diseño determinado.

En algunas realizaciones, la celda de flujo puede ser parte del cartucho. La Fig. 7A muestra una vista despiezada de un cartucho 700 ilustrativo para la codificación de barras estocástica. El cartucho 700 puede incluir una celda 702 de flujo con un canal fluídico 704 formado por un sustrato 708 de matriz de micropocillos, una capa 712 de canal fluídico y una placa 716 de cubierta. El número de capas que forman la celda 700 de flujo puede ser diferente en diferentes implementaciones, en el intervalo de 1 a 20. En algunas realizaciones, el número de capas que forman la celda 700 de flujo puede ser, o ser aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el número de capas que forman la celda 700 de flujo puede ser al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20. La Fig. 7A muestra que el cartucho 700 incluye una vía de entrada, formada por los componentes 720a y 720b de vía de entrada en la placa 716 de cubierta y la capa 712 de canal fluídico respectivamente. Los componentes 720a y 720b de la vía de entrada pueden ser coaxiales a lo largo del eje 722. El cartucho 700 incluye una vía 724 de salida en la capa 712 de canal fluídico. Las ubicaciones de la vía de salida pueden ser diferentes en diferentes implementaciones. En algunas realizaciones, la vía de salida puede estar en la placa 716 de cubierta. En algunas realizaciones, la vía de salida puede estar formada por componentes de la vía de salida en la placa 716 de cubierta y la capa 712 de canal fluídico.

El cartucho 700 o la celda 702 de flujo pueden incluir (i) una o más vías de entrada para crear conexiones de fluido con el instrumento o introducir manualmente muestras de células, suspensiones de perlas u otros reactivos de ensayo en el cartucho. La celda de flujo puede incluir uno o más de (ii) uno o más canales de derivación, es decir, para la autodosificación de muestras de células y suspensiones de perlas, para evitar el llenado excesivo o el flujo posterior, (iii) uno o más conjuntos de celdas de flujo/matriz de micropocillos integrados, o una o más cámaras dentro de las cuales se colocan los sustratos de micromatriz, (iv) bombas en miniatura integradas u otros mecanismos de accionamiento de fluido para controlar el flujo de fluido a través del dispositivo, (v) válvulas en miniatura integradas (u otros mecanismos de contención) para compartimentar

reactivos precargados (p. ej., suspensiones de perlas) o controlar el flujo de fluido a través del dispositivo, (vi) uno o más respiraderos para proporcionar una ruta de escape para el gas atrapado, (vii) uno o más depósitos de residuos de muestras y reactivos, (viii) una o más vías de salida para crear conexiones de fluido con el instrumento o proporcionar un punto de recolección de muestras procesadas. (ix) características de la interfaz mecánica para posicionar de forma reproducible el cartucho consumible y extraíble con respecto al sistema de instrumentos, y para proporcionar acceso de modo que los imanes externos puedan ponerse cerca de la matriz de micropocillos, (x) componentes de control de temperatura integrados o una interfaz térmica para proporcionar un buen contacto térmico con el sistema de instrumentos, (xi) características de interfaz óptica, por ejemplo, una ventana transparente, para su uso en la interrogación óptica de la matriz de micropocillos, o cualquier combinación de los mismos.

La Fig. 7B muestra una vista en sección transversal del cartucho 700 ilustrativo tomada a lo largo del plano 728 en la Fig. 7A. La Fig. 7B muestra dos secciones 704a y 704b de canal fluido del canal fluido 704. La sección 704a del canal fluido comprende un techo 732 de canal fluido, dos paredes laterales 736a y 736b de canal fluido (también denominadas primera pared 736a lateral y una segunda pared 736b lateral), y una parte inferior 740 de canal fluido. El techo 732 del canal fluido y la pared lateral 736a del canal fluido forman un borde 744a (también denominado borde de primera pared lateral de techo). El techo 732 del canal fluido y la pared lateral 736b del canal fluido forman otro borde 744b (también denominado borde de segunda pared lateral de techo). Las paredes laterales 736a y 736b del canal fluido pueden tener ángulos de incidencia positivos con respecto al techo 732 del canal fluido, por ejemplo, en el intervalo de 1-15 grados. En algunas realizaciones, el ángulo de incidencia de la pared lateral 736a o 736b del canal fluido con respecto al techo 732 del canal fluido puede ser, o ser aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 grados, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el ángulo de incidencia de la pared lateral 736a o 736b del canal fluido con respecto al techo 732 del canal fluido puede ser al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 grados.

La parte inferior 740 del canal fluido y la pared lateral 736a del canal fluido forman un borde 748a (también denominado borde de primera pared lateral de parte inferior). La parte inferior 740 del canal fluido y la pared lateral 736b del canal fluido forman otro borde 748b (también denominado borde de segunda pared lateral de parte inferior). Las paredes laterales 736a y 736b del canal fluido pueden tener ángulos de incidencia negativos con respecto a la parte inferior 740 del canal fluido, por ejemplo, en el intervalo de -1 a -15 grados. En algunas realizaciones, el ángulo de incidencia de la pared lateral 736a o 736b del canal fluido con respecto a la parte inferior 740 del canal fluido puede ser, o ser aproximadamente, -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15 grados, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el ángulo de incidencia de la pared lateral 736a o 736b del canal fluido con respecto a la parte inferior 740 del canal fluido puede ser al menos, o como máximo, -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, o -15 grados.

El cartucho puede diseñarse para procesar más de una muestra en paralelo. El cartucho puede comprender además una o más cámaras de recolección de muestras extraíbles que son adecuadas para interactuar con cicladores térmicos de PCR independientes o instrumentos de secuenciación. El propio cartucho puede ser adecuado para interactuar con cicladores térmicos independientes o instrumentos de secuenciación. El término "cartucho" como se utiliza en esta descripción puede entenderse que incluye cualquier ensamblaje de piezas que contiene la muestra y perlas durante la realización del ensayo.

El cartucho puede comprender además componentes que están diseñados para crear barreras físicas o químicas que evitan la difusión de (o aumentan las longitudes de la ruta y los tiempos de difusión para) moléculas grandes para minimizar la contaminación cruzada entre micropocillos. Ejemplos de tales barreras pueden incluir, aunque no de forma limitativa, un patrón de canales de serpentina utilizados para el suministro de células y soportes sólidos (p. ej., perlas) a la matriz de micropocillos, una placa retráctil o membrana deformable que se presiona para el contacto con la superficie del sustrato de matriz de micropocillos durante las etapas de lisis o incubación, el uso de perlas más grandes, por ejemplo, perlas de Sephadex como se ha descrito anteriormente, para bloquear las aberturas de los micropocillos, o la liberación de un fluido hidrófobo inmiscible desde un depósito dentro del cartucho durante las etapas de lisis o incubación, para separar y compartimentar de forma efectiva cada micropocillo en la matriz.

Los cartuchos pueden fabricarse utilizando una variedad de técnicas y materiales conocidos por los expertos en la técnica. En general, los cartuchos se fabricarán como una serie de partes componentes separadas y posteriormente se ensamblan utilizando cualquiera de varias unidades mecánicas o técnicas de unión. Ejemplos de técnicas de fabricación adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, mecanizado convencional, mecanizado CNC, moldeo por inyección, termoformado e impresión 3D. Una vez que se han fabricado los componentes del cartucho, pueden ensamblarse mecánicamente utilizando tornillos, clips y similares, o unirse permanentemente utilizando cualquiera de una variedad de técnicas (dependiendo de la elección de materiales utilizados), por ejemplo, mediante el uso de unión/soldadura térmica o cualquiera de una variedad de adhesivos o películas adhesivas, que incluyen adhesivos basados en epoxi, basados en acrílico, basados en silicona, curables por UV, basados en poliuretano o basados en cianoacrilato.

Los componentes del cartucho pueden fabricarse utilizando cualquiera de varios materiales adecuados, que incluyen, aunque no de forma limitativa, silicio, sílice fundida, vidrio, cualquiera de una variedad de polímeros, por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS; elastómero), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), poliimida, polímeros de olefina cíclica (COP), copolímeros de olefina cíclica (COC),

tereftalato de polietileno (PET), resinas epoxi, materiales antiadherente tales como teflon (PTFE), metales (p. ej. aluminio, acero inoxidable, cobre, níquel, cromo y titanio), o cualquier combinación de los mismos.

Las características de entrada y salida del cartucho pueden diseñarse para proporcionar conexiones de fluido convenientes y a prueba de fugas con el instrumento, o pueden servir como depósitos abiertos para pipeteo manual de muestras y reactivos dentro o fuera del cartucho. Ejemplos de diseños mecánicos convenientes para los conectores de vía de entrada y salida pueden incluir, aunque no de forma limitativa, conectores roscados, conectores de bloqueo Luer, deslizamiento Luer o conectores de "punta deslizante", conectores de ajuste a presión y similares. Las vías de entrada y salida del cartucho pueden comprender además tapas, cubiertas o cierres cargados por resorte, o membranas de polímero que pueden abrirse o perforarse cuando el cartucho se coloca en el instrumento, y que sirven para evitar la contaminación de las superficies internas del cartucho durante el almacenamiento o que evitan que los fluidos se derramen cuando el cartucho se retira del instrumento. Las una o más vías de salida del cartucho pueden comprender además una cámara de recolección de muestras extraíble que es adecuada para interactuar con cicladores térmicos de PCR o instrumentos de secuenciación independientes.

En algunas realizaciones, la vía de entrada y la vía de salida pueden ser capaces de dirigir un flujo de un fluido a través del canal fluido, poniendo en contacto de este modo los micropocillos con el fluido. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una interfaz de punta de pipeta para cargar o eliminar una muestra celular, un reactivo de ensayo, una suspensión de perlas, desechos del dispositivo o una combinación de los mismos. El dispositivo puede comprender la muestra celular, el reactivo de ensayo, la suspensión de perlas o una combinación de los mismos.

El cartucho puede incluir bombas en miniatura integradas u otros mecanismos de accionamiento de fluido para controlar el flujo de fluido a través del dispositivo. Ejemplos de bombas en miniatura o mecanismos de accionamiento de fluido adecuados pueden incluir, aunque no de forma limitativa, una jeringa en miniatura o mecanismos de émbolo accionados electromecánicamente o neumáticamente, bombas de diafragma de membrana accionadas neumáticamente o por un pistón externo, bolsas de reactivo accionadas neumáticamente o cámaras de aire, o bombas electroosmóticas.

El cartucho puede incluir válvulas en miniatura para compartimentar reactivos precargados o controlar el flujo de fluido a través del dispositivo. Ejemplos de válvulas en miniatura adecuadas pueden incluir, aunque no de forma limitativa, válvulas de una sola inyección que se fabrican utilizando tapones de cera o polímero que pueden fundirse o disolverse, o membranas de polímero que pueden ser perforadas; válvulas de pinza construidas utilizando una membrana deformable y accionamiento neumático, magnético, electromagnético o electromecánico (solenoides), válvulas unidireccionales construidas con aletas deformables de membrana, y válvulas de compuerta en miniatura.

El cartucho puede incluir respiraderos para proporcionar una vía de escape para aire o gas atrapado, tal como CO₂ o N₂. Los respiraderos pueden construirse según una variedad de técnicas, por ejemplo, mediante el uso de un tapón poroso de polidimetilsiloxano (PDMS) u otro material hidrófobo que permita la absorción capilar de aire o gas, pero bloquee la penetración por agua.

Las características de la interfaz mecánica del cartucho pueden proporcionar un posicionamiento fácilmente extraíble pero altamente preciso y repetible del cartucho con respecto al sistema de instrumentos. Las características de interfaz mecánica adecuadas pueden incluir, aunque no de forma limitativa, pasadores de alineación, guías de alineación, topes mecánicos y similares. Las características de diseño mecánico pueden incluir características de relieve para poner el aparato externo, por ejemplo, imanes o componentes ópticos, en estrecha proximidad con la cámara de matriz de micropocillos.

El cartucho puede incluir componentes de control de temperatura o características de interfaz térmica para el acoplamiento a módulos de control de temperatura externos. Ejemplos de elementos de control de temperatura adecuados pueden incluir, aunque no de forma limitativa, elementos de calentamiento resistivos, fuentes de luz de emisión de infrarrojo en miniatura, dispositivos de calentamiento o enfriamiento Peltier, disipadores de calor, termistores, termopares y similares. Las características de la interfaz térmica pueden fabricarse a partir de materiales que son buenos conductores térmicos (p. ej., cobre, oro, plata, etc.) y pueden comprender una o más superficies planas capaces de establecer un buen contacto térmico con bloques de calentamiento externos o bloques de enfriamiento.

El cartucho puede incluir características de la interfaz óptica para su uso en imágenes ópticas o interrogación espectroscópica de la matriz de micropocillos. El cartucho puede incluir una ventana ópticamente transparente, por ejemplo, el propio sustrato de micropocillos o el lado de la celda de flujo o cámara de micromatriz que está opuesta a la matriz de micropocillos, fabricada a partir de un material que cumple con los requisitos espectrales para la técnica espectroscópica o de formación de imágenes utilizada para probar la matriz de micropocillos. Ejemplos de materiales de ventana óptica adecuados pueden incluir, aunque no de forma limitativa, vidrio, sílice fundida, polimetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polímeros de olefina cíclica (COP) o copolímeros de olefina cíclica (COC).

Canal fluido

La Fig. 8 muestra una vista en sección transversal de un canal fluido 704 ilustrativo de un cartucho 700 para la codificación de barras estocástica. El canal fluido 704 comprende un techo 732 de canal fluido, dos paredes laterales 736a y 736b de canal fluido, y una parte inferior 740 de canal fluido. El techo 732 del canal fluido y la pared lateral 736a del canal fluido

forman un borde. El techo 732 del canal fluidoico y la pared lateral 736b del canal fluidoico forman otro borde. Las paredes laterales 736a y 736b del canal fluidoico tienen ángulos de incidencia positivos, por ejemplo, en el intervalo de 1-15 grados. El ancho y la altura del canal fluidoico 704 que se muestra en la Fig. 8 pueden ser de 7 mm y 1,2 mm respectivamente.

5 El ancho del canal fluidoico 704 puede ser diferente en diferentes implementaciones, por ejemplo, en el intervalo de 1 mm a 20 mm. En algunas realizaciones, el ancho del canal fluidoico 704 puede ser, o ser aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 mm, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el ancho del canal fluidoico 704 puede ser al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mm. Una anchura más grande, por ejemplo, 7 mm, puede aumentar el área de celda de flujo de una longitud de celda de flujo determinada.

10 La altura del canal fluidoico 704 puede ser diferente en diferentes implementaciones, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 mm a 2 mm. En algunas realizaciones, la altura del canal fluidoico 704 puede ser, o ser aproximadamente, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20 mm, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, la altura del canal fluidoico 704 puede ser al menos, o como máximo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19 o 0,20 mm.

Propiedades del techo y las paredes laterales del canal fluidoico

20 Como se describe en la presente memoria, en algunas realizaciones, el ángulo de contacto del techo del canal fluidoico puede ser más pequeño que el ángulo de contacto de una pared lateral del canal fluidoico en, por ejemplo, 10 grados. En algunas realizaciones, el techo del canal fluidoico es hidrófilo. El grado de hidrofiliidad del techo del canal fluidoico puede representarse mediante el ángulo de contacto del techo del canal fluidoico. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto del techo del canal fluidoico corresponde a un promedio de ángulos de contacto de una pluralidad de ubicaciones en el techo del canal fluidoico. El ángulo de contacto del techo del canal fluidoico puede ser diferente en diferentes implementaciones, por ejemplo, en el intervalo de 0 a 90 grados. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto del techo del canal fluidoico puede ser, o ser aproximadamente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 grados, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto del techo del canal fluidoico puede ser al menos, o como máximo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 grados.

30 El ángulo de contacto del techo del canal fluidoico puede ser más pequeño que el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico. La diferencia entre el ángulo de contacto del techo del canal fluidoico y el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico puede ser diferente en diferentes implementaciones. En algunas realizaciones, la diferencia puede ser, o ser aproximadamente, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 grados, o un número o un intervalo entre cualesquiera dos de estos valores. En algunas realizaciones, la diferencia puede ser al menos, o como máximo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 grados.

40 El grado de hidrofiliidad de la pared lateral del canal fluidoico puede representarse por el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico corresponde a un promedio de ángulos de contacto de una pluralidad de ubicaciones en la pared lateral del canal fluidoico. El ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico puede ser diferente en diferentes implementaciones. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico puede ser, o ser aproximadamente, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 88, 90 grados, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico puede ser al menos, o como máximo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 88 o 90 grados. En algunas realizaciones, la pared lateral del canal fluidoico tiene un ángulo de incidencia positivo de 1-15 grados.

50 En algunas realizaciones, el ángulo de contacto del techo del canal fluidoico es suficientemente más pequeño (p. ej., 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o más grados) que el ángulo de contacto de la pared lateral del canal fluidoico para permitir el flujo no laminar dentro del canal fluidoico. En algunas realizaciones, el flujo no laminar dentro del canal fluidoico permite la agitación de una partícula en la superficie del sustrato por un flujo dentro del canal fluidoico. Una velocidad del flujo en un límite entre el flujo y la parte inferior del canal fluidoico puede ser distinta de cero. La velocidad de flujo relativa de un flujo a través de una sección transversal del canal fluidoico puede ser constante o aproximadamente constante. El flujo no laminar puede ser un flujo de tipo pistón.

55 En algunas realizaciones, el flujo no laminar puede ser aproximadamente un flujo de pistón. El flujo de pistón puede ser un flujo de pistón aproximadamente horizontal. El flujo de pistón horizontal puede ser un flujo de pistón horizontal asistido por capilar. En algunas realizaciones, el flujo de pistón puede no depender de la flotabilidad del gas. El flujo de pistón puede no depender de la inclinación del dispositivo. El flujo de pistón puede estar en una interfaz de amortiguador-gas.

60 Cada una de las Figs. 9A-9H es una ilustración esquemática de una vista en sección transversal de un canal fluidoico 704 ilustrativo no limitativo con el techo 732 del canal fluidoico, paredes laterales 736a, 736b y/o parte inferior 740 que comprende un recubrimiento. El canal fluidoico 704 comprende un techo 732 de canal fluidoico, dos paredes laterales 736a y 736b de canal fluidoico, y una parte inferior 740 de canal fluidoico. El techo 732 del canal fluidoico y la pared lateral 736a del canal fluidoico forman un borde 744a. La parte inferior 740 del canal fluidoico y la pared lateral 736a del canal fluidoico forman un borde 748a. La parte inferior 740 del canal fluidoico y la pared lateral 736b del canal fluidoico forman otro borde 748b. El techo 732 del canal

fluido y la pared lateral 736b del canal fluido forman otro borde 744b. Las paredes laterales 736a y 736b del canal fluido pueden tener ángulos de incidencia cero o positivos, por ejemplo, en el intervalo de 1-15 grados.

En algunas realizaciones, el techo 732 del canal fluido comprende un recubrimiento 752 hidrófilo. Por ejemplo, el recubrimiento 752 hidrófilo puede ser un recubrimiento superhidrófilo. El recubrimiento 752 hidrófilo puede comprender polietilenglicol (PEG), poli-Hema, ácido plurónico F68, ácido plurónico F108, ácido plurónico F127, polisorbato 20, dióxido de silicio (SiO₂), nitrato de silicio, o cualquier combinación de los mismos. El ángulo de contacto del recubrimiento 752 hidrófilo puede ser diferente en diferentes implementaciones. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto del recubrimiento 752 hidrófilo puede ser, o ser aproximadamente, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 grados, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el ángulo de contacto del recubrimiento 752 hidrófilo puede ser al menos, o como máximo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 grados. El techo 732 puede recubrirse con el recubrimiento hidrófilo mediante pulverización catódica, crecimiento térmico, adsorción, unión covalente (p. ej., incubando el techo 732 del canal fluido o la superficie del techo 732 del canal fluido en un líquido con el material de recubrimiento disuelto en el mismo), o cualquier combinación de los mismos.

El recubrimiento 752 hidrófilo tiene un desplazamiento 754a, 754b desde el borde 744a, 744b formado por el techo 732 del canal fluido y la pared lateral 744a, 744b del canal fluido. Por ejemplo, el recubrimiento 753 hidrófilo puede desplazarse desde uno de los bordes 744a, 744b de modo que la parte central del techo 732 del canal fluido comprenda el recubrimiento 753 hidrófilo mientras que las partes no centrales del techo 732 del canal fluido no comprendan el recubrimiento hidrófilo. Como otro ejemplo, el recubrimiento 753 hidrófilo puede desplazarse desde ambos bordes 744a, 744b. El desplazamiento 754a, 754b puede ser diferente en diferentes implementaciones, por ejemplo, en el intervalo de 1 micrómetro a 4000 micrómetros. En algunas realizaciones, el desplazamiento 744a, 744b puede ser, o ser aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000 micrómetros, o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores. En algunas realizaciones, el desplazamiento 744a, 744b puede ser al menos, o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000 o 4000 micrómetros. El desplazamiento 744a, 744b puede ser diferente en diferentes implementaciones, por ejemplo, en el intervalo de 1 % a 25 % del ancho del techo 732 del canal fluido. En algunas realizaciones, el desplazamiento 744a, 744b puede ser, o ser aproximadamente, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 % o un número o un intervalo entre dos cualesquiera de estos valores, del ancho del techo 732 del canal fluido. En algunas realizaciones, el desplazamiento 744a, 744b puede ser al menos, o como máximo, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % o 25 % del techo 732 del canal fluido.

En algunas realizaciones, el techo 732 del canal fluido y una superficie más del canal fluido 704 comprenden un recubrimiento, tal como un recubrimiento hidrófilo. Las Fig. 9B-9D ilustran que la pared lateral 756a (Fig. 9B), 756b (Fig. 9C), o la parte inferior 760 (Fig. 9D) que comprende un recubrimiento 756a, 756b, 760. En algunas realizaciones, el techo 732 del canal fluido y dos superficies más del canal fluido 704 comprenden un recubrimiento, tal como un recubrimiento hidrófilo (Fig. 9E-9G). En algunas realizaciones, el techo 732 del canal fluido y tres superficies más del canal fluido comprenden un recubrimiento, tal como un recubrimiento hidrófilo (Fig. 9H). Los recubrimientos 752, 756a, 756b, 760 pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, los recubrimientos 752, 756a, 756b, 760 pueden ser recubrimientos hidrófilos diferentes. Como otro ejemplo, el recubrimiento 752 en el techo 732 del canal fluido puede ser un recubrimiento hidrófilo, y los recubrimientos 756a, 756b, 760 en las paredes laterales 736a, 736b del canal fluido y la parte inferior 740 pueden ser un recubrimiento hidrófilo o un recubrimiento hidrófobo. Aunque las Fig. 9A-9H muestran que todos los recubrimientos 756a, 756b, 760 están desplazados de los bordes 744a, 744b, 748a, 748b, tales desplazamientos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos. El número de los recubrimientos 756a, 756b, 760 que están desplazados de los bordes 744a, 744b, 748a, 748b pueden ser diferentes en diferentes implementaciones, tales como 0, 1, 2, 3 o 4. Cada recubrimiento 752, 756a, 756b, 760 puede estar desplazado de uno o más bordes 744a, 744b, 748a, 748b.

Ejemplos

Algunos aspectos de las realizaciones descritas anteriormente se describen con más detalle en los siguientes ejemplos, que no están destinados a limitar el alcance de la presente descripción que está limitado por las reivindicaciones.

Ejemplo 1 (comparativo)

Agregaciones de perlas en los límites del canal fluido cuando el techo y las paredes laterales del canal fluido no tenían revestimiento hidrófilo

Este ejemplo demuestra que tener una pequeña diferencia en los ángulos de contacto entre el techo y las paredes laterales de un canal fluido puede dar como resultado agregaciones de perlas en los límites del canal fluido.

Las Figs. 10A-10B son imágenes de una matriz de micropocillos que muestran agregaciones de perlas sustanciales en los límites del canal fluido. La matriz de micropocillos estaba en la parte inferior de una celda de flujo. El canal fluido de la celda de flujo tenía 7 mm de ancho. El techo y las paredes laterales del canal fluido de la celda de flujo no tenían recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio. Las agregaciones de perlas fueron sustanciales en los límites del canal fluido debido al desplazamiento incompleto del gas. El frente de fluido no uniforme también dio como resultado grandes pérdidas

de perlas en el centro de la celda de flujo, y dio como resultado una cobertura irregular de las perlas a lo largo de la matriz de micropocillos.

5 En conjunto, estos datos demuestran que tener una pequeña diferencia en los ángulos de contacto entre el techo y las paredes laterales de un canal fluídico puede dar como resultado un desplazamiento de gas incompleto, lo que a su vez puede dar como resultado agregaciones sustanciales de perlas en los límites del canal fluídico.

Ejemplo 2 (comparativo)

10 Recubrimientos hidrófilos en el techo y las paredes laterales del canal de celda de flujo

15 Este ejemplo demuestra que tener recubrimientos hidrófilos en el techo y las paredes laterales de un canal de celda de flujo puede dar como resultado algunas reducciones de agregaciones de perlas en los límites de canal fluídico con un flujo de trabajo de no inclinación horizontal, aunque las diferencias en los ángulos de contacto entre el techo y las paredes laterales del canal de celda de flujo son más pequeñas.

20 La Fig. 11A muestra una imagen de una matriz de micropocillos. La matriz de micropocillos se encuentra en la parte inferior de una celda de flujo. El canal fluídico de la celda de flujo tiene 4 mm de ancho. El techo y las paredes laterales del canal fluídico de la celda de flujo tienen recubrimientos hidrófilos sobre sus superficies. Las regiones de la matriz de micropocillos etiquetadas 1 y 9 corresponden a las regiones más cercanas a la entrada y a la salida de la celda de flujo respectivamente. Tener recubrimientos hidrófilos sobre el techo y la pared lateral dio como resultado cierto desplazamiento de gas incompleto cerca de los límites del canal fluídico con un flujo de trabajo horizontal no inclinado.

25 Las Figs. 11B-11C son imágenes que muestran que los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos con dobletes de perlas fueron similares en el centro y el límite del canal fluídico para la región 1 de la matriz de micropocillos (que estaba más cerca de la entrada de la celda de flujo). Las Figs. 11D-11E son imágenes que muestran que el porcentaje de micropocillos de la matriz de micropocillos con dobletes de perlas fue menor en el centro en comparación con el límite del canal fluídico para la región 9 de la matriz de micropocillos (que estaba más cerca de la salida de la celda de flujo).

30 Las Figs. 11F-11I son gráficos que muestran los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos sin perla, perlas individuales o dobletes de perlas a lo largo de la dirección del flujo. Tener recubrimientos hidrófilos en el techo y paredes laterales del canal fluídico dio como resultado cierto desplazamiento de gas incompleto cerca de los límites del canal fluídico con un flujo de trabajo horizontal no inclinado. El efecto del desplazamiento de gas incompleto fue más evidente en los límites del canal fluídico hacia el extremo del canal fluídico, más cerca de la región 9.

35 En conjunto, estos datos demuestran que pueden lograrse algunas reducciones en las agregaciones de perlas en los límites de las celdas de flujo sin inclinar la celda de flujo si el techo y las paredes laterales del canal de celda de flujo tienen pequeños ángulos de contacto (p. ej., si el techo y las paredes laterales del canal de celda de flujo comprenden un recubrimiento hidrófilo), aunque las diferencias en los ángulos de contacto entre el techo y las paredes laterales del canal de celda de flujo son pequeñas. Por lo tanto, la celda de flujo puede utilizarse con un flujo de trabajo horizontal no inclinado. Sin embargo, el efecto del desplazamiento de gas incompleto cerca de los límites del canal fluídico fue más evidente en los límites del canal fluídico hacia el extremo del canal fluídico.

45 Ejemplo 3 (comparativo)

Reducciones adicionales de agregaciones de perlas en los límites de las celdas de flujo

50 Este ejemplo demuestra que pueden lograrse reducciones adicionales de agregaciones de perlas en los límites de las celdas de flujo si el ángulo de contacto del techo del canal fluídico es más pequeño que los ángulos de contacto de las paredes laterales de las celdas de flujo.

55 Las Figs. 12A-12C son imágenes de una matriz de micropocillos que muestra que las agregaciones de perlas se redujeron significativamente en los límites de las celdas de flujo. La matriz de micropocillos estaba en la parte inferior de una celda de flujo. El canal fluídico de la celda de flujo tenía 7 mm de ancho. El ancho de 7 mm (en comparación con un ancho de 4 mm) puede aumentar el área de la celda de flujo de una longitud de celda de flujo dada. El techo, y no las paredes laterales, del canal fluídico de la celda de flujo tenía un recubrimiento hidrófilo. Las agregaciones de perlas se redujeron aún más en los límites de las celdas de flujo. Se observó poca variación espacial de la uniformidad o consistencia de la carga de las perlas. Por lo tanto, puede eliminarse el requisito de utilizar flotabilidad para desplazar gas con amortiguador o para desplazar el amortiguador con gas. A su vez, puede eliminarse el requisito de flujo de trabajo de inclinación no horizontal de la celda de flujo.

60 En conjunto, estos datos demuestran que pueden lograrse reducciones adicionales de agregaciones de perlas en los límites de las celdas de flujo sin inclinar la celda de flujo si el ángulo de contacto del techo del canal fluídico es más pequeño que los ángulos de contacto de las paredes laterales de las celdas de flujo (p. ej., si hay un recubrimiento hidrófilo en el techo, y no en las paredes laterales, del canal de celda de flujo). Por lo tanto, la celda de flujo puede utilizarse con un flujo de trabajo horizontal no inclinado.

65

Ejemplo 4

Otros tratamientos de superficies del canal fluídico

5

Este ejemplo demuestra las propiedades de otros tratamientos de las superficies del canal fluídico.

10

Los copolímeros de olefina cíclica tratados con plasma (COC) tenían buenas características de humectación, similares a los del recubrimiento de SiO₂. Sin embargo, el tratamiento con plasma dio como resultado la adhesión de perlas a la superficie, afectando la capacidad de recuperar perlas de la celda de flujo. La vida útil para el tratamiento con plasma puede variar y puede requerir almacenamiento de celdas de flujo en condiciones secas. El tratamiento selectivo con plasma a través del enmascaramiento no fue trivial.

15

En comparación, el injerto de PEG en COC puede proporcionar una superficie altamente inerte para una adsorción reducida no específica de oligonucleótidos, células o perlas. Sin embargo, el injerto de PEG en COC no fue trivial.

20

Otro tratamiento de superficie probado para recubrir el sustrato de micropocillos con SiO₂. Dicho recubrimiento dio como resultado buenas características de humectación y proporcionó autohumectación de los micropocillos. Sin embargo, el comportamiento del flujo de pistón cambió. Y se redujo la agitación en la superficie de micropocillos, lo que dio como resultado una mayor densidad de doblete de la perla. La recuperación de perlas del sustrato también se vio afectada negativamente.

25

En conjunto, estos datos demuestran que el recubrimiento de SiO₂ en el techo del canal fluídico fue ventajoso para mejorar la carga celular, la carga de las perlas y la recuperación de las perlas en comparación con el tratamiento con plasmas, el injerto de PEG y el recubrimiento de SiO₂ en la superficie de los micropocillos.

Ejemplo 5

30

Reducciones adicionales de agregaciones de perlas en los límites del canal fluídico

Este ejemplo demuestra que el ángulo de contacto de las partes centrales del techo del canal fluídico es más pequeño que los ángulos de contacto de las partes no centrales del techo del canal fluídico y las paredes laterales de las celdas de flujo pueden resultar en reducciones adicionales de las agregaciones de las perlas en los límites de las celdas de flujo.

35

Las Fig. 13A1-13C2 son imágenes de matrices de micropocillos con un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio en el techo del canal fluídico (Fig. 13A1-13A2) no según la invención, o en las partes centrales del techo del canal fluídico (Fig. 13B1-13C2), que muestran reducciones adicionales en las agregaciones de las perlas en los límites de las celdas de flujo. Los canales de fluidos en las Fig. 13A1-13C2 tenían 7 mm de ancho. Las Fig. 13A1-13A2 son imágenes de una matriz de micropocillos en una celda de flujo con un recubrimiento hidrófilo en el techo del canal fluídico. Se observaron algunas agregaciones de perlas en el límite del canal fluídico. La Fig. 13A1 muestra que la expansión ortogonal del frente de fluido, en los bordes de la celda de flujo, dio como resultado un lavado ineficaz de las perlas cerca del borde de la celda de flujo.

40

45

Para eliminar eficazmente el exceso de perlas, el perfil del frente de fluido amortiguador/gas debe tener un componente que sea paralelo en lugar de ortogonal a los bordes de celda de flujo. Las Fig. 13B1-13C2 son imágenes de matrices de micropocillos en celdas de flujo con recubrimientos hidrófilos en las partes centrales de los techos del canal fluídico que están desplazadas de los límites del canal fluídico por 500 micrómetros y 1000 micrómetros respectivamente. Las Fig. 13B1-13C2 muestran que los desplazamientos en el techo del canal fluídico mejoraron la capacidad de eliminar el exceso de perlas.

50

En conjunto, estos datos demuestran que más reducciones de agregaciones de perlas en los límites de las celdas de flujo pueden lograrse si el ángulo de contacto de las partes centrales del techo del canal fluídico es más pequeño que los ángulos de contacto de las partes no centrales del techo del canal fluídico y las paredes laterales de las celdas de flujo (p. ej., recubriendo las partes centrales del techo del canal fluídico). Por lo tanto, la celda de flujo puede utilizarse con un flujo de trabajo horizontal no inclinado.

55

Ejemplo 6

Alta eficiencia de carga constante

60

Este ejemplo demuestra una alta eficiencia de carga constante cuando el ángulo de contacto de la parte central del techo del canal fluídico de una celda de flujo es menor que los ángulos de contacto de las partes no centrales del techo del canal fluídico y las paredes laterales de las celdas de flujo.

65

Para cada experimento de carga, las perlas se cargaron en una matriz de micropocillos de una celda de flujo en forma de U de un cartucho (Fig. 14A), y las perlas en exceso se lavaron. El canal fluídico de la celda de flujo tenía 7 mm de ancho. Para eliminar eficazmente el exceso de perlas, el perfil del frente de fluido de gas/amortiguador tenía un componente que era

paralelo en lugar de ortogonal a los bordes de celda de flujo, que se logró mediante el techo del canal fluídico que tiene un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio. Las paredes laterales del canal fluídico y la parte inferior del canal fluídico no tenían un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio. Por lo tanto, el ángulo de contacto de la parte central del techo del canal fluídico de una celda de flujo es menor que los ángulos de contacto de las partes no centrales del techo del canal fluídico y las paredes laterales de las celdas de flujo. El recubrimiento hidrófilo en el techo del canal fluídico se desplazó con respecto a los bordes de forma por el techo del canal fluídico y las paredes laterales del canal fluídico. Los experimentos de carga se repitieron 207 veces.

Las Fig. 15A1-15J2 son imágenes de matrices de micropocillos de celdas de flujo para 10 de los 207 experimentos de carga. Los 10 experimentos de carga muestran que puede lograrse una buena eficiencia de carga con un recubrimiento hidrófilo de dióxido de silicio en la parte central del techo de celda de flujo (Figs. 14B, 14C, 15A1-15J2). La Tabla 1 es un resumen de la eficiencia de carga de los 10 experimentos de carga. Los experimentos de carga también muestran una agregación mínima de perlas en los límites de las celdas de flujo y se logró poca variación de la uniformidad o consistencia de la carga de la perla (Figs. 14D-14G, 15A1-15J2). Las Figs. 14B-14C son imágenes de uno del experimento de carga que muestra que los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos con dobletes de perlas fueron similares en el centro y en el límite del canal fluídico para la matriz de micropocillos. Las Figs. 14D-14G son gráficos para dos experimentos de carga que no muestran ningún efecto de borde con respecto a los porcentajes de los micropocillos de la matriz de micropocillos sin perla, perlas individuales o dobletes de perlas a lo largo de la dirección de flujo.

Tabla 1. Eficiencia de carga de 10 experimentos de carga

Después del lavado de perlas, % de pocillos con perlas	
91,2	
95,1	
95,3	
96,1	
93,7	
96,5	
95,4	
93,7	
95,6	
96,0	

Tabla 2. Eficiencia de carga de los 207 experimentos de carga

Después del lavado de perlas, % de pocillos con perlas									
91,18	94,85	95,49	96,43	94,06	94,31	93,31	95,73	96,54	95,93
92,98	93,59	96,26	95,90	96,24	93,68	90,02	96,39	96,66	95,78
90,67	93,30	94,93	95,39	95,30	93,59	94,15	95,92	92,40	94,01
92,94	93,22	95,11	94,48	95,31	94,85	95,11	97,16	95,73	94,42
95,99	94,30	94,78	95,41	95,21	96,15	93,50	96,71	96,98	95,87
89,70	93,30	95,05	95,20	95,53	94,60	94,35	97,08	97,06	95,63
92,88	93,94	95,85	95,29	95,44	94,10	95,22	94,03	96,73	92,43
96,20	94,55	96,47	94,90	96,08	91,17	95,41	95,90	96,58	94,09
95,74	93,72	96,33	91,69	95,75	95,24	95,67	95,97	95,99	95,15
95,71	94,76	96,11	92,09	95,83	95,08	95,08	96,14	95,74	96,31
95,93	94,31	94,98	92,07	96,69	93,15	92,55	90,45	94,67	95,15
96,23	94,46	92,89	94,57	95,43	95,41	93,56	94,73	95,97	96,20
95,77	94,11	93,80	92,54	95,86	94,63	94,25	95,63	95,30	94,76
95,91	95,01	95,00	92,82	96,79	96,39	93,73	94,12	96,97	94,90
95,42	95,02	96,08	89,10	96,51	96,37	91,14	95,37	96,58	94,88

Después del lavado de perlas, % de pocillos con perlas									
96,34	94,74	95,67	92,89	96,49	96,49	91,63	89,97	96,67	91,79
95,34	94,64	95,81	93,70	85,25	95,75	95,79	94,58	96,56	95,70
94,60	95,15	96,10	90,24	95,22	96,00	96,68	95,24	96,51	
94,97	95,27	92,75	94,16	94,82	95,65	96,45	94,99	96,91	
95,05	91,38	95,88	94,16	94,35	96,47	96,21	94,84	95,98	
94,14	93,46	95,71	92,84	95,48	92,28	96,51	96,44	95,98	

Las Figs. 16A-16D muestran la eficiencia de carga elevada consistente de los 207 experimentos de carga. La Fig. 16A es un gráfico que muestra la eficiencia de carga para los 207 experimentos de carga. La Fig. 16B es un gráfico de barras que muestra una eficiencia de carga consistente y alta para los 207 experimentos de carga. Las Figs. 16C y 16D son tablas que resumen las estadísticas de los 207 experimentos de carga. La Tabla 2 es un resumen de la eficiencia de carga de los 207 experimentos de carga.

En conjunto, estos datos demuestran que la alta eficacia de carga, la agregación mínima de perlas en los límites de las celdas de flujo y la poca variación de la uniformidad o coherencia de la carga de la perla pueden lograrse cuando el ángulo de contacto de la parte central del techo del canal fluídico de una celda de flujo es menor que los ángulos de contacto de las partes no centrales del techo del canal fluídico y las paredes laterales de las celdas de flujo.

En al menos algunas de las realizaciones descritas anteriormente, uno o más elementos utilizados en una realización pueden utilizarse indistintamente en otra realización a menos que un reemplazo de este tipo no sea técnicamente factible. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse otras omisiones, adiciones y modificaciones a los métodos y estructuras descritos anteriormente sin apartarse del alcance del objeto reivindicado. Todas estas modificaciones y cambios están destinados a encontrarse dentro del alcance del objeto, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Con respecto al uso de sustancialmente cualquier término plural y/o singular en la presente memoria, los expertos en la técnica pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural según sea apropiado para el contexto y/o la aplicación. Las diversas permutaciones singulares/plurales pueden establecerse expresamente en la presente memoria por razones de claridad. Como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cualquier referencia a “o” en la presente memoria pretende abarcar “y/o” a menos que se indique lo contrario.

Los expertos en la técnica entenderán que, en general, los términos utilizados en la presente memoria, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas (p. ej., los cuerpos de las reivindicaciones adjuntas) están destinados generalmente como términos “abiertos” (p. ej., el término “que incluye” debe interpretarse como “que incluye, aunque no de forma limitativa,” el término “que tiene” debe interpretarse como “que tiene al menos”, el término “incluye” debe interpretarse como “incluye, aunque no de forma limitativa”, etc.). Los expertos en la técnica entenderán además que si se pretende un número específico de una recitación de reivindicación introducida, dicha intención se enumerará explícitamente en la reivindicación, y en ausencia de tal recitación, dicha intención no está presente. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases introductorias “al menos un” y “uno o más” para introducir recitaciones de reivindicaciones. Sin embargo, el uso de tales frases no debe interpretarse como que implica que la introducción de una recitación de reivindicación por los artículos indefinidos “un” o “una” limita cualquier reivindicación particular que contenga dicha recitación de reivindicación introducida a las realizaciones que contengan solo una de estas recitaciones, incluso cuando la misma reivindicación incluya las frases introductorias “uno o más” o “al menos uno” y artículos indefinidos tales como “un” o “una” (p. ej., “un” y/o “una” debe interpretarse como “al menos uno” o “uno o más”); lo mismo es válido para el uso de artículos definidos utilizados para introducir recitaciones de reivindicaciones. Además, incluso si se menciona explícitamente un número específico de una recitación de reivindicación introducida, los expertos en la técnica reconocerán que dicha mención debe interpretarse como al menos el número mencionado (p. ej., la simple mención de “dos recitaciones”, sin otros modificadores, significa al menos dos recitaciones, o dos o más recitaciones). Además, en aquellos casos en los que se utiliza una convención análoga a “al menos uno de A, B, y C, etc.”, en general dicha construcción está prevista en el sentido en el que un experto en la técnica entendería la convención (p. ej., “un sistema que tiene al menos uno de A, B y C” incluiría, aunque no de forma limitativa, sistemas que tienen A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). En aquellos casos donde se utiliza una convención análoga a “al menos uno de A, B, o C, etc.”, en general dicha construcción está prevista en el sentido en el que un experto en la técnica entendería la convención (p. ej., “un sistema que tiene al menos uno de A, B o C” incluiría, aunque no de forma limitativa, sistemas que tienen A solo, B solo, C solo, A y B juntos, A y C juntos, B y C juntos, y/o A, B y C juntos, etc.). Los expertos en la técnica entenderán además que prácticamente cualquier palabra y/o expresión disyuntiva que presentan dos o más términos alternativos, ya sea en la descripción, reivindicaciones o dibujos, debe entenderse que contemplan las posibilidades de incluir uno de los términos, cualquiera de los términos o ambos términos. Por ejemplo, se entenderá que la frase “A o B” incluye las posibilidades de “A” o “B” o “A y B”.

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

5 Como entenderá un experto en la técnica, para todos y cada uno de los fines, tal como en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos descritos en la presente memoria también abarcan todos y cada uno de los subintervalos posibles y combinaciones de subintervalos de los mismos. Cualquier intervalo enumerado puede reconocerse fácilmente como que describe suficientemente y que permite que el mismo intervalo se divida al menos en mitades, tercios, cuartos, quintos, décimos, etc. Como un ejemplo no limitativo, cada intervalo analizado en la presente memoria puede dividirse fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc. Como también entenderá un experto en la técnica todo el lenguaje tal como “hasta”, “al menos”, “mayor que”, “menor que” y similares incluyen el número mencionado y se refieren a intervalos que pueden dividirse posteriormente en subintervalos como se ha analizado anteriormente. Finalmente, como entenderá un experto en la técnica, un intervalo incluye cada miembro individual. Así, por ejemplo, un grupo que tiene 1-3 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2 o 3 artículos. De forma similar, un grupo que tiene 1-5 artículos se refiere a grupos que tienen 1, 2, 3, 4 o 5 artículos, y así sucesivamente.

Si bien se han descrito diversos aspectos y realizaciones en la presente memoria, otros aspectos y realizaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los diversos aspectos y realizaciones descritos en la presente memoria tienen fines ilustrativos y no pretenden ser limitativos, con el verdadero alcance indicado por las siguientes reivindicaciones.

20

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo que comprende:
 - 5 una celda (702) de flujo que comprende un canal fluídico (704), una vía de entrada y una vía de salida, en donde el canal fluídico (704) comprende un techo (732), una primera pared lateral (736a) y una parte inferior (740) del canal fluídico, en donde el techo (732) y la primera pared lateral (736a) forman un borde de primera pared lateral de techo, (744a) y en donde la parte inferior (740) y la primera pared lateral (736a) forman un borde (748a) de primera pared lateral de parte inferior,
 - 10 en donde la parte inferior (740) del canal fluídico (704) comprende un sustrato (708) que comprende una pluralidad de micropocillos, y en donde la vía de entrada y la vía de salida están en comunicación de fluidos con la celda (702) de flujo a través del canal fluídico (704),
 - 15 **caracterizado por que** el techo (732) comprende una parte central que está desplazada del borde (744a) de la primera pared lateral de techo, formando de este modo un desplazamiento del borde (744a) de la primera pared lateral de techo, en donde la parte central es más hidrófila que el desplazamiento,
 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde el canal fluídico (704) tiene una sección transversal no circular.
 3. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el canal fluídico (704) tiene una sección transversal rectangular.
 4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el canal fluídico (704) comprende una segunda pared lateral (736b), en donde el techo (732) y la segunda pared lateral (736b) forman un borde (744b) de segunda pared lateral de techo, y en donde la parte inferior (740) y la segunda pared lateral (736b) forman un borde (748b) de segunda pared lateral de parte inferior.
 5. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el sustrato (708) comprende silicio, sílice fundida, vidrio, un polímero, un metal, un elastómero, polidimetilsiloxano, agarosa, un hidrogel o una combinación de los mismos.
 6. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la celda (702) de flujo comprende silicio, sílice fundida, vidrio, polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), polipropileno (PP), polietileno (PE), polietileno de alta densidad (HDPE), poliimida, polímeros de olefina cíclica (COP), copolímeros de olefina cíclica (COC), tereftalato de polietileno (PET), resina epoxi, metal o una combinación de los mismos.
 7. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el techo (732) es hidrófilo.
 8. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además una pluralidad de partículas que residen en la pluralidad de micropocillos del sustrato, y en donde al menos 25 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula.
 9. El dispositivo de la reivindicación 8, en donde cada partícula comprende una perla o una célula.
 10. El dispositivo de la reivindicación 9, en donde la perla comprende una pluralidad de códigos de barras estocásticos.
 11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la pluralidad de micropocillos comprende 1000-5000000 de micropocillos.
 12. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una interfaz de punta de pipeta para cargar o eliminar una muestra celular, un reactivo de ensayo, una suspensión de perlas, desechos del dispositivo o una combinación de los mismos.
 13. El dispositivo de la reivindicación 12, que comprende además la muestra celular, el reactivo de ensayo, la suspensión de perlas o una combinación de los mismos.
 14. Un método para la carga de muestras, que comprende
 - (a) proporcionar un dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
 - (b) introducir un gas en el canal fluídico a través de la vía de entrada; y
 - (c) introducir una primera muestra que comprende una primera pluralidad de partículas en el canal fluídico a través de la vía de entrada,

en donde al menos 25 % de la pluralidad de micropocillos contiene cada uno una única partícula de la primera pluralidad de partículas.

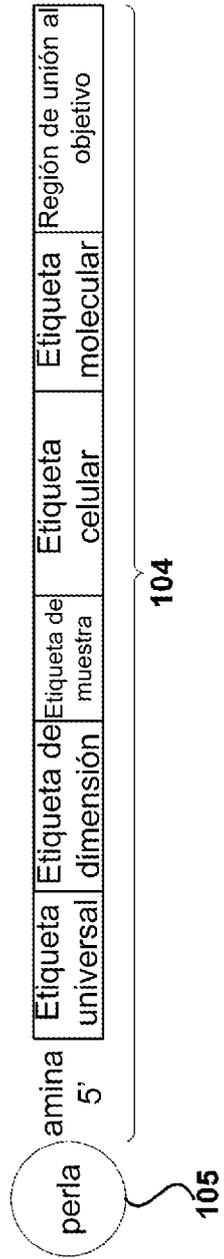


Figura 1

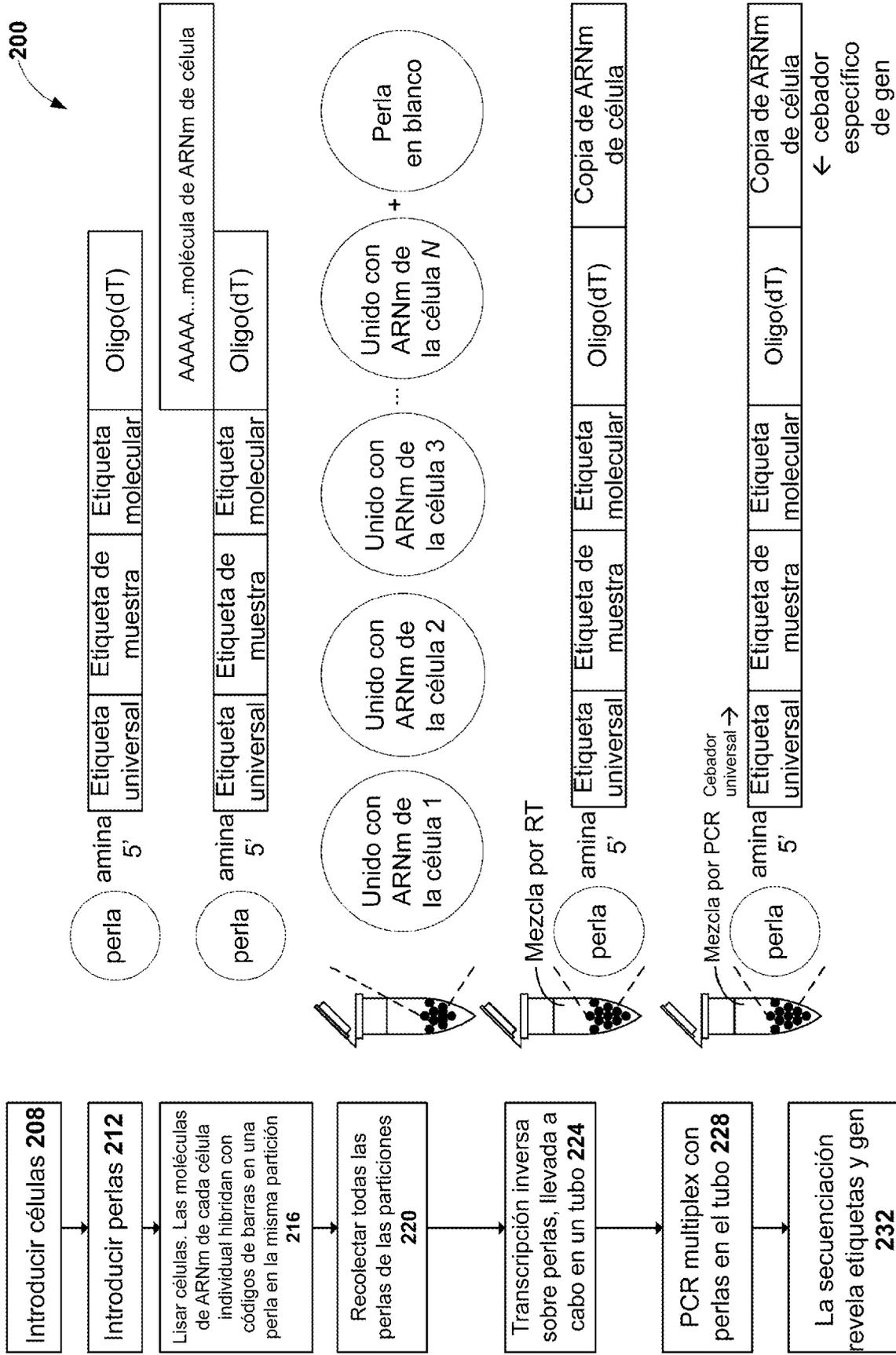


Figura 2

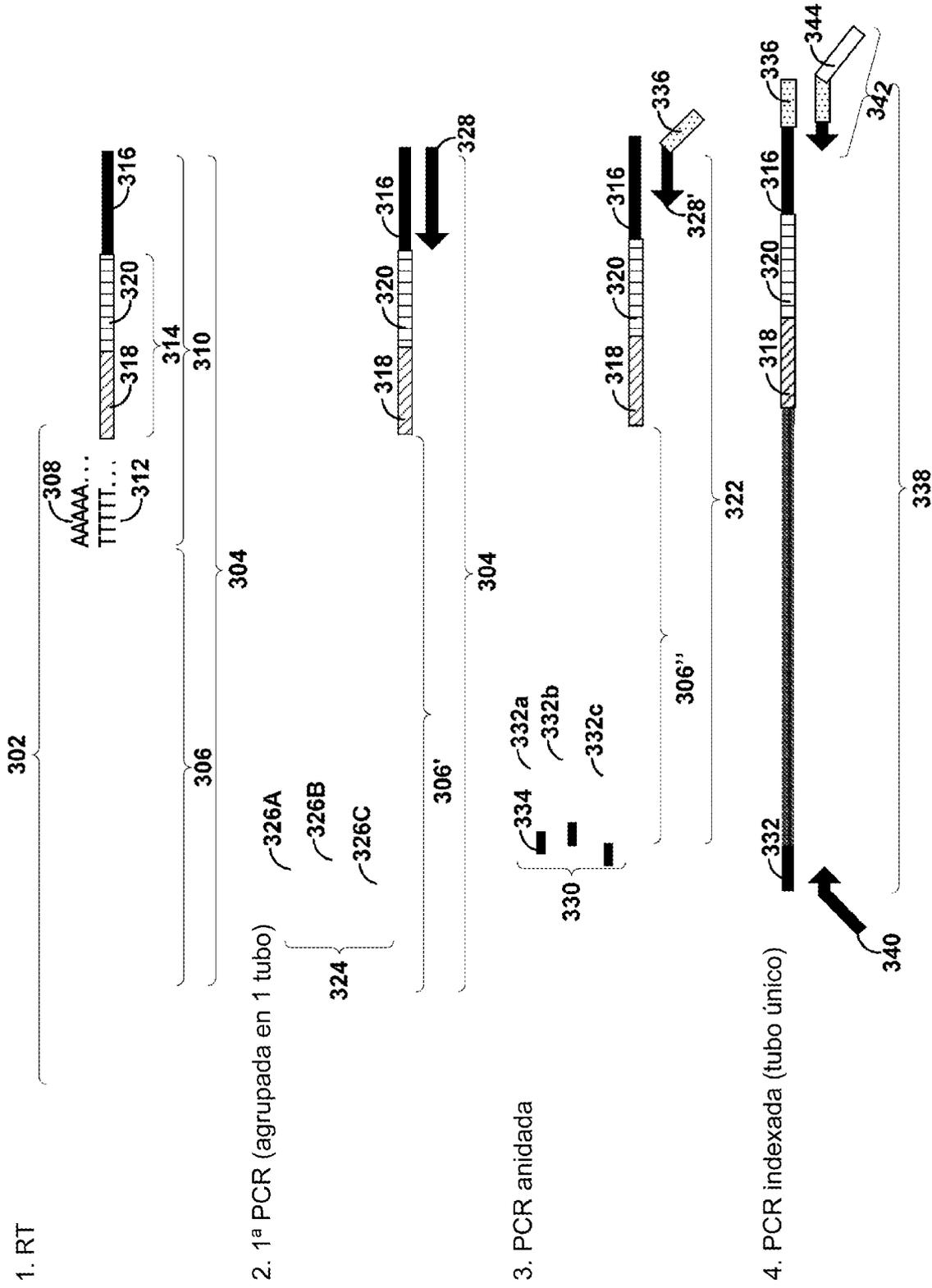


Figura 3

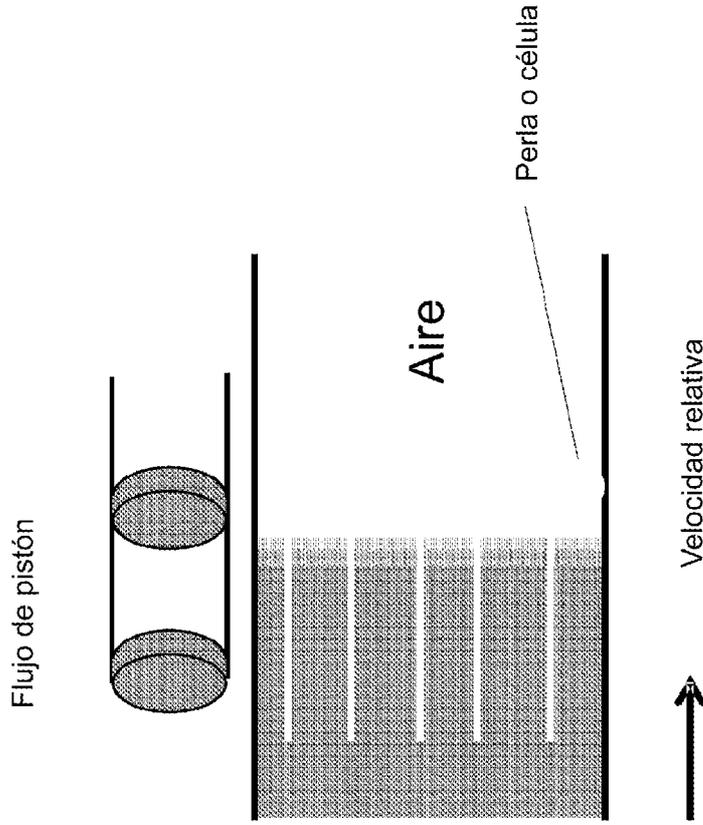


Figura 4B

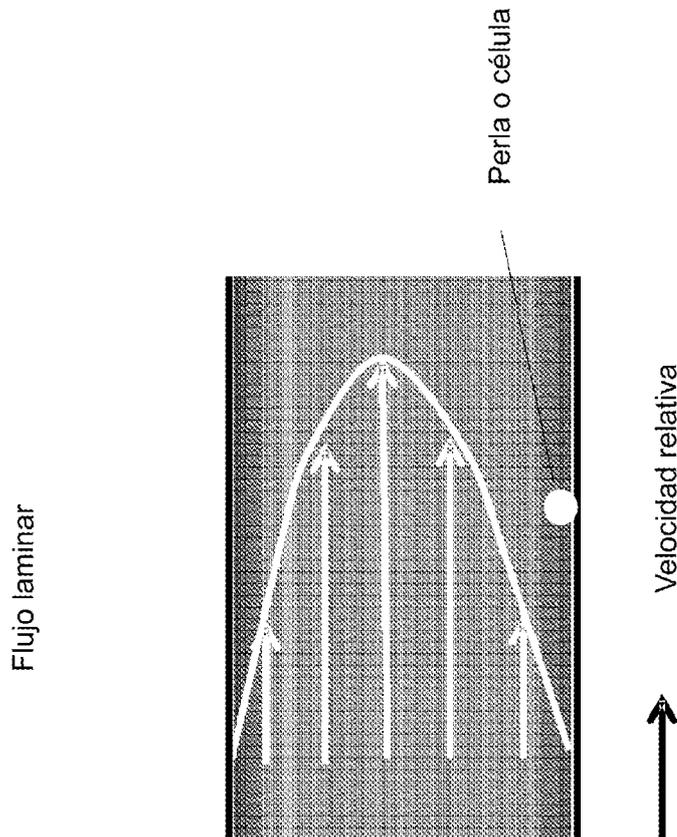


Figura 4A

Uso de flotabilidad para el flujo de pistón de amortiguación de aire

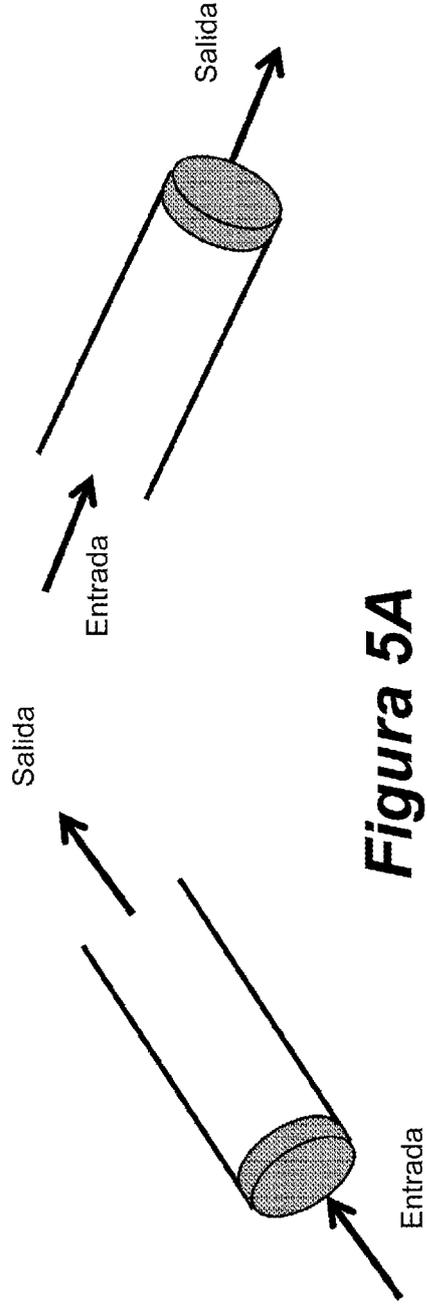


Figura 5A

El uso de flujo asistido por capilar permite el flujo de pistón horizontal

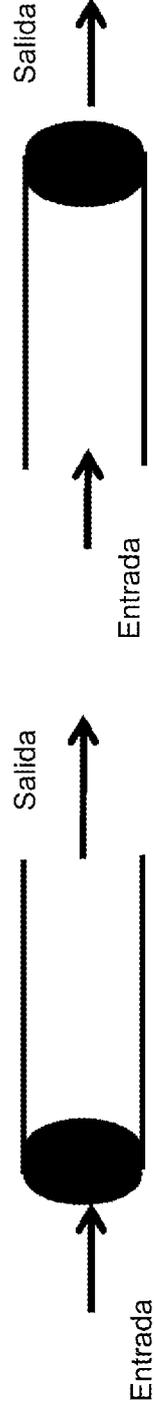
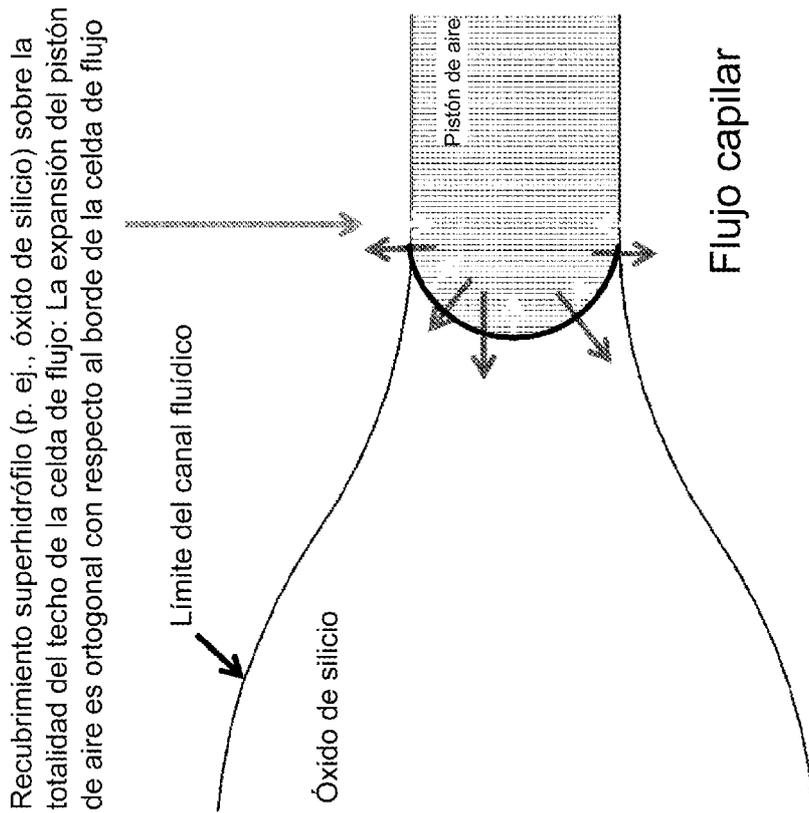


Figura 5B



← Flujo accionado por presión

Figura 6A

El enmascaramiento del recubrimiento de óxido en el borde del techo del canal fluidico deja una superficie hidrófoba en el límite del canal fluidico: Se reduce el componente ortogonal del flujo capilar en el límite del canal fluidico.

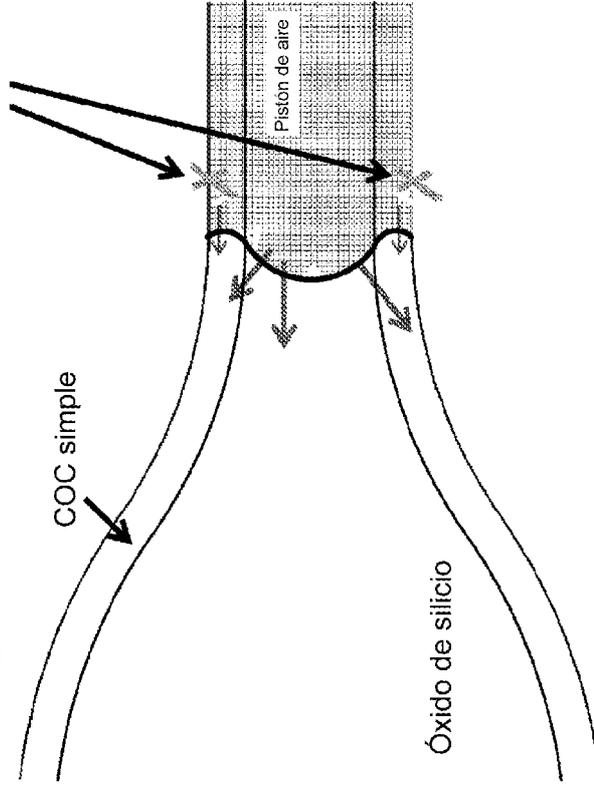


Figura 6B

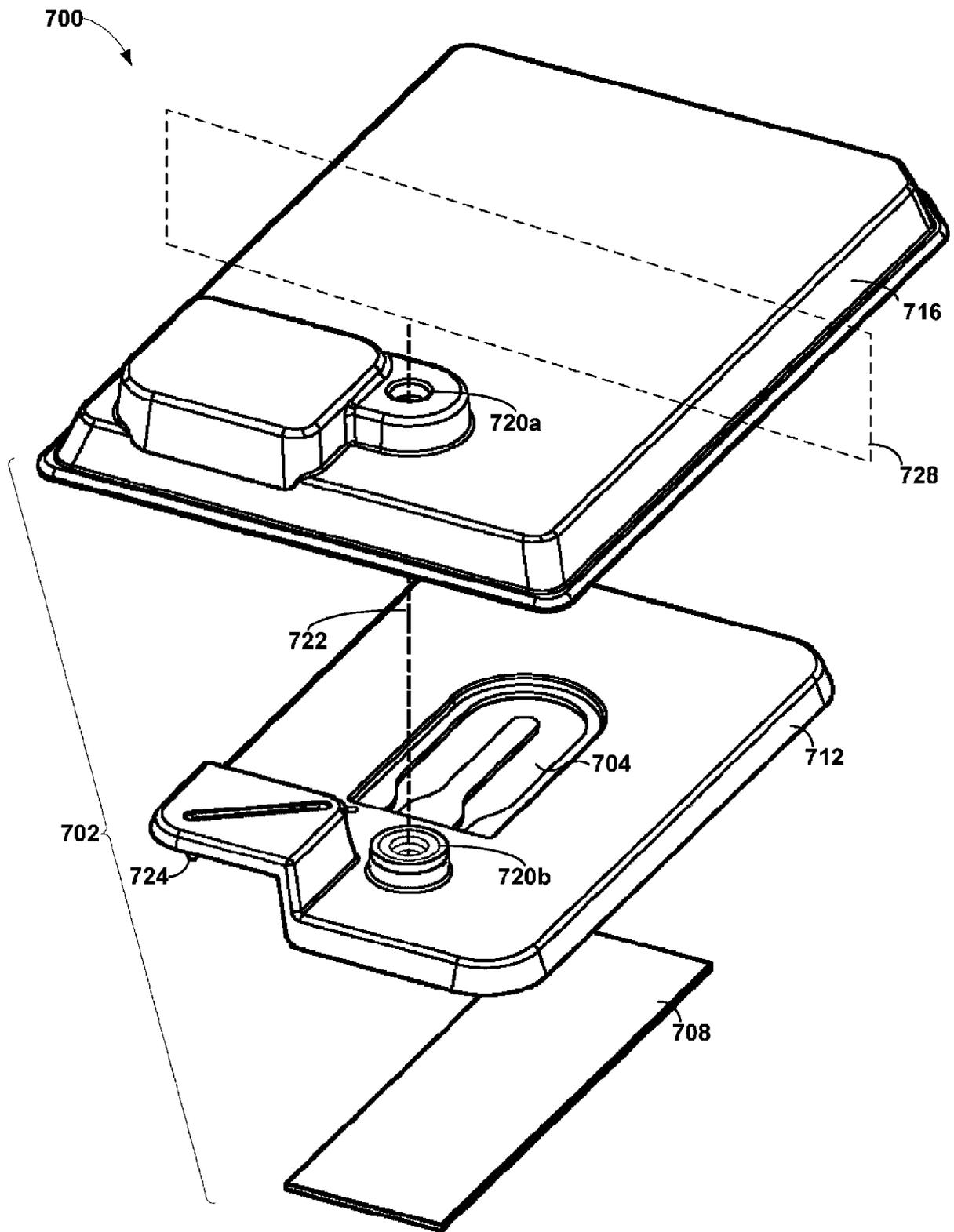


Figura 7A

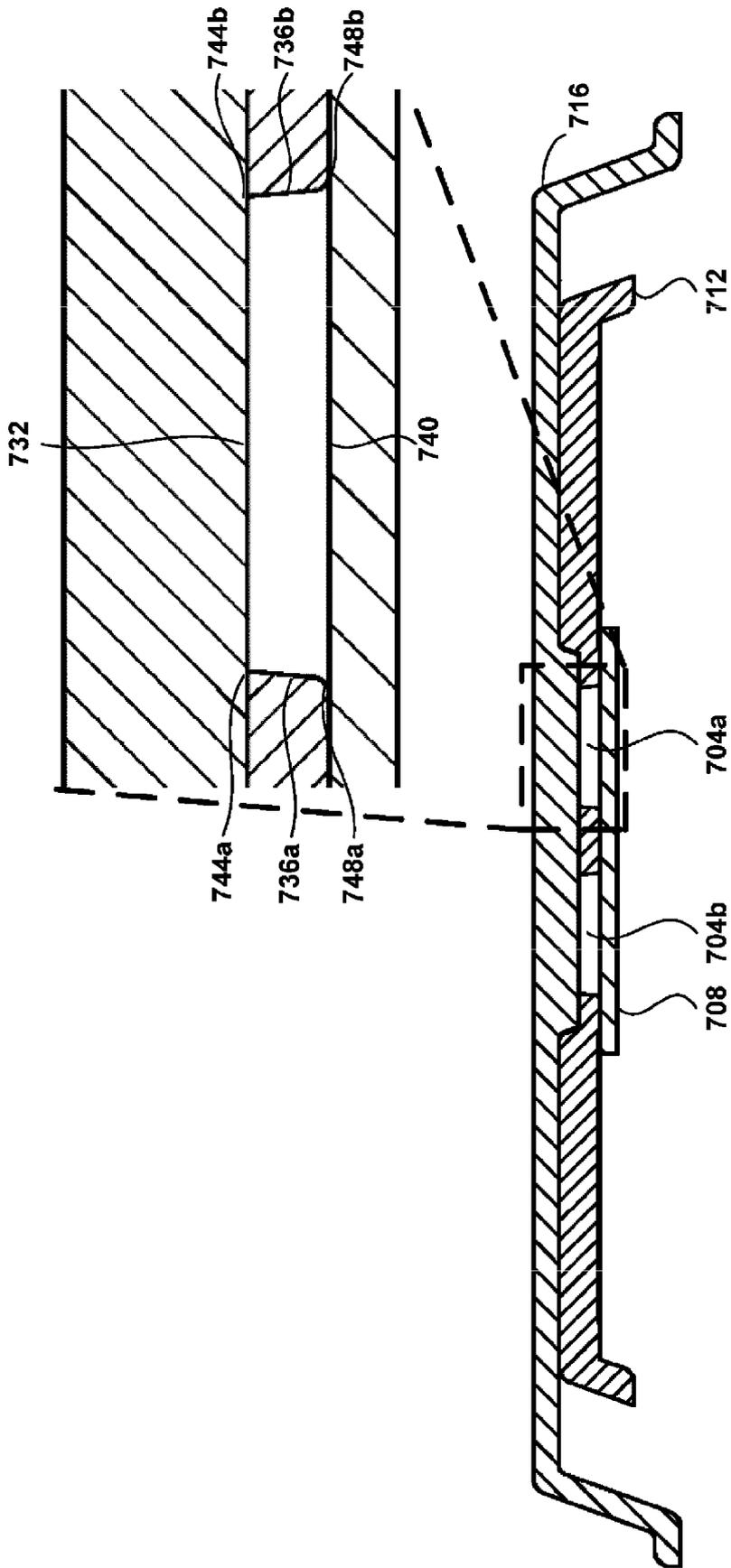


Figura 7B

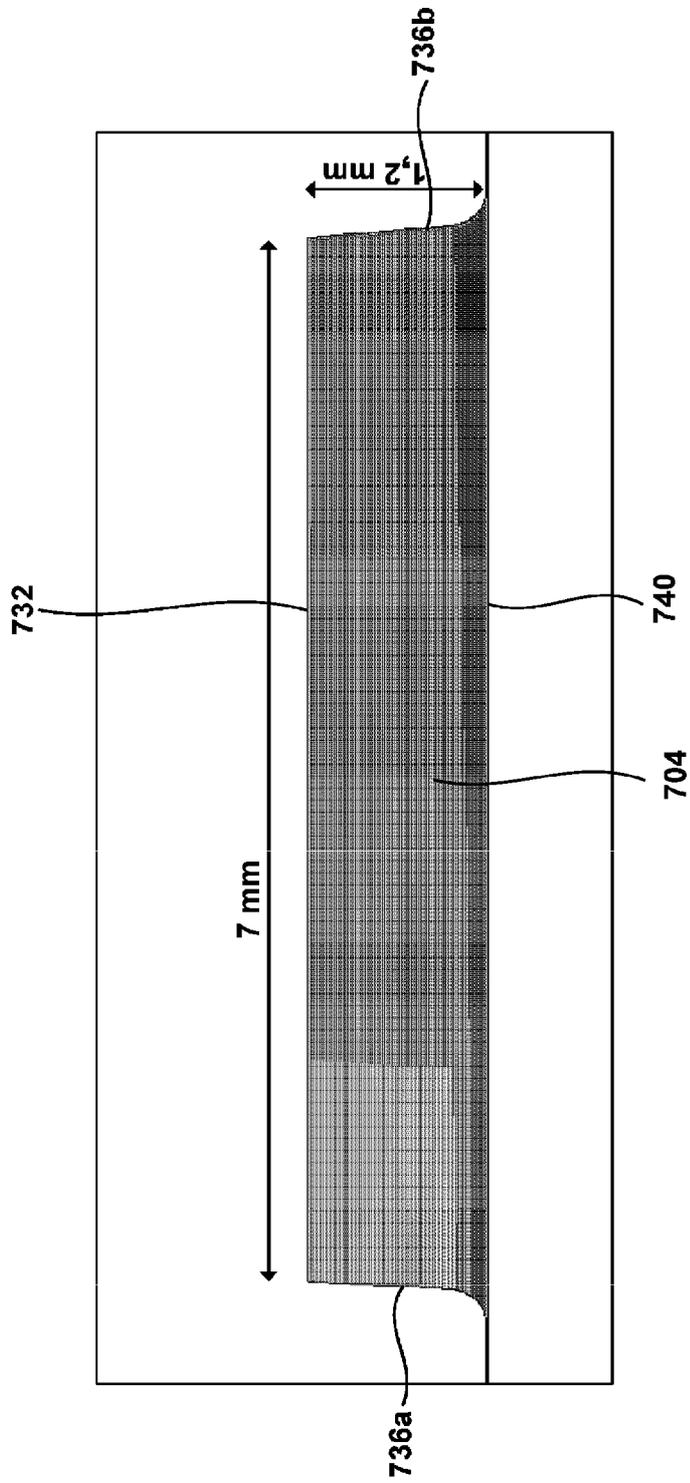
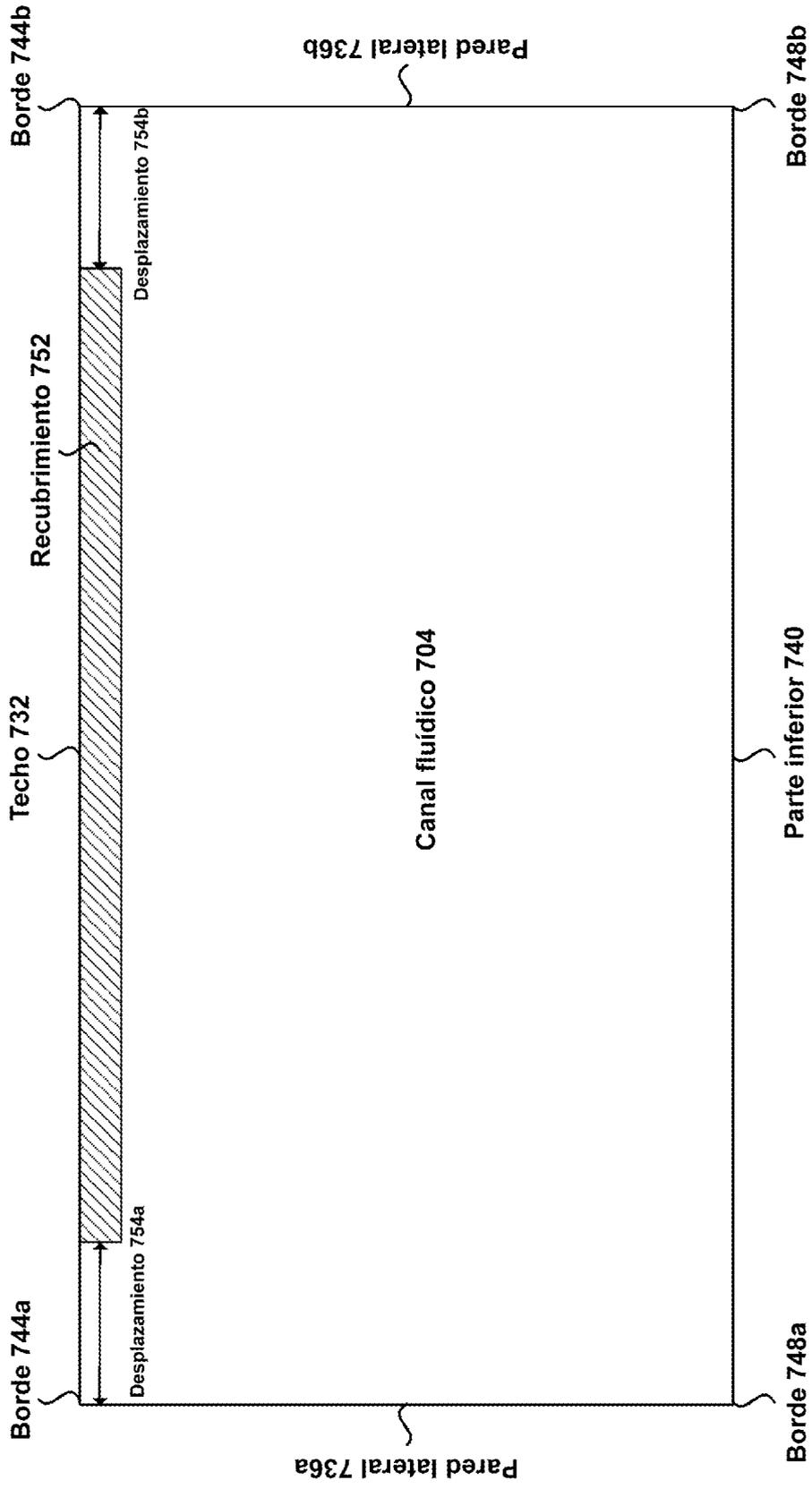
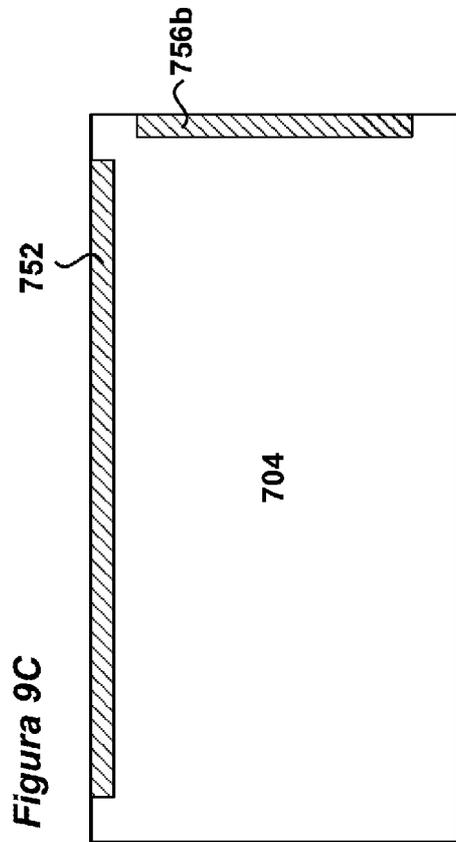
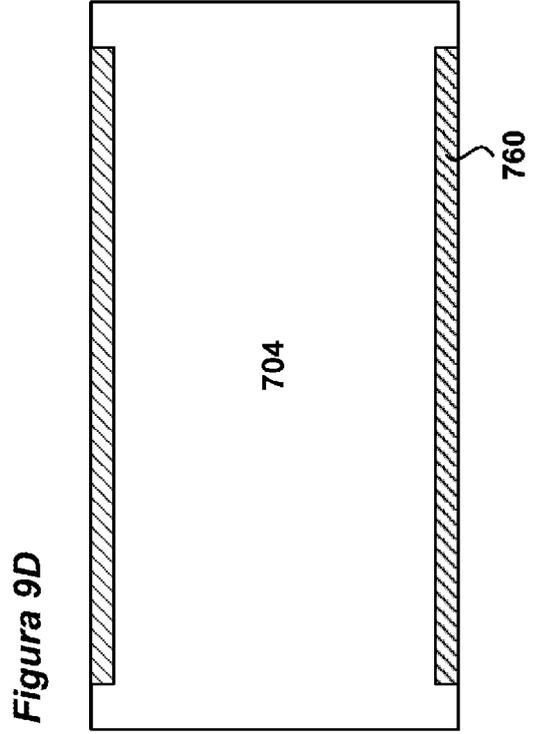
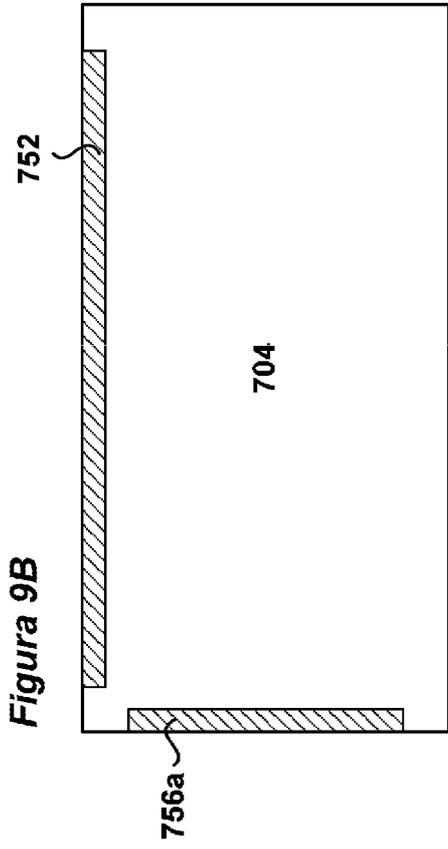


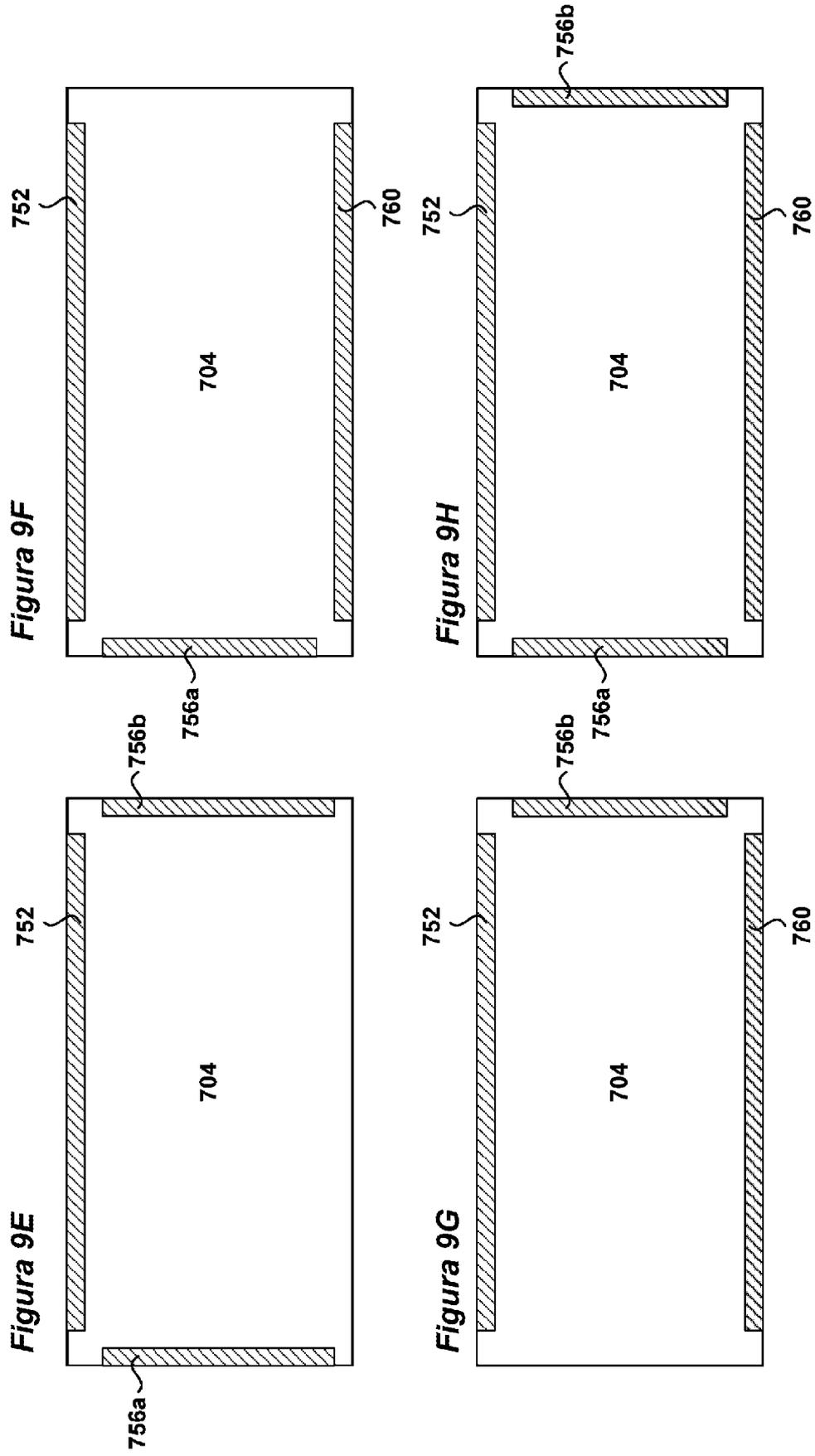
Figura 8



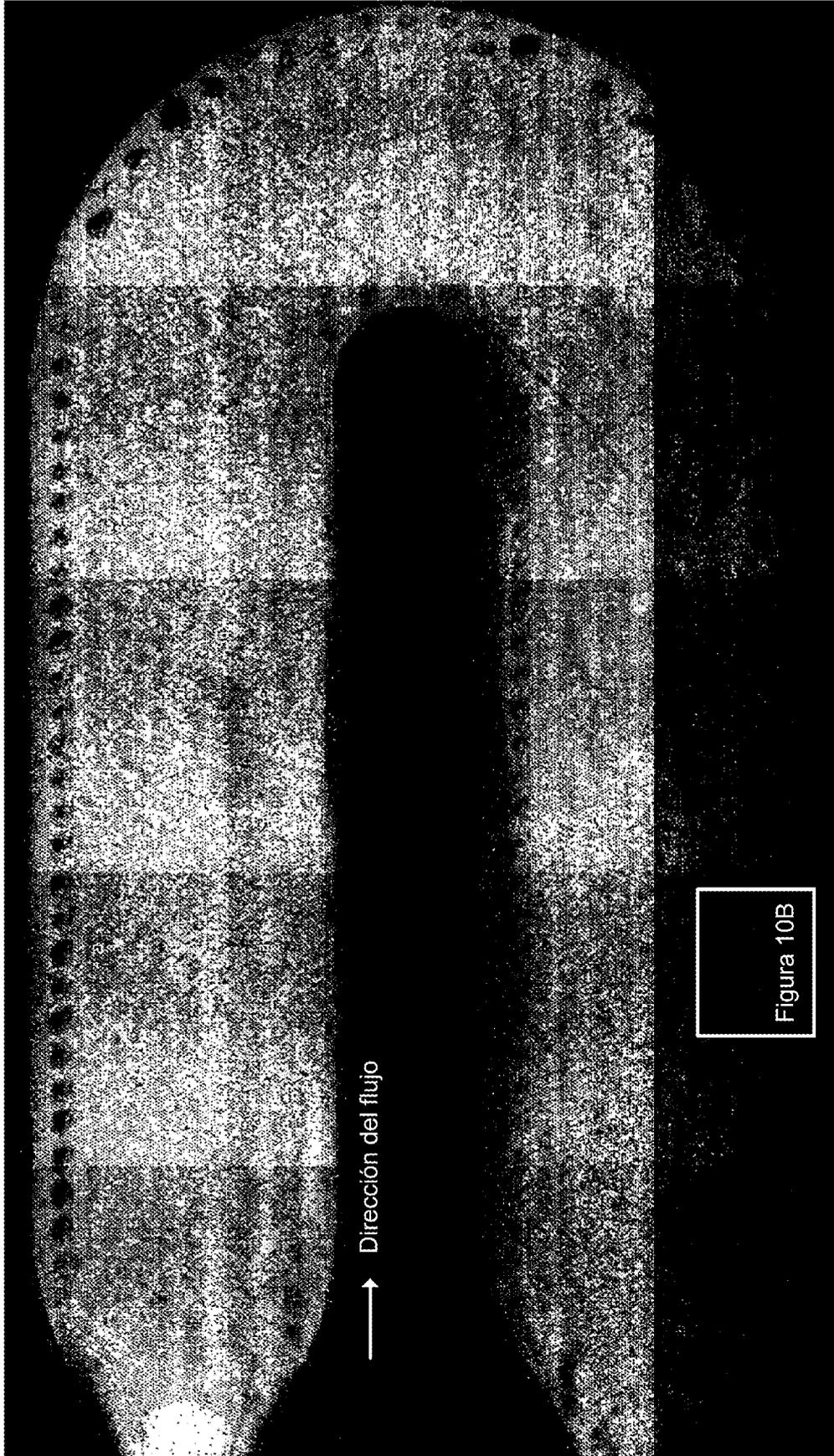
Recubrimiento
(p. ej., hidrófilo o superhidrófilo)

Figura 9A





Canal amplio, sin SiO₂ en pared lateral o techo



↑ Dirección del flujo

Figura 10B

Figura 10A

Agregación de perlas en los límites del canal fluidoico

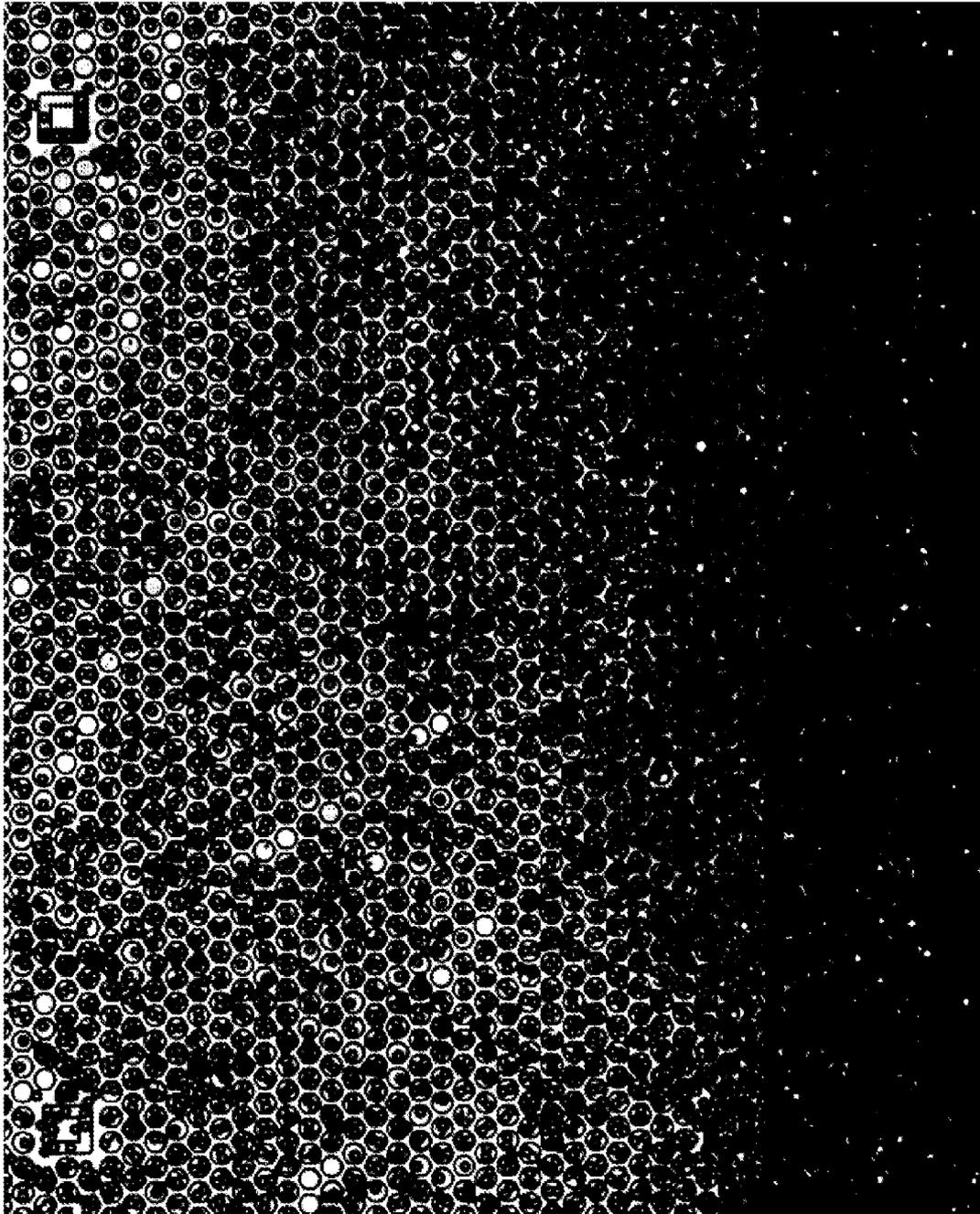


Figura 10B

Recubrimiento hidrófilo sobre el techo y las paredes laterales: El desplazamiento de aire incompleto resultó en mayores dobletes de perlas en el límite de las celdas de flujo

Figura 11A

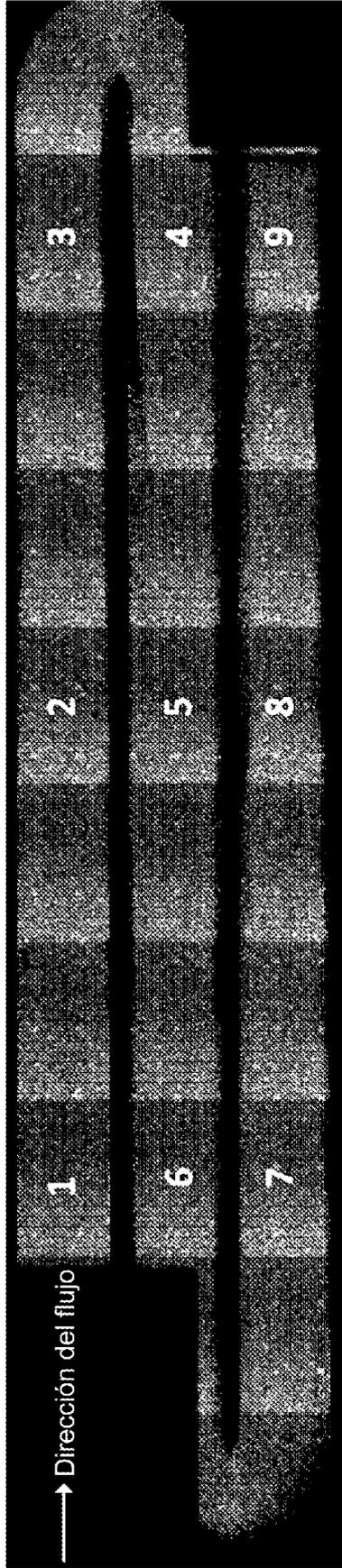


Figura 11B

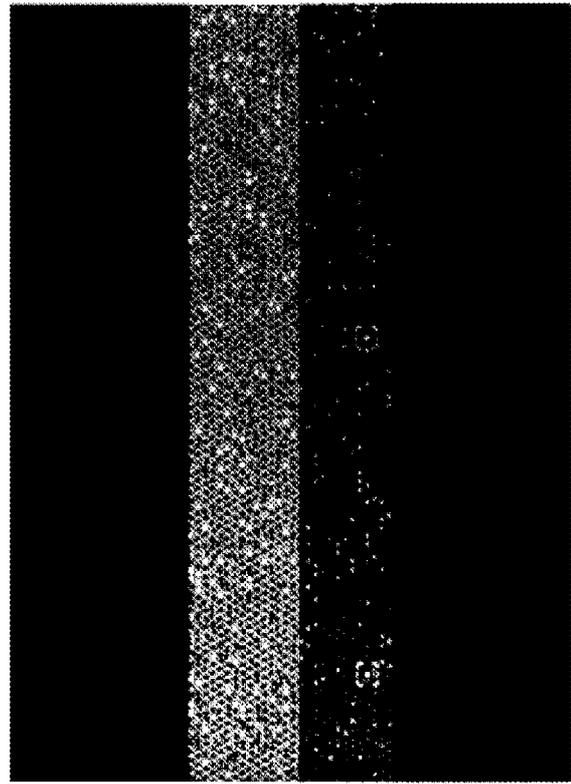
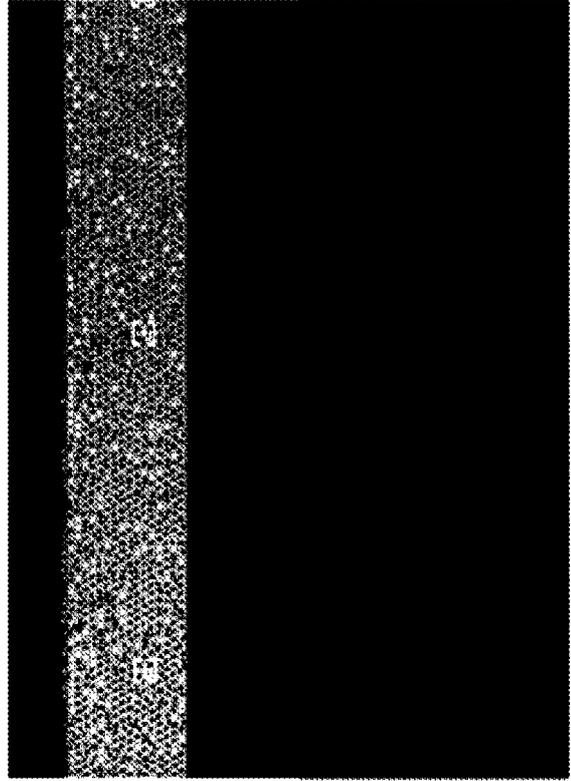


Figura 11C



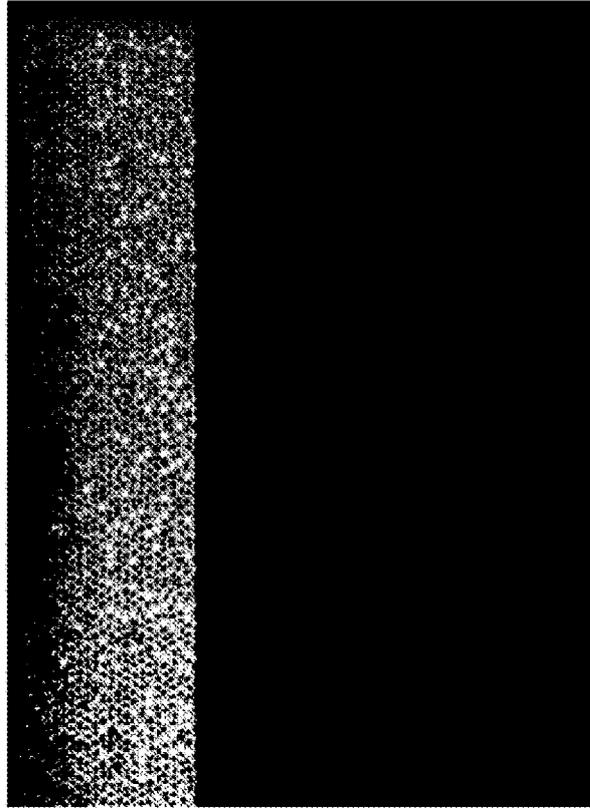


Figura 11E

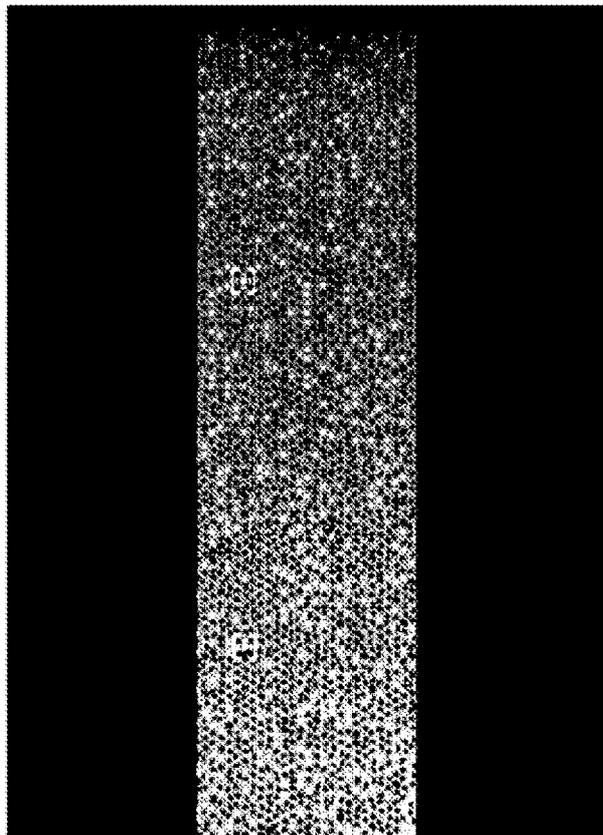


Figura 11D

Figura 11F

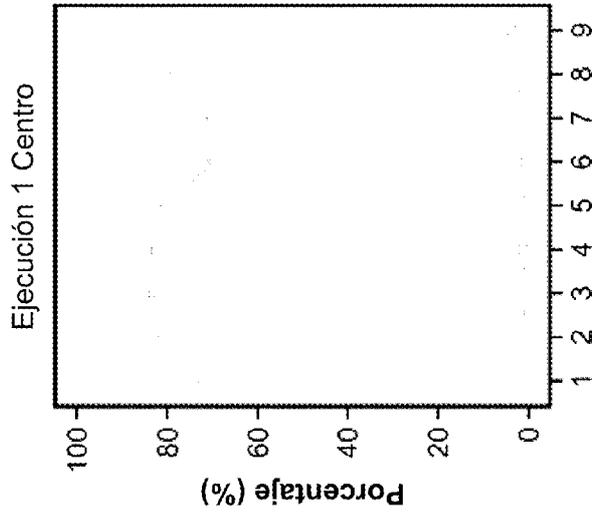


Figura 11G

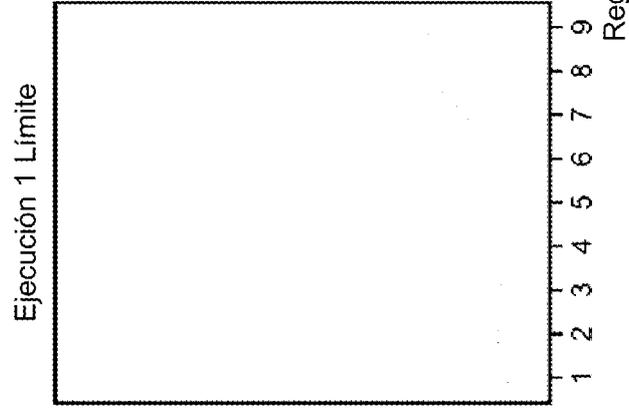


Figura 11H

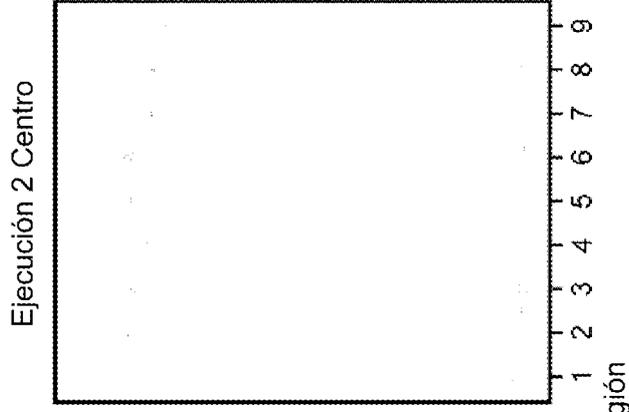
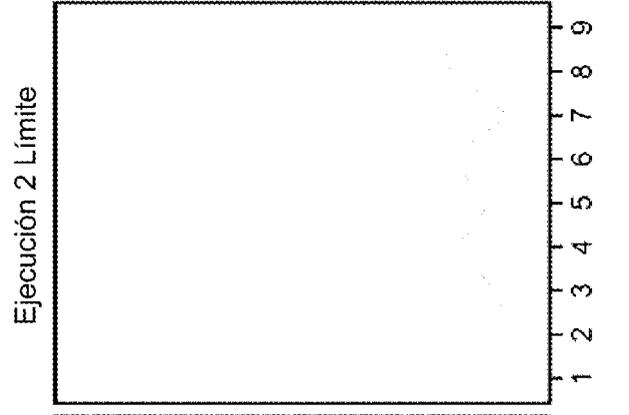


Figura 11I



---●--- % Pocillos_1perlas - - - ■ - - % Pocillo_2perlas

Celda de flujo de canal amplia, recubrimiento únicamente en el techo: Los agregados de perlas se reducen significativamente en los límites de las celdas de flujo.

Se observó una leve variación espacial de la uniformidad de carga de perlas

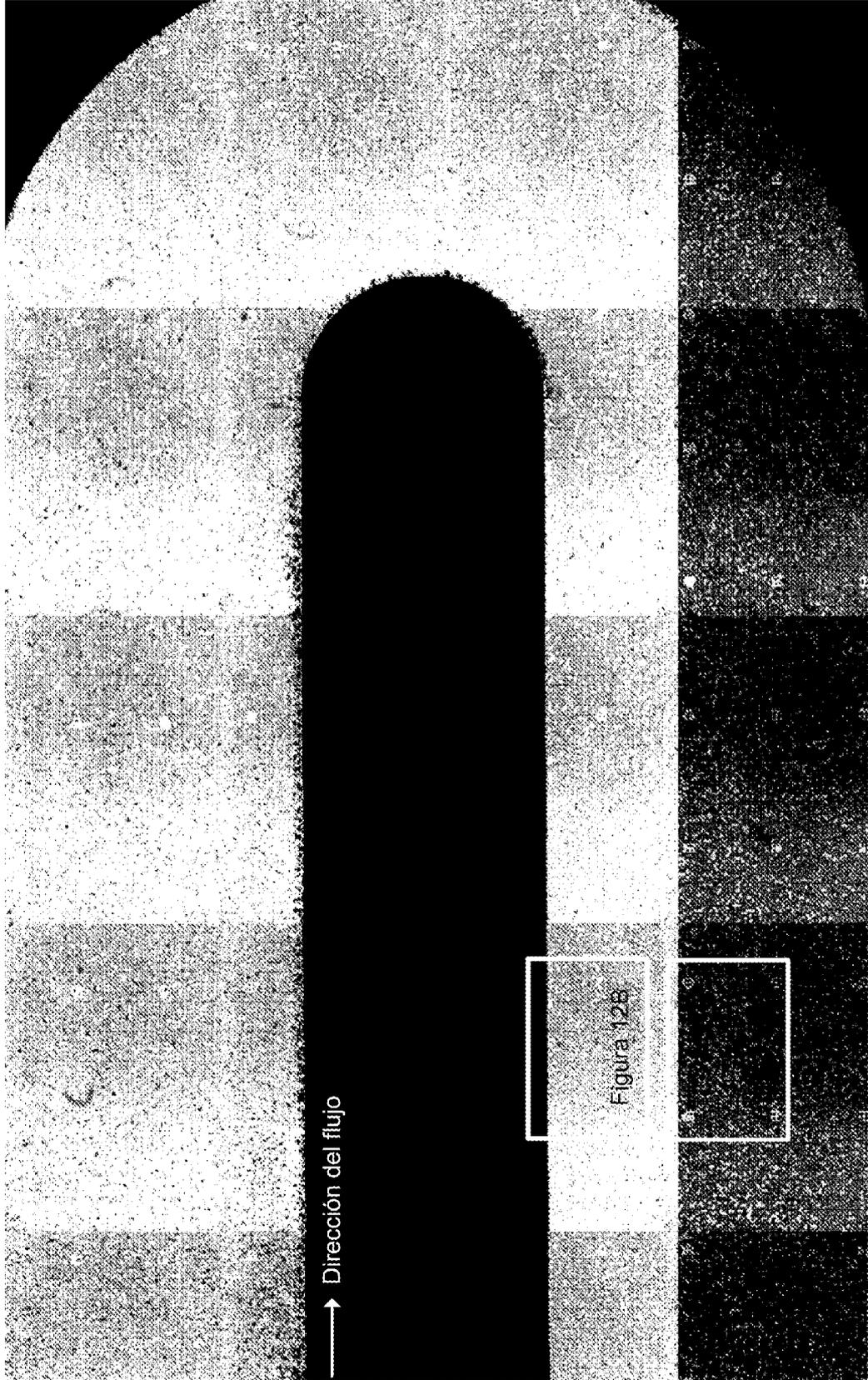


Figura 12A

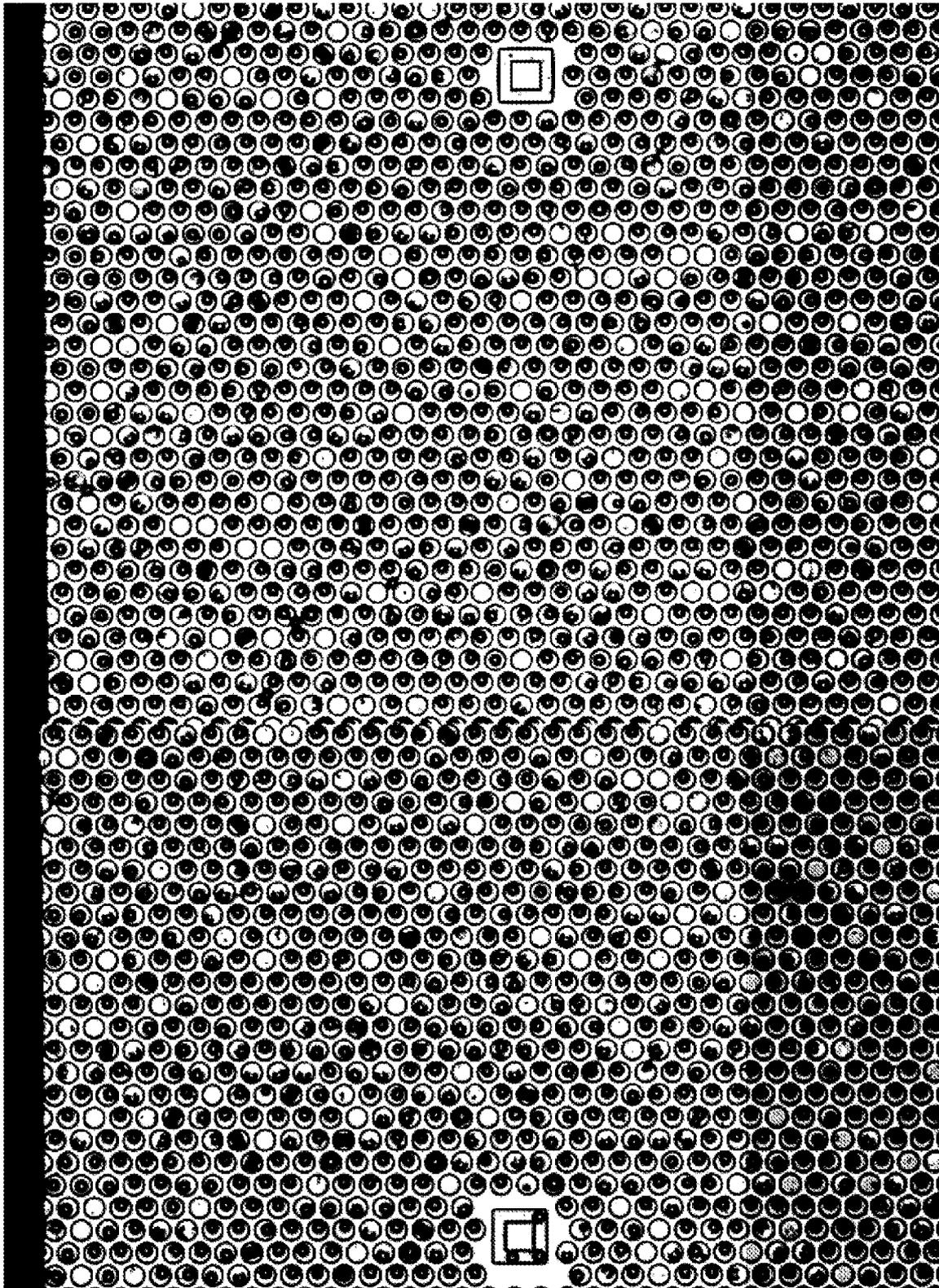


Figura 12B

Límite

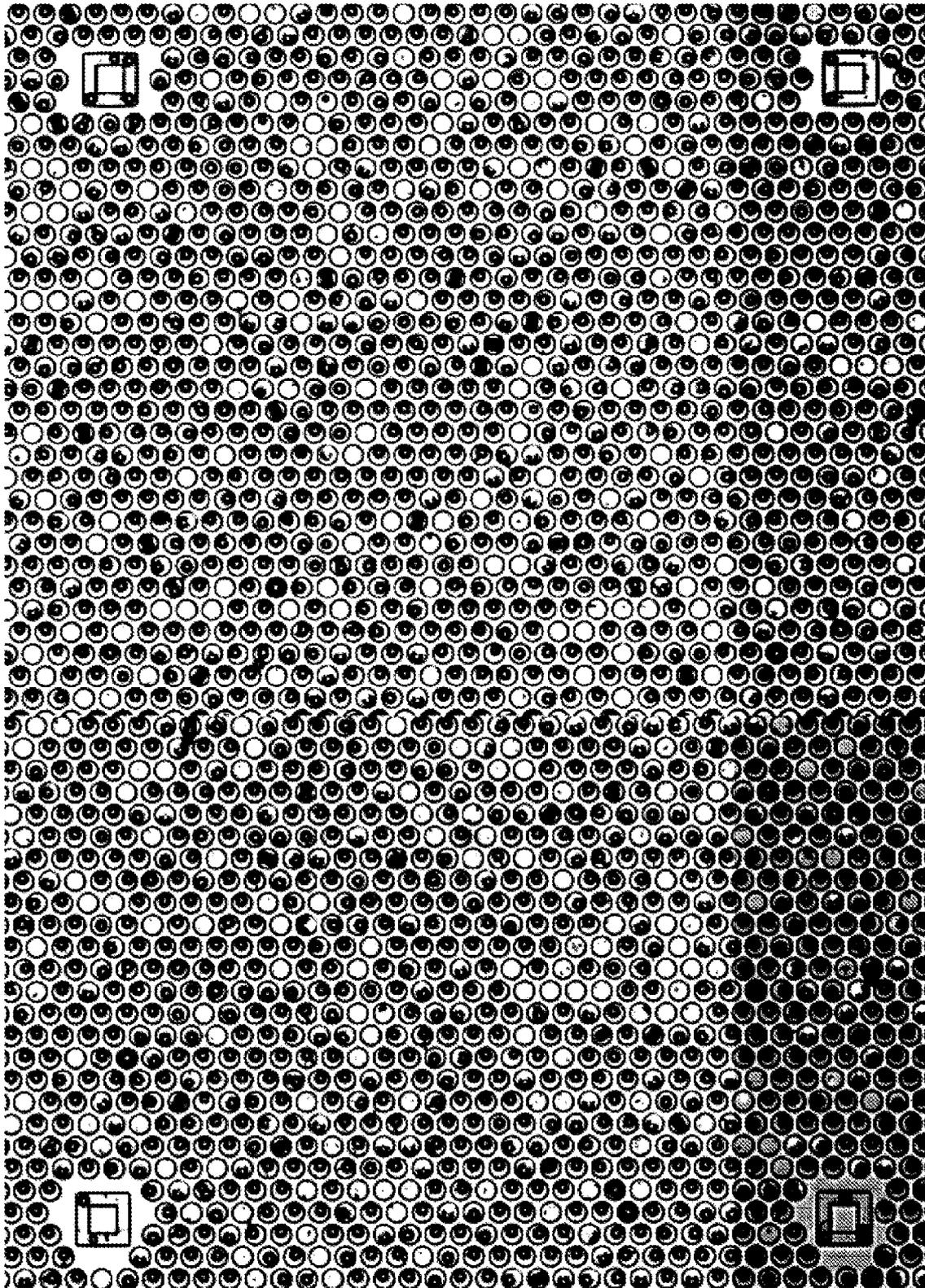


Figura 12C

Centro

Sin desplazamiento

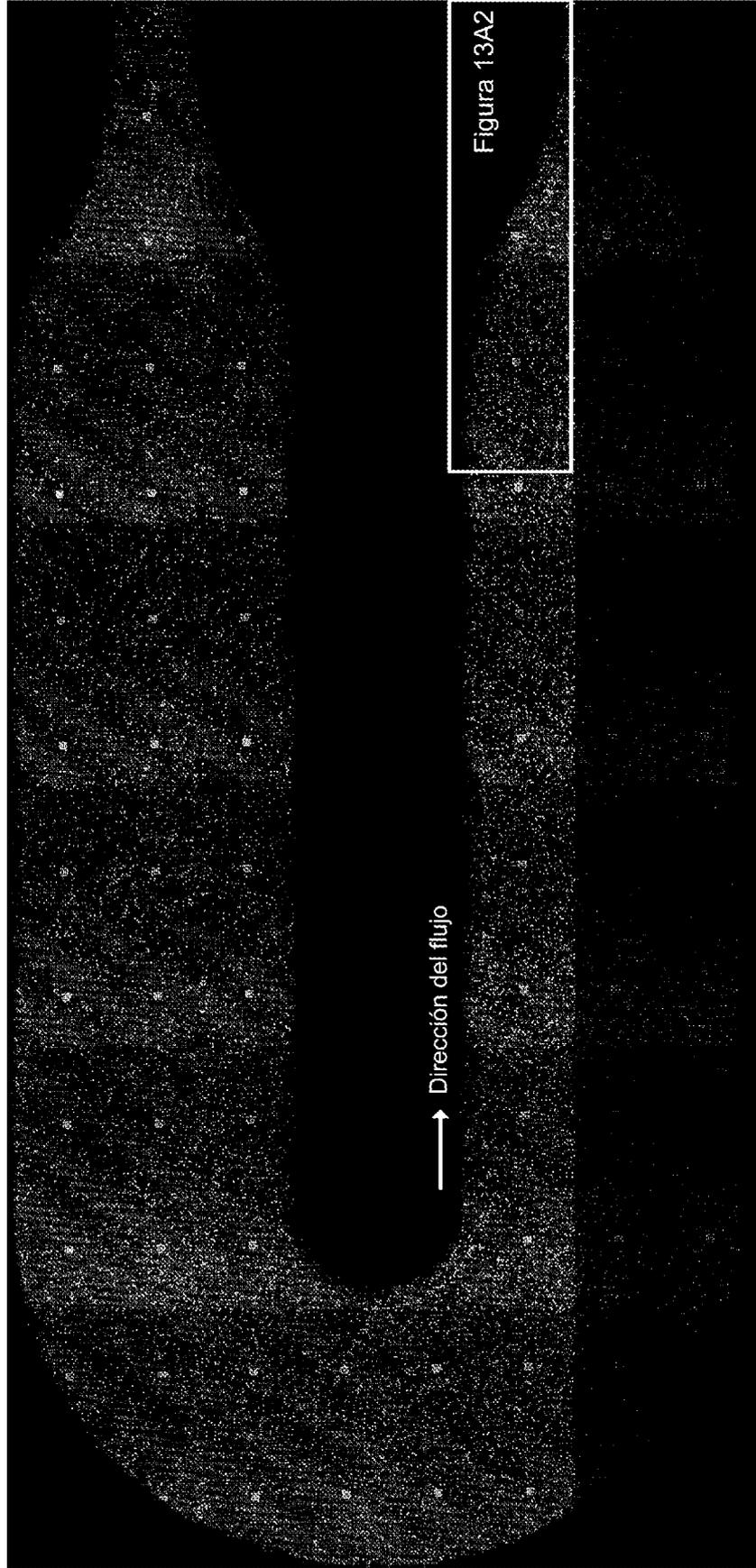


Figura 13A1

Agregaciones de perlas en los límites del canal flúidico

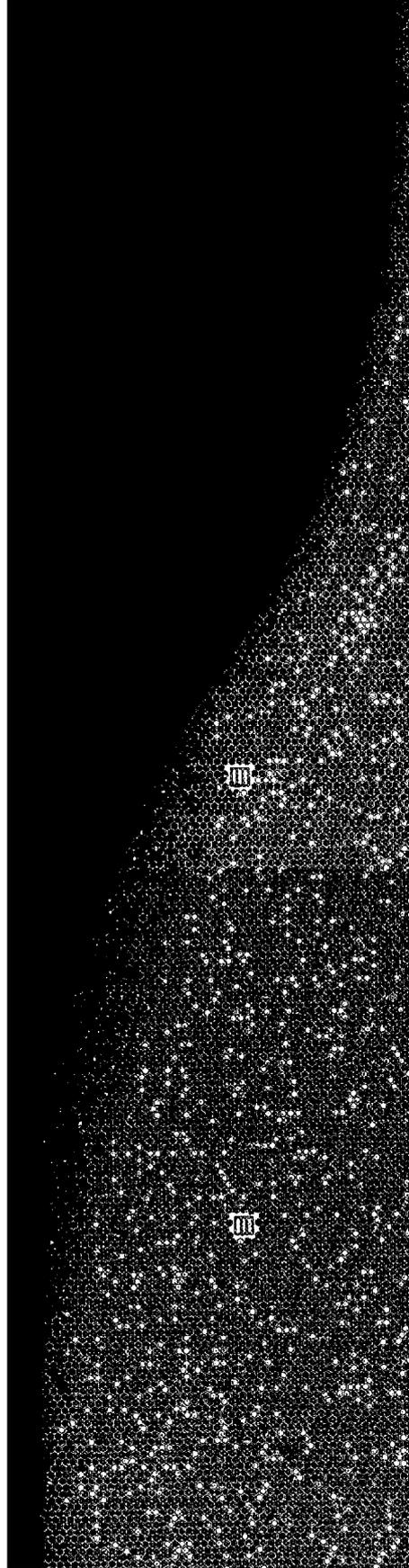


Figura 13A2

Desplazamiento de 500 μm

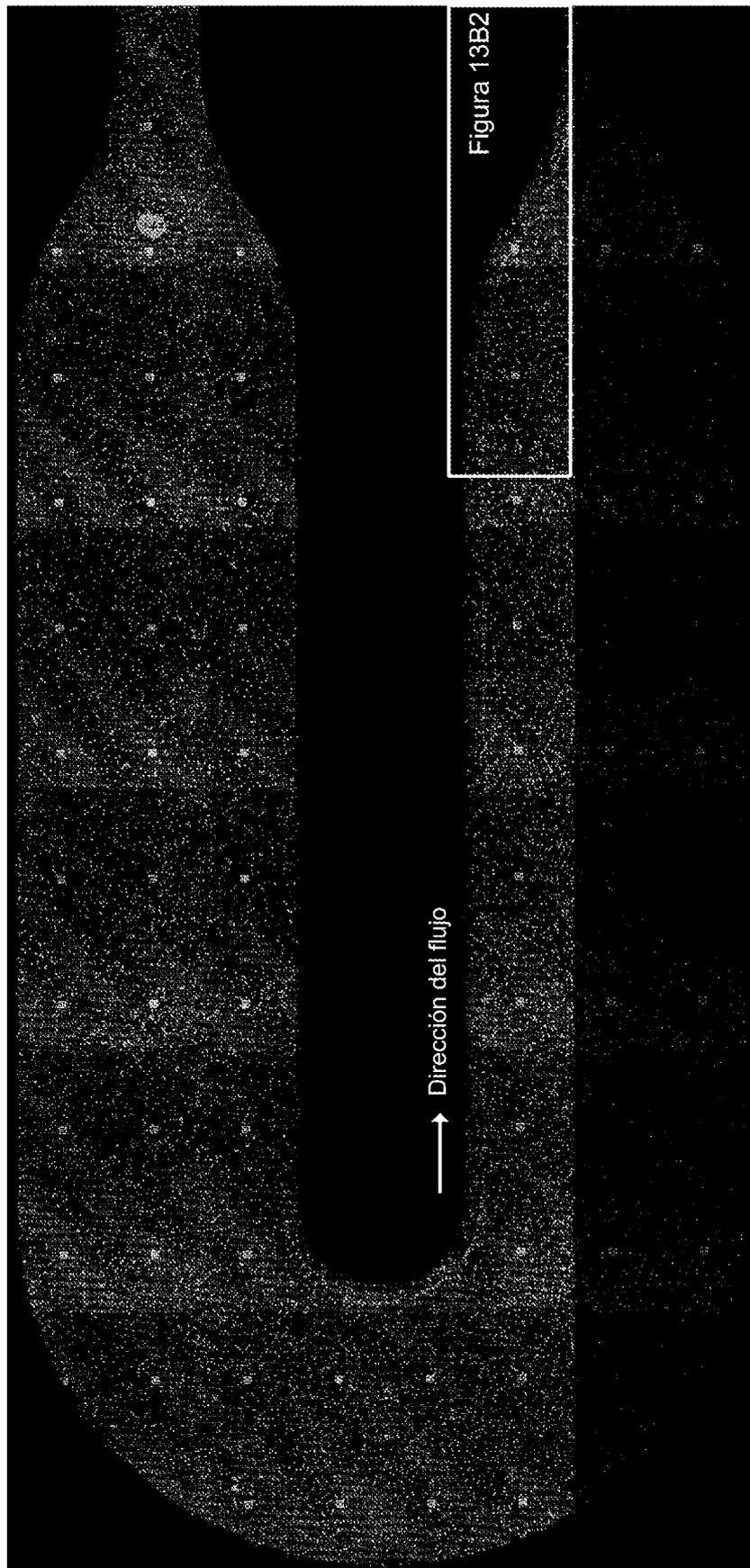


Figura 13B1

Menos agregaciones de perlas en los límites del canal flúidico

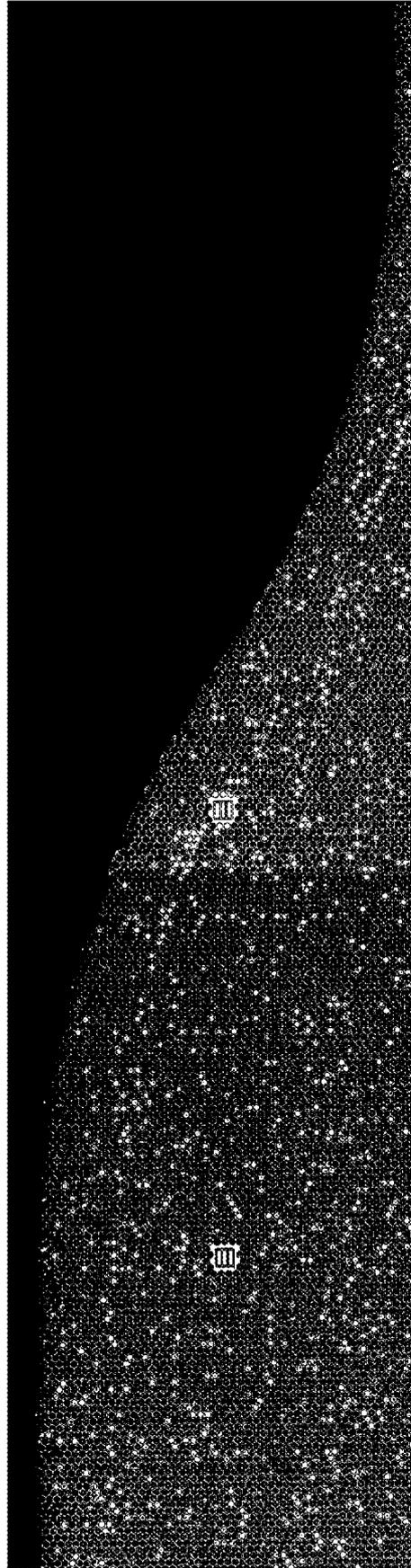


Figura 13B2

Desplazamiento de 1000 μm

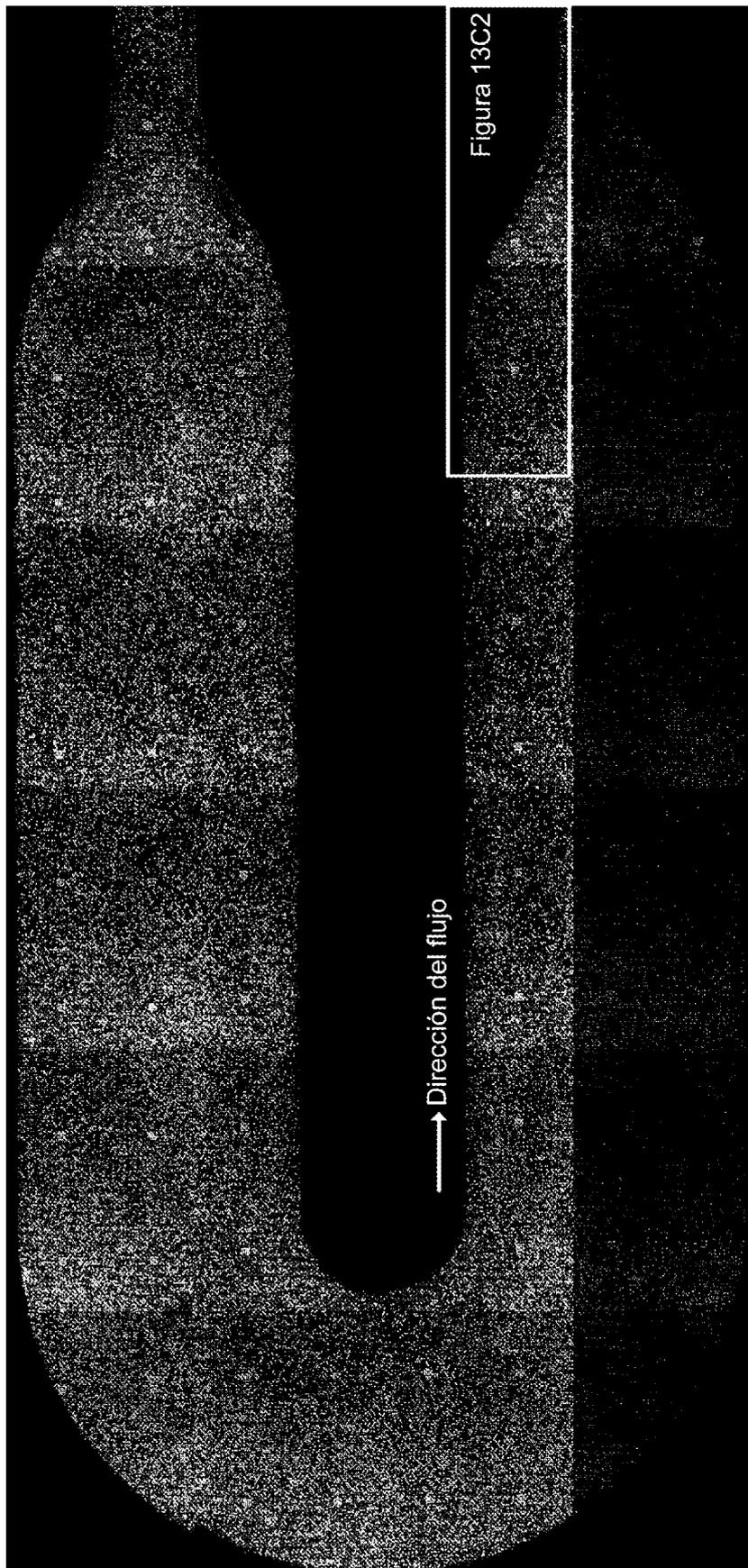


Figura 13C1

Menos agregaciones de perlas en los límites del canal fluidoico

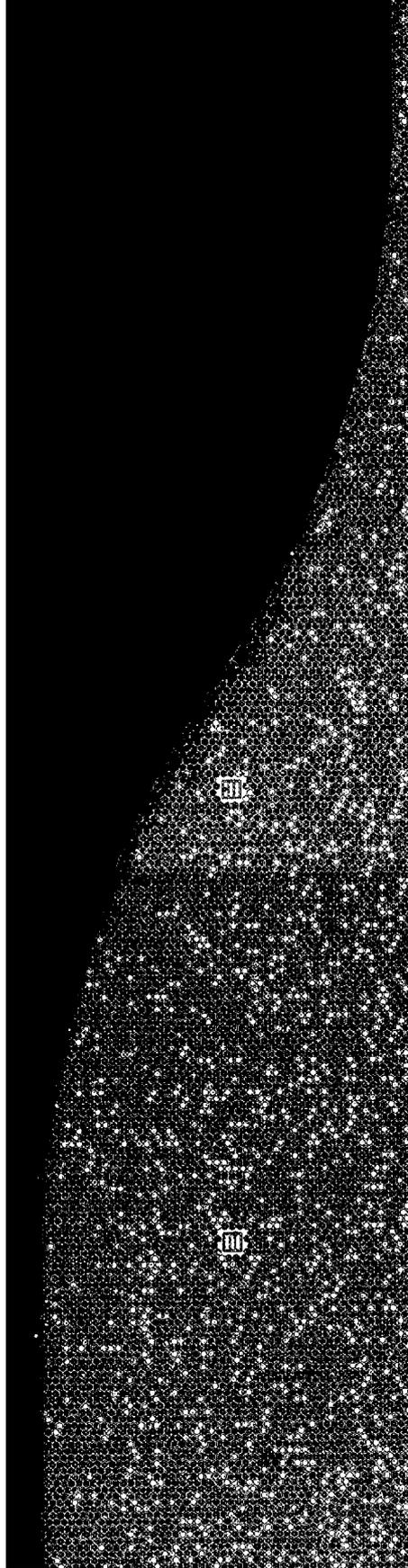


Figura 13C2

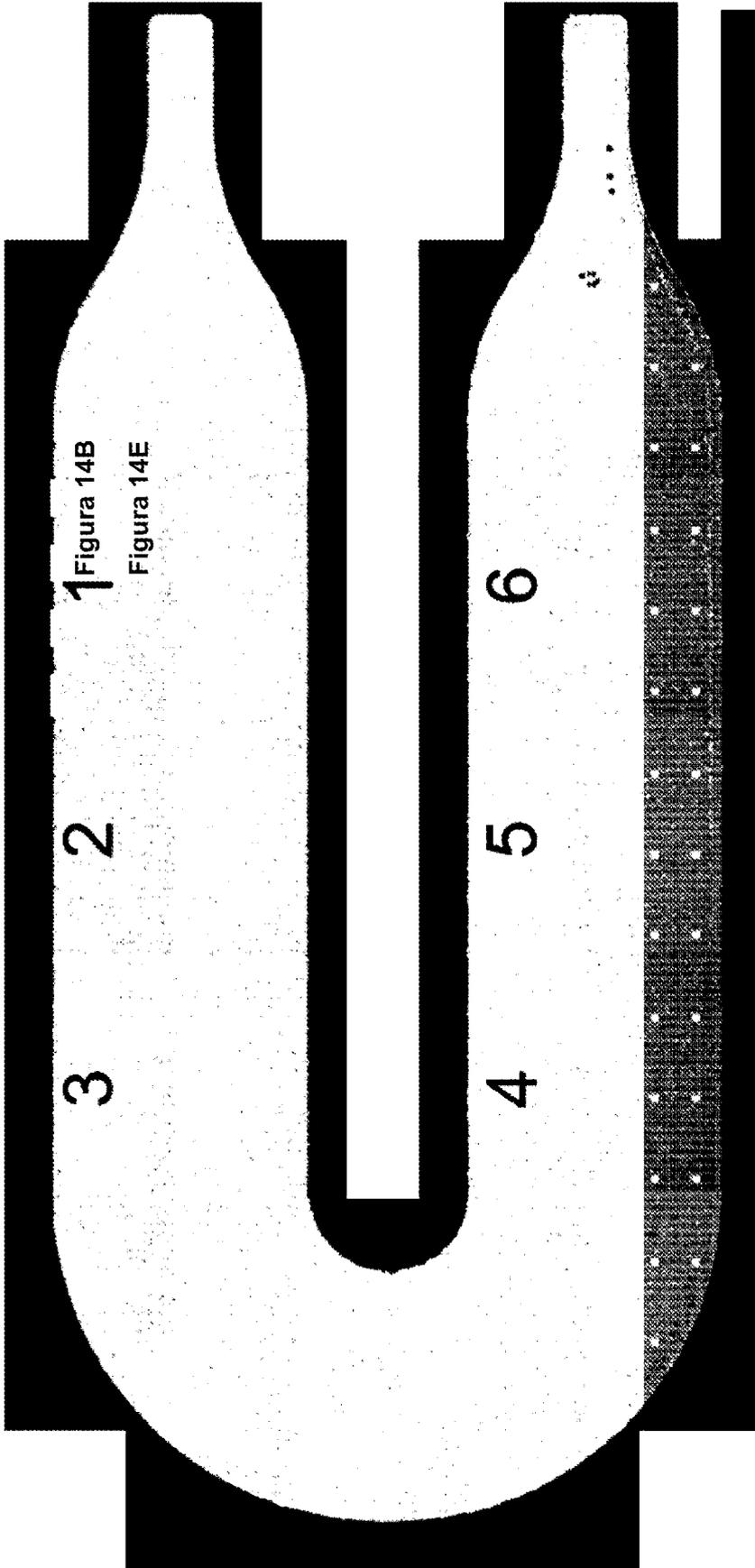


Figura 14A

Figura 14B

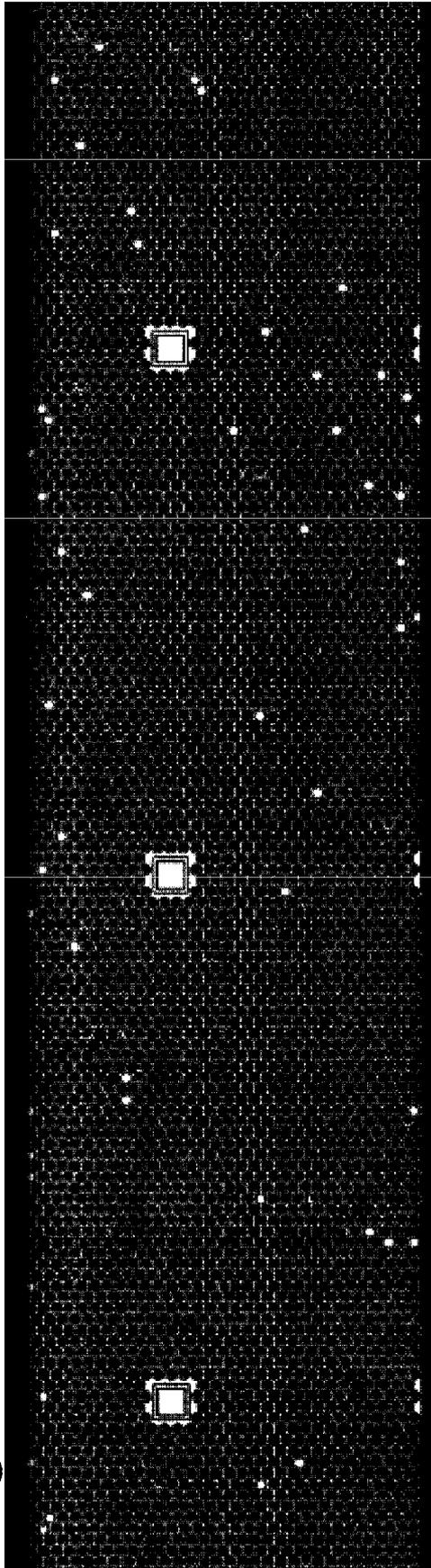
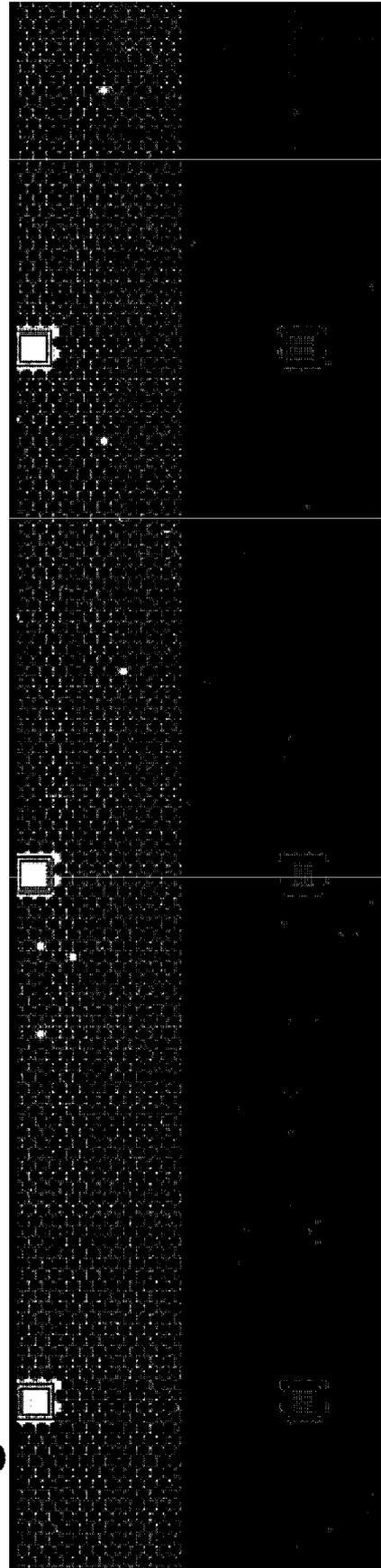
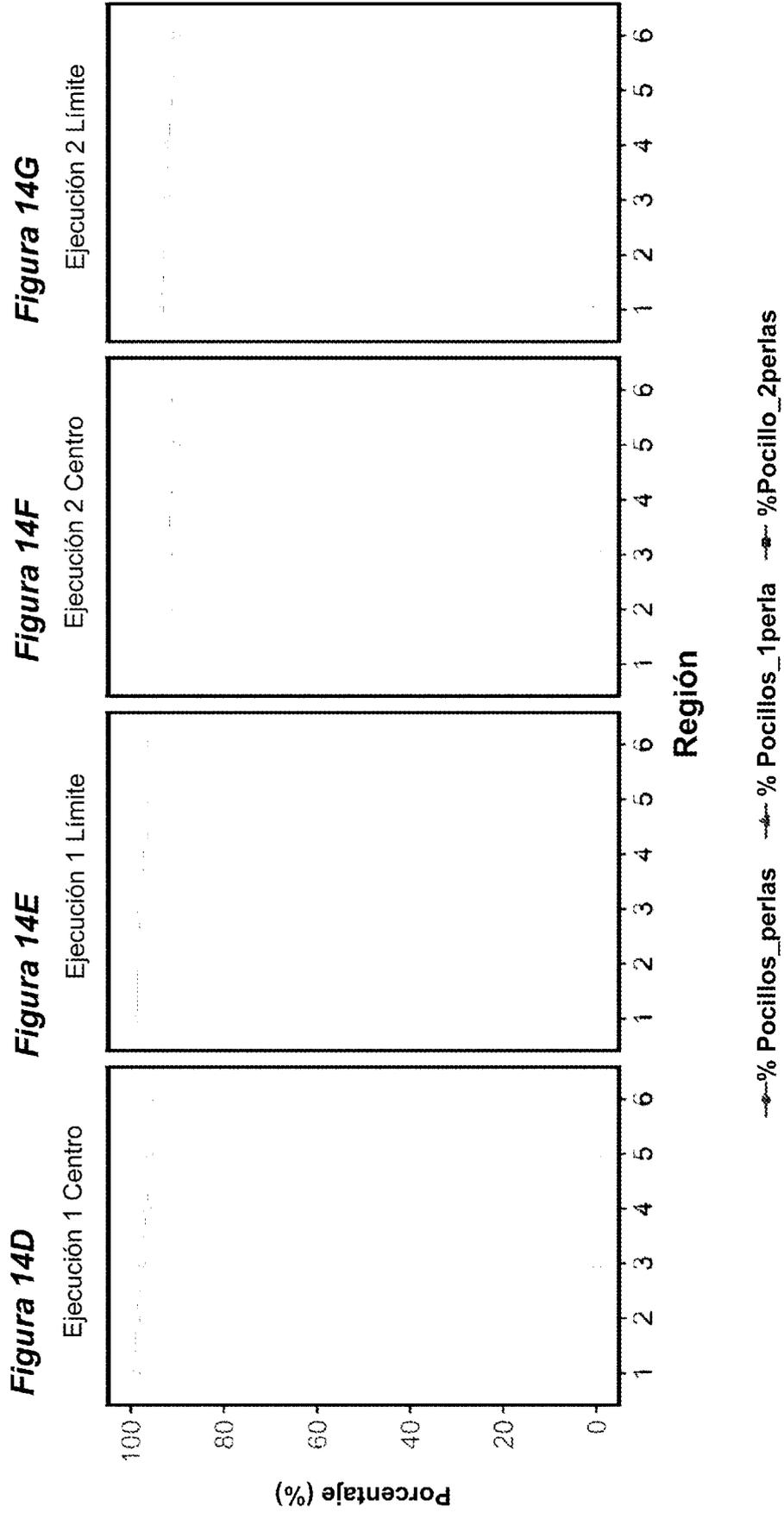


Figura 14C





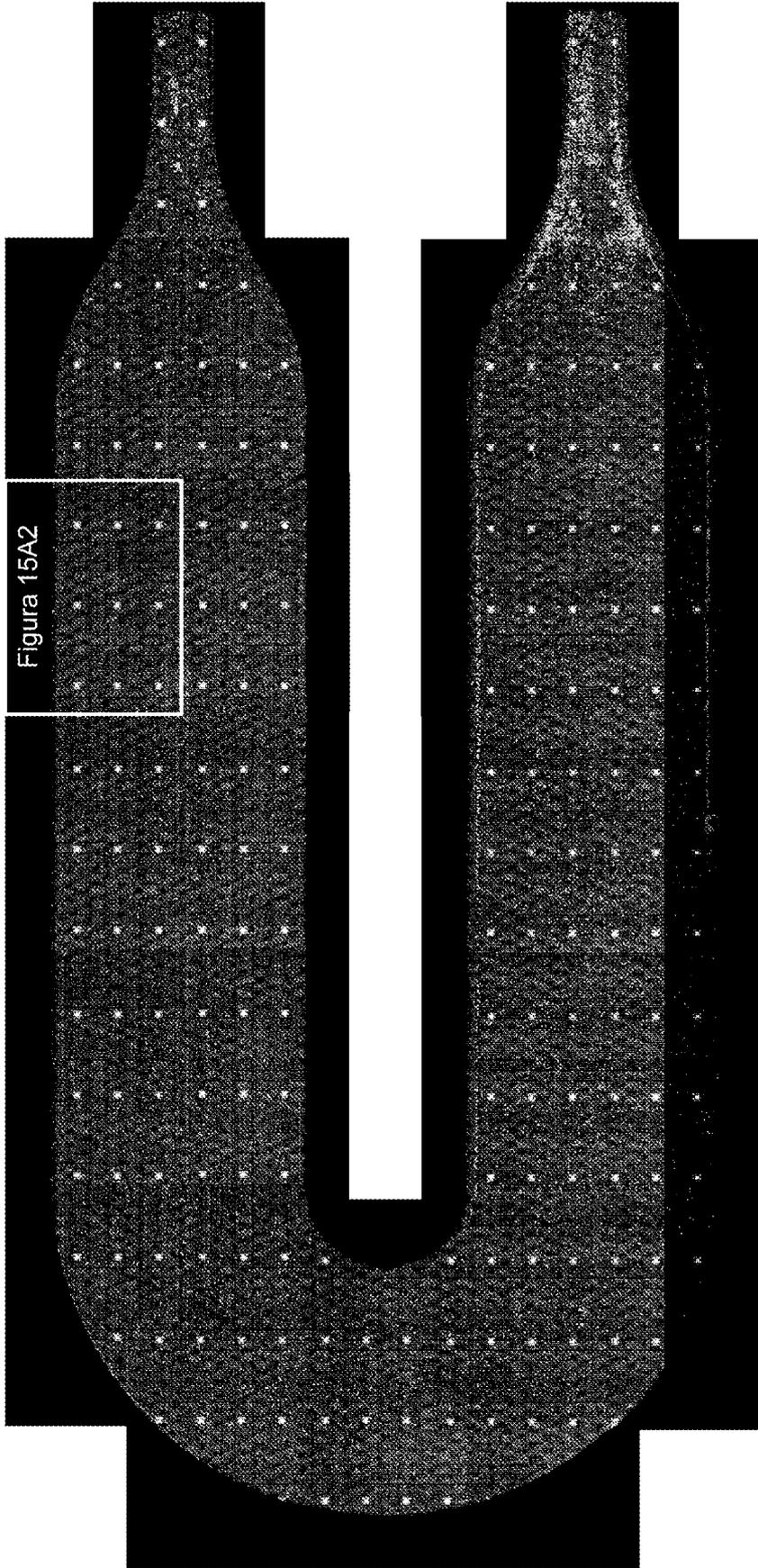


Figura 15A2

Figura 15A1

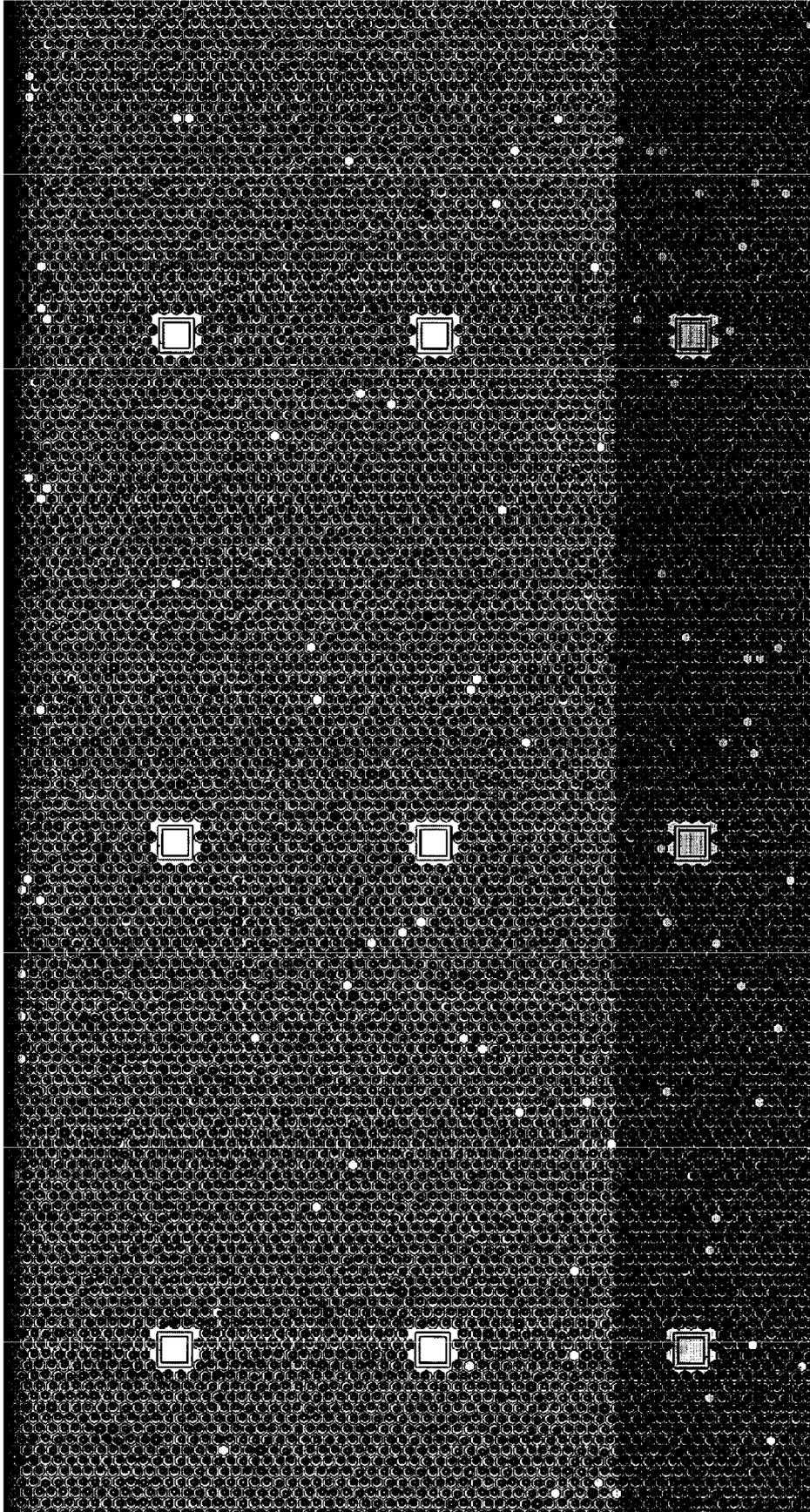


Figura 15A2

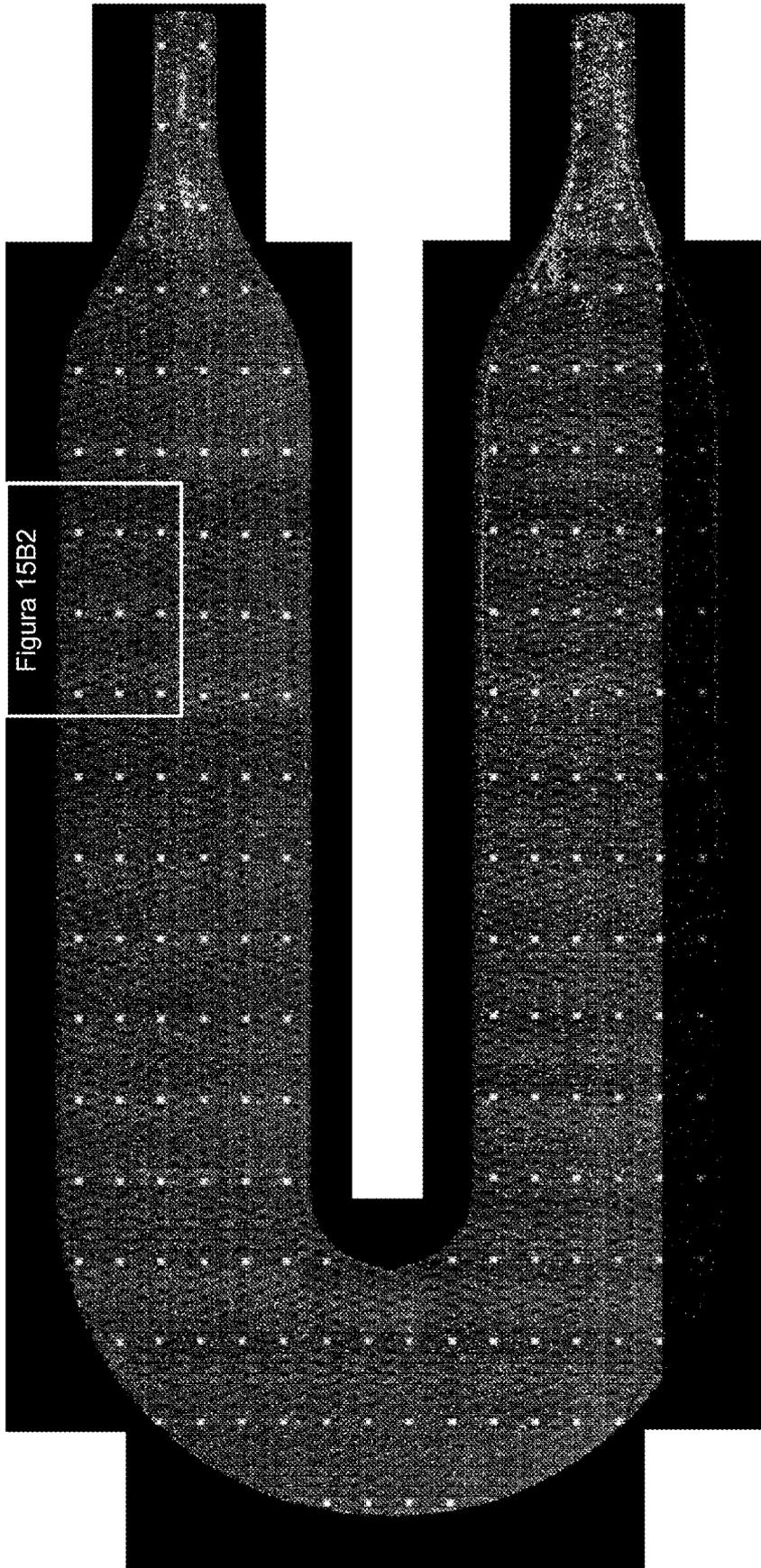


Figura 15B1

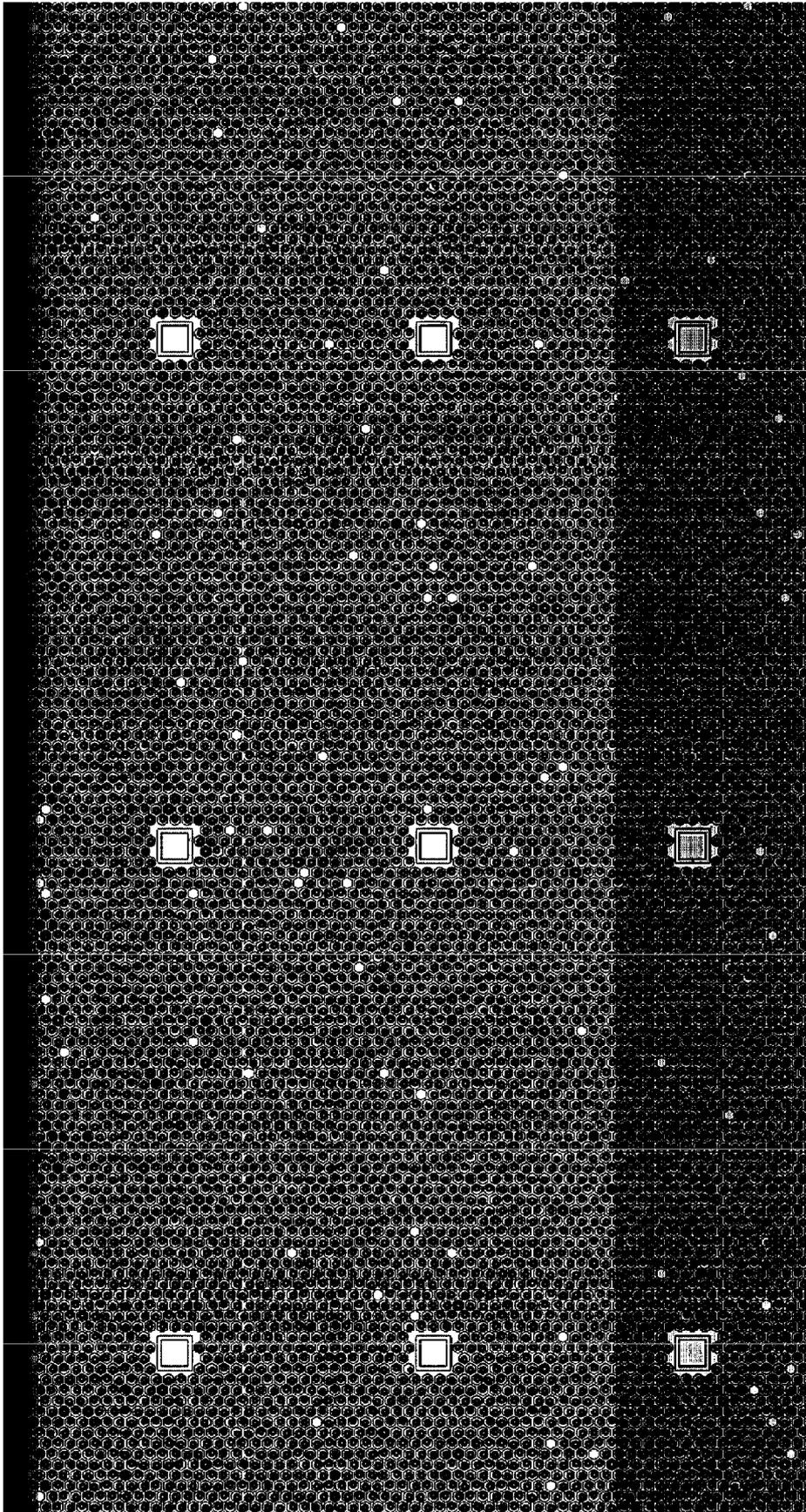


Figura 15B2

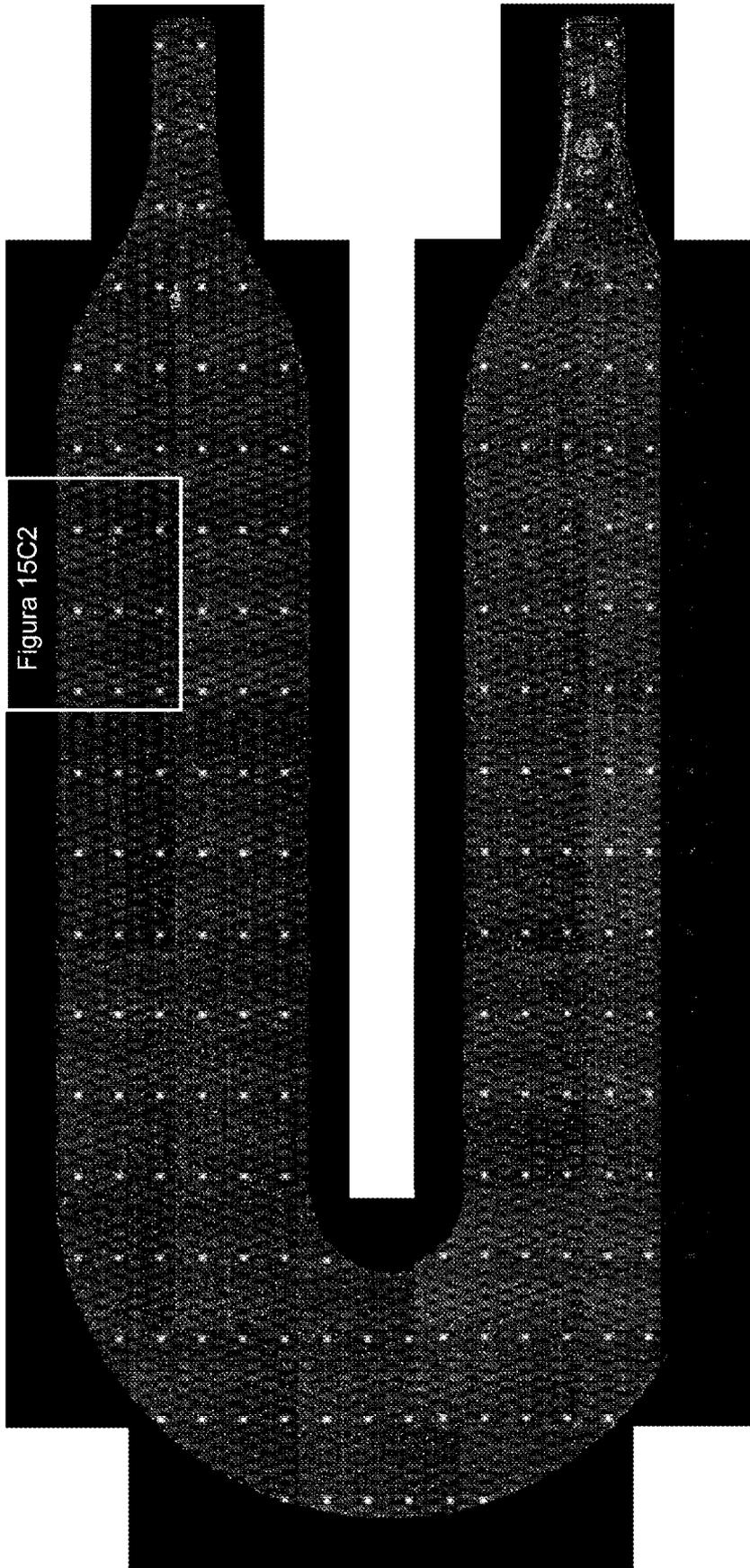


Figura 15C2

Figura 15C1

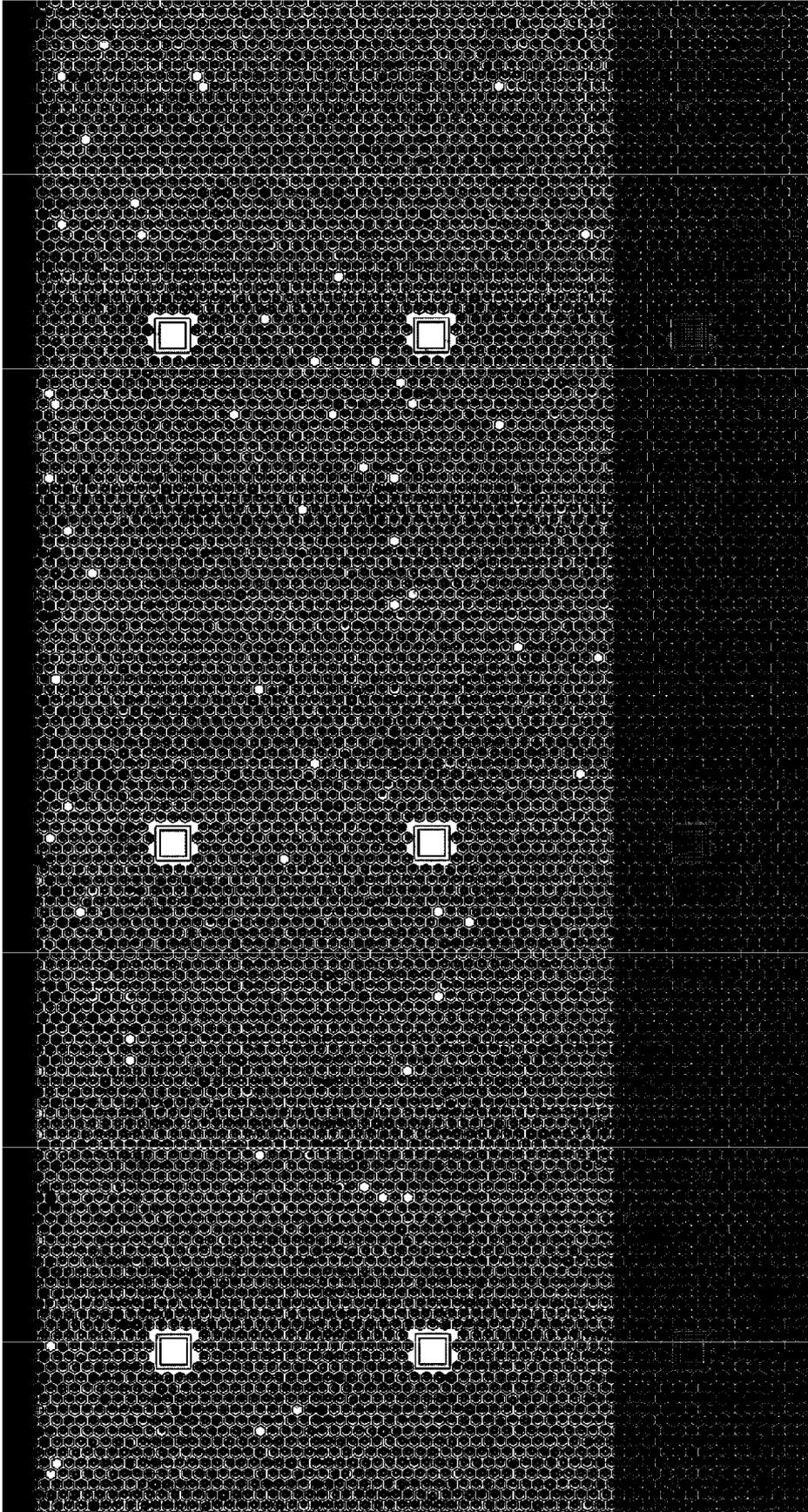


Figura 15C2

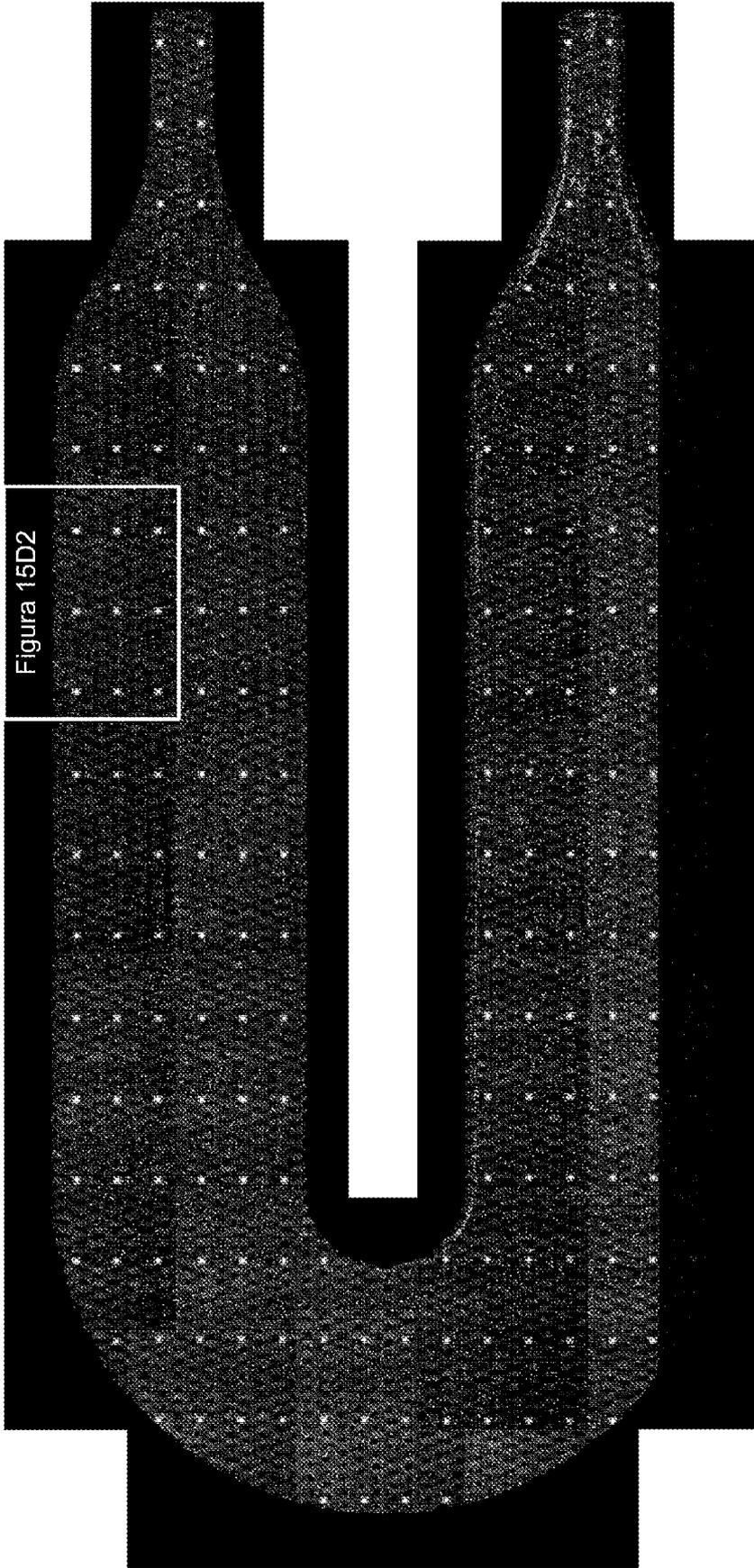


Figura 15D1

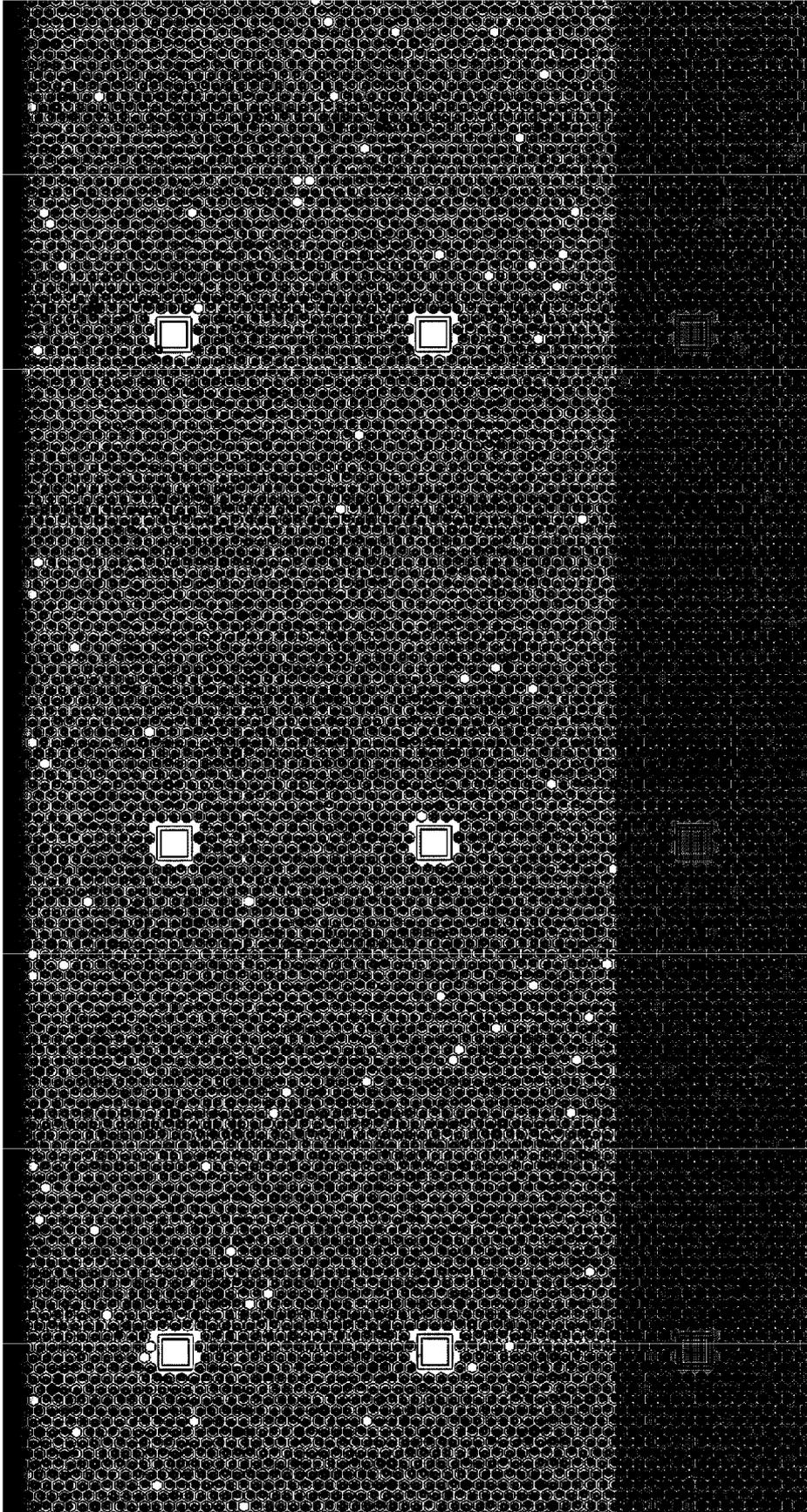


Figura 15D2

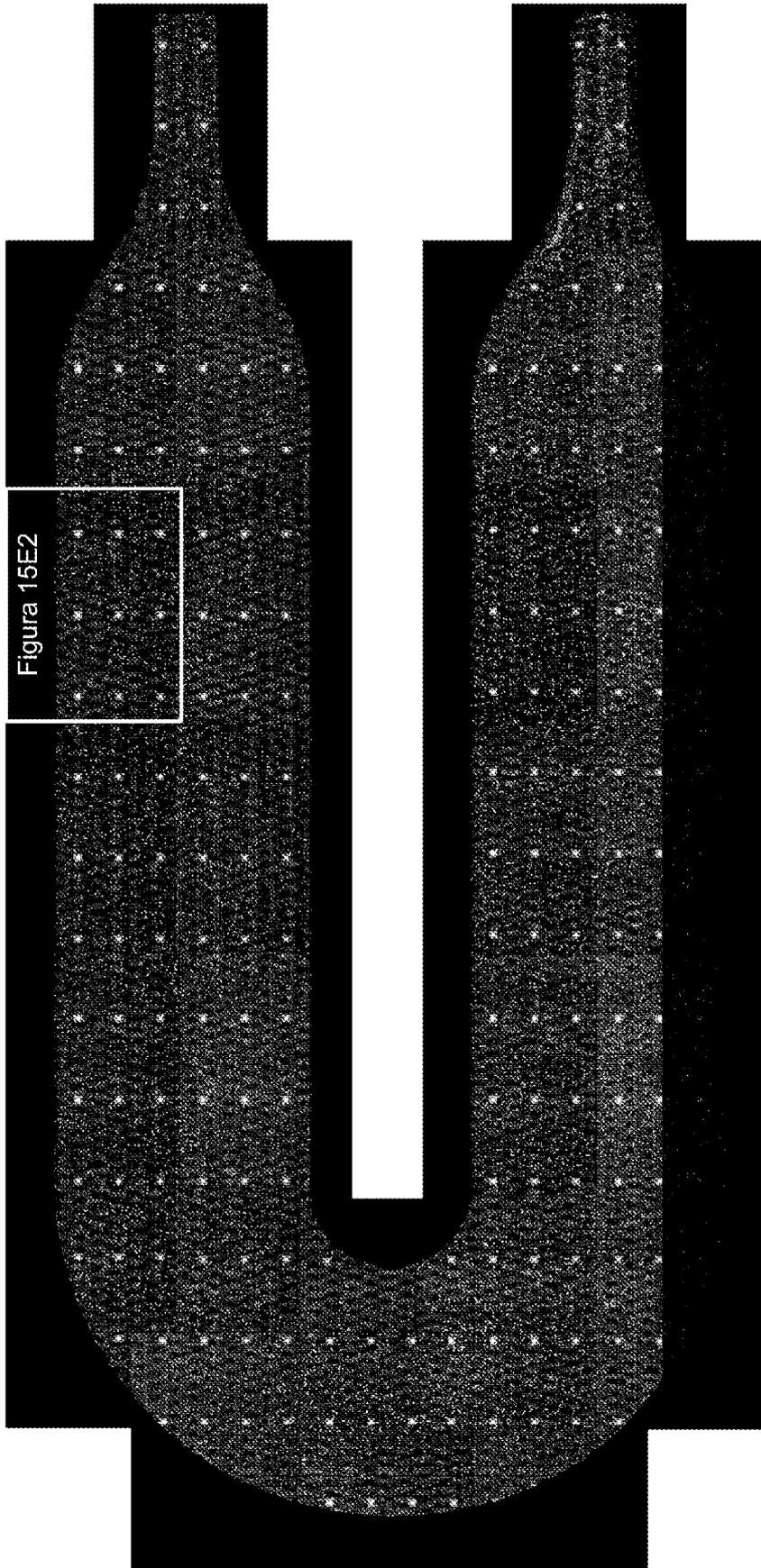


Figura 15E2

Figura 15E1

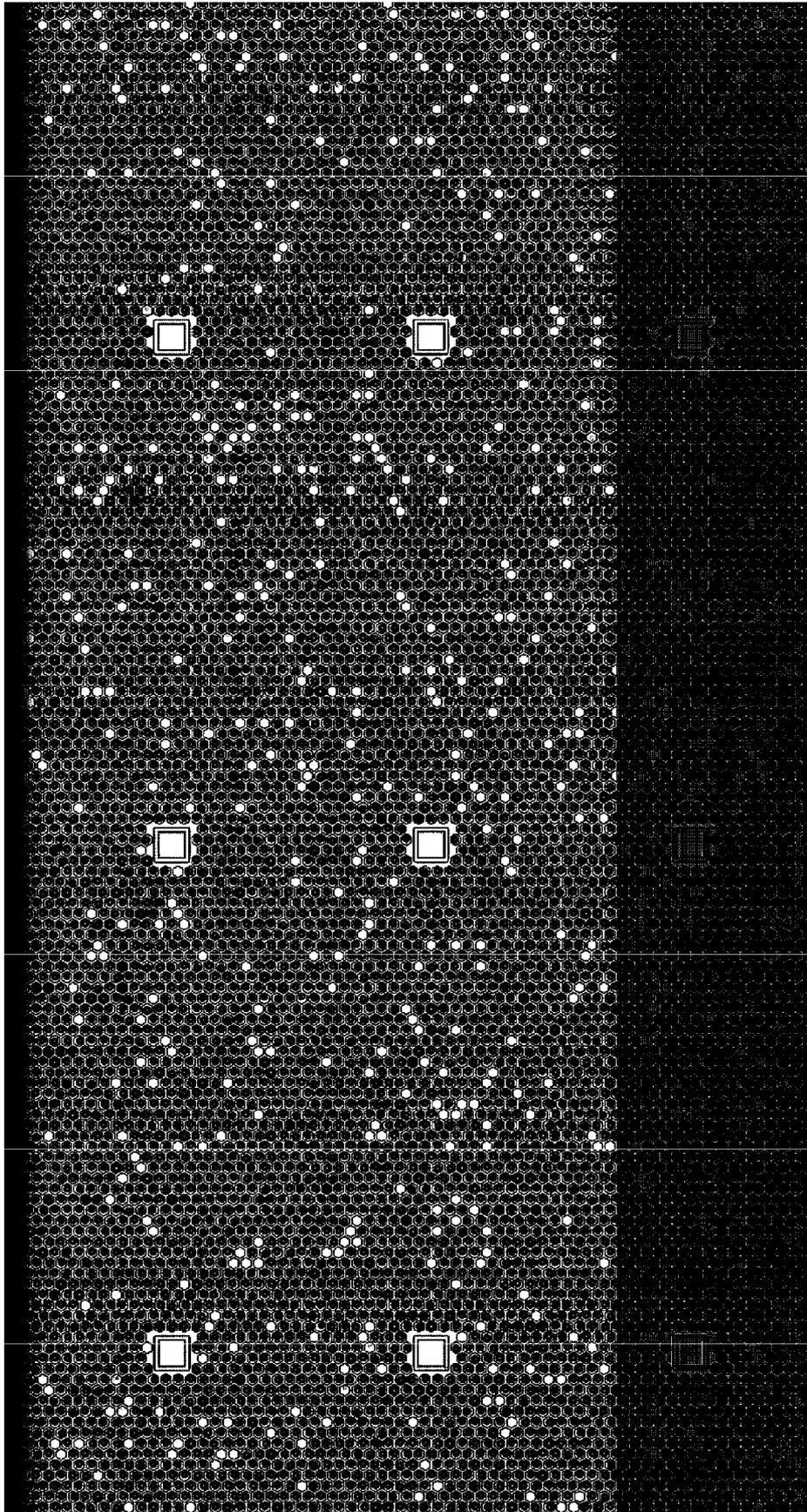


Figura 15E2

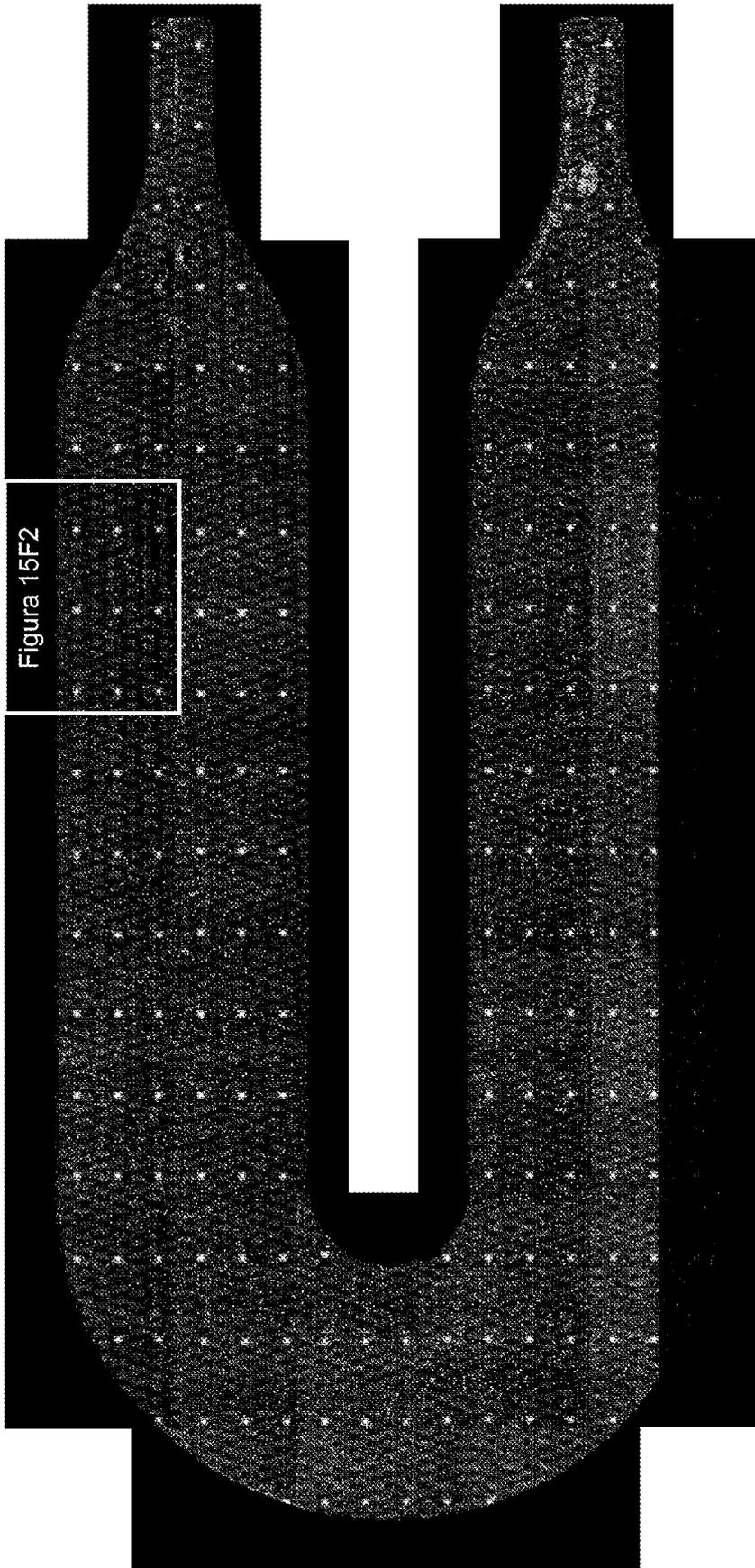


Figura 15F1

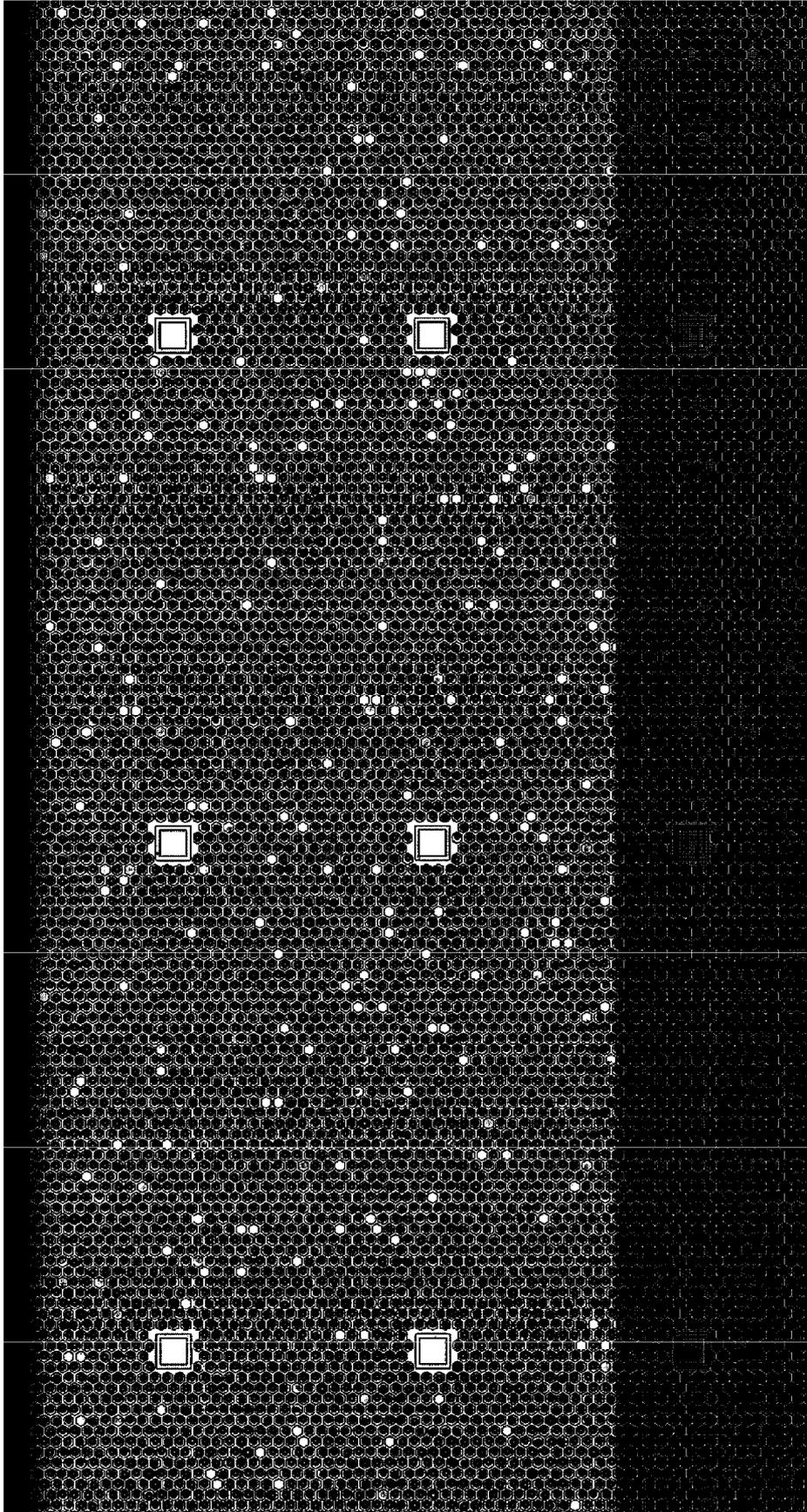


Figura 15F2

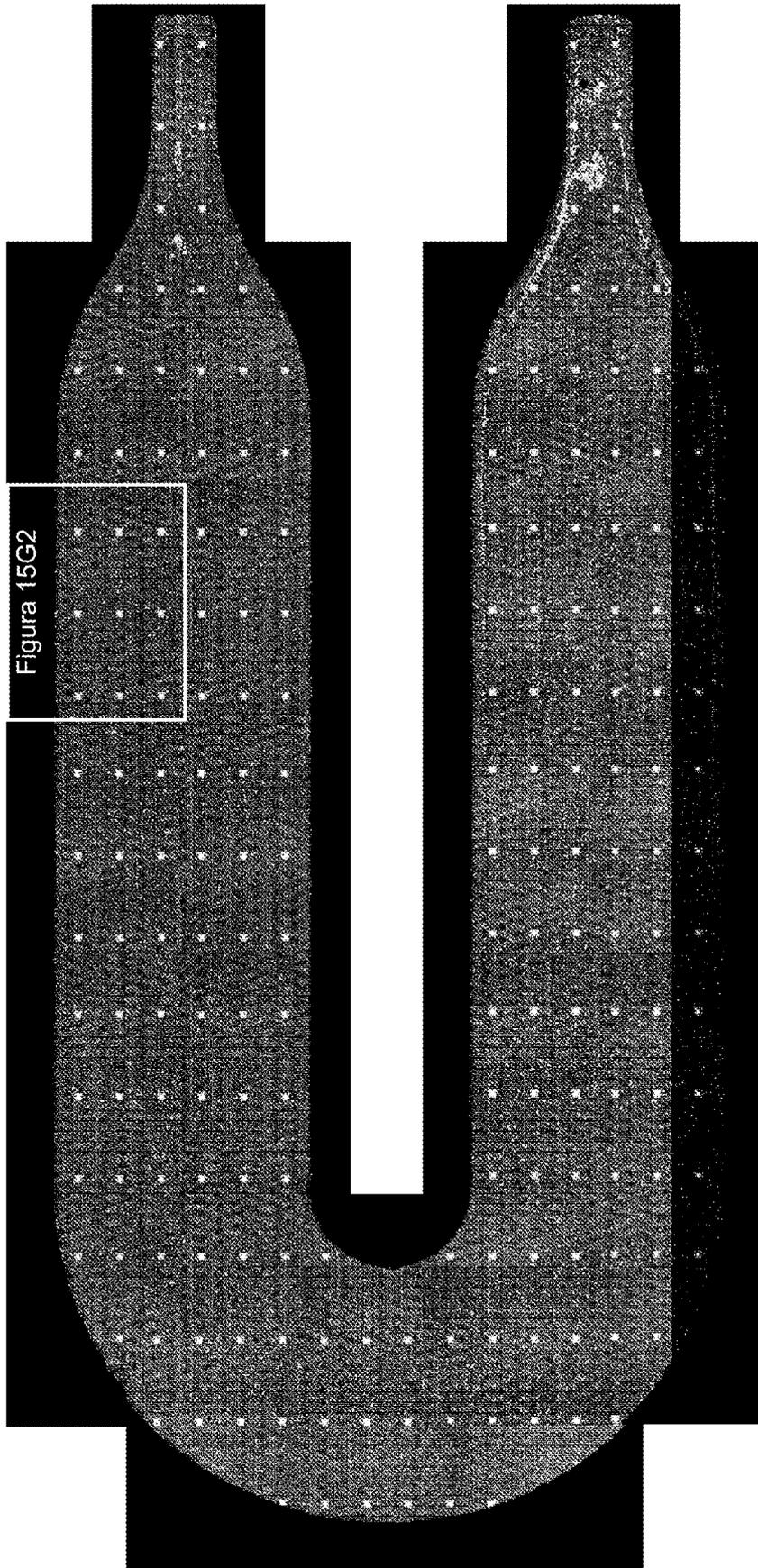


Figura 15G1

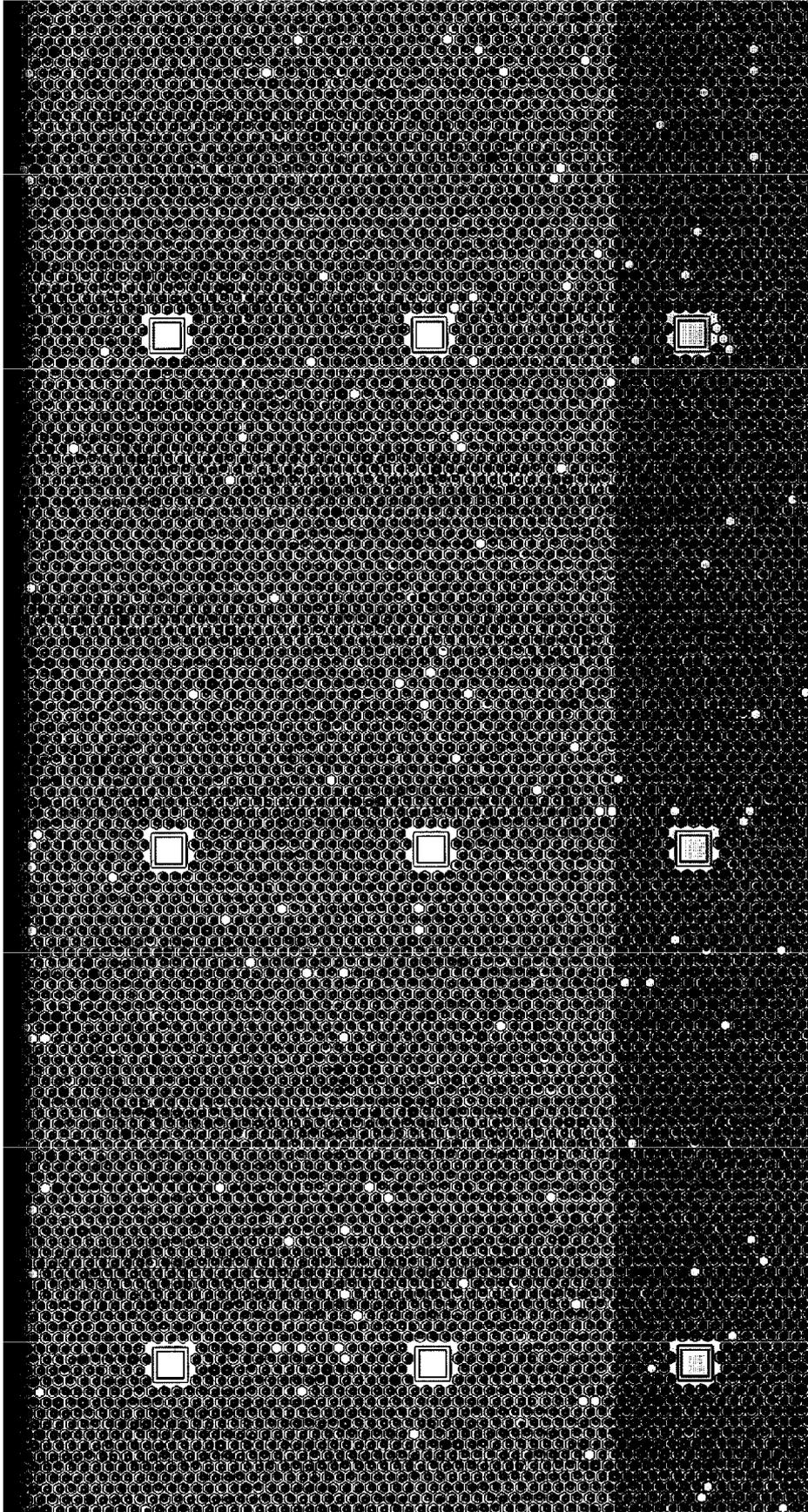


Figura 15G2

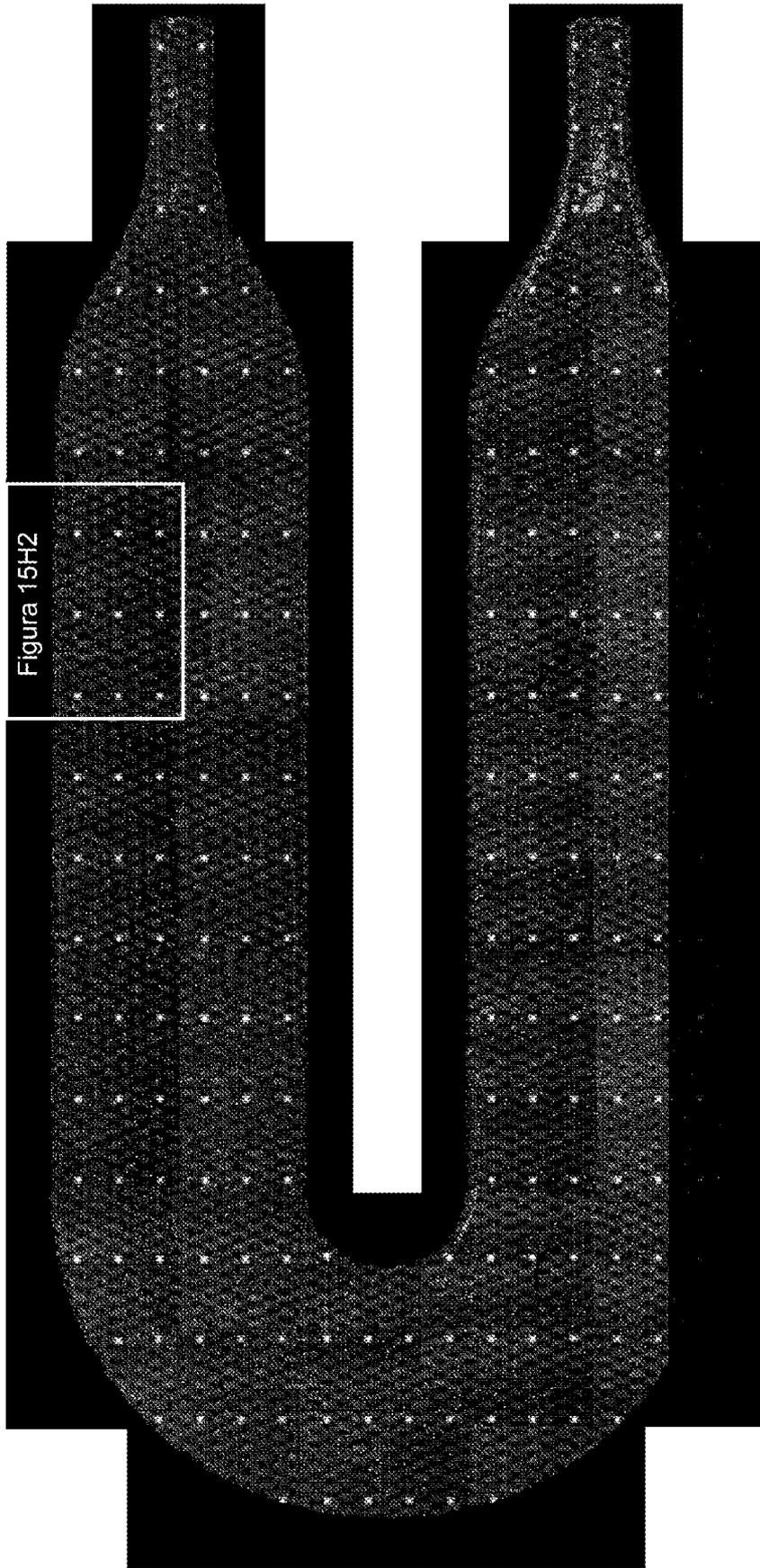


Figura 15H1

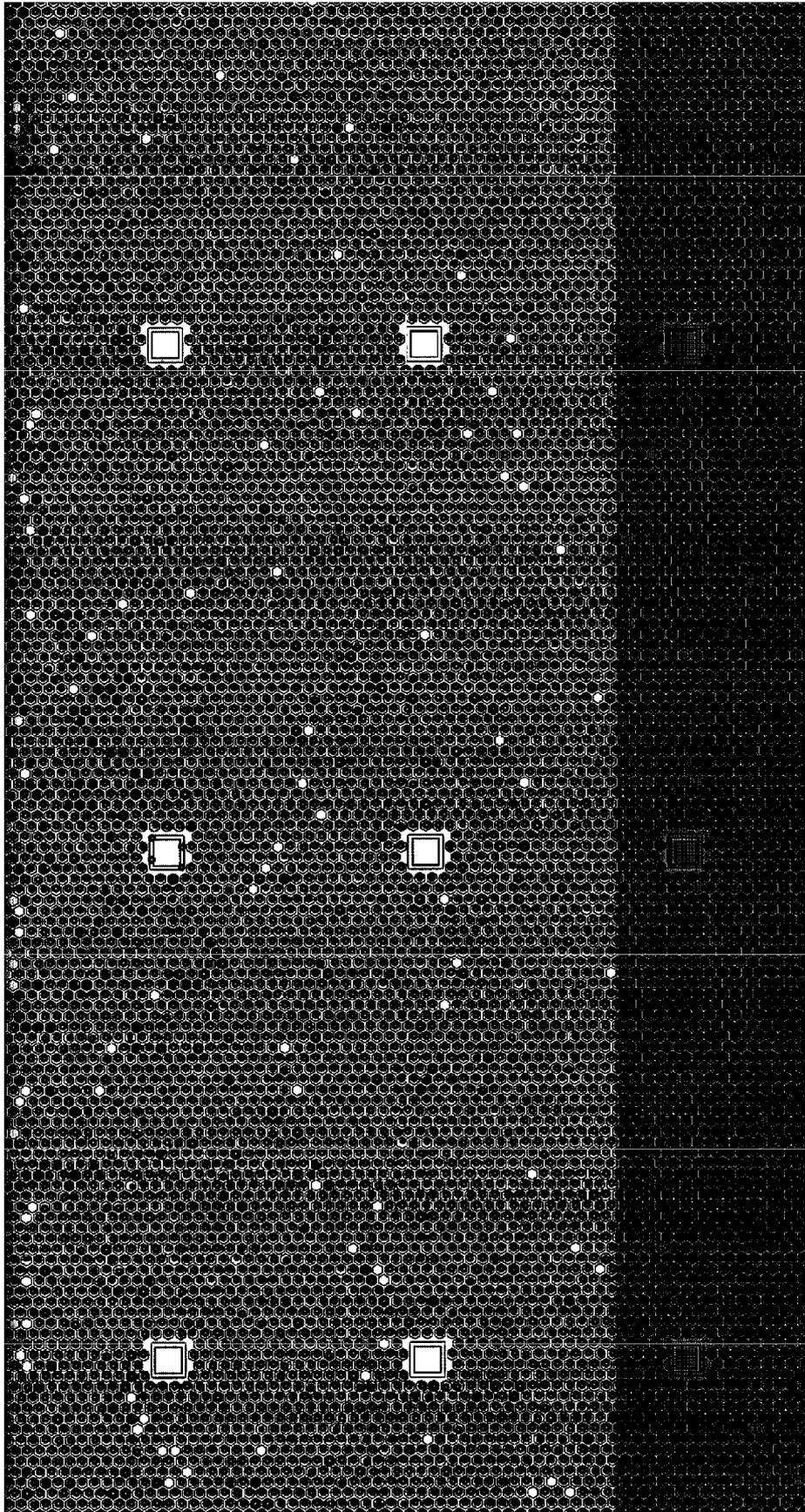


Figura 15H2

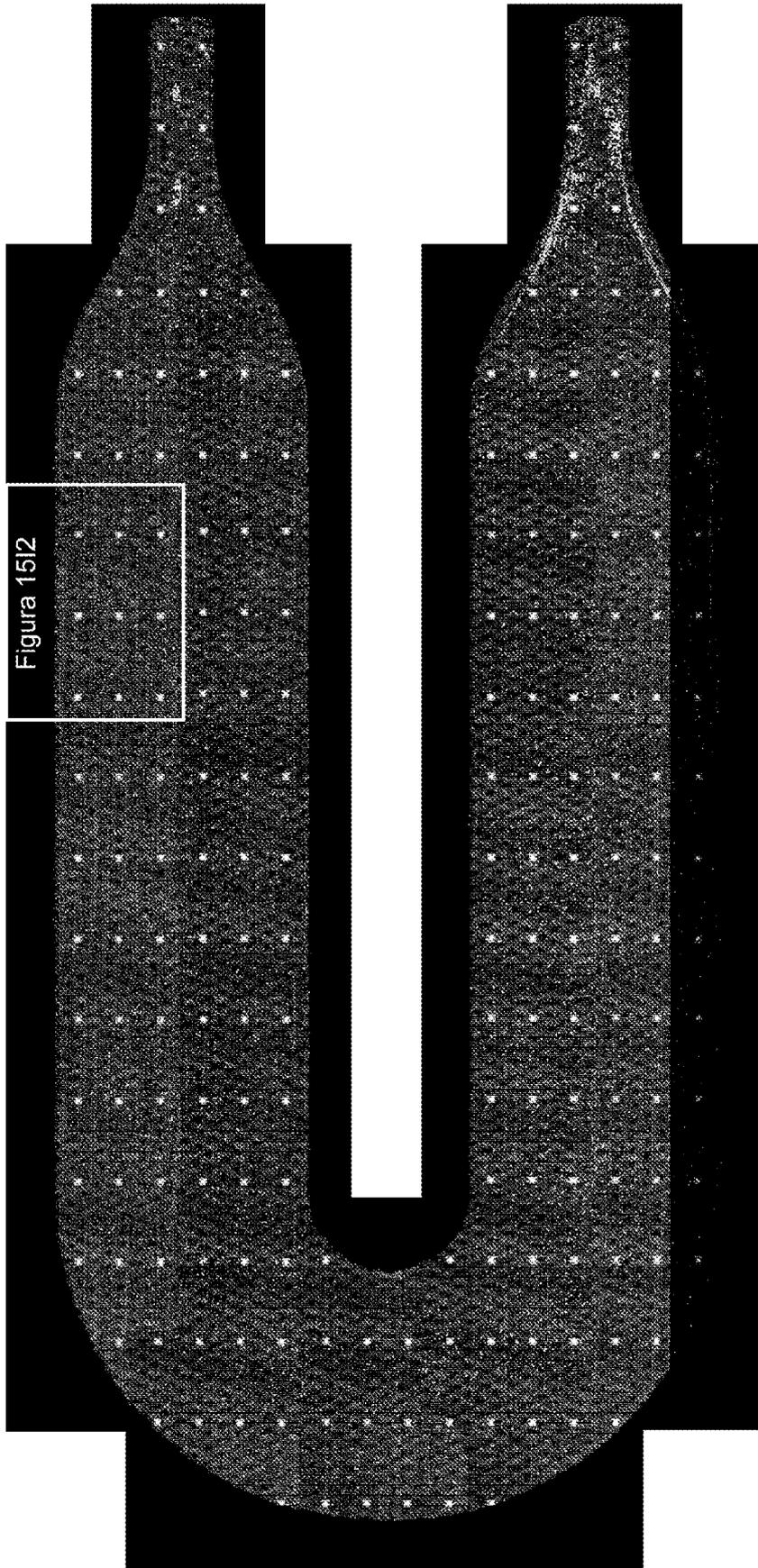


Figura 1511

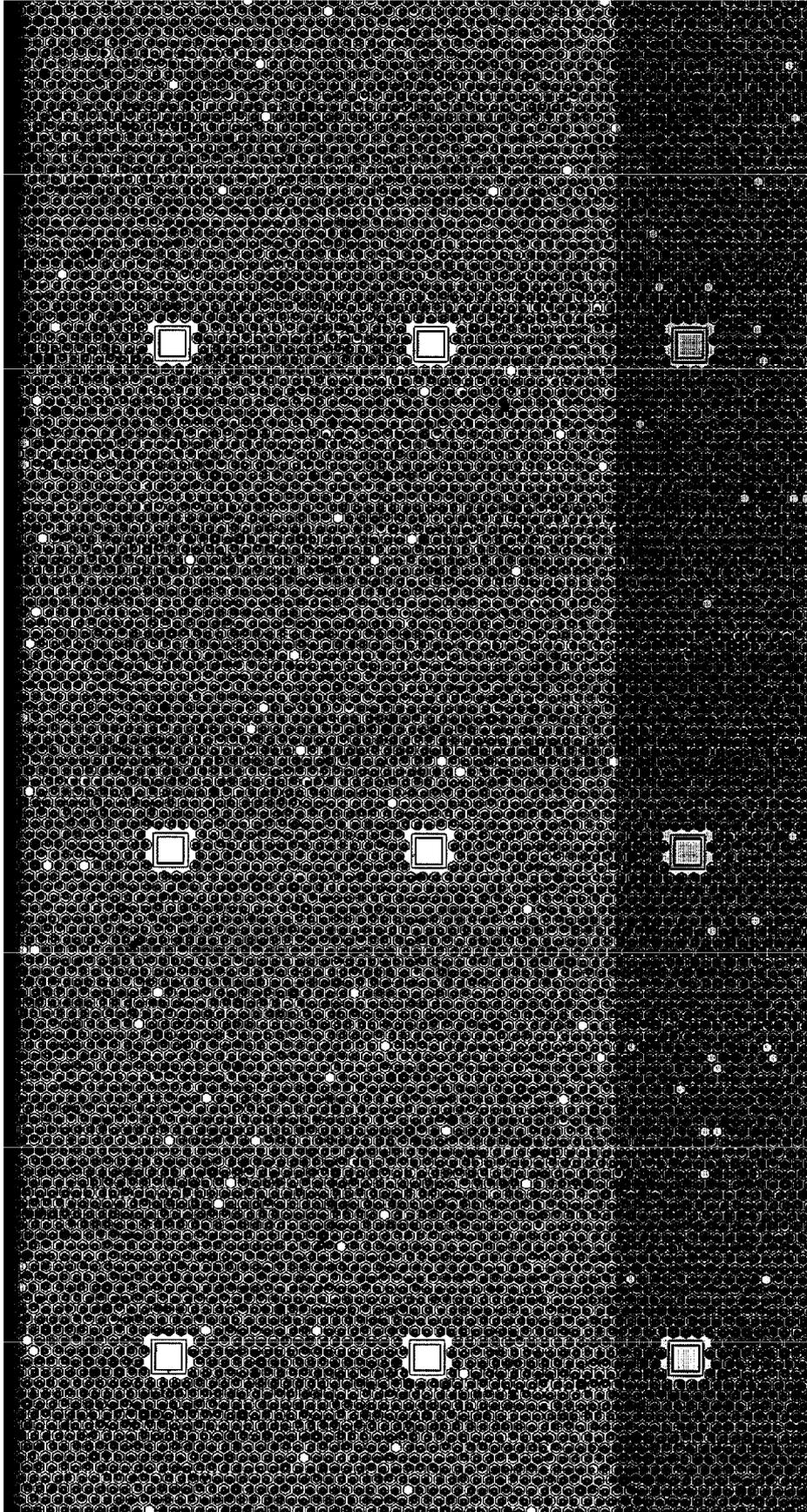


Figura 15I2

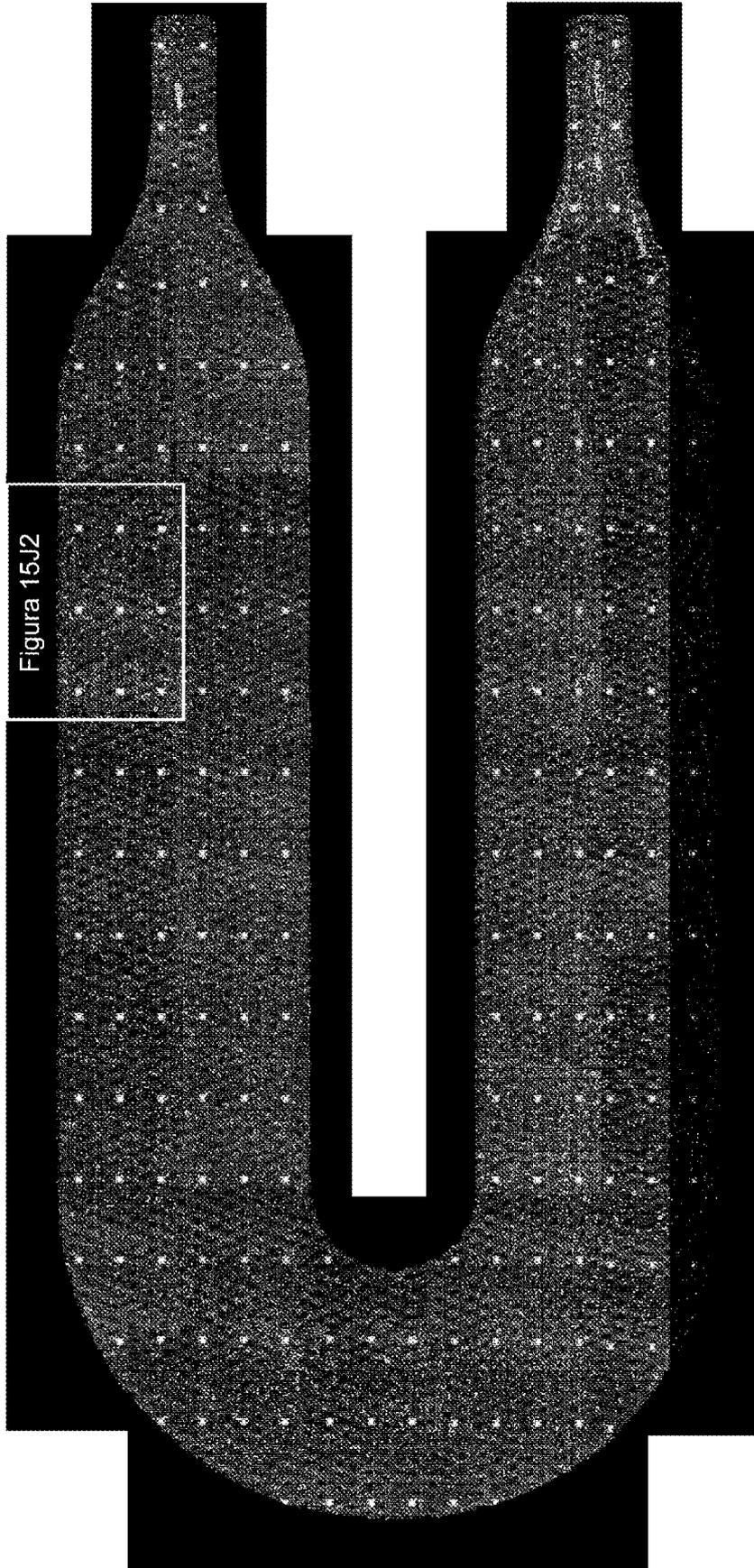


Figura 15J2

Figura 15J1

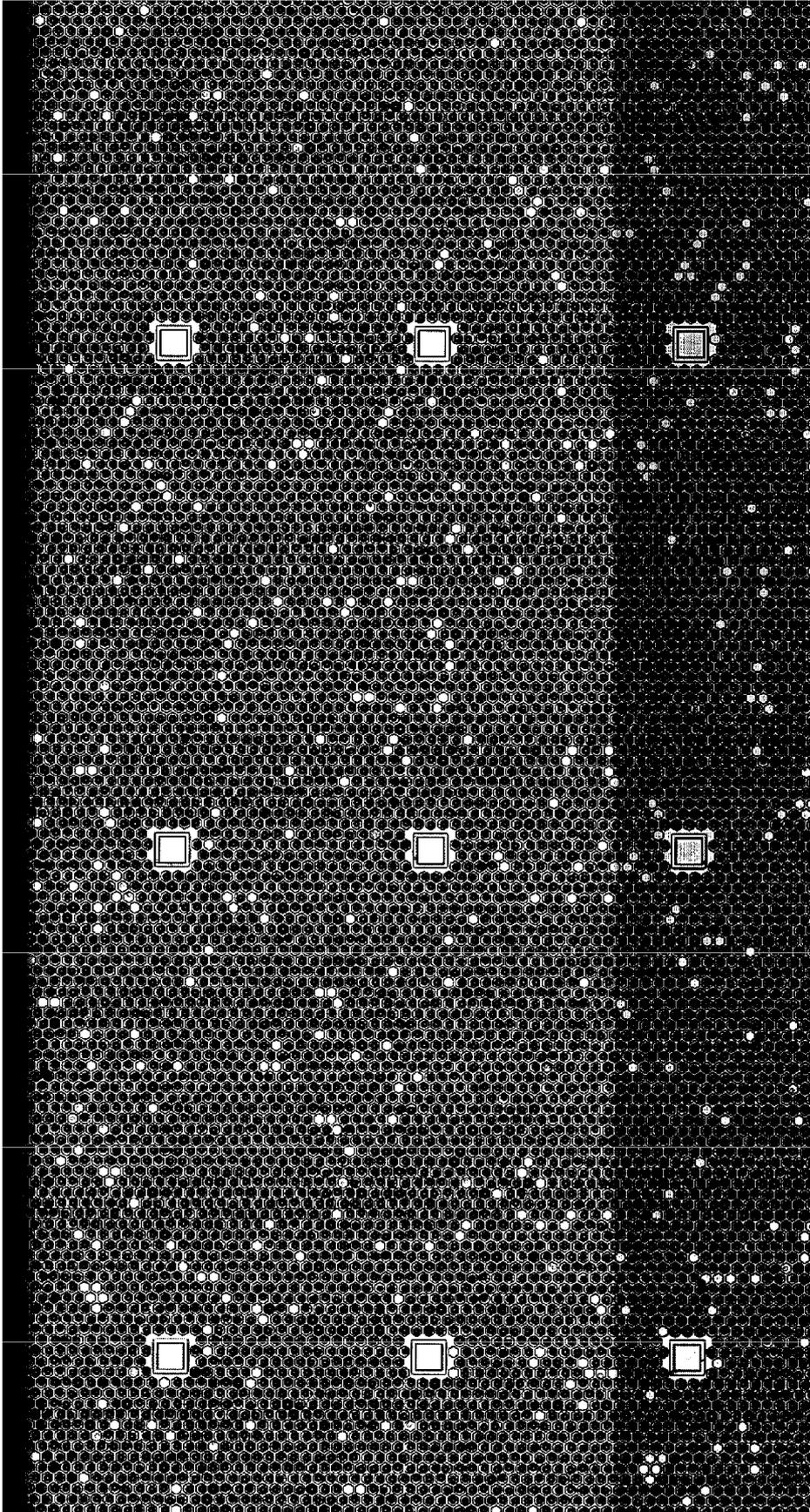


Figura 15J2

Figura 16A

Lavado de perlas: % de pocillos con perlas

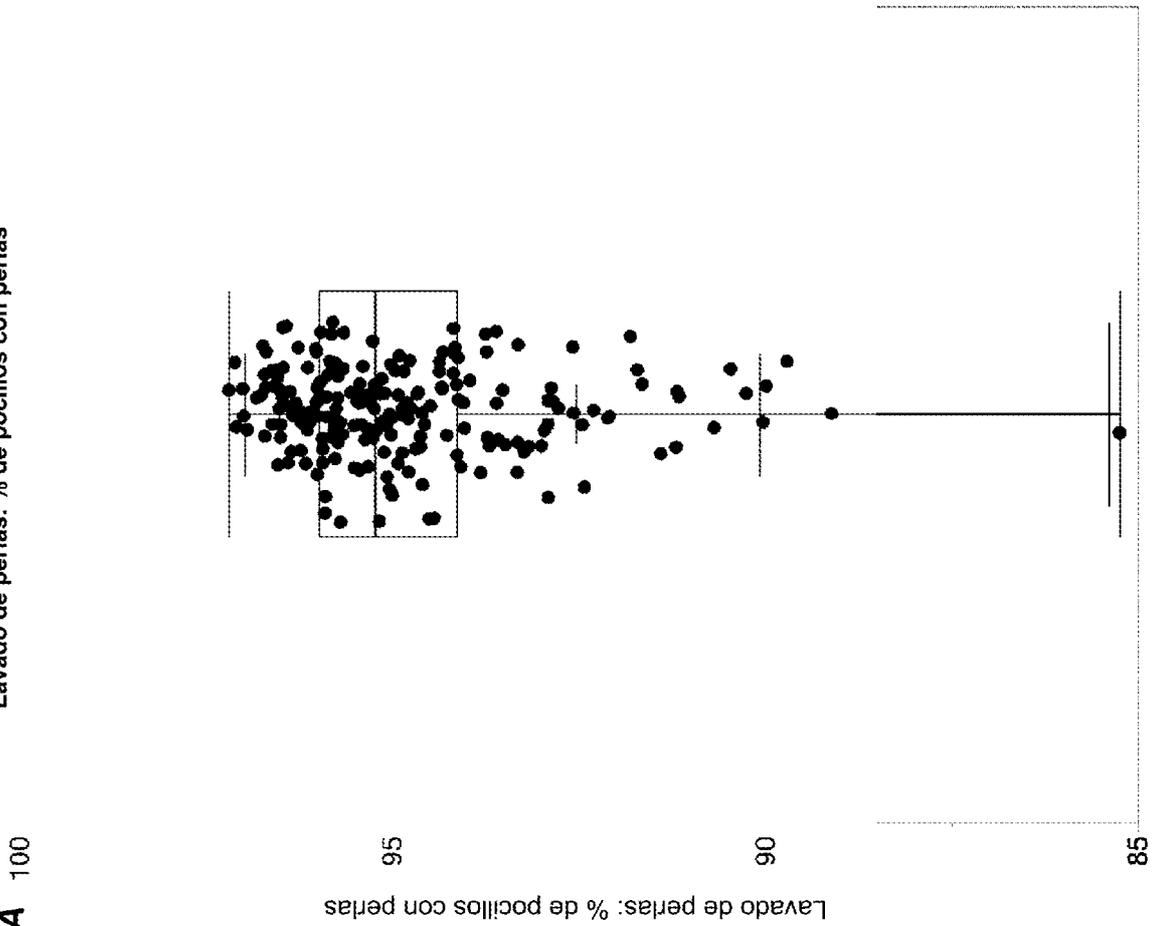


Figura 16B

Lavado de perlas: % de pocillos con perlas

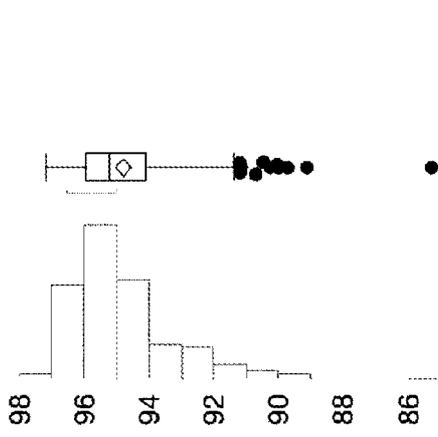


Figura 16C

Cuantiles

100,0%	máximo	97,161206
99,5%		97,15801523
97,5%		96,954977694
90,0%		96,494118706
75,0%	cuartil	95,96646987
50,0%	mediana	95,212042
25,0%	cuartil	94,11284871
10,0%		92,522511156
2,5%		90,063815408
0,5%		85,400045063
0,0%	mínimo	85,24584253

Figura 16D

Estadística de resumen

Media	94,790576
Desv estándar	1,7335477
Err. estándar de la media	0,1204899
Media del 95% superior	95,028127
Media del 95% inferior	94,563024
N	207