

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 870**

51 Int. Cl.:

<b>B01F 13/00</b>	(2006.01)
<b>B01L 3/02</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/36</b>	(2006.01)
<b>B01L 7/00</b>	(2006.01)
<b>B01F 3/08</b>	(2006.01)
<b>B01L 3/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2011 PCT/IE2011/000040**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12011091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011 E 11804823 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2595754**

54 Título: **Células de líquido compuesto**

30 Prioridad:

**01.04.2011 US 201161470515 P**  
**01.04.2011 US 201161470520 P**  
**22.07.2010 US 344434 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.05.2018**

73 Titular/es:

**GENCELL BIOSYSTEMS LIMITED (100.0%)**  
**Ballycummin Avenue Raheen Business Park**  
**Raheen, Limerick, IE**

72 Inventor/es:

**CURRAN, KIERAN;**  
**TUOHY, PATRICK;**  
**ROSCA, INGA;**  
**FLEMING, PAUL;**  
**GILHOOLEY, SEAMUS y**  
**KEANE, MICHEÁL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 669 870 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**

Células de líquido compuesto.

Antecedentes

5 Actualmente, el procesamiento de muestras de bioquímica tiene una serie de inconvenientes clave. Estos incluyen el tamaño del volumen, lo que da como resultado altos costos de reactivos; altos costos de consumibles; y protocolos y procesos intensivos en mano de obra que son muy susceptibles a la contaminación cruzada. Por estas razones, actualmente no se puede garantizar el control y aislamiento completo de cada muestra individual dentro del proceso bioquímico.

10 Para numerosas aplicaciones de procesos bioquímicos (preparación de microesferas de secuencia, pirosecuenciación, ligadura de ácidos nucleicos y reacción en cadena de la polimerasa) y no limitadas a estas, son evidentes las limitaciones del tamaño del volumen, costo de la química, costo de mano de obra y la eficiencia de reacción.

15 La preparación de microesferas de secuencia es un proceso mediante el cual se recubren microesferas pequeñas en una química específica de la aplicación. Por ejemplo, en la replicación del ADN, las microesferas se recubren inicialmente con cebadores de ADN antes del proceso de amplificación. Incluso para los secuenciadores de última generación de la actualidad se requiere una concentración local relativamente alta de la molécula diana para secuenciar con precisión. Las estimaciones actuales para un protocolo típico estiman que solo el 80% de las microesferas procesadas están suficientemente recubiertas para garantizar una secuenciación precisa. Por lo tanto, para garantizar una concentración relativamente alta de la muestra diana, se debe usar una gran cantidad de  
20 microesferas para lograr una precisión estadística. Además, la transferencia de microesferas revestidas uniformes de un pocillo a otro conduce inevitablemente a pérdidas tanto de las microesferas como del fluido suspendido. Esto es el resultado de los volúmenes muertos y las ineficiencias inherentes en los sistemas actuales de pipeteo y manejo de líquidos. Este proceso bioquímico se realiza generalmente en placas estáticas de 96 o 384 pocillos con volúmenes típicos que varían de 10 microlitros a 200 microlitros.

25 Otro proceso bioquímico, pirosecuenciación, mezcla una concentración relativamente alta de ácido nucleico con microesferas recubiertas con cebador. Los ácidos nucleicos se unen y forman una colonia clonal en las microesferas. Esto luego se amplifica utilizando PCR basada en emulsión. La máquina de secuenciación contiene una gran cantidad de pocillos con volumen de picolitros que son lo suficientemente grandes para una sola perla junto con las enzimas relevantes requeridas para la secuenciación. La pirosecuenciación utiliza la enzima luciferasa para  
30 generar luz como lectura, y la máquina de secuenciación toma una imagen de los pocillos por cada nucleótido agregado. Una de las dificultades clave en este proceso es el revestimiento eficiente de las microesferas con imprimadores. Un porcentaje de microesferas que utilizan las tecnologías actuales no se recubre adecuadamente con la química de cebadores, lo que da como resultado una menor eficiencia de reacción. El uso de las tecnologías actuales para mejorar la eficiencia del recubrimiento de las microesferas requeriría un aumento insostenible en el  
35 costo del reactivo.

Dentro de la ligadura de ácidos nucleicos surgen problemas similares de procesamiento de la bioquímica. La ligadura de ácidos nucleicos se ha convertido en una herramienta importante en la investigación de la biología molecular moderna para generar secuencias de ácidos nucleicos recombinantes. Por ejemplo, las ligasas de ácido nucleico se usan con enzimas de restricción para insertar fragmentos de ácido nucleico, a menudo genes, en plásmidos para uso en ingeniería genética. La ligadura de ácidos nucleicos es una técnica relativamente frecuente en biología molecular en la que las cadenas cortas de ADN se pueden unir mediante la acción de una enzima llamada ligasa a una temperatura específica, normalmente 16–25 °C, dependiendo del protocolo utilizado. Para unir  
40 más de dos secuencias de cadenas cortas de ADN, por ejemplo en la construcción de una secuencia genética sintética, es imposible combinar todas las cadenas de ADN y luego realizar la ligadura. Esto daría como resultado secuencias aleatorias en las que el extremo de una cadena se uniría al comienzo de una cadena incorrecta. Esta secuencia u orientación incorrecta no sería deseable en un gen sintéticamente construido donde el orden del código genético es crucial. Para realizar la técnica correctamente, las combinaciones de pares de secuencias vecinas se deben ligar primero para producir la orientación correcta. Estas construcciones sintéticas emparejadas se pueden ligar entonces en la orientación correcta para producir construcciones sintéticas incluso más largas. El proceso  
50 implica una gran e intrincada cantidad de procesamiento y manipulación de la química. Este puede ser un proceso bastante laborioso o si se realiza utilizando la manipulación de líquidos de hoy en día y da como resultado grandes costes de consumibles y experimenta pérdidas conocidas de volumen muerto de las placas de pocillos estáticos y las aspiraciones de las pipetas. Además, gracias a las tecnologías actuales de manejo de líquidos, la mezcla y el control de pequeños volúmenes está limitada por la capacidad de aspirar y manipular volúmenes relativamente  
55 pequeños. Los volúmenes típicos utilizados en la ligadura de ácidos nucleicos son de 10 a 200 microlitros con longitudes de cadena de ácido nucleico entre 50 y 200 pares de bases.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha usado ampliamente para amplificar el ADN y el ADNc diana para muchas aplicaciones en biología molecular. La técnica de PCR amplifica una o varias copias de un fragmento de ADN, generando de miles a miles de millones de copias de una secuencia de ADN particular. Los modernos

instrumentos de PCR llevan a cabo el proceso de la PCR en volúmenes de reacción que varían de 10 a 200 microlitros. Uno de los mayores obstáculos para llevar a cabo la PCR en pequeños volúmenes es la dificultad de manipular pequeños volúmenes de los reactivos constituyentes con pipetas manuales. El gran tamaño de volumen es el resultado directo de la escasa capacidad de las tecnologías existentes para dispensar y mezclar volúmenes de subnanolitros. Además, para las tecnologías de microfluidos de próxima generación basadas en sistemas de flujo, estas están todavía limitadas por el volumen inicial dispensado frente a la cantidad real de muestra requerida para el proceso bioquímico. Estos sistemas de microfluidos también están limitados durante el proceso bioquímico a un control de protocolo definido de las muestras. Estos sistemas generalmente dependen de redes de canales de fluidos a microescala para transportar y mezclar volúmenes de submicrolitros. Algunos de los principales inconvenientes de estas tecnologías son: el uso único de las tarjetas de microfluidos, para evitar la contaminación, la falta de control dinámico de cada muestra individual, el transporte y la mezcla de cualquier muestra individual en cualquier punto del proceso bioquímico, y la arquitectura cerrada del sistema.

En particular, los procedimientos actuales de Reacción en Cadena de la Polimerasa Digital (dPCR) se realizan a través de la división de una muestra inicial en múltiples muestras de volúmenes más pequeños hasta que un plantilla de ADN permanece en cada subvolumen. Contando el número de subvolúmenes positivos que contienen ADN, se puede calcular el número de copias inicial en el volumen original. Típicamente, esto implica múltiples pasos de dilución en serie para generar un volumen de muestra con estadísticamente una diana de ADN por volumen de reacción. Estadísticamente, se puede analizar un subconjunto del volumen total para determinar el número de copias inicial, lo que permite una reducción en el número total de reacciones de PCR. Sin embargo, para la detección de dianas raras, se debe analizar un subconjunto más grande de volúmenes para mejorar la precisión estadística. Esto da como resultado una mayor cantidad de volúmenes en blanco y un volumen de prueba más grande, lo que da como resultado el uso de más química, tiempo, instrumentación, manejo de muestras y pasos de procesamiento.

Otro procedimiento de dPCR es mediante el cual se genera una emulsión del volumen de prueba en un soporte de base aceite. Este procedimiento es un esfuerzo para reducir el número de instrumentos requeridos y el tiempo requerido para un resultado. Primero, se diluye la muestra diana y se emulsiona en volúmenes suficientemente pequeños con una distribución estadística de menos de una copia por gotita, dentro del aceite portador. Este mayor volumen puede ser tratado como un único volumen de muestra y ser procesado mediante protocolos de PCR. Sin embargo, este procedimiento generalmente se limita a la detección del punto final. Se requiere instrumentación adicional en forma de un citómetro de flujo, pudiendo por lo tanto detectar la presencia de la diana por cada gotita que pasa por un sensor. Los citómetros de flujo son de baja velocidad; costosos; pueden requerir medios líquidos específicos y solo permite la detección del punto final. Las limitaciones de la detección de punto final incluyen el requisito de un paso de procesamiento posterior; menor sensibilidad; mayores tiempos hasta resultados; especificidad y más instrumentación. Un desafío adicional para los procedimientos de PCR de base emulsión es la estabilidad requerida y el control de cada gotita. La fusión o división de gotitas introduce más errores estadísticos en el procesamiento.

Los sistemas actuales de pipeteo y manejo de líquidos no pueden procesar el 100% del volumen inicial dado. Para las pipetas, tanto el sistema de almacenamiento de líquidos (placas de pocillos estáticas) como el accionamiento mecánico dentro del sistema evitan la aspiración completa de la muestra. Esta pérdida o volumen muerto en placas estáticas puede explicarse por las características de humectación superficial y la geometría, ninguna de las cuales se pueden explicar con las tecnologías actuales.

En los sistemas de flujo, la recolección de muestras biológicas individuales durante o al final del proceso bioquímico está demostrando ser un gran desafío para las tecnologías existentes. Los sistemas de flujo continuo típicos comprenden bombas y depósitos que generalmente hacen que sea técnicamente difícil una fácil recuperación de fluidos críticos, particularmente a escala micro. Además, dentro de los sistemas de flujo, el cebado inicial del sistema requiere mucho tiempo, es costoso y, si se realiza incorrectamente, conduce a un fallo catastrófico de la prueba lo que requiere una nueva prueba de la muestra biológica.

Otro inconveniente del procesamiento bioquímico existente es la incapacidad para automatizar el proceso de bioquímica para volúmenes de nanolitros y subnanolitros. El transporte, la mezcla o la recuperación de cada muestra individual no pueden ser realizados mediante las tecnologías automatizadas existentes.

En el procesamiento químico más general, tal como la microquímica genérica, donde es necesaria la manipulación de pequeñas cantidades de fluido, se pueden ver claramente las limitaciones de la tecnología actual en el volumen de fluido residual que permanece en las placas de pocillos estáticas o dentro del sistema. Esto es el resultado de la falta de capacidad de la tecnología actual para dispensar y controlar los volúmenes más pequeños que exigen las técnicas de biología molecular cada vez más sofisticadas, y el llamamiento a mejorar las eficiencias. El documento WO2009/13495 informa procedimientos para disponer gotitas en posiciones predeterminadas en una matriz. El documento US2007/0275415 informa procedimientos de detección de analitos diana mediante la ejecución de operaciones de gotitas en un microactuador de gotitas para combinar reactivos de muestra y de ensayo. El documento US2002/0050659 informa la producción de microcápsulas extruyendo simultáneamente un material de núcleo líquido junto con un líquido polimerizable.

La divulgación, por lo tanto, se dirige a proporcionar una manipulación mejorada de la muestra para superar al menos algunos de los problemas anteriores.

Compendio

5 Se describen dispositivos, sistemas y procedimientos para fabricar y manipular células de líquido compuesto. El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Breve divulgación de los dibujos

Las FIG. 1A y 1B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la generación de células de líquido compuesto utilizando fuerzas electrostáticas.

10 Las FIG. 2A y 2B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la generación de células de líquido compuesto utilizando el efecto hidrófobo.

15 Las FIG. 3A y 3B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la generación de células de líquido compuesto utilizando control de aire direccional.

Las FIG. 4A-4F ilustran esquemáticamente la generación de una célula de líquido compuesto utilizando un tubo de control y una dirección de flujo variable;

La FIG. 5, que se incluye como divulgación de referencia que no es parte de la invención reivindicada, ilustra esquemáticamente el control de una célula de líquido compuesto utilizando fuerzas electrostáticas.

20 Las FIG. 6A-6C, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente el control de una célula de líquido compuesto utilizando el efecto hidrófobo.

La FIG. 7 ilustra esquemáticamente el control de una célula de líquido compuesto utilizando control de aire direccional.

25 La FIG. 8, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, ilustra esquemáticamente un espolón de control estático que ancla una célula de líquido compuesto.

Las FIG. 9A y 9B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente un mecanismo de transporte para el procesamiento de flujo continuo de la bioquímica a lo largo de una superficie de control hidrófoba estática utilizando fuerzas electrostáticas.

30 Las FIG. 10A-10F ilustran esquemáticamente la generación de células de líquido compuesto, de múltiples muestras, de la divulgación utilizando un tubo de control y una dirección de flujo variable.

Las FIG. 11A-11C, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la generación de células de líquido compuesto, de múltiples muestras, utilizando fuerzas electrostáticas.

35 Las FIG. 12A y 12B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, son fotografías que muestran una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras.

Las FIG. 13A-13C, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la generación de células de líquido compuesto, de múltiples muestras, utilizando tensión superficial.

40 Las FIG. 14A y 14B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la generación de células de líquido compuesto, de múltiples muestras, utilizando agitación mecánica.

Las FIG. 15A y 15B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, son fotografías de una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, basada en emulsión.

45 La FIG. 16, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, es una fotografía de una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, con múltiples dianas de muestra internas.

Las FIG. 17A y 17B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la generación de células compuestas, de múltiples muestras, utilizando control de aire direccional.

Las FIG. 18A-18C ilustran esquemáticamente el control de una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras,

utilizando el efecto hidrófobo.

Las FIG. 19A y 19B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente el transporte de células compuestas, de múltiples muestras, utilizando una superficie de control hidrófoba con características de estabilización.

- 5 La FIG. 20, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, ilustra esquemáticamente el control de una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, que utiliza fuerzas electrostáticas.

La FIG. 21 ilustra esquemáticamente el control de una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, utilizando control de aire direccional.

- 10 La FIG. 22, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, ilustra esquemáticamente el espolón de control estático que ancla una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras.

La FIG. 23, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, es una fotografía de una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, con un volumen de control central utilizado para ordenar las muestras originales de la célula de líquido compuesto.

- 15 Las FIG. 24A-24D, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente una característica de estabilización hidrófoba unitaria para una célula de líquido compuesto.

- Las FIG. 25A-25D, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente un número de diferentes formas de características de estabilización hidrófoba para una célula de líquido compuesto.
- 20

La FIG. 26, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, ilustra esquemáticamente dos características de estabilización hidrófoba para una única célula de líquido compuesto.

- Las FIG. 27A-27B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente la colocación de células de líquido compuesto en ubicaciones discretas a lo largo de un larguero hidrófobo con características de estabilización utilizando un tubo de control y dirección de flujo variable.
- 25

La FIG. 28 ilustra esquemáticamente una matriz de características de estabilización hidrófoba.

- La FIG. 29, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, ilustra esquemáticamente un mecanismo de transporte de una célula de líquido compuesto que utiliza una superficie de control hidrófoba con una característica de estabilización.
- 30

Las FIG. 30A y 30B, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, ilustran esquemáticamente un mecanismo de transporte para una matriz de células de líquido compuesto que utilizan características de estabilización hidrófoba.

- La FIG. 31, que se incluye como divulgación de referencia que no forma parte de la invención reivindicada, es un diagrama que ilustra una red simple de células de líquido compuesto.
- 35

La FIG. 32A-32F, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, son diagramas que ilustran un procedimiento de transporte para una célula de líquido compuesto dentro de una red de fluido compuesto.

- Las FIG. 33A-33E son diagramas que ilustran un proceso de mezcla de células de líquido compuesto dentro de una red de fluido compuesto.
- 40

Las FIG. 34A y 34B son fotografías que muestran la fusión de dos células de líquido compuesto dentro de una red de fluido compuesto.

Las FIG. 35A-35C son fotografías que muestran la fusión de dos células de líquido compuesto para generar una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, dentro de una red de fluido compuesto.

- Las FIG. 36A-36E ilustran esquemáticamente un proceso de mezcla de células de líquido compuesto para generar una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, dentro de una red de fluido compuesto.
- 45

Las FIG. 37A-37C ilustran esquemáticamente una red de fluido compuesto para cuatro células de líquido compuesto que se combinarán en dos etapas.

- Las FIG. 38A-38G ilustran esquemáticamente una red de fluido compuesto para 32 células de líquido compuesto que se combinarán en cinco etapas.
- 50

FIG. 39 ilustra esquemáticamente un aparato de células de líquido compuesto para la amplificación isotérmica de ácido nucleico.

La FIG. 40 ilustra esquemáticamente una gama de características de estabilización en una plataforma hidrófoba en forma de disco.

5 La FIG. 40A muestra un sistema ejemplar que utiliza la plataforma en forma de disco.

Las FIG. 41A-41D son diagramas que ilustran la generación de una red de fluido compuesto.

Las FIG. 42A-42D, que se incluyen como divulgaciones de referencia que no forman parte de la invención reivindicada, es un diagrama que ilustra una superficie de control hidrófoba para el control de la trayectoria del fluido que encapsula el tampón no miscible.

10 Las FIG. 43-47 ilustran varios procedimientos que pueden implementarse como programación de controlador.

#### Descripción detallada

15 La divulgación proporciona sistemas y procedimientos para la generación de una muestra biológica dentro de una célula de fluido no miscible y se coloca en una superficie libre de un fluido portador recíprocamente no miscibles. Esto implica generación, y/o control de ubicación, y/o control de movimiento, y/o mezcla, y/o procesamiento de muestras biológicas dentro de dichas células de líquido compuesto (sinónimo de "célula de fluido compuesto") y colocado en un fluido portador no miscible.

La muestra biológica tiene típicamente una densidad entre la del fluido portador y el fluido exterior de la célula de líquido compuesto. El fluido portador típicamente tiene una densidad más alta que la del fluido exterior de la célula de líquido compuesto.

20 Los valores típicos de densidades para los fluidos implicados varían dentro de los valores de 1.300 a 2.000 kg/m<sup>3</sup> para el fluido portador, de 700 a 990 kg/m<sup>3</sup> para la célula de fluido no miscible y de 900 a 1.200 kg/m<sup>3</sup> para la muestra biológica. Un ejemplo de uno de tales conjuntos de fluidos y densidades operativos se describe en el presente documento, pero no se limita a estos; el fluido portador es Fluorinert FC-40 (aceite fluorocarbonado) con densidad de aproximadamente 1.900 kg/m<sup>3</sup>; el fluido exterior de la célula de líquido compuesto es fenilmetilpolisiloxano (aceite de silicona) con una densidad de aproximadamente 920 kg/m<sup>3</sup>; y la muestra biológica es una solución de base acuosa de reactivos de la PCR con una densidad de aproximadamente 1.000 kg/m<sup>3</sup>.

El fluido portador puede ser un aceite de amina perfluorada.

30 El fluido encapsulante puede ser una solución de un aceite de base fenilmetilpolisiloxano y un aditivo de polisorbato. Los aditivos tienen un número de equilibrio hidrófilo-lipófilo en el intervalo de 2 a 8. El número combinado total de equilibrio hidrófilo-lipófilo de los aditivos está en el intervalo de 2 a 8. Ejemplos de aditivos de polisorbato son SPAN 80, SPAN 65 y Tween 20 pero no se limitan solo a estos. Estos aditivos dentro del fluido encapsulante del tampón varían entre 0,001% y 10%.

35 La muestra diana puede ser una suspensión de partículas sólidas en medios de base acuosa y el fluido encapsulante es un aceite de base fenilmetilpolisiloxano, en un fluido portador que es un aceite de base fluorocarbono.

La muestra diana puede ser un aceite fenilmetilpolisiloxano de base acuosa en y el fluido encapsulante es un aceite de base fenilmetilpolisiloxano, en un fluido portador que es un aceite de base fluorocarbono.

Las superficies de control pueden ser un material hidrófobo.

40 Un sistema usado para fabricar y manipular células de líquido compuesto incluirá típicamente un sistema de manejo de líquidos bajo el control de un controlador (tal como un ordenador programable). El controlador está típicamente programado para hacer que el sistema de manejo de líquidos realice varios pasos, con los pasos del programa almacenados en un medio legible por ordenador.

#### Generación de células de líquido compuesto

45 Con referencia a la FIG. 1A, que se incluye como divulgación de referencia, una muestra biológica 1 y una célula de fluido 2, recíprocamente no miscibles, colocadas en una superficie libre de un fluido portador 3 recíprocamente no miscibles pueden combinarse utilizando una superficie de control 4. La superficie de control 4 puede usar fuerzas electrostáticas para controlar la ubicación de la célula de fluido no miscible 2. La superficie de control se carga y se lleva muy cerca de la célula de fluido no miscible, se producirá una separación de carga. Por ejemplo, a la superficie de control se le da una carga muy positiva, los iones cargados negativamente dentro de la célula de fluido no miscible se separarán hacia el cuerpo cargado. El resultado es una separación de carga polar y una fuerza atractiva hacia el cuerpo cargado. Con referencia a la FIG. 1B, también divulgación antecedente, se genera una célula 5 de líquido compuesto.

- Con referencia a la FIG. 2A, que se incluye como divulgación de referencia, una muestra biológica 21 y una célula de fluido 20 recíprocamente no miscibles colocadas en una superficie libre de un fluido portador 22 recíprocamente no miscibles pueden combinarse utilizando una superficie de control 23. La superficie de control 23 utiliza el efecto hidrófobo para controlar la ubicación de la célula 20 de fluido no miscible. Las superficies hidrófobas repelen los medios de base acuosa pero los aceites de base silicio humedecen fácilmente las superficies permitiendo el control que utiliza tensión capilar. Poner la superficie 23 de control en contacto con la célula de fluido no miscible 20 dará como resultado una humectación de la superficie del cuerpo por la célula 20 de fluido no miscible. La célula de fluido puede entonces ser transportada a una ubicación en el fluido 22 de soporte trasladando la superficie 23 de control. Con referencia a la FIG. 2B, también incluida como divulgación de referencia, se genera una célula compuesta 24.
- Con referencia a la FIG. 3A, que se incluye como divulgación de referencia, una muestra biológica 31 y una célula 30 de fluido, recíprocamente no miscibles, colocadas en una superficie libre de un fluido portador 32, recíprocamente no miscibles, pueden combinarse utilizando un tubo de control direccional 33. El tubo de control direccional 33 proporciona un chorro de aire que cuando se dirige incidiendo sobre la célula 30 de fluido no miscible genera una fuerza de arrastre mayor que la resistencia de traslación, transportando de ese modo el fluido de la célula de una manera controlada. Con referencia a la FIG. 3B, también divulgación antecedente, se genera una célula 34 de líquido compuesto.
- Con referencia a la FIG. 4A, las células de líquido compuesto se pueden generar utilizando el procedimiento y el sistema que se muestran. Con referencia a la FIG. 4A, una placa 41 de pocillos contiene la muestra biológica 42 en una o más ubicaciones (B1, B2, B3) y está cubierta por un fluido no miscible 43. Un tubo de control 44 tiene una presión controlable a través del tubo. En este modo de operación, se mantiene una caída de presión continua dentro del tubo, retirando así el fluido no miscible 43 en el tubo cuando el tubo se traslada en contacto con el fluido no miscible 43. Se extrae un volumen de fluido no miscible 43 en el tubo. Con referencia a la FIG. 4B, el tubo de control 44 se traslada a la muestra biológica 41 y extrae un volumen de muestra biológica C1. Con referencia a la FIG. 4C el tubo de control vuelve a la capa de fluido no miscible retirando un volumen de fluido no miscible. Después de esto, el tubo de control sale entonces del recubrimiento de fluido y retira el aire antes de repetir el procedimiento en la misma ubicación de muestra biológica o en una nueva ubicación de muestra biológica. Con referencia a la FIG. 4D el tubo de control está cargado con muestras biológicas C1, C2, C3, fluido no miscible y un espacio de aire 45 que separa los fluidos no miscibles y las muestras biológicas. Con referencia a la FIG. 4E, el tubo de control está colocado sobre la capa 46 de aceite portador alojado en un recipiente 47 biocompatible. El tubo de control puede estar en contacto o colocado a 0-3 mm por encima de la superficie libre del aceite portador 46. La dirección del flujo se invierte en el tubo de control y el fluido no miscible, la muestra y el fluido no miscible se depositan sobre la superficie libre del aceite portador, generando una célula de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 4F al depositar una célula 48 de líquido compuesto completa, el tubo de control se traslada a una nueva posición para depositar la siguiente célula de líquido compuesto.
- Transporte de células de líquido compuesto
- Con referencia a la FIG. 5, que se incluye como divulgación de referencia, la célula 51 de líquido compuesto es transportada sobre un fluido 52 portador no miscible utilizando la superficie 53 de control. La superficie 53 de control utiliza fuerzas electrostáticas para controlar la ubicación de la célula 52 de líquido compuesto. La superficie de control está cargada y se lleva muy cerca del fluido exterior de la célula de líquido compuesto, se producirá una separación de carga. Por ejemplo, a la superficie de control se le da una carga muy positiva, los iones cargados negativamente dentro de la célula de fluido no miscible se separarán hacia el cuerpo cargado. El resultado es una separación de carga polar y una fuerza atractiva hacia el cuerpo cargado. Utilizando este movimiento de transporte, se pueden fusionar una o más células de líquido compuesto o se pueden agregar muestras biológicas adicionales a una célula de líquido compuesto.
- Con referencia a la FIG. 6A, que se incluye como divulgación de referencia, una célula 61 de líquido compuesto colocada en una superficie libre de un fluido portador 62 recíprocamente no miscibles puede transportarse utilizando una superficie 63 de control. La superficie 63 de control utiliza el efecto hidrófobo para controlar la ubicación de la célula 61 de líquido compuesto. Las superficies hidrófobas repelen los medios de base acuosa, pero los aceites de base silicio humedecen fácilmente las superficies permitiendo el control que utiliza tensión capilar. El llevar la superficie 63 de control en contacto con la célula 61 de líquido compuesto dará como resultado una humectación de la superficie del cuerpo por el fluido exterior de la célula 61 de líquido compuesto. La célula de líquido compuesto puede luego ser transportada a una ubicación en el fluido portador 62 trasladando la superficie 63 de control. Utilizando este movimiento de transporte, se pueden fusionar una o más células de líquido compuesto o se pueden agregar muestras biológicas adicionales a una célula de líquido compuesto.
- Con referencia a la FIG. 7 una célula 71 de líquido compuesto colocada en un fluido portador no miscible 72 puede controlar la posición utilizando un tubo 73 de control direccional. El tubo 73 de control direccional proporciona un chorro de aire que cuando se dirige incidiendo contra la célula 71 de líquido compuesto genera una fuerza de arrastre mayor que la resistencia de traslación, transportando así el fluido celular de una manera controlada. Utilizando este movimiento de transporte, se pueden fusionar una o más células de líquido compuesto o se pueden agregar muestras biológicas adicionales a una célula de líquido compuesto.

Con referencia a la FIG. 8A, que se incluye como divulgación de referencia, una célula de líquido compuesto 81 colocada en un fluido portador no miscible 82 puede anclarse temporalmente utilizando un espolón hidrófobo 83 unido a una base 84. Utilizando este movimiento de transporte se pueden fusionar una o más células de líquido compuesto o se pueden agregar muestras biológicas adicionales a una célula de líquido compuesto.

- 5 Una célula de líquido compuesto puede moverse utilizando una combinación de fuerzas electrostáticas y el efecto hidrófobo. Con referencia a las FIG. 9A y 9B, que se incluyen como divulgación de referencia, una célula de líquido compuesto 91 está colocada en un fluido portador no miscible 92, y ubicada en contacto con una pista hidrófoba 93. Una superficie 94 de control dinámico utiliza fuerzas hidrostáticas para mover la célula de líquido compuesto junto con la pista hidrófoba definida. La superficie 94 de control también se puede usar para separar la célula de líquido compuesto del larguero hidrófobo y mover la célula de líquido compuesto independientemente o a otra ubicación hidrófoba. Utilizando este movimiento de transporte, se pueden fusionar una o más células de líquido compuesto o se pueden agregar muestras biológicas adicionales a una célula de líquido compuesto.

Los largueros hidrófobos pueden estar parcialmente sumergidos en el fluido portador.

- 15 Las múltiples superficies de control pueden permitir el movimiento independiente de células de líquido compuesto discretas.

- 20 El movimiento de transporte puede ser una combinación de control dinámico utilizando el efecto hidrófobo. Se coloca una célula de líquido compuesto sobre un fluido portador no miscible y se ubica en contacto con una pista hidrófoba. Una superficie de control dinámico que utiliza el efecto hidrófobo mueve la célula de líquido compuesto a lo largo de la pista hidrófoba definida. La superficie de control también se puede usar para separar la célula de líquido compuesto del larguero hidrófobo y mover la célula de líquido compuesto independientemente o a otra ubicación hidrófoba. Utilizando este movimiento de transporte, se pueden fusionar una o más células de líquido compuesto o se pueden agregar muestras biológicas adicionales a una célula de líquido compuesto.

- 25 El fluido portador puede ser un fluido que fluye continuamente y con su momento resultante que transporta las células de líquido compuesto a lo largo de sus líneas de corriente. En otra realización, el momento fluido del portador es asistido por superficies hidrófobas estáticas a lo largo de las cuales pueden avanzar las células de líquido compuesto. El momento del fluido portador puede ser asistido por superficies hidrófobas dinámicas mediante las cuales las células de líquido compuesto pueden ser transportadas.

A menos que se establezca lo contrario, cualquiera de las divulgaciones aquí relacionadas con las células de líquido compuesto en general, también se aplica a las células de líquido compuesto, de múltiples muestras, en particular.

- 30 Generación de células de líquido compuesto con muestras múltiples

- 35 Con referencia a las FIG. 10A-10F, las células de líquido compuesto se pueden generar utilizando el procedimiento y el sistema que se muestran. Con referencia a la FIG. 10A, una placa de pocillos 41 contiene la muestra biológica 42 en una o más ubicaciones (B101, B102, B103) y está cubierta por un fluido no miscible 43. Un tubo de control 44 tiene una presión controlable a través del tubo. En este modo de operación, se mantiene una caída de presión continua dentro del tubo, extrayendo así el fluido no miscible 43 en el tubo de control 44 cuando el tubo de control 44 se traslada en contacto con el fluido no miscible 43. Un volumen de fluido no miscible 43 se retira hacia el tubo extrae. Con referencia a la FIG. 10B, el tubo de control 44 se traslada a la muestra biológica 41 y extrae un volumen de muestra biológica C101. Con referencia a la FIG. 10C el tubo de control vuelve a la capa de fluido no miscible retirando un volumen de fluido no miscible. Después de esto, el tubo de control repite entonces el procedimiento en la misma muestra biológica o se traslada mientras está todavía dentro de la capa de fluido antes de repetir el procedimiento en una nueva ubicación de muestra biológica. Después de la extracción de fluido no miscible y muestras biológicas de una célula de líquido compuesto de múltiples muestras, el tubo de control sale entonces del aceite no miscible y retira el aire antes de repetir el procedimiento en una nueva célula de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 10D el tubo de control está cargado con muestras biológicas C101, C102, C103 y fluido no miscible de las células de líquido compuesto de múltiples muestras. Con referencia a la FIG. 10E, el tubo de control está colocado sobre la capa de aceite portador 46 alojado en un recipiente 47 biocompatible. El tubo de control puede estar en contacto o colocado entre 0 - 3 mm por encima de la superficie libre del aceite portador 46. La dirección del flujo se invierte en el tubo de control y el fluido no miscible, la muestra y el fluido no miscible se depositan sobre la superficie libre del aceite portador, que genera una célula de líquido compuesto de múltiples muestras. Con referencia a la FIG. 10F al depositar una célula 48 de líquido compuesto completa de múltiples muestras, el tubo de control se traslada a una nueva posición para depositar la siguiente célula de líquido compuesto de múltiples muestras.

- 55 Con referencia a las FIG. 11A-11C, que se incluyen como divulgación de referencia, una muestra biológica 201 en una o más ubicaciones (S1, S2) y una célula 202 de fluido recíprocamente no miscibles en una o más ubicaciones (O1, O2) colocadas en una superficie libre de un el fluido portador 203 recíprocamente no miscible se pueden combinar utilizando una superficie de control 204. La superficie de control 204 utiliza fuerzas electrostáticas para controlar la ubicación de la célula 202 de fluido no miscible. La superficie de control se carga y se lleva muy cerca de la célula 202 de fluido no miscible, se producirá una separación de cargas. Por ejemplo, la superficie 204 de control



recibe una carga muy positiva, los iones cargados negativamente dentro de la célula 202 de fluido no miscible se separarán hacia el cuerpo cargado. El resultado es una separación de carga polar y una fuerza atractiva hacia el cuerpo cargado. Con referencia a la FIG. 11B se genera una célula 205 de líquido compuesto en una o más ubicaciones (D1, D2). La superficie 204 de control utiliza fuerzas electrostáticas para controlar la ubicación de la célula 205 de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 11C, se genera una célula 206 de líquido compuesto, de múltiples muestras, fusionando dos o más células de líquido compuesto.

Las FIGS. 12A y 12B, que se incluyen como divulgación de referencia, son imágenes que muestran una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, que resulta de este procedimiento. En este ejemplo, se generó una célula de líquido compuesto que comprende un volumen de 2,5 microlitros de agua destilada con un 2% de colorante verde y 15 microlitros de fluido no miscible Fenilmetilpolisiloxano - aceite PD5 con un 5% de aditivo polisorbato - SPAN 80 (v/v) fue generado. Se generó una segunda célula de líquido compuesto con los mismos reactivos, sin embargo, se usó un colorante rojo al 2% en agua destilada en lugar del colorante verde. Los colores son visibles como distintos tonos de grises en las figuras. Las dos células de líquido compuesto se fusionaron utilizando superficies hidrófobas (la forma en V invertida visible en estas imágenes) y se ubicaron dentro de una característica de estabilización en un larguero hidrófobo.

Con referencia a las FIG. 13A-13C, que se incluyen como divulgación de referencia, una muestra biológica 220 dentro de un tubo de control 223 y una célula 221 de fluido recíprocamente no miscibles colocadas en una superficie libre de un fluido portador 222 recíprocamente no miscible pueden combinarse utilizando el efecto hidrófobo de una superficie 223 de control tubular. El tubo de control 223 utiliza el efecto hidrófobo para controlar la ubicación de la célula 221 de fluido no miscible. Las superficies hidrófobas repelen los medios de base acuosa, pero los aceites de base silicio mojan fácilmente las superficies, permitiendo el control que utiliza tensión capilar. Con referencia a la FIG. 13B, al poner el tubo de control 223 en contacto con la célula de fluido no miscible 221 se producirá una humectación de la superficie del cuerpo por la célula 221 de fluido no miscible. La muestra biológica 220 puede luego liberarse para hacer contacto con la célula 221 de fluido no miscible en el fluido portador 222. Como se muestra en la FIG. 13B se genera una célula 224 de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 13C, repitiendo el procedimiento con otro volumen de muestra biológica, se genera una célula 225 de líquido compuesto, de múltiples muestras.

Con referencia a las FIG. 14A y 14B, que se incluyen como divulgación de referencia, una muestra biológica 230 dentro de una célula 231 de fluido recíprocamente no miscible colocada en una superficie libre de un fluido portador 232 recíprocamente no miscible se puede subdividir utilizando una superficie 235 de ultrasonidos. Con referencia a la FIG. 14B se genera una célula 236 de líquido compuesto, de múltiples muestras.

Las FIG. 15A y 15B, que se incluyen como divulgación de referencia, son imágenes que muestran una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, como la célula 236 de la FIG. 14B. En este ejemplo, se agitó vorticialmente un volumen de 100 microlitros de agua destilada en una célula de fluido no miscible de 500 microlitros compuesta de aceite de base fenilmetilpolisiloxano - PD5 con aditivo de polisorbato al 5% - SPAN 80 (v/v). La FIG. 15B usó agua destilada con un colorante verde al 2% para la muestra biológica. Las FIG. 15A y 15B son una muestra representativa de 20 microlitros.

Se puede generar una célula de líquido compuesto con múltiples muestras de múltiples distintas dianas muestra. Con referencia a la FIG. 16, que se incluye como divulgación de referencia, se emulsionan cuatro distintas dianas de muestras y se combinan de forma estable como una única célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, con múltiples dianas muestra internas. Se generaron cuatro células de líquido compuesto individuales con 10 microlitros de agua destilada con colorante verde al 2%, colorante azul al 2%, colorante amarillo al 5% y sin colorante en una célula de fluido no miscible de 500 microlitros compuesta de aceite de base fenilmetilpolisiloxano - PD5 con aditivo de polisorbato al 5% - SPAN 80 (v/v). Después de la emulsificación, las células de líquido compuesto se fusionaron, véase la FIG. 16. De la FIG. 16 es evidente que las muestras de agua sin colorante no se contaminan con las muestras de agua teñida, lo que demuestra que no hay transferencia entre las muestras dentro de la célula de líquido compuesto de múltiples muestras. Los diversos colores son visibles como distintos tonos de grises.

Con referencia a las FIG. 17A y 17B, que se incluyen como divulgación de referencia, una célula 240 de fluido recíprocamente no miscible y dos o más muestras biológicas 241, colocadas en una superficie libre de un fluido de soporte 242 recíprocamente no miscible se combinan utilizando un tubo 243 de control direccional. El tubo 243 de control direccional proporciona un chorro de aire que cuando se dirige incidiendo sobre las muestras 241 genera una fuerza de arrastre mayor que la resistencia de traslación, transportando por ello el fluido tampón 240 y las muestras 241 de una manera controlada. Con referencia a la FIG. 17B se genera una célula 244 de líquido compuesto de múltiples muestras resultante.

Transporte de las células de líquido compuesto con múltiples muestras

Todos los procedimientos generales de transporte de células de líquido compuesto, por ejemplo los comentados anteriormente, son también aplicables a células de líquido compuesto de múltiples muestras.

Con referencia a las FIG. 18A-18C, y como se explica en referencia a las FIG. 6A-6C, una célula 261 de líquido

compuesto, de múltiples muestras, colocada en una superficie libre de un fluido portador 262 recíprocamente no miscible puede transportarse utilizando un dispositivo que tiene una superficie 263 de control hidrófoba.

5 La superficie de control puede estar parcialmente sumergida en el fluido portador. Con referencia a las FIG. 19A y 19B, que se incluyen como divulgación de referencia, la célula 290 de líquido compuesto, de múltiples muestras, colocada en una superficie libre 293 del portador no miscible está confinada entre dos largueros hidrófobos 291. Los largueros hidrófobos 291 tienen características de estabilización 292 dentro de ellos. Como se muestra en la FIG. 19A, estas características se usan para controlar las muestras dentro de la célula de líquido compuesto, y como se muestra en la FIG. 19B, los largueros hidrófobos se pueden mover a lo largo del fluido portador 293 que transporta de forma estable las células 290 de líquido compuesto de múltiples muestras.

10 Con referencia a la FIG. 20, que se incluyen como divulgación de referencia, y como se explica en referencia a la FIG. 5, la célula 251 de líquido compuesto, de múltiples muestras, puede transportarse sobre un fluido portador 252 no miscible mediante una superficie 253 de control del dispositivo utilizando fuerzas electrostáticas.

15 Con referencia a la FIG. 21, y como se explica en referencia a la FIG. 7, una célula 271 de líquido compuesto colocada en un fluido portador 272 no miscible puede controlarse su posición utilizando un tubo 273 de control direccional que proporciona un chorro de aire.

Con referencia a la FIG. 22, que se incluye como divulgación de referencia, y como se explica en referencia a la FIG. 8, una célula 281 de líquido compuesto, de múltiples muestras, colocada en un fluido portador 282 no miscible puede anclarse temporalmente utilizando un espolón 283 hidrófobo unido a una base 284.

Control interno de múltiples volúmenes de muestra con una célula de líquido compuesto

20 Los volúmenes de muestra internos con una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, se pueden ordenar para el análisis 2D. Con referencia a la FIG. 23, que se incluye como divulgación de referencia, puede añadirse un gran volumen de muestra a la célula de líquido compuesto y colocarse centralmente dando como resultado que las muestras de células de líquido compuesto originales estén ordenadas en el anillo para su análisis. Un volumen de 25 100 microlitros de agua destilada con un 2% de colorante verde se agitó vorticialmente en una célula de fluido no miscible de 500 microlitros compuesta de aceite de base fenilmetilpolisiloxano - PD5 con aditivo de polisorbato al 5% - SPAN 80 (v/v). Se segmentó una muestra representativa de 20 microlitros y una gran muestra de agua no teñida, del orden de 10 microlitros, se pipeteó en el centro de la célula de líquido compuesto. La estructura resultante se muestra en la FIG. 23.

30 Las muestras internas de una célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, pueden recombinarse utilizando un aditivo sorbato. Los ejemplos de aditivos de polisorbato son SPAN 80 y Tween 20, pero no están limitados a estos. Estos aditivos dentro del fluido encapsulante del tampón varían entre el 0,001% y el 10%.

Características mecánicas para la estabilización

35 Con referencia a las FIG. 24A-24D, que se incluyen como divulgación de referencia, una célula de líquido compuesto que comprende una muestra diana 311 encapsulada en un fluido tampón no miscible 312 colocado en una superficie libre de un fluido portador 313 recíprocamente no miscible es colocada de forma estable en una superficie hidrófoba 314. La superficie hidrófoba 314 se coloca sobre o en el fluido portador 313 recíprocamente no miscible. La superficie hidrófoba 314 con características de estabilización localizadas 315 controla la posición de la célula de líquido compuesto. Las características de estabilización permiten la generación, y/o control de ubicación, y/o control de movimiento, y/o mezcla, y/o división, y/o procesamiento de muestras biológicas dentro de una célula de líquido compuesto y colocadas en un fluido portador no miscible.

40 Con referencia a la FIG. 24B, la célula de líquido compuesto comprende aproximadamente 1,7 microlitros de muestra diana 301 encapsulada en aproximadamente 12 micro litros de tampón no miscible 302 colocado en una superficie libre de un fluido portador 303 recíprocamente no miscible es colocada estable en una característica hidrófoba 404 que tiene una superficie 304 en forma de V invertida. La superficie hidrófoba se coloca sobre o en el fluido portador 303 recíprocamente no miscible. El dispositivo o característica hidrófoba 304 con características de estabilización localizadas controla la posición de la célula de líquido compuesto. La característica de estabilización puede ser una ranura de 45 grados con una profundidad de cara de 2,5 mm y un espesor de 1,5 mm. Esto se utiliza para controlar células de líquido compuesto de tamaño de microlitros. Con referencia a la FIG. 24C se muestra un plano inferior de la realización. Con referencia a la FIG. 24D, la célula de líquido compuesto descrita anteriormente se muestra con una carcasa 305 que tiene una pared circundante para retener el líquido portador.

45 Con referencia a las FIG. 25A-25D, que se incluyen como divulgación de referencia, una característica de estabilización tiene una serie de parámetros que se ajustan para una aplicación dada. Dos de estos parámetros son la forma de la característica y el espesor de la característica. La forma de la característica tiene un impacto sobre el tamaño global y el control de ubicación de una muestra interna 321. Con referencia a la FIG. 25A una característica 50 324 de estabilización en forma de "V" invertida controla la ubicación de la muestra interna 321 con los puntos tangentes A y B como se ilustra. Con referencia a la FIG. 25B, una característica 325 de estabilización de forma curvada tiene menos control sobre la posición interna de la muestra. La variación en la forma permite la

personalización de las proporciones de células de líquido compuesto de una muestra interna 321 para encapsular el fluido tampón 322. Típicamente, una forma circular puede alcanzar un mayor volumen de muestra frente a la relación de fluido encapsulante y mantener muestras libres de contaminación. Con referencia a la FIG. 25C el espesor C de la característica de estabilización tiene un impacto sobre la estabilización de la célula de líquido compuesto, permitiendo la personalización de las aplicaciones. Para un espesor mayor, típicamente superior al 50% del diámetro de la célula de líquido compuesto, las propiedades de estabilización no mejoran. Para el control estacionario o el procesamiento de una célula de líquido compuesto, un espesor en el intervalo de 5 - 50% es suficiente para la estabilización de la célula de líquido compuesto en la superficie portadora libre 323. La característica de estabilización se coloca sobre o en el fluido portador. Con referencia a la FIG. 25D, la característica de estabilización puede reducirse gradualmente para la generación de células de líquido compuesto, y/o control de ubicación, y/o control de movimiento, y/o mezclado, y/o división, y/o procesamiento de muestras biológicas dentro de una célula de líquido compuesto y colocada en un fluido portador no miscible.

Con referencia a la FIG. 26, que se incluye como divulgación de referencia, una célula 331 de líquido compuesto colocada en un fluido portador no miscible 332 está colocada entre dos superficies hidrófobas 333 con características de ubicación 334. Las características de estabilización permiten la generación y/o control de ubicación y/o movimiento control, y/o mezcla, y/o división, y/o procesamiento de muestras biológicas dentro de una célula de líquido compuesto y colocada en un fluido portador no miscible.

Con referencia a la FIG. 28, se puede generar una red de células de líquido compuesto discretas.

Generación de células de líquido compuesto con características mecánicas

Las células de líquido compuesto se pueden generar como se describió anteriormente, por ejemplo, las FIG. 4A-D. Con referencia a la FIG. 27A, que se incluye como divulgación de referencia, el tubo de control se coloca sobre la capa 46 de aceite portador alojado en un recipiente 47 biocompatible. El tubo de control puede estar en contacto o colocado entre 0 - 3 mm por encima de la superficie libre del aceite portador 46. La dirección del flujo se invierte en el tubo de control y fluido no miscible, muestra y fluido no miscible se depositan en la superficie libre del aceite portador, en una característica de estabilización en un larguero hidrófobo 349, generando una célula de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 27B, al depositar una célula 48 de líquido compuesto completa, el tubo de control se traslada a una nueva posición a lo largo del larguero hidrófobo 349 para depositar la siguiente célula de líquido compuesto en la característica de estabilización.

Se pueden usar dos o más superficies hidrófobas con características de estabilización para controlar la ubicación de la célula de líquido compuesto. El uso de características de estabilización en un larguero hidrófobo permite la generación de células de líquido compuesto en ubicaciones controladas y discretas mejorando de ese modo el seguimiento y/o la automatización de las muestras y/o el control del proceso.

Transporte de células de líquido compuesto con características mecánicas

Con referencia a la FIG. 29, que se incluye como divulgación de referencia, una célula 361 de líquido compuesto colocada en una superficie libre de un fluido portador 362 recíprocamente no miscibles puede transportarse utilizando una superficie 363 de control. La superficie 363 de control utiliza el efecto hidrófobo para controlar la ubicación de la célula 361 de líquido compuesto. Las superficies hidrófobas repelen los medios de base acuosa, pero los aceites de base silicio humedecen fácilmente las superficies, lo que permite el control que utiliza tensión capilar. Llevando la superficie 363 de control en contacto con la célula 361 de líquido compuesto dará como resultado una humectación de la superficie del cuerpo por el fluido exterior de la célula 361 de líquido compuesto. La célula de líquido compuesto puede luego ser transportada a una ubicación en el fluido portador 362 trasladando la superficie 363 de control. Utilizando este movimiento de transporte, se pueden fusionar una o más células de líquido compuesto o se pueden agregar muestras biológicas adicionales a una célula de líquido compuesto.

Con referencia a las FIG. 30A y 30B, que se incluyen como divulgación de referencia, se puede transportar una matriz de células 371 de líquido compuesto situadas sobre una superficie libre de un fluido portador 372 recíprocamente no miscibles utilizando la superficie 373 de control. La superficie 373 de control utiliza el efecto hidrófobo para controlar la ubicación de las células 371 de líquido compuesto. Las superficies hidrófobas repelen los medios de base acuosa, pero los aceites de base silicio humedecen fácilmente las superficies permitiendo el control que utiliza tensión capilar. Las superficies 373 de control están separadas por no más de 0,5 veces el diámetro de la muestra para asegurar el confinamiento de la ubicación de la muestra. La matriz de células 371 de líquido compuesto se transporta a una ubicación en el fluido portador 372 trasladando la superficie 373 de control. Utilizando este movimiento de transporte con las características de estabilización, las células de líquido compuesto pueden procesarse individualmente, asegurando la precisión en la muestra en ubicaciones discretas y/o haciendo referencia a la ubicación de la característica de estabilización. Esto evita la fusión descontrolada y/o la pérdida de muestra.

Red de células de líquido compuesto

Con referencia a la FIG. 31, que se incluye como divulgación de referencia, una red células de líquido compuesto consiste en al menos dos zonas de estabilización 381 con una zona de conexión 382. Cada zona de estabilización

permite la generación, y/o control de ubicación, y/o control de movimiento, y/o mezcla, y/o división, y/o procesamiento de muestras biológicas 383 dentro de una célula 384 de líquido compuesto y colocada en un fluido portador no miscible 385.

5 Con referencia a las FIG. 32A-32F, que se incluyen como divulgación de referencia, se utiliza una red de células de líquido compuesto para transportar una célula de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 32A, una célula 391 de líquido compuesto en un aceite portador 392 está situada con un conjunto de largueros hidrófobos con características de estabilización 393. Con referencia a la FIG. 32B, un tubo de control 394 está colocado en/o en la zona de la ubicación a la que se moverá la célula 391 de líquido compuesto. El tubo de control 394 se coloca por encima de la superficie libre del fluido portador 392 y comienza a infundir fluido tampón encapsulante no miscible 395. Con referencia a la FIG. 32C, el fluido encapsulante 395 se mueve a través de la red y se fusiona con la célula 391 de líquido compuesto. El tubo de control 394 es detenido y la dirección de flujo se invierte. Con referencia a la FIG. 32D, la célula de líquido compuesto se mueve desde la ubicación original de la característica de estabilización a la nueva ubicación prescrita. Con referencia a la FIG. 32E cuando la célula de líquido compuesto está en la nueva ubicación, el flujo en el tubo de control 394 se detiene y se retira. Con referencia a la FIG. 32F, la célula de líquido compuesto ha sido transportada a una nueva ubicación para su procesamiento.

Se pueden transportar dos o más células de líquido compuesto simultáneamente utilizando una inyección controlada y extracción del fluido tampón encapsulante.

20 Con referencia a las FIG. 33A-33E, se puede usar una red de fluido compuesto para transportar y fusionar dos células de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 33A, una célula 401 de líquido compuesto en un fluido de soporte 402 está ubicada dentro de una estructura hidrófoba 403. Con referencia a la FIG. 33B se inyecta un fluido tampón encapsulante no miscible 404 sobre el fluido de soporte 402 en la ubicación de control 405. Con referencia a la FIG. 33C, el fluido 404 de tampón encapsulante no miscible se mueve a través de la red y se fusiona con las células 401 de líquido compuesto. Se detiene la infusión de fluido 404 de tampón encapsulante no miscible. Con referencia a la FIG. 33D, el fluido 404 de tampón encapsulante no miscible se extrae de la ubicación de control 405 con las muestras internas que se mueven desde sus ubicaciones originales a una nueva ubicación. Con referencia a la FIG. 33E, cuando las muestras están en la nueva ubicación, se detiene el flujo de fluido 404 de tampón encapsulante no miscible en la ubicación de control 405. Las muestras se fusionan dando como resultado una célula de líquido compuesto de una sola muestra. La formación de interfaces complejas de aceite encapsulante, limitadas por superficies de control, aceite portador y una interfaz aérea, se rige por la energía de la superficie libre que es proporcional al área de la superficie de la interfaz de aceite encapsulante/aire. La retirada controlada del aceite encapsulante hará que el sistema minimice el área de la superficie, lo que provocará que el aceite encapsulante sea eliminado por igual de los extremos de la red. Esta contracción interfacial de los extremos de la red también transporta gotitas acuosas contenidas en su interior.

35 La FIG. 34A es una imagen de una red de fluido compuesto con dos células de líquido compuesto. Las células de líquido compuesto en esta imagen contienen 2,5 microlitros de volúmenes de muestra de agua destilada, una muestra teñida de rojo y la segunda teñida de azul. El fluido de tampón encapsulado era un fluido no miscible de Fenilmetilpolisiloxano - aceite de PD5 en un portador fluorocarbonado no miscible - FC40. El larguero hidrófobo era un material de base PTFE que estaba ubicado en la interfaz del fluido portador y el aire. Las características de estabilización tienen una dimensión de aproximadamente 2 mm en la más ancha y un ángulo de aproximadamente 45 grados.

La FIG. 34B muestra una única célula de líquido compuesto con una única muestra interna, que es el resultado de la fusión de los dos volúmenes de muestra de células de líquido compuesto anteriores por el procedimiento descrito anteriormente.

45 Con referencia a las FIG. 35A-35C y 36A-36E, el fluido encapsulante tiene un aditivo y la fusión de las células de líquido compuesto da como resultado una célula de líquido compuesto de múltiples muestras.

Ejemplos de redes de células de líquido compuesto se describen en el presente documento, pero no se limitan a estos. Con referencia a las FIG. 37A-37C, una red de células de líquido compuesto para fusionar cuatro células de líquido compuesto en dos etapas. Con referencia a la FIG. 37B, las células de líquido compuesto de las características de estabilización contiguas se fusionan primero. Con referencia a la FIG. 37C, las muestras de células de líquido compuesto restantes se fusionan dando como resultado una única célula de líquido compuesto.

55 Otro ejemplo, con referencia a las FIG. 38A-38G, es una red para fusionar 32 células de líquido compuesto en 5 etapas. Con referencia a la FIG. 38A, una red de largueros hidrófobos y aceite portador antes de la carga de células de líquido compuesto. Con referencia a la FIG. 38B, las células de líquido compuesto se cargan en las ubicaciones externas de la red de fluido compuesto. Con referencia a la FIG. 38C, las células de líquido compuesto en las características de estabilización contiguas se fusionan utilizando un proceso de infusión/extracción del fluido encapsulante de tampón no miscible. Con referencia a la FIG. 38D, la segunda etapa del procesamiento de célula de líquido compuesto - las células de líquido compuesto de las características de estabilización contiguas se fusionan utilizando un proceso de infusión/extracción del fluido encapsulante de tampón no miscible. Las células de líquido compuesto contienen ahora cuatro de las células de líquido compuesto originalmente depositadas. Con referencia a

la FIG. 38E, la tercera etapa del procesamiento de células de líquido compuesto - las células de líquido compuesto en las características de estabilización contiguas se fusionan utilizando un proceso de infusión/extracción del fluido encapsulante de tampón no miscible. Las células de líquido compuesto contienen ahora ocho de las células de líquido compuesto originalmente depositadas. Con referencia a la FIG. 38F, la cuarta etapa del procesamiento de células de líquido compuesto - las células de líquido compuesto de las características de estabilización contiguas se fusionan utilizando un proceso de infusión/extracción del fluido encapsulante tampón no miscible. Las células de líquido compuesto contienen ahora dieciséis de las células de líquido compuesto originalmente depositadas. Con referencia a la FIG. 38G, la quinta etapa del procesamiento de células de líquido compuesto - las células de líquido compuesto de las características de estabilización contiguas se fusionan utilizando un proceso de infusión/extracción del fluido encapsulante tampón no miscible. Las células de líquido compuesto contienen ahora las treinta y dos células de líquido compuesto originalmente depositadas. En cada una de las etapas se puede realizar el procesamiento biológico de las células de líquido compuesto. Estos procesos pueden incluir pero no están limitados a: reacción en cadena de la polimerasa, y/o ciclado térmico, y/o amplificación isotérmica, y/o análisis óptico, y/o adición de reactivos adicionales.

Con referencia a las FIG. 41A-41D, se puede generar una red de fluido compuesto utilizando un procedimiento de infusión del fluido tampón encapsulante no miscible. Con referencia a la FIG. 41A, las muestras diana se dispensan dentro de la red de largueros hidrófobos en el fluido portador. Con referencia a la FIG. 41B, el fluido tampón encapsulante no miscible se infunde en el fluido portador. Con referencia a la FIG. 41C, el fluido tampón encapsulante no miscible encapsuló los volúmenes de muestra dentro de las características de estabilización de los largueros hidrófobos. Con referencia a la FIG. 41D, se muestra un ejemplo de la red de fluido compuesto.

Con referencia a las FIG. 42A-42D, que se incluyen como divulgación de referencia, la red de fluido compuesto tiene superficies de control hidrófobas para controlar la trayectoria de la red de fluido tampón encapsulante no miscible en el fluido portador. Con referencia a la FIG. 42A, una red de fluido compuesto con dos muestras de características de estabilización discretas dentro de un fluido tampón encapsulante no miscible. Con referencia a la FIG. 42B, las superficies de control hidrófobas se utilizan para cortar el fluido tampón encapsulante no miscible, mientras se mantiene una trayectoria de fluido portador. Con referencia a la FIG. 42C, el fluido tampón encapsulante no miscible puede ser retirado. Con referencia a la FIG. 42D, se generan dos células de líquido compuesto discretas. Este procedimiento también se utiliza para hacer avanzar una célula de líquido compuesto a través de una red de fluido compuesto y/o para aislar una célula de líquido compuesto de otros procesos dentro de la red de fluido compuesto.

### 30 Procesamiento de las células de líquido compuesto

El sistema puede implicar uno o más de los siguientes pasos en cualquier orden que logre la combinación de muestra diana al final del procedimiento: extracción de muestras para la diana; procesar las muestras para cargarlas en el sistema dispensador; dispensar la muestra diana; dispensar la célula de fluido encapsulante no miscible; dispensar el fluido portador; combinar la muestra biológica y la célula de fluido encapsulante no miscible; combinar la muestra biológica y la célula de líquido compuesto; combinar la muestra biológica y la célula de líquido compuesto de múltiples muestras; controlar el movimiento de la célula de fluido encapsulante no miscible; controlar el movimiento del fluido portador; transportar una o más células de fluido no miscible; transportar una o más células de fluido no miscible para combinar con una o más muestras biológicas; transportar una o más células de líquido compuesto para combinarlas con una o más muestras biológicas; transportar una o más células de líquido compuesto, de múltiples muestras, para combinarlas con una o más muestras biológicas; transportar una o más células de líquido compuesto para combinarlas con una o más células de líquido compuesto; transportar una o más células de líquido compuesto, de múltiples muestras, para combinarlas con una o más células de líquido compuesto; transportar una o más células de líquido compuesto, de múltiples muestras, para combinarlas con una o más células de líquido compuesto de múltiples muestras; detectar un efecto de la muestra biológica dentro de la célula de líquido compuesto; detectar un efecto de la muestra biológica dentro de la célula de líquido compuesto de múltiples muestras; detectar efectos de muestras biológicas dentro de la célula de líquido compuesto de múltiples muestras; proporcionar información de salida a un usuario de la detección; analizar los datos de salida de la detección. Ejemplos de los protocolos biológicos se dan en las siguientes secciones.

### PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha usado ampliamente para amplificar el ADN y el ADNc diana para muchas aplicaciones en biología molecular. La técnica de PCR amplifica una o varias copias de un fragmento de ADN, generando de miles a miles de millones de copias de una secuencia de ADN particular. Los modernos instrumentos de PCR llevan a cabo el proceso de PCR en volúmenes de reacción que varían de 10 a 200 microlitros. Uno de los mayores obstáculos para llevar a cabo la PCR en pequeños volúmenes es la dificultad de manipular pequeños volúmenes de los reactivos constituyentes con pipetas manuales. Otro obstáculo de la PCR son las dificultades en las reacciones de multiplexación que permiten un aumento del rendimiento.

Los procedimientos de la divulgación generalmente implican combinar los fluidos necesarios para formar la célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, resultante. La muestra diana puede ser una muestra biológica acuosa, que comprende reactivos requeridos para la amplificación de ácidos nucleicos, y la célula fluida externa es un aceite de silicona (Fenilmetilpolisiloxano, PD 5) con un aditivo de polisorbato (SPAN 80), en un fluido portador que es un

aceite de base fluorocarbono (Fluorinert FC-40). Los reactivos individuales están ordenados de manera que todos los componentes necesarios para la PCR se colocan como células de líquido compuesto individuales. Esto evita la contaminación cruzada de reactivos biológicos. Los componentes de células de líquido compuesto individuales se combinan juntos en la secuencia correcta. Las células de líquido compuesto individuales se combinan juntas formando una célula de líquido compuesto de múltiples muestras. La célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, es transportada luego a diferentes zonas térmicas o zonas de interrogación óptica donde la medición cuantitativa de los productos se realiza a través de medida de la fluorescencia. La colocación de los volúmenes diana de PCR dentro de las células de líquido compuesto evita la evaporación durante el ciclado térmico. Las temperaturas típicas de ciclos térmicos varían entre 55 y 95 °C.

Las células de líquido compuesto pueden tener una marca de detección asociada añadida como una muestra discreta.

La combinación de reacciones posteriores a la PCR puede requerirse para un procesamiento posterior que puede incluir secuenciación genética. El uso de células de líquido compuesto, de múltiples muestras, simplifica en gran medida el procedimiento de recopilación y secuenciación para estos volúmenes diana relativamente pequeños. Las células de líquido compuesto, de múltiples muestras, después del procesamiento individual se pueden combinar selectivamente, eliminando cualquier reacción de amplificación inespecífica o reacción ineficiente del volumen recogido final. El volumen diana final amalgamado, que consiste en muchas moléculas diana diferentes, se transfiere a un instrumento de secuenciación para un análisis detallado. La célula de líquido compuesto facilita el 100% de recuperación de volumen a medida que la muestra biológica se está procesando y no necesita tocar ninguna superficie sólida y también tiene el beneficio adicional de una característica antihumectante. Además, el volumen de fluido que requiere ciclos térmicos se ha reducido enormemente, eliminando toda la masa y la resistencia térmica de las placas de pocillos estáticas, las estrategias de calentamiento dirigidas pueden facilitar instrumentos de menor potencia y tiempos de procesamiento de reacción más rápidos.

LECTURAS FAM

LECTURAS RED

<>	NTB 1	Alelo 1	NTB 2	Alelo 2	NTB 3	<>	NTB 1	Alelo 1	NTB 2	Alelo 2	NTB 3
	3776	34503	3492	4579	2916		3489	3460	3291	14928	2685
A						A					

Tabla 1 - Resultados de intensidad de fluorescencia que muestran la capacidad de detectar polimorfismos de un solo nucleótido en células de líquido compuesto sin contaminación remanente

Con referencia a la Tabla 1, la célula de líquido compuesto ha realizado con éxito la detección del polimorfismo de un solo nucleótido. Se usaron dos muestras positivas, conteniendo cada una de ellas un alelo diferente del gen, denominados alelo 1 y alelo 2. Cada alelo se marcó con un colorante diferente y la lectura a la intensidad correcta permitió la detección de cada alelo. Se añadió un control sin plantilla en una célula de líquido compuesto y se amplificó. Esto se repitió en el siguiente orden para un alelo positivo 1, un control sin plantilla, un alelo positivo 2 y finalmente otro control sin plantilla. Con referencia a la Tabla 1, los resultados muestran que la amplificación se realizó con éxito en células de líquido compuesto sin contaminación cruzada entre muestras. Esto se indica por ningún aumento en la intensidad de la fluorescencia entre el control inicial sin plantilla y las muestras sin control de plantilla que siguieron a cada muestra positiva.

Con referencia a la FIG. 39, un aparato para una amplificación de ácido nucleico isotérmico de múltiples células de líquido compuesto. Las células de líquido compuesto están ordenadas en una plataforma circular que se mueve a través de las etapas requeridas de generación de células de líquido compuesto, procesamiento térmico, detección óptica y eliminación. La generación de células de líquido compuesto tiene tres etapas, la adición del fluido tampón encapsulante no miscible al fluido portador, la adición de los reactivos de la PCR maestros al fluido tampón encapsulante y la adición de la muestra a la célula de líquido compuesto. La célula de líquido compuesto se procesa biológicamente calentando a 65 °C durante 10 minutos. Para completar la rotación de la placa hidrófoba, las células de líquido compuesto pasan a través de una zona de detección fluorescente después de lo cual las células de líquido compuesto se eliminan del fluido portador y la plataforma vuelve a la etapa inicial de generación de células de líquido compuesto. La placa gira continuamente con nuevas células de líquido compuesto generadas a una velocidad que depende de la velocidad de rotación de la plataforma.

La FIG. 40 muestra un ejemplo de una plataforma en forma de disco, típicamente de un material hidrófobo, que proporciona una red de características de estabilización. La FIG. 40A muestra el disco incorporado en un sistema. El sistema tiene un baño circular estacionario de líquido portador. La rotación en la superficie de este baño de aceite

portador es un disco de PTFE que contiene características de estabilización. El disco se puede girar mediante un eje accionado por el conjunto de caja de engranajes del motor que se muestra. Las células de líquido compuesto pueden ser dispensadas de las características de estabilización desde un tubo dispensador fijo (no mostrado).

#### PCR digital

- 5 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación molecular ampliamente utilizada. La técnica tiene amplias aplicaciones en diagnóstico clínico, biotecnología agrícola y bioinvestigación. Se utiliza de forma rutinaria para la detección de SNP, diagnóstico de enfermedades hereditarias, huella digital genética, análisis forense, expresión génica y otros tipos de análisis de ácidos nucleicos. El desarrollo de PCR digital ha aumentado el uso de PCR convencional. La PCR digital es una técnica que amplifica una única plantilla de ADN. Para una revisión de la metodología de PCR, véase PCR digital (Proc Natl Acad Sci USA 96 (16): 9236-41 (1999)) por Vogelstein y Kinzler; Principle and application of digital PCR (Expert Review Molecular Diagnostics 4 (1): 41-47 (2004)) de Pohl y Shih.

- 15 Los procedimientos de la divulgación generalmente implican combinar y distribuir los fluidos necesarios para formar la célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, resultante. La muestra diana puede ser una muestra biológica acuosa, que comprende reactivos requeridos para la amplificación de ácidos nucleicos, y la célula de fluido externo es un aceite de silicona (Fenilmetilpolisiloxano, PD 5) con un aditivo de polisorbato (SPAN 80), en un fluido portador que es un aceite de base fluorocarbono (Fluorinert FC-40). Los reactivos individuales están orientados de manera que todos los componentes necesarios para la PCR digital se colocan como células de líquido compuesto individuales. Esto evita la contaminación cruzada de reactivos biológicos. Los componentes de células de líquido compuesto individuales se combinan juntos en la secuencia correcta. A continuación, las células de líquido compuesto individuales se someten a ultrasonidos para formar una célula de líquido compuesto de múltiples muestras. La célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, se transporta luego a diferentes zonas térmicas o zonas de interrogación ópticas donde la medición cuantitativa de los productos se realiza mediante medición de la fluorescencia. La colocación de los volúmenes diana de PCR digital dentro de las células de líquido compuesto evita la evaporación durante el ciclado térmico. Las temperaturas típicas de ciclos térmicos varían entre 55 y 95 °C. La célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, facilita el uso de procedimientos de detección más simples ya que la célula de líquido compuesto, de múltiples muestras, no requiere ópticas de integración tridimensional para la determinación de la cuantificación.

- 25 Las células de líquido compuesto individuales pueden ser agitadas mecánicamente para formar una célula de líquido compuesto de múltiples muestras.

#### Ligadura de ácido nucleico/ADN

- 30 La ligadura de ácidos nucleicos implica el uso de ligasas de ácidos nucleicos, que son enzimas que se usan para unir fragmentos de ácido nucleico. Al construir largas cadenas de ADN, se combinan fragmentos de ADN más cortos, por lo que es necesario realizar múltiples pasos de ligadura para lograr estos resultados. El producto de una reacción de ligadura se convierte en el fragmento de otra. La ligadura debe realizarse de forma pareja para evitar problemas de eficiencia y orientación que afecten a la reacción.

- 35 Los reactivos de reacción - los fragmentos de ADN que se unirán; la enzima ligasa; y los reactivos reguladores - pueden ser pipeteados individualmente en pocillos separados de una placa de microtitulación. El fluido compuesto externo, un aceite de silicona (fenilmetilpolisiloxano, PD 5), se pipetea sobre los reactivos de base acuosa dentro de cada pocillo, creando una interfaz aceitosa-acuosa.

- 40 Un capilar de muestreo hidrófobo manipulado por una plataforma robótica automatizada, aspira un volumen de aceite. En el intervalo de 500-2.000 nanolitros de aceite de silicona (fenilmetilpolisiloxano, PD 5) del primer pocillo de muestreo, seguido de aspiración de 100-700 nl del volumen diana (reactivos acuosos), seguido de un volumen similar de aceite de silicona (fenilmetilpolisiloxano, PD 5) en el intervalo de 500-2.000 nanolitros. A continuación, el capilar de muestreo se traslada a través del aire, aun aspirando, en el siguiente pozo de muestreo. El procedimiento se repite para el siguiente pozo de muestreo, aspirando el aceite de cobertura, seguido de los reactivos acuosos, seguido del aceite de cobertura. A continuación, el tubo capilar de muestreo hidrófobo se traslada luego hasta que se ha aspirado un número predeterminado de muestras. El capilar de muestreo hidrófobo tiene ahora una serie de líquidos discretos segmentados por aire, aspirados durante la traslación.

- 45 El tubo capilar de muestreo hidrófobo se traslada sobre la plataforma de procesamiento. La dirección del flujo en el tubo capilar de muestreo hidrófobo se invierte para dispensar cada secuencia de fluido como una célula de líquido compuesto individual en la superficie de un aceite portador, un aceite de base fluorocarbono (Fluorinert FC-40). El tubo capilar de muestreo hidrófobo se traslada entre la dispensación discreta de líquido hasta una nueva ubicación inicial de célula de líquido compuesto. Las células de líquido compuesto se dispensan de manera que se interconectan con un larguero hidrófobo que asegura la ubicación de las células de líquido compuesto. La secuencia de células de líquido compuesto que se combinan para proporcionar la construcción sintética de ADN final se coloca en un único larguero hidrófobo. El proceso de distribución genera una serie de células de líquido compuesto separadas por una distancia en el intervalo de 0,5 mm-10 mm, colocadas en largueros hidrófobos.

En el caso de células de líquido compuesto de muestra única, una superficie de control manipulada por una plataforma robótica automatizada crea una combinación por pares de células de líquido compuesto de manera que los reactivos dentro de las células de líquido compuesto se combinan y se mezclan mediante la acción de la tensión capilar con la superficie de control. O, si se utiliza una red de células de fluido, entonces los controles de fluido tampón encapsulante no miscible de inyección/retirada de la red de fluido compuesto producen combinaciones por pares de células de líquido compuesto de manera que los reactivos se combinan y se mezclan dentro de las células de líquido compuesto.

Estos reactivos contienen los fragmentos de ADN vecinos y otros reactivos necesarios para que se produzca la ligadura. Las células de líquido compuesto se controlan a condiciones de temperatura específicas durante un tiempo específico para que se produzca la ligadura. Las condiciones típicas son 16 °C durante 1 hora para asegurar la ligadura de los fragmentos con extremos cohesivos. Después de esta etapa de ligadura, se forman y procesan otras combinaciones en pares de células de líquido compuesto vecinas a la temperatura correcta generando fragmentos más largos. Este proceso se repite hasta que se alcanza la longitud final deseada del fragmento. La cadena de ADN sintético recién construido es aspirada y almacenada para su uso futuro.

La creación de células de líquido compuesto simplifica en gran medida el procedimiento de ligadura de ADN. El volumen de reacción más pequeño, que normalmente no se utiliza en este proceso, garantiza una mayor eficiencia de reacción y tiempos de reacción más rápidos. La combinación de fragmentos de cadena de ADN diana para cada ligadura por parejas subsiguiente se simplifica enormemente y el número de manipulaciones totales de líquidos se reduce enormemente, ya que la secuencia completa de células de líquido compuesto de ADN diana se ubican conjuntamente en la red de largueros hidrófobos. La coalescencia mediante este procedimiento es fácil de lograr manipulando la posición de las células de líquido compuesto. Este procedimiento de ligadura es particularmente útil cuando los productos de un paso de ligadura son necesarios para otro paso.

El uso de células de líquido compuesto simplifica en gran medida el procedimiento de recogida para estos volúmenes diana relativamente pequeños. Las células de líquido compuesto que siguen al procesamiento individual se pueden combinar selectivamente, eliminando cualquier muestra no reactiva o reacciones ineficaces del proceso de ligadura. La célula de líquido compuesto facilita la recuperación del 100% del volumen ya que la muestra biológica en el procesamiento no necesita tocar ninguna superficie sólida y también tiene el beneficio adicional de una característica anti-humectación.

Más particularmente, se pueden usar células de líquido compuesto de múltiples muestras. Las células de líquido compuesto, de múltiples muestras, se controlan en condiciones de temperatura específicas durante un tiempo específico para que se produzca la ligadura. Las condiciones típicas son 16 °C durante 1 hora para asegurar la ligadura de los fragmentos con extremos cohesivos. Después de la ligadura, la amplificación del ácido nucleico se realiza para amplificar selectivamente la zona correcta de interés y el siguiente paso de ligadura. Después de este paso, las muestras internas se combinan en una secuencia por pares, se agregan reactivos adicionales si se requieren y se procesan a la temperatura correcta generando fragmentos más largos. Este proceso se repite hasta que se alcanza la longitud final deseada del fragmento. La cadena de ADN sintético recién construido es aspirada y almacenada para su uso futuro.

La creación de células de líquido compuesto, de múltiples muestras, simplifica enormemente el procedimiento de ligadura de ADN. El volumen de reacción más pequeño, que normalmente no se utiliza en este proceso, garantiza una mayor eficiencia de reacción y tiempos de reacción más rápidos. La combinación de fragmentos de cadena de ADN diana para cada ligadura por pares subsiguientes se simplifica enormemente y el número de manipulaciones totales de líquido se reduce enormemente, ya que la secuencia completa de muestras de ADN diana se ubica conjuntamente dentro de la célula de líquido compuesto de múltiples muestras. La coalescencia interna de la muestra mediante este procedimiento es fácil de lograr manipulando las posiciones externas de la superficie del aceite dentro de las características de ubicación de la superficie hidrófoba. Este procedimiento de ligadura es particularmente útil cuando los productos de un paso de ligadura son necesarios para otro paso.

#### Revestimiento de microesferas de secuenciación genética

La preparación de microesferas de secuenciación genética es un proceso mediante el cual se recubren pequeñas microesferas en una química específica de la aplicación. El recubrimiento de las microesferas antes del cribado genético se puede lograr generando células de líquido compuesto con una solución de base acuosa de microesferas como volúmenes diana. La química de cebadores específica, utilizada para recubrir las microesferas, se introduce en la célula de fluido a través de un capilar que deposita una gotita acuosa directamente en la célula de fluido, de modo que los volúmenes diana se combinan, lo que da como resultado la mezcla y coalescencia de la química de cebadores con la solución acuosa de las microesferas.

Puede haber creación de una célula de líquido compuesto para la química de cebadores y luego la manipulación para fusionarse con la célula de líquido compuesto que contiene la solución acuosa de microesferas, de modo que los volúmenes diana se combinen y se mezclen.

Estos procedimientos proporcionan una forma conveniente de manipular y combinar volúmenes de submicrolitros de



fluido que actualmente no es posible lograr utilizando técnicas convencionales, reduciendo de ese modo los volúmenes de muestra iniciales y mejorando la eficiencia del revestimiento de microesferas reduciendo el volumen de reacción. El procesamiento adicional mediante PCR y ciclado térmico y secuenciación genética es específico de la aplicación.

- 5 El uso de células de líquido compuesto simplifica en gran medida el procedimiento de recogida para estos volúmenes diana relativamente pequeños. Las células de líquido compuesto que siguen al procesamiento individual se pueden combinar selectivamente, eliminando las microesferas no reactivadas. La célula de líquido compuesto facilita la recuperación del 100% del volumen ya que la muestra biológica en el procesamiento no necesita tocar ninguna superficie sólida y también tiene el beneficio adicional de una característica anti-humectante. Estas características hacen que la automatización del proceso bioquímico sea más fácil de favorecer.

10 La invención no se limita a las realizaciones descritas, sino que puede variar en cuanto a construcción y detalle. Por ejemplo, el fluido tampón encapsulante puede ser cualquier líquido o gas adecuado, lo más frecuentemente un líquido. El fluido portador puede ser cualquier líquido o gas adecuado, pero lo más frecuente es un líquido. La elección de fluido encapsulante y portador puede elegirse de manera que los grupos funcionales de los fluidos den como resultado la inmiscibilidad mutua que limita la difusión de las moléculas de fluido de portador en el fluido encapsulante y viceversa. Esta restricción de inmiscibilidad también debe aplicarse entre el fluido encapsulante y la muestra diana de modo que la difusión molecular esté limitada por los diferentes grupos funcionales de los fluidos constituyentes. Por ejemplo, los grupos funcionales fenilmetilo presentes en fenilmetilpolisiloxanos (aceites de silicona) elegidos para encapsular fluidos son no miscibles con los grupos funcionales perfluorados presentes en aceites portadores basados en fluorocarbonos que se eligen frecuentemente como fluidos portadores. Estos dos aceites son además no miscibles con muestras de base acuosa que son frecuentes en bioquímica molecular. También es ventajoso elegir fluidos de diferentes densidades de manera que el fluido portador tenga la densidad más alta y forme la capa más baja de fluido, el fluido encapsulante tenga la densidad más baja y la muestra diana tenga una densidad intermedia entre la del fluido portador y la del fluido encapsulante

15 La divulgación abarca un sistema de manejo de muestras que comprende una entrada de muestra-líquido, una entrada de encapsulante-líquido, un conducto de portador-líquido que comprende una característica de estabilización, un sistema de manejo de líquidos y un controlador conectado de manera operativa al sistema de manejo de líquidos. El controlador puede programarse para: (1) extraer un líquido encapsulante de la entrada de encapsulante-líquido; (2) descargar el líquido de encapsulado extraído (a) sobre una superficie libre de un líquido portador en el conducto portador-líquido para que el líquido encapsulante descargado no se mezcle con el líquido portador y flote sobre el líquido portador; (3) extraer un líquido de muestra de la entrada de muestra-líquido; y (4) descargar el líquido de muestra extraído, siendo el líquido de muestra no miscible con el líquido encapsulante y con el líquido portador, de modo que el líquido de muestra no se mezcle con el líquido encapsulante o con el líquido portador. Los diagramas de flujo de ejemplo se muestran en las FIG. 43-46.

25 El sistema de manejo de líquidos puede comprender un tubo de control y un accionador. El controlador puede estar programado para activar el accionador para hacer que el tubo de control realice los pasos (1) y (3) antes de llevar a cabo los pasos (2) y (4) (FIG. 44). El controlador puede estar programado para activar el accionador para hacer que el tubo de control realice el paso (1), luego el paso (3), luego (5) extraiga líquido de encapsulado adicional, luego (6) descargue el líquido encapsulante, luego realice el paso (4), luego el paso (2), de modo que el líquido encapsulante, el líquido de muestra y el líquido encapsulante adicional se descarguen como una unidad desde el tubo de control y sobre la superficie libre del líquido portador en el conducto de portador-líquido, fusionándose de ese modo el líquido encapsulante y el líquido de muestra adicional y rodeando el líquido de muestra para formar una célula de líquido compuesto (FIG. 45). El controlador también puede programarse para activar el accionador para hacer que el tubo de control, después del paso (5) y antes del paso (6), a (7) extraiga un separador (FIG. 45). El separador puede comprender aire. El controlador puede estar programado para activar el accionador para hacer que el tubo de control, después del paso (7) y antes del paso (6), (1a) extraiga un líquido encapsulante desde una entrada de encapsulante-líquido, luego (3a) extraiga un líquido de muestra desde una entrada de muestra-líquido, luego (5a) extraiga líquido encapsulante adicional, luego (6a) descargue el líquido encapsulante de los pasos (1a) y (5a) con el líquido de muestra del paso (3a) como segunda unidad del tubo de control y sobre la superficie libre del líquido portador en el conducto portador-líquido, formando así la segunda unidad una segunda célula de líquido compuesto (FIG. 45).

El controlador puede programarse adicionalmente para activar el accionador para hacer que el tubo de control, después del paso (5) y antes del paso (6), (8) extraiga un segundo líquido de muestra desde una segunda entrada de muestra-líquido, siendo el segundo líquido de muestra no miscible con el líquido portador y el líquido encapsulante, luego (9) extraiga líquido encapsulante adicional, luego (10) descargue el líquido encapsulante adicional de la etapa (9) y el segundo líquido de muestra en la unidad, de modo que la célula de líquido compuesto así formada comprenda una gotita del líquido de muestra y una gotita del segundo líquido de muestra (FIG. 46).

También se incluye como una divulgación de referencia un sistema de manejo de líquidos que puede comprender un tubo de control y un accionador, y el controlador está programado para activar el accionador para hacer que el tubo de control lleve a cabo los pasos (1) a (4) en el orden citado (FIG. 47). El controlador puede programarse para realizar el paso (1), luego repetir el paso (2) para una pluralidad de características de estabilización, luego realizar el

- 5 paso (3), luego repetir el paso (4) para la pluralidad de características de estabilización, formando así una pluralidad de células de líquido compuesto distribuidas entre las características de estabilización (FIG. 47). El controlador puede programarse adicionalmente para activar el accionador para hacer que el tubo de control (11) extraiga un reactivo que sea miscible con el líquido de muestra, y (12) descargue el reactivo próximo al líquido de muestra descargado (FIG. 47). El sistema de manejo de muestras puede comprender además un sistema de movimiento que traslade al menos una parte de descarga del sistema de manejo de líquidos en relación con el conducto de portador-líquido. El controlador puede estar programado para accionar el sistema de movimiento para hacer que el tubo de control mueva una célula de líquido compuesto formada en la superficie libre del líquido portador con relación al conducto portador-líquido.
- 10 En algunos ejemplos, (a) el conducto de portador-líquido comprende un baño dimensionado para recibir un disco que puede girar dentro del mismo en un baño de líquido portador; (b) el sistema comprende además (1) un accionador de rotación acoplado operativamente al disco para hacer que gire en el baño, y (2) un sistema de movimiento que traslade al menos una parte de descarga del sistema de manejo de líquidos verticalmente en relación con el conducto portador-líquido; y (c) el controlador está operativamente conectado al accionador de rotación y al sistema de movimiento y está programado para hacer que el sistema de rotación gire el disco y hacer que el sistema de movimiento traslade la parte de descarga del sistema de manejo de líquidos verticalmente en relación con el disco.
- 15 El controlador puede programarse para hacer que el sistema de manejo de líquidos descargue suficiente líquido encapsulante entre dos células de líquido compuesto, formadas en la superficie libre del líquido portador y separadas por un espacio, líquido para cerrar el espacio, dando lugar así a que la dos células de líquido compuesto se fusionen entre sí. En algunas realizaciones, el controlador puede programarse para hacer que el sistema de manejo de líquidos descargue el líquido de muestra del paso (4) próximo al líquido encapsulante descargado.
- 20 La divulgación abarca un procedimiento de manipulación de muestra que comprende extraer un líquido encapsulante de una entrada de encapsulante-líquido; descargar el líquido encapsulante extraído en una superficie libre de un líquido portador en un conducto portador-líquido, siendo el líquido encapsulante no miscible con el líquido portador, de modo que el líquido encapsulante descargado no se mezcla con el líquido portador, flota en la parte superior del líquido portador; extraer un líquido de muestra desde una entrada de muestra-líquido; y descargar el líquido de muestra extraído, siendo el líquido de muestra no miscible con el líquido encapsulante y con el líquido portador, de manera que el líquido de muestra no se mezcla con el líquido encapsulante o con el líquido portador.
- 25 La divulgación abarca un procedimiento para procesar muestras biológicas, comprendiendo el procedimiento encapsular una muestra en un fluido tampón no miscible y moverlos como una unidad combinada para la manipulación de las muestras.
- 30 La muestra, mientras está encapsulada, puede colocarse sobre o en un fluido portador.
- 35 El fluido portador puede ser un líquido y la muestra puede colocarse sobre la superficie del líquido, siendo el fluido portador no miscible con el fluido tampón encapsulante.
- El fluido portador puede tener una densidad mayor que el fluido tampón encapsulante.
- El fluido encapsulante puede ser no reactivo con la muestra diana.
- Puede haber una superficie de control que controle el movimiento del fluido tampón encapsulado a través de fuerzas electrostáticas tales como la introducción de muestras en el fluido tampón.
- 40 Puede haber una superficie de control que controle el movimiento del fluido tampón encapsulante a través de fuerzas de tensión superficial tales como la introducción de muestras en el fluido amortiguador.
- Puede haber una pluralidad de superficies de control.
- Las superficies de control pueden incluir una superficie dinámica.
- Las superficies de control pueden incluir una superficie estática.
- 45 Las superficies de control pueden incluir una combinación de superficies dinámicas y estáticas.
- Las superficies de control pueden sumergirse dentro del fluido portador en algunas ocasiones.
- Las superficies de control pueden estar en la interfaz de fluido portador.
- Las superficies de control pueden estar por encima del fluido portador.
- El fluido portador puede fluir.
- 50 Al menos un sistema de análisis puede realizar el análisis de la muestra biológica dentro del fluido tampón

- encapsulante en el fluido portador.
- Puede haber una pluralidad de etapas de análisis.
- El análisis puede incluir ciclar térmicamente el fluido tampón encapsulante.
- El fluido encapsulante tampón puede ser un aceite de base de base silicona o un aceite de base fluorocarbono.
- 5 El fluido portador puede ser un aceite de base silicona o un aceite de base fluorocarbono.
- La muestra puede ser una muestra biológica.
- La muestra puede ser una muestra biológica de base acuosa.
- La muestra puede ser una partícula sólida.
- La muestra puede ser una emulsión acuosa en aceite.
- 10 La amplificación de la muestra se puede realizar, y en algunos casos se puede realizar la cuantificación de la amplificación.
- Se puede realizar la cuantificación en tiempo real de la amplificación.
- El procedimiento puede comprender formar una muestra diana encapsulada en un volumen de fluido no miscible y depositarla en un fluido portador que no sea miscible con el fluido tampón encapsulante; y controlar el fluido tampón encapsulado con fuerzas electrostáticas.
- 15 La muestra diana puede encapsularse en un volumen de fluido no miscible dispensado en un fluido portador que fluye.
- La muestra encapsulada puede dispensarse en una ubicación estática.
- Se puede realizar el procesamiento biológico de la muestra encapsulada, y la muestra encapsulada se puede combinar con una o más muestras encapsuladas.
- 20 Se puede realizar la amplificación genómica.
- El procedimiento puede comprender la etapa de controlar el fluido tampón encapsulante con fuerzas de tensión superficial.
- Se puede realizar la ligadura de ácido nucleico.
- 25 La divulgación proporciona un sistema de manejo de muestras que comprende medios para realizar los pasos de cualquier procedimiento como se define aquí.
- El sistema puede comprender: un conducto para el flujo continuo del fluido portador, tal como un aceite que lleva el fluido encapsulante con la muestra diana; una etapa de análisis; y un controlador para controlar el sistema.
- El sistema puede comprender una etapa de ciclado térmico.
- 30 El sistema puede estar adaptado para depositar el encapsulado en o sobre una posición estática en un fluido portador.
- En el presente documento puede haber una pluralidad de posiciones.
- Puede haber una pluralidad de conductos.
- El sistema puede comprender además medios para controlar el movimiento de una muestra encapsulada por fuerzas electrostáticas.
- 35 El sistema puede estar adaptado para mover una muestra encapsulada en o sobre un fluido portador estático.
- La muestra puede moverse a cualquiera de una pluralidad de ubicaciones y puede haber una pluralidad de muestras en el fluido portador estático.
- Un conducto puede estar cerrado.
- 40 La divulgación abarca un procedimiento para procesar muestras, en algunos casos muestras biológicas, comprendiendo el procedimiento encapsular dos o más muestras en un fluido tampón de manera no miscible con las muestras y moverlas como una unidad combinada.

El fluido tampón puede ser un líquido.

Dos o más muestras, mientras están encapsuladas, pueden colocarse sobre o en un fluido portador.

La muestra puede ser una reacción múltiple.

Se pueden encapsular dos o más muestras dentro de la superficie del fluido encapsulante.

- 5 El fluido portador puede ser un líquido y la muestra o muestras, mientras que se encapsulan, pueden colocarse en la superficie del líquido, siendo el fluido portador no miscible con el fluido tampón encapsulante.

La muestra, mientras está encapsulada, puede combinarse con otra muestra, mientras está encapsulada, dando como resultado dos muestras discretas, mientras están encapsuladas dentro de una superficie encapsulante.

La muestra, mientras está encapsulada, puede procesarse para una o más dianas.

- 10 Al menos un sistema de análisis puede realizar el análisis de una o más muestras biológicas dentro del fluido tampón encapsulante, en algunos casos en el fluido portador.

El fluido encapsulante tampón puede tener un aditivo añadido para la estabilidad de la muestra.

El fluido encapsulante tampón puede ser un aceite de base silicona con un aditivo de polisorbato.

El aditivo de polisorbato se puede agregar en el intervalo de 0,001% a 10%.

- 15 El fluido tampón puede incluir un aditivo que incluya un tensioactivo.

El número de equilibrio hidrófilo-lipófilo total de los tensioactivos añadidos puede estar en un intervalo de 2 a 8.

El procedimiento puede comprender formar dos o más muestras diana encapsuladas en un volumen de fluido no miscible y depositarlo en un fluido portador que no sea miscible con el fluido tampón encapsulante; y controlar el fluido tampón encapsulado con fuerzas electrostáticas.

- 20 Dos o más muestras diana pueden encapsularse en un volumen de fluido no miscible dispensado en un fluido portador que fluye.

Puede dispensarse al menos una muestra encapsulada en una ubicación estática.

Se puede realizar el procesamiento biológico de al menos una muestra encapsulada, y al menos la muestra encapsulada se puede combinar con una o más muestras encapsuladas.

- 25 Se puede añadir una muestra adicional a la célula formando así muestras ordenadas.

Las muestras pueden ser ordenadas para detección óptica.

La célula puede ser transportada por choque de un gas desde una dirección de salida tal como un tubo.

La divulgación proporciona un sistema de manejo de muestras que comprende medios para realizar los pasos de cualquier procedimiento definido anteriormente.

- 30 El sistema comprende: un conducto para el flujo continuo del fluido portador tal como aceite que transporta el fluido encapsulante con dos o más muestras diana; una etapa de análisis; y un controlador para controlar el sistema.

El sistema puede comprender: un conducto para el flujo de un fluido tampón tal como aceite con dos o más muestras diana que está interconectado con un fluido portador; una etapa de análisis; y un controlador para controlar el sistema.

- 35 El sistema puede comprender: un larguero hidrófobo en movimiento sobre el cual un fluido portador, tal como un aceite, lleva fluido tampón con dos o más muestras diana; una etapa de análisis; y un controlador para controlar el sistema.

El aceite portador puede tener un aditivo tensioactivo.

- 40 La divulgación puede usarse para procesar una muestra, estando la muestra encapsulada en un fluido tampón no miscible y colocada en una superficie de control hidrófoba para la manipulación de la muestra.

La superficie de control hidrófoba puede ser estacionaria.

La superficie de control hidrófoba puede ser dinámica.

La superficie de control hidrófoba puede ser un fluoropolímero.

- Puede haber una pluralidad de superficies de control hidrófobas.
- La superficie de control puede estar electrostáticamente activada.
- Las superficies de control hidrófobas pueden incluir una combinación de superficies dinámicas y estáticas.
- La célula de líquido compuesto puede controlarse mediante una o más superficies de control hidrófobas.
- 5 La superficie de control hidrófoba puede tener temperatura controlada.
- La superficie de control hidrófoba puede ser parte de un sistema de detección óptica.
- La superficie de control hidrófoba puede tener un marcador para la detección óptica.
- La superficie de control hidrófoba puede tener un circuito de identificación de radiofrecuencia.
- La superficie de control hidrófoba puede controlar una pluralidad de células de líquido compuesto.
- 10 La superficie de control hidrófoba puede tener características de estabilización.
- Puede haber una pluralidad de características de estabilización.
- Las características de estabilización pueden ser bolsas en la superficie de control hidrófoba.
- Las características de estabilización pueden tener forma de v.
- Las características de estabilización pueden tener forma circular.
- 15 Las características de estabilización pueden ser ahusadas.
- Las características de estabilización pueden usarse para localizar la muestra encapsulada en un fluido tampón no miscible en un fluido portador recíprocamente no miscible.
- Las características de estabilización pueden estar dispuestas para formar una red.
- La red puede usarse para mezclar células de líquido compuesto.
- 20 La red puede usarse para transportar una célula de líquido compuesto.
- La red puede comprender una superficie de control hidrófoba estática.
- La red puede comprender una superficie de control hidrófoba dinámica.
- La red puede comprender una combinación de superficies de control estáticas y dinámicas.
- Se puede realizar la cuantificación en tiempo real de las proteínas.
- 25 La muestra encapsulada se puede dispensar, por ejemplo, en una ubicación estática.
- Se puede realizar el procesamiento biológico de la muestra encapsulada, y/o la muestra encapsulada se puede combinar con una o más muestras encapsuladas.
- El sistema puede comprender: un conducto para la deposición de fluido encapsulante adyacente a una superficie de control hidrófoba con deposiciones periódicas de muestras diana; de modo que la superficie de control hidrófoba transporta el fluido encapsulante con la muestra diana; una etapa de análisis; y un controlador para controlar el sistema. La deposición puede ser continua.
- 30 La divulgación proporciona procedimientos y sistemas para generar, y/o transportar, y/o mezclar, y/o procesar muestras biológicas. Lo consigue mediante la formación de una célula de fluido no miscible dentro de la cual puede manipularse la muestra biológica (sólida, líquida, emulsión de agua en aceite o suspensión de sólido en un líquido no miscible). El procedimiento y el sistema pueden generar, y/o transportar, y/o mezclar, y/o procesar un intervalo de volúmenes desde volúmenes de microlitros hasta subnanolitros.
- 35 La divulgación proporciona un procedimiento y/o un sistema para procesar muestras biológicas, que comprende encapsular dos o más muestras en un fluido tampón que no sea miscible con las muestras, para proporcionar una célula de múltiples muestras y mover la célula como una unidad combinada para el manejo de muestras.
- 40 El procedimiento y el sistema pueden generar volúmenes de microlitros o nanolitros o subnanolitros no contaminantes que pueden controlarse mediante varios procedimientos.
- Pueden generarse una o más muestras biológicas dentro de una célula de fluido no miscible y esta célula de líquido

compuesto se coloca luego en una superficie libre de un fluido recíprocamente no miscibles, denominado fluido portador.

5 El fluido portador puede proporcionar una plataforma de manipulación para la célula de líquido compuesto. La célula de líquido compuesto puede ser generada recogiendo dentro de un tubo los componentes compuestos en la siguiente secuencia: fluido no miscible, muestra biológica (fluido, emulsión, partículas sólidas o suspendidas), fluido no miscible, y, en algunos casos, aire. Esto se puede repetir para múltiples células de líquido compuesto con el tubo, o, en algunos casos, para una o más células de líquido compuesto de múltiples muestras.

El contenido del tubo se puede luego dispensar sobre el fluido portador generando las células de líquido compuesto.

10 El procedimiento y el sistema pueden generar volúmenes de nanolitros o subnanolitros no contaminantes que se pueden controlar mediante una serie de procedimientos. El procedimiento de la divulgación contempla que la célula de líquido compuesto será controlada por fuerzas electrostáticas.

La divulgación puede tener al menos una superficie de control cargada eléctricamente que puede controlar la célula de líquido compuesto. La divulgación puede proporcionar un procedimiento independiente de control mediante el uso del efecto hidrófobo.

15 La divulgación puede tener al menos una superficie de control que tiene una propiedad de hidrofobicidad que permite la adhesión entre ella y el fluido exterior de una célula de fluido no miscible mientras repele el volumen de fluido interno, evitando la contaminación. Utilizando estructuras sólidas integradas o parcialmente incrustadas en el aceite encapsulante y las muestras biológicas. Este proceso de mezcla facilita la combinación de volúmenes diana de submicrolitros con gran eficiencia, evita la contaminación de otras fuentes y garantiza que no haya volumen

20 La divulgación puede proporcionar el transporte de células de líquido compuesto en cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. La mezcla de las células de líquido compuesto en algunas realizaciones implica el transporte de las células de líquido compuesto hasta el contacto, promoviendo la coalescencia fluida del aceite encapsulante y las muestras biológicas. Este proceso de mezcla facilita la combinación de volúmenes diana de submicrolitros con gran eficiencia, evita la contaminación de otras fuentes y garantiza que no haya volumen  
25 muerto por manipulación química. Las muestras no se mezclan, lo que da como resultado células de líquido compuesto de múltiples muestras.

El transporte de células de líquido compuesto a través de un proceso biológico puede no ser susceptible al aire, lo que conduce a la evaporación de volúmenes diana a temperaturas elevadas. El transporte independiente de cada célula de líquido compuesto dentro del sistema a través del aceite portador reduce el consumo de energía del  
30 sistema general que de otro modo sería necesario para calentar, enfriar o bombear el fluido portador, y en su lugar el protocolo térmico puede dirigirse a la célula de líquido compuesto.

La divulgación permite una fácil automatización de los procesos bioquímicos. Permite el control dinámico de muestras individuales, lo que permite la recuperación del volumen completo de las muestras. Permite el uso tanto en una plataforma de manipulación de arquitectura abierta como cerrada. Permite el análisis y la manipulación de  
35 muestras biológicas. Las muestras se pueden analizar fácilmente por procedimientos ópticos, acústicos o electromagnéticos.

Las características individuales de diversas realizaciones descritas en este documento se pueden combinar como se desee mutatis mutandis, en la medida en que no sean recíprocamente excluyentes entre sí.

**REIVINDICACIONES**

1. Un sistema de manejo de muestras que comprende:

una entrada de muestra-líquido para un líquido de muestra (42);

una entrada de encapsulante-líquido para un líquido encapsulante (43);

5 un conducto de portador-líquido para un líquido portador (46);

en donde el líquido de muestra (42) tiene una densidad entre la del líquido portador (46) y la del líquido encapsulante (43) y el líquido portador (46) tiene una densidad más alta que la del líquido encapsulante (43);

un sistema de manejo de líquidos que comprende un tubo de control (44) y un accionador; y

10 un controlador conectado operativamente al sistema de manejo de líquidos;

en donde el controlador está programado para hacer que el sistema de manejo de líquidos:

(i) extraiga un líquido encapsulante (43) de la entrada encapsulante-líquido;

15 (ii) descargue el líquido encapsulante (43) sobre una superficie libre de un líquido portador (46) en el conducto de portador-líquido, siendo el líquido encapsulante (43) no miscible con el líquido portador (46), de modo que el líquido encapsulante descargado (43) no se mezcla con el líquido portador (46) y flota sobre el líquido portador (46);

(iii) extraiga un líquido de muestra (42) desde la entrada de muestra-líquido; y

20 (iv) descargue el líquido de muestra extraído (42), siendo el líquido de muestra (42) no miscible con el líquido encapsulante (43) y con el líquido portador (46), de modo que el líquido de muestra (42) no se mezcla con el líquido encapsulante (43) o con el líquido portador (46);

y en donde el controlador está programado para activar el accionador para hacer que el tubo de control (44) realice primero el paso (i) extraer un líquido encapsulante (43), luego llevar a cabo el paso (iii) extraer un líquido de muestra (42), luego llevar a cabo el paso (i) nuevamente para extraer el líquido encapsulante adicional (43), luego llevar a cabo el paso (ii) descargar el líquido encapsulante adicional (43), luego llevar a cabo el paso (iv) descargar el líquido de muestra extraído, y luego llevar a cabo el paso (ii) nuevamente para descargar el líquido encapsulante (43), de modo que el líquido encapsulante (43), el líquido de muestra (42) y el líquido encapsulante adicional (43) sean descargados como una unidad desde el tubo de control (44) y sobre la superficie libre del líquido portador (46) en el conducto de portador-líquido, fusionándose de ese modo el líquido encapsulante (43) y el líquido encapsulante adicional (43) y rodeando así el líquido de muestra (42) para formar una célula de líquido compuesto.

30 2. Sistema de la reivindicación 1, en donde el controlador está programado adicionalmente para activar el accionador para hacer que el tubo de control (44), después de realizar el paso (i) vuelva a extraer líquido encapsulante adicional (43) y antes de llevar a cabo el paso (ii) descargue el fluido encapsulante adicional (43), (v) extraer un separador (45).

3. Sistema de la reivindicación 2, en donde el separador (45) comprende aire.

35 4. Sistema de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el controlador está programado adicionalmente para activar el accionador para hacer que el tubo de control (44), después del paso (v) y antes de llevar a cabo el paso (ii) descargue el fluido encapsulante adicional (43), (i(a)) extraiga un líquido encapsulante (43) desde una entrada de encapsulante-líquido, luego (iii(a)) extraiga un líquido de muestra (42) desde una entrada de muestra-líquido, luego (v(a)) extraiga líquido encapsulante adicional (43), luego (vi(a)) descargue el líquido encapsulante (43) de los pasos (i(a)) y (v(a)) con el líquido de muestra (42) del paso (iii(a)) como una segunda unidad del tubo de control (44) y sobre la superficie libre del líquido portador (46) en el conducto de portador-líquido, formando así la segunda unidad una segunda célula de líquido compuesto.

45 5. Sistema de la reivindicación 1, en donde el controlador está programado adicionalmente para activar el accionador para hacer que el tubo de control (44) después de realizar el paso (i) extraiga de nuevo líquido encapsulante adicional y antes de llevar a cabo el paso (ii) descargue el fluido encapsulante adicional (43), (vi) extraiga un segundo líquido de muestra (42) desde una segunda entrada de muestra-líquido, siendo el segundo líquido de muestra (42) no miscible con el líquido portador (46) y el líquido encapsulante (43), luego (vii) extraiga líquido encapsulante adicional (43), luego (viii) descargue el líquido encapsulante adicional (43) del paso (vii) y el segundo líquido de muestra (42) en la unidad, de modo que la célula de líquido compuesto formado comprenda una gotita del líquido de muestra (42) y una gotita del segundo líquido de muestra (42).

6. Sistema de la reivindicación 1, en donde el sistema de manejo de líquidos comprende un tubo de control (44) y un

accionador, y el controlador está programado para activar el accionador para hacer que el tubo de control (44) realice los pasos (i) a (iv) en el orden citado.

5 7. Sistema de la reivindicación 6, en donde el controlador está programado adicionalmente para activar el accionador para hacer que el tubo de control (44) (ix) extraiga un reactivo que sea miscible con el líquido de muestra (42), y (x) descargue el reactivo próximo al líquido de muestra descargado (42).

10 8. Sistema de cualquier reivindicación precedente, en donde (a) el conducto de portador-líquido comprende un baño dimensionado para recibir un disco que puede girar dentro de un baño de líquido portador (46); (b) el sistema comprende además (1) un accionador de rotación acoplado operativamente al disco para hacer que gire en el baño, y (2) un sistema de movimiento que traslada al menos una parte de descarga del sistema de manejo de líquidos verticalmente en relación con el conducto portador-líquido; y (c) el controlador está conectado operativamente al accionador de rotación y al sistema de movimiento y está programado para hacer que el sistema de rotación gire el disco y haga que el sistema de movimiento traslade la parte de descarga del sistema de manejo de líquidos verticalmente en relación con el disco.

15 9. Sistema de la reivindicación 8, en donde el controlador está programado adicionalmente para accionar el sistema de movimiento para hacer que el tubo de control (44) mueva una célula de líquido compuesto formada sobre la superficie libre del líquido portador (46) en relación con el conducto de portador-líquido (46).

20 10. Sistema de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el controlador está programado adicionalmente para hacer que el sistema de manejo de líquidos descargue suficiente líquido encapsulante (43) entre dos células de líquido compuesto, formadas en la superficie libre del líquido portador (46) y separadas por un espacio, para cerrar el espacio, haciendo de ese modo que las dos células de líquido compuesto se fusionen entre sí.

11. El sistema de cualquier reivindicación precedente, en donde el controlador está programado para hacer que el sistema de manejo de líquidos descargue el líquido de muestra (42) de el paso (iv) próximo al líquido encapsulante descargado (43).

25 12. Un procedimiento de manejo de muestras, que comprende:

proporcionar una entrada de muestra-líquido para un líquido de muestra (42);

proporcionar una entrada de encapsulante-líquido para un líquido encapsulante (43);

proporcionar un conducto de portador-líquido para un líquido portador (46);

30 en donde el líquido de muestra (42) tiene una densidad entre la del líquido portador (46) y la del líquido encapsulante (43) y el líquido portador (46) tiene una densidad más alta que la del líquido encapsulante (43);

proporcionar un sistema de manejo de líquidos que comprende un tubo de control (44) y un controlador; y

proporcionar un controlador conectado operativamente al sistema de manejo de líquidos;

en donde el controlador está programado para hacer que el sistema de manejo de líquidos:

35 (i) extraiga un líquido encapsulante (43) desde una entrada de encapsulante-líquido;

(ii) descargue el líquido encapsulante (43) sobre una superficie libre de un líquido portador (46) en el conducto portador-líquido, siendo el líquido encapsulante (43) no miscible con el líquido portador (46), de modo que el líquido encapsulante descargado (43) no se mezcla con el líquido portador (46) y flota sobre el líquido portador (46);

40 (iii) extraiga un líquido de muestra (42) desde la entrada de muestra-líquido; y

(iv) descargue el líquido de muestra extraído (42), siendo el líquido de muestra (42) no miscible con el líquido encapsulante (43) y con el líquido portador (46), de modo que el líquido de muestra (42) no se mezcle con el líquido encapsulante (43) o con el líquido portador (46);

45 y en donde el controlador está programado para activar el accionador para hacer que el tubo de control (44) realice primero el paso (i) para extraer un líquido encapsulante (43), luego realizar el paso (iii) de extraer un líquido de muestra (42), luego llevar a cabo el paso (i) para extraer nuevamente líquido encapsulante adicional (43), luego llevar a cabo el paso (ii) para descargar el líquido encapsulante adicional (43), luego llevar a cabo el paso (iv) para descargar el líquido de muestra extraído, y luego llevar a cabo el paso (ii) nuevamente para descargar el líquido encapsulante (43), de modo que el líquido encapsulante (43), el líquido de muestra (42) y el líquido encapsulante adicional (43) son descargados como una unidad desde el tubo de control (44) y sobre la superficie libre del líquido portador (46) en el conducto de portador-líquido, fusionándose de ese modo el líquido encapsulante (43) y el líquido



encapsulante adicional (43) y rodeando el líquido de muestra (42) para formar una célula de líquido compuesto.

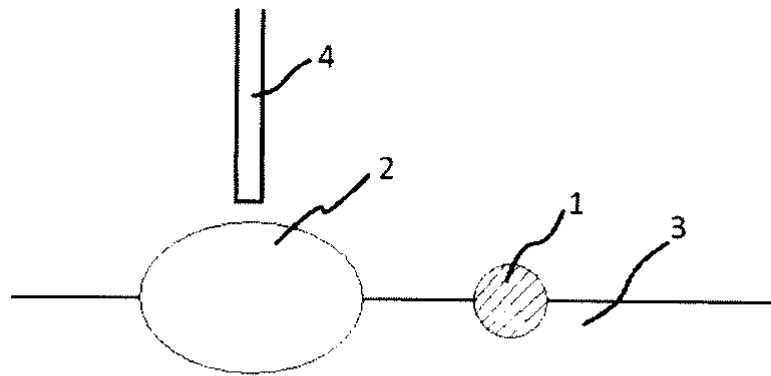


FIG. 1A

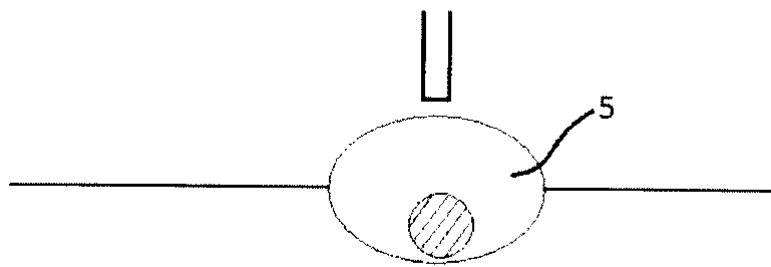


FIG. 1B

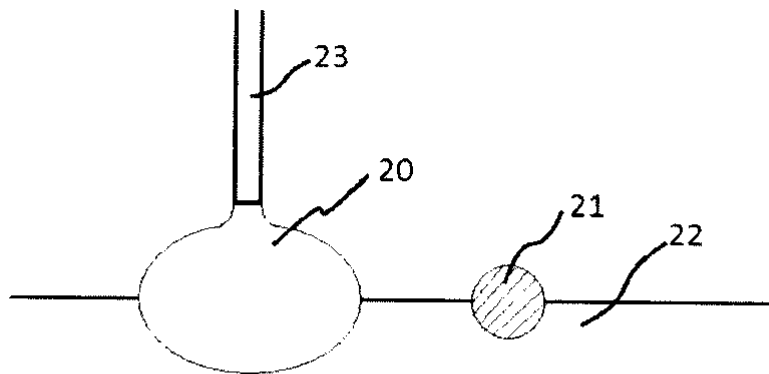


FIG. 2A

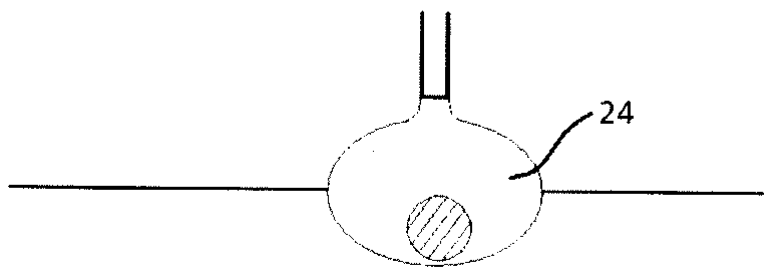


FIG. 2B

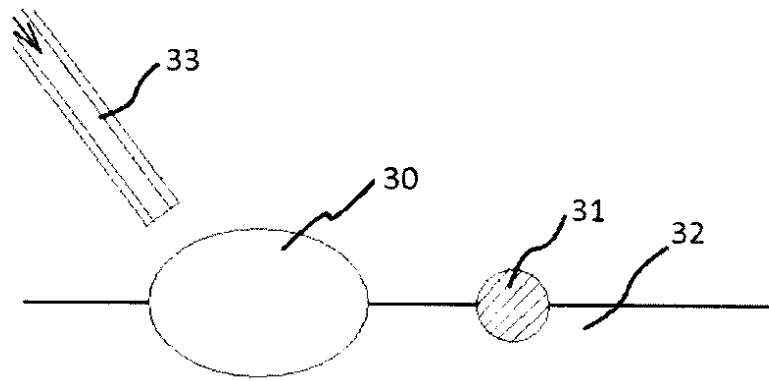


FIG. 3A

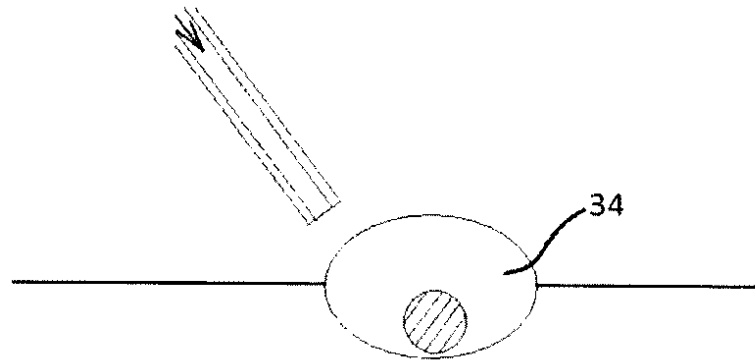


FIG. 3B

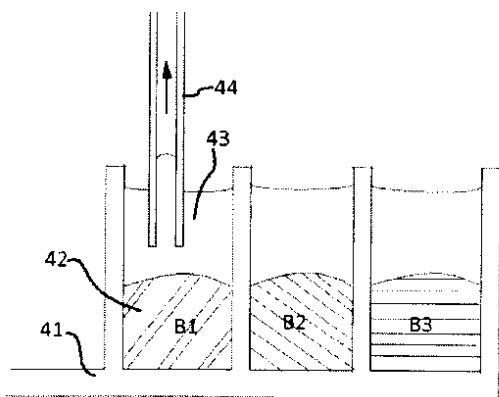


FIG. 4A

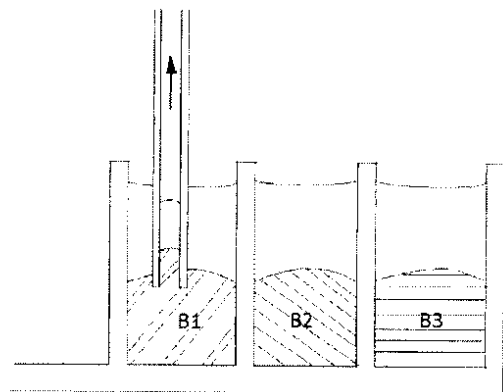


FIG. 4B

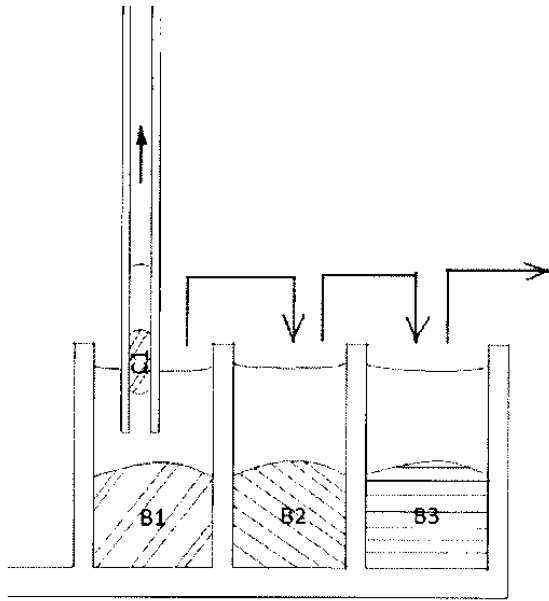


FIG. 4C

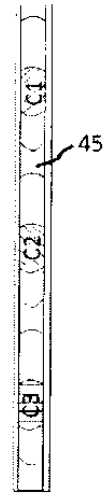


FIG. 4D

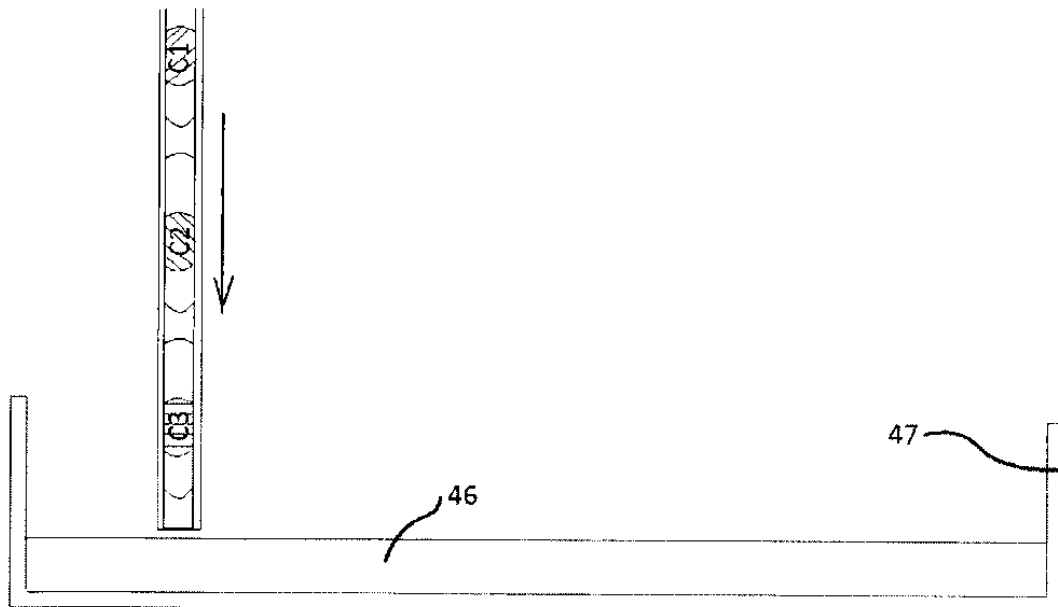


FIG. 4E

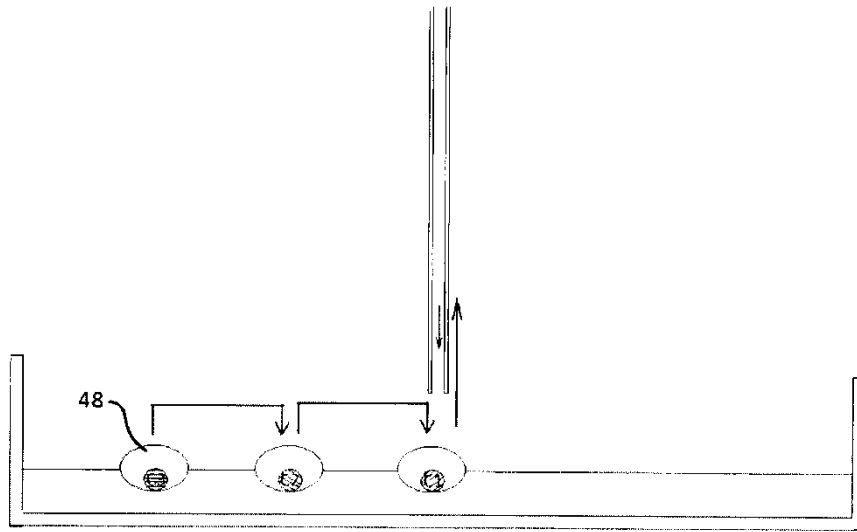


FIG. 4F

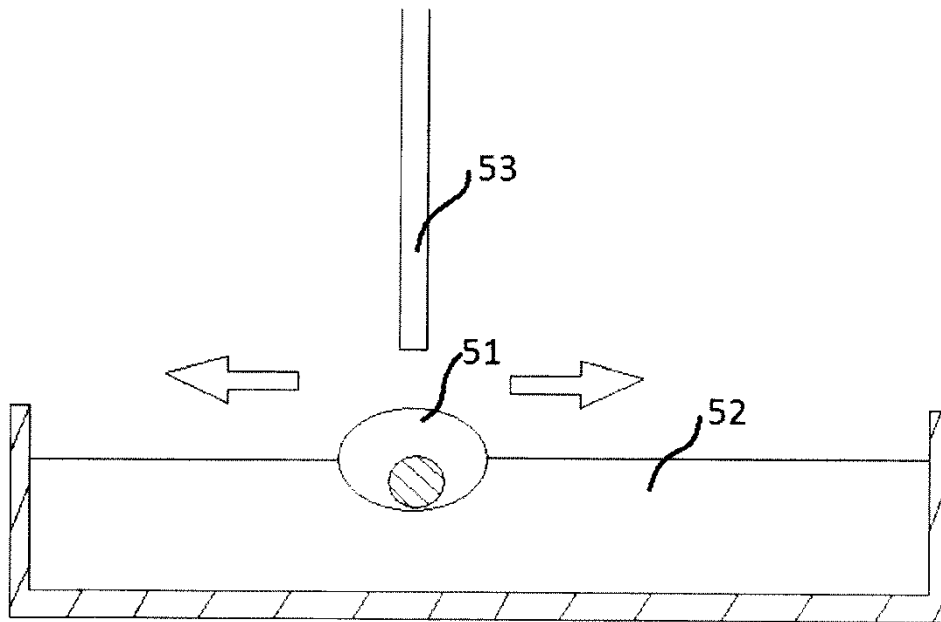


FIG. 5

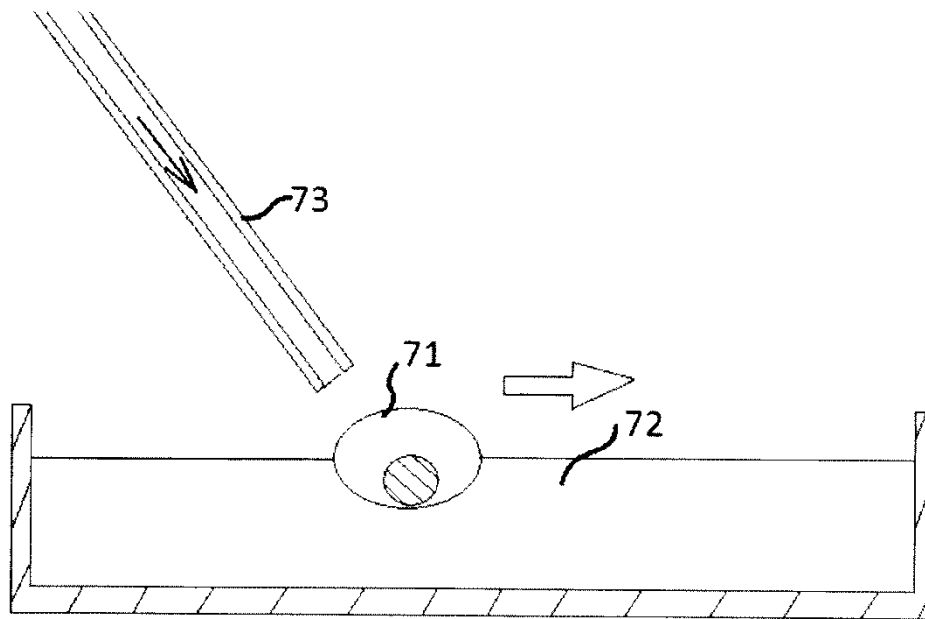
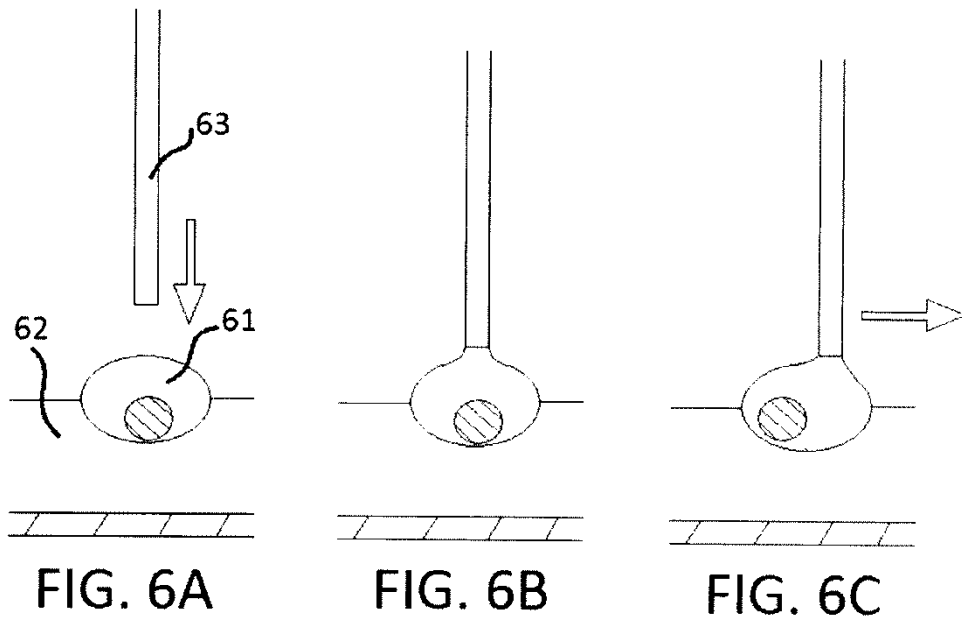


FIG. 7

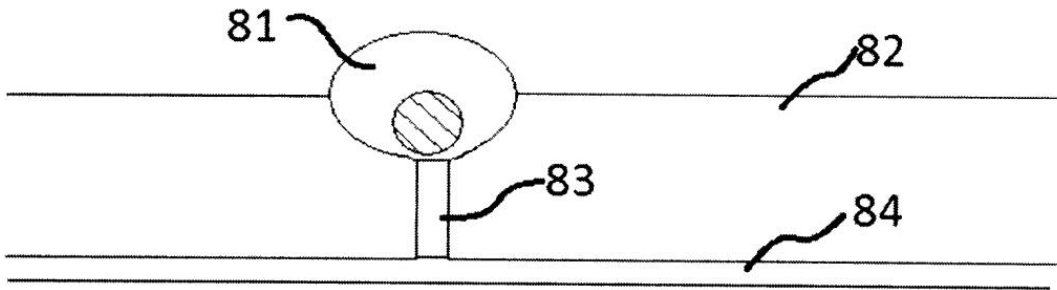


FIG. 8

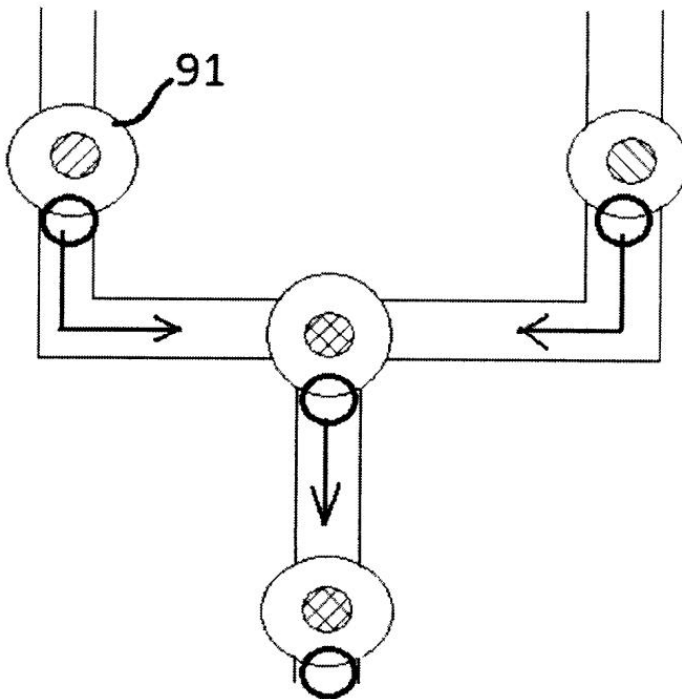


FIG. 9A

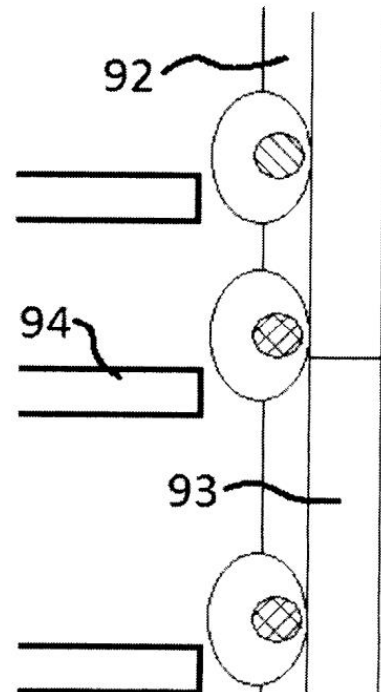


FIG. 9B

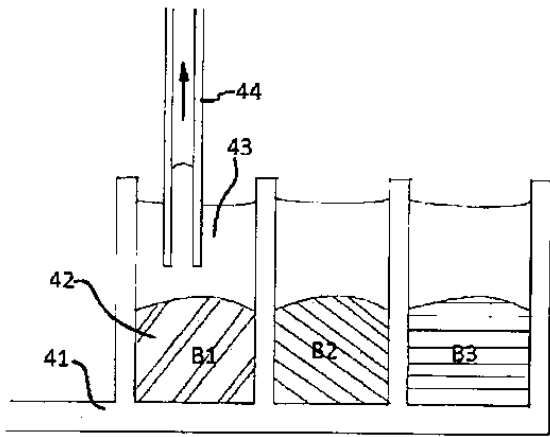


FIG. 10A

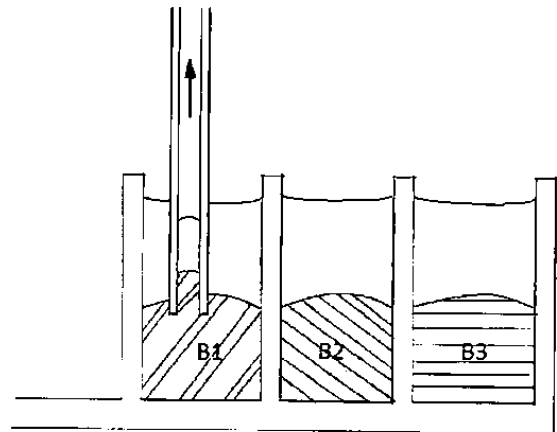


FIG. 10B

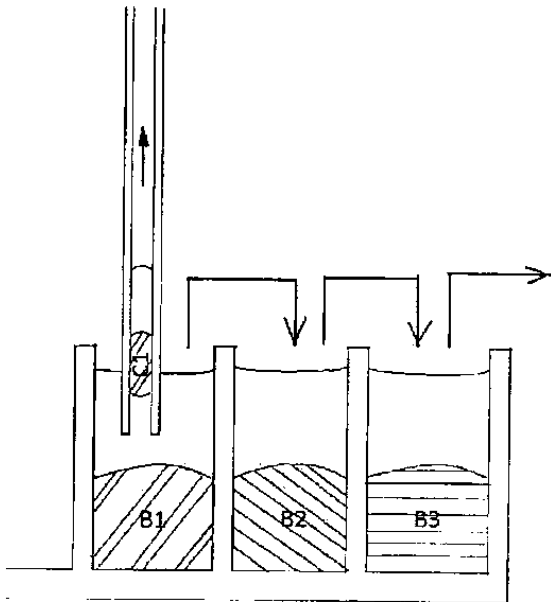


FIG. 10C



FIG. 10D



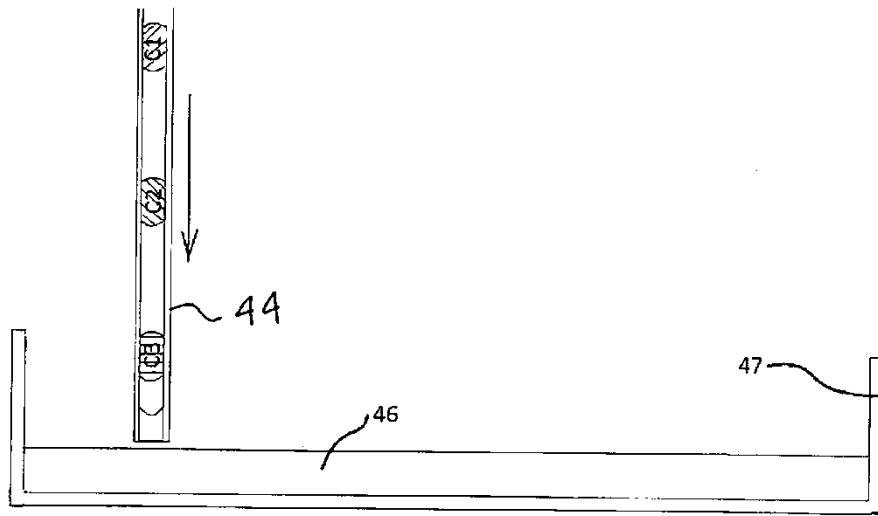


FIG. 10E

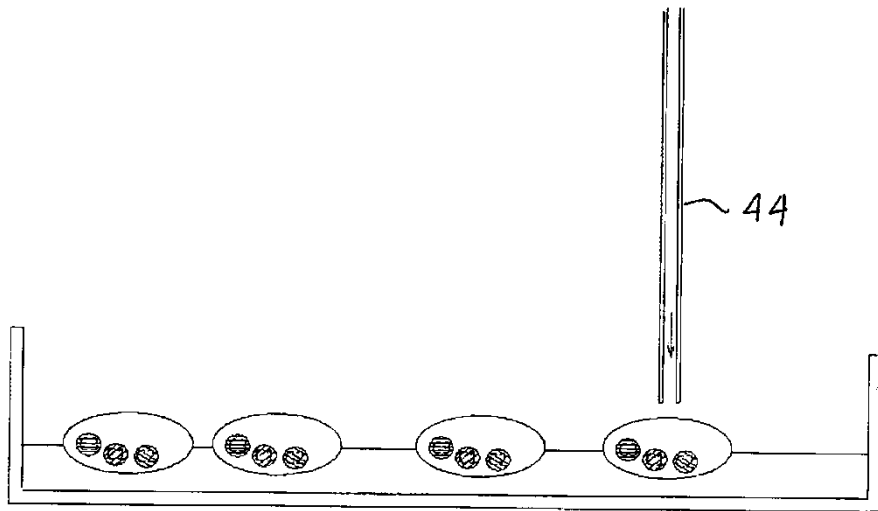


FIG. 10F

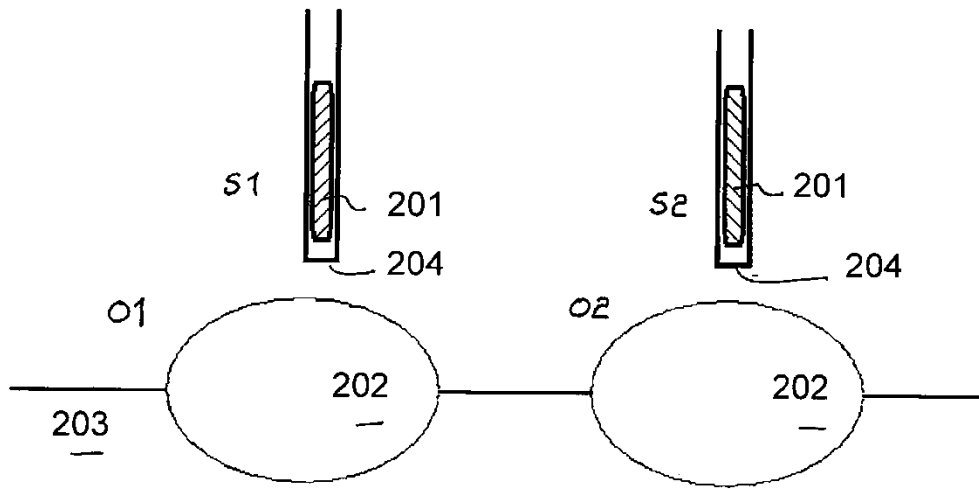


FIG. 11A

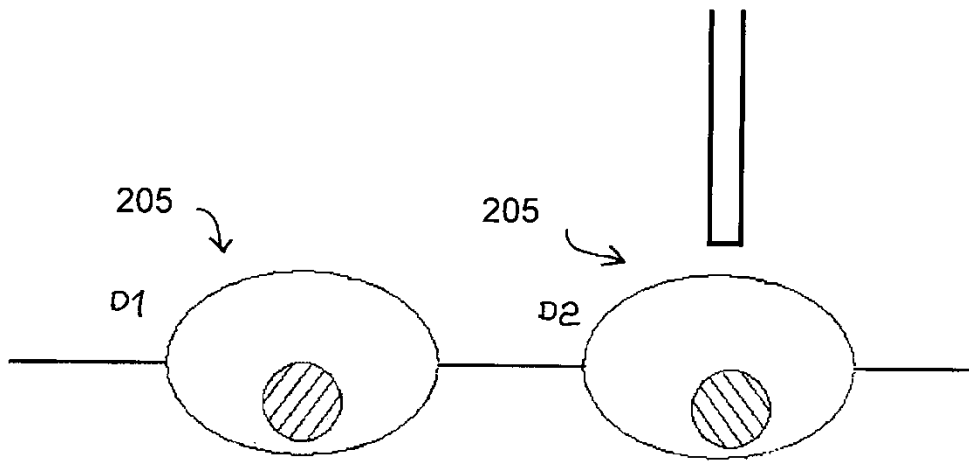


FIG. 11B

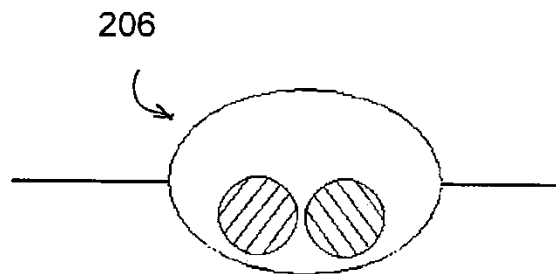


FIG. 11C

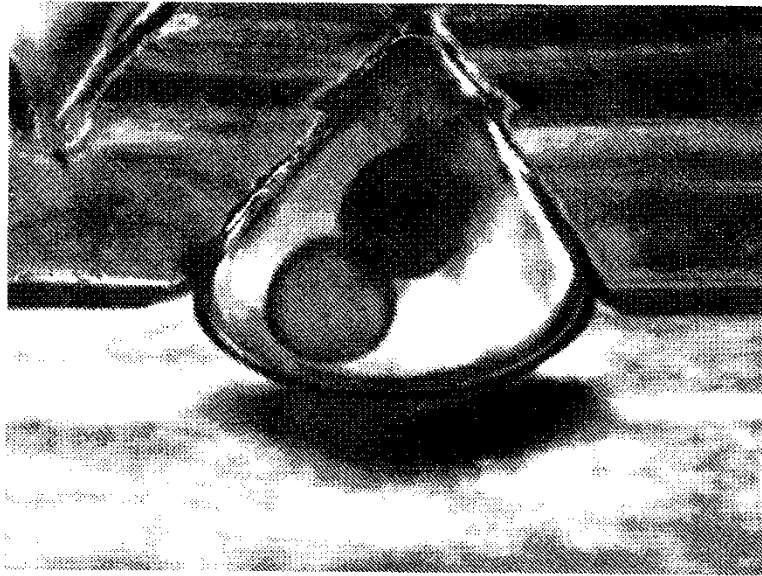


FIG. 12A

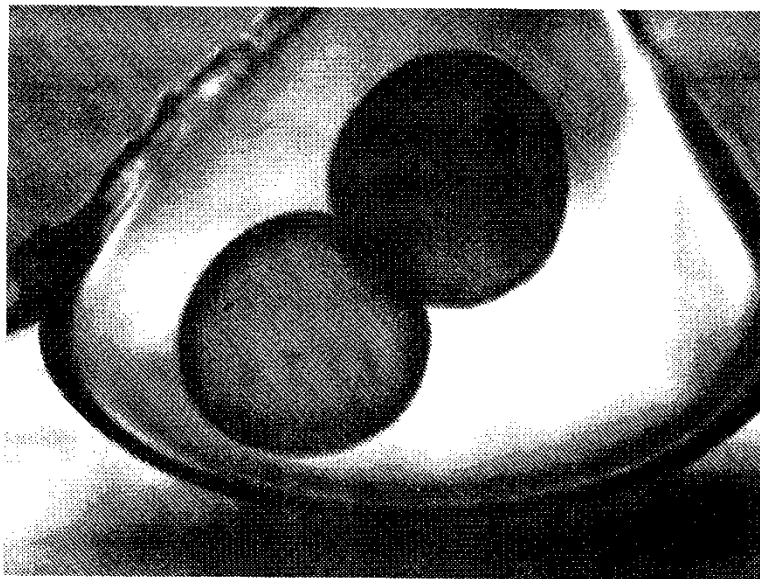
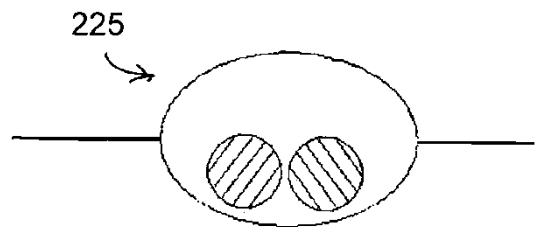
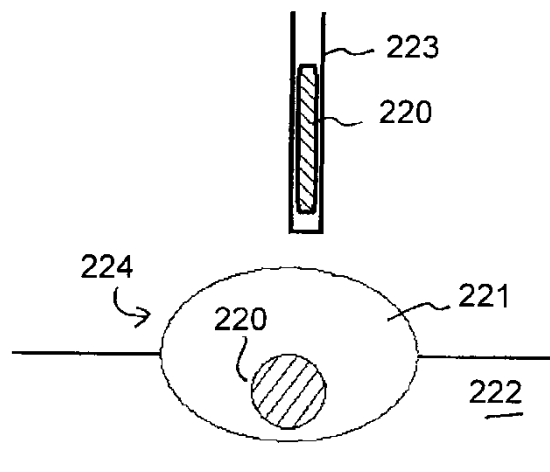
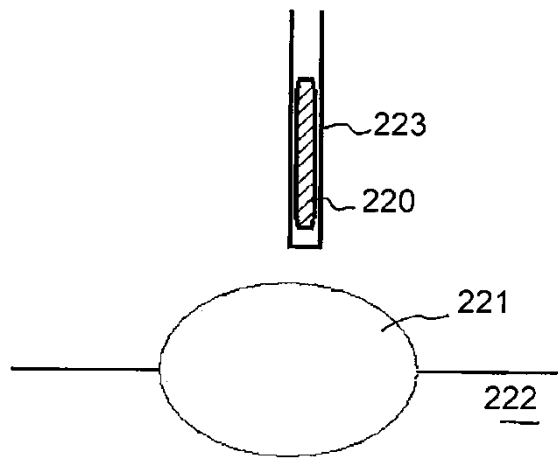


FIG. 12B



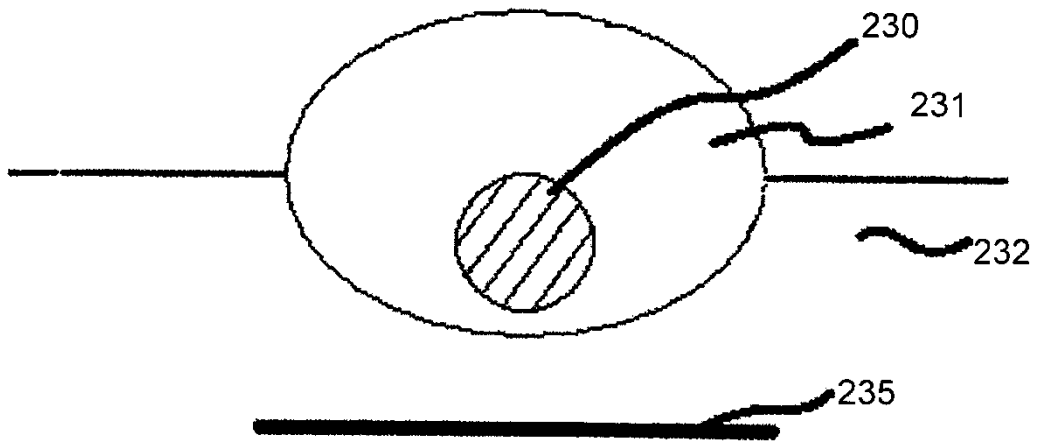


FIG. 14A

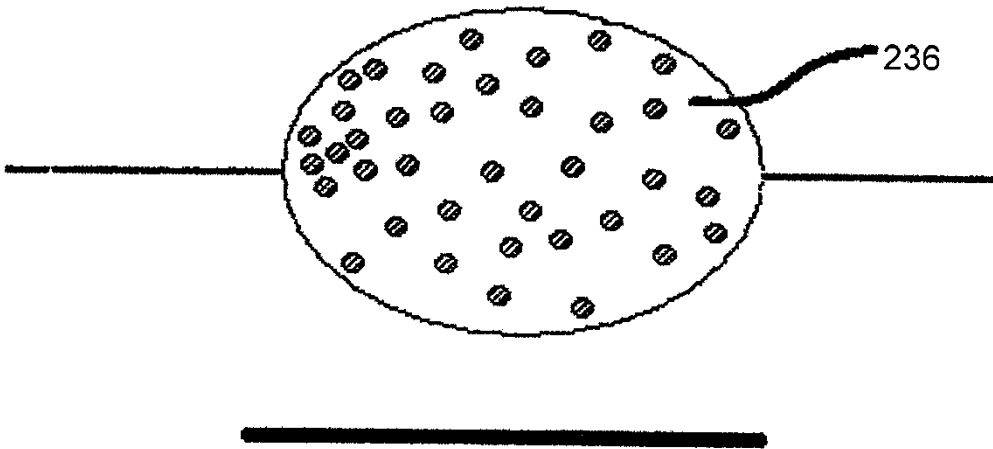


FIG. 14B

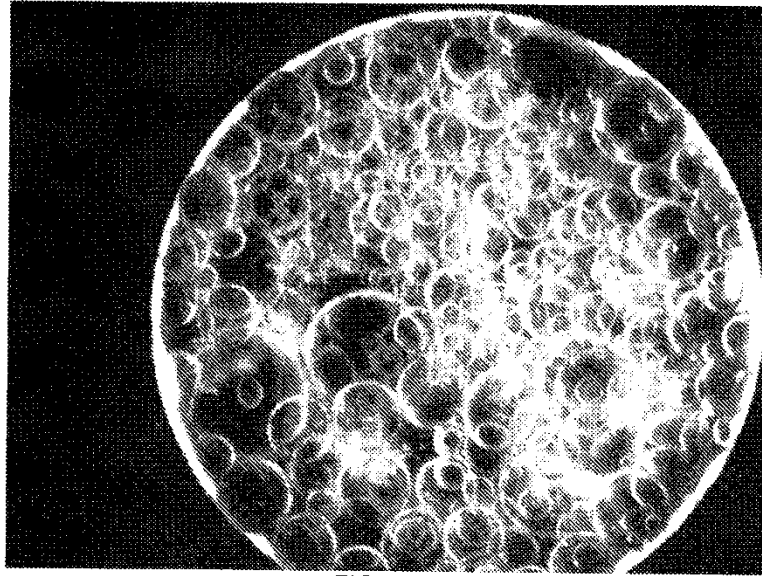


FIG. 15A

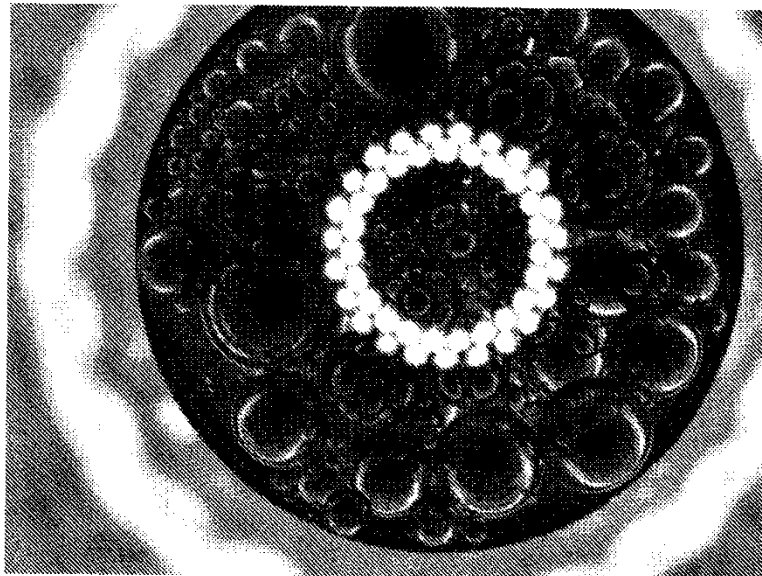


FIG. 15B

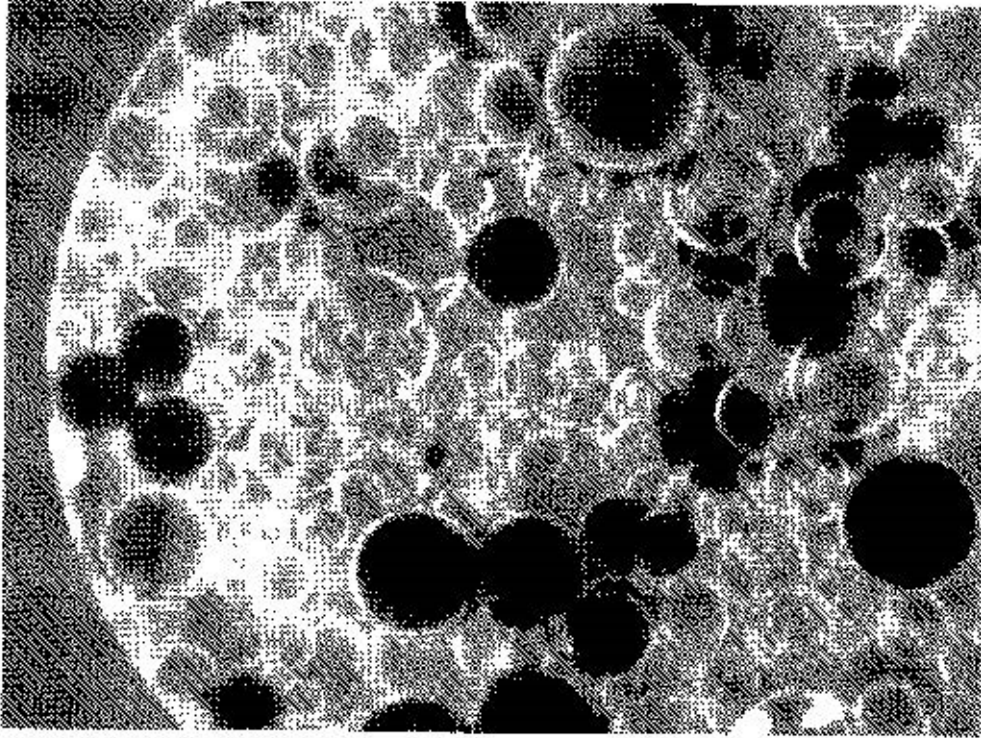


FIG. 16

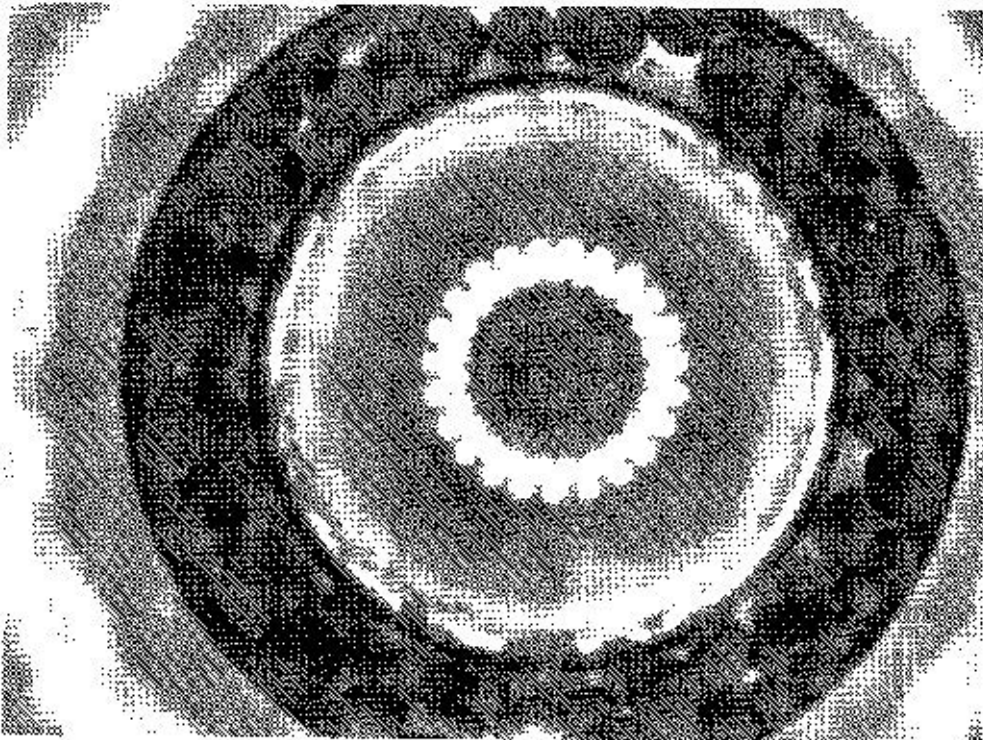


FIG. 23

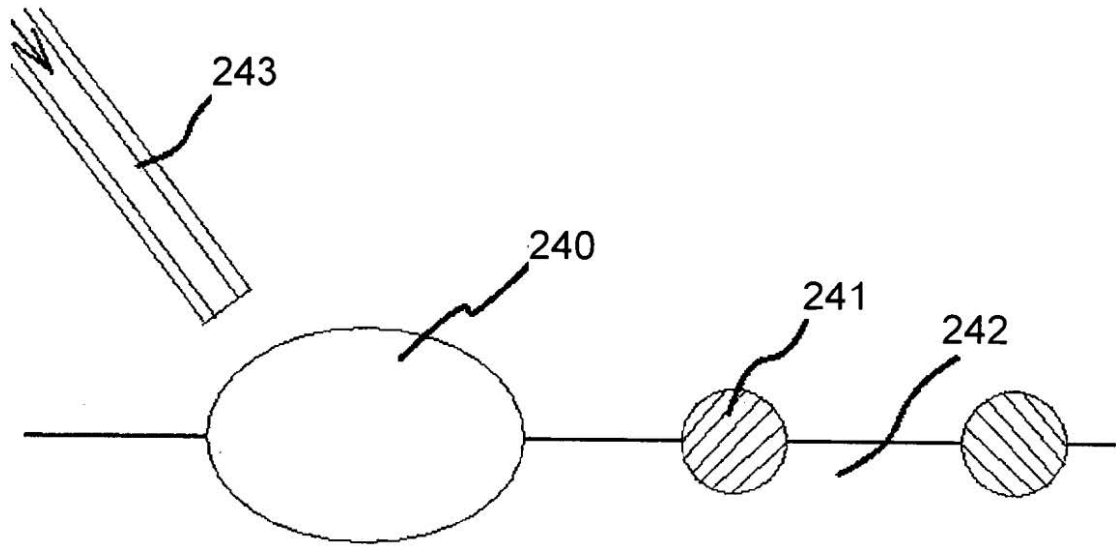


FIG. 17A

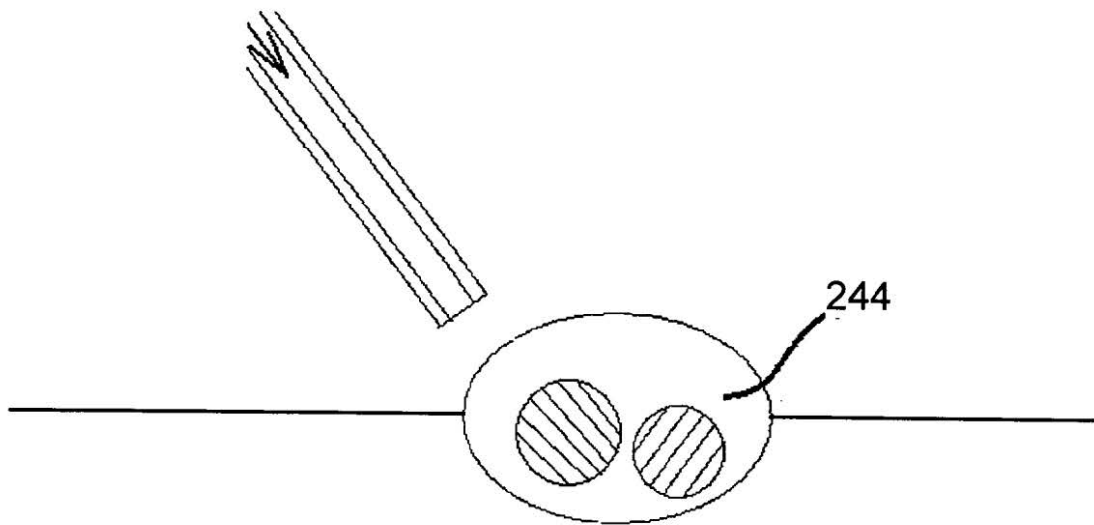


FIG. 17B



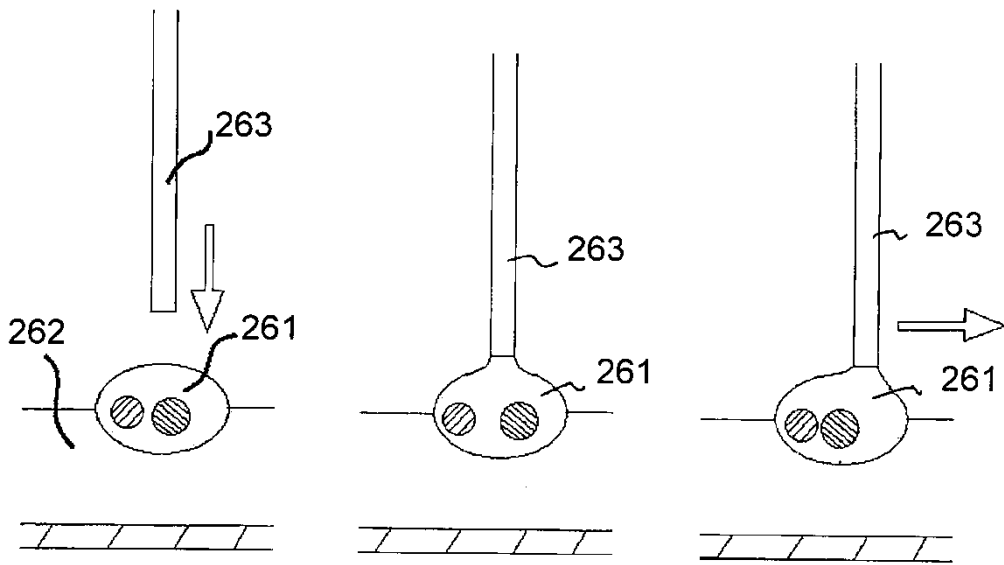


FIG. 18A

FIG. 18B

FIG. 18C

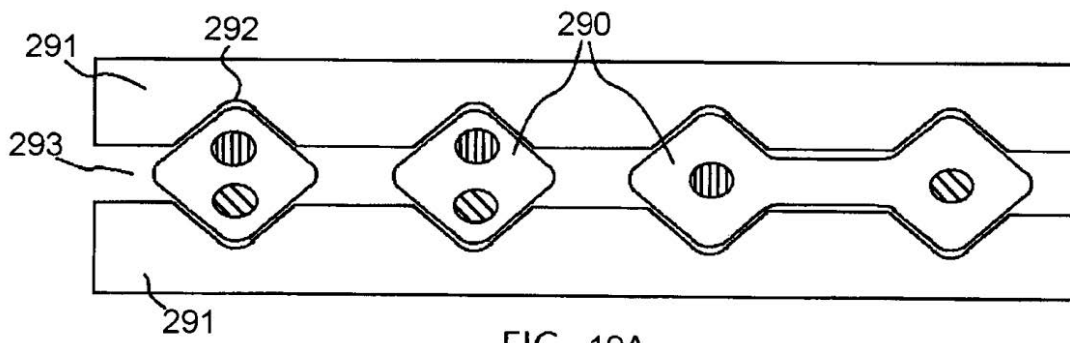


FIG. 19A

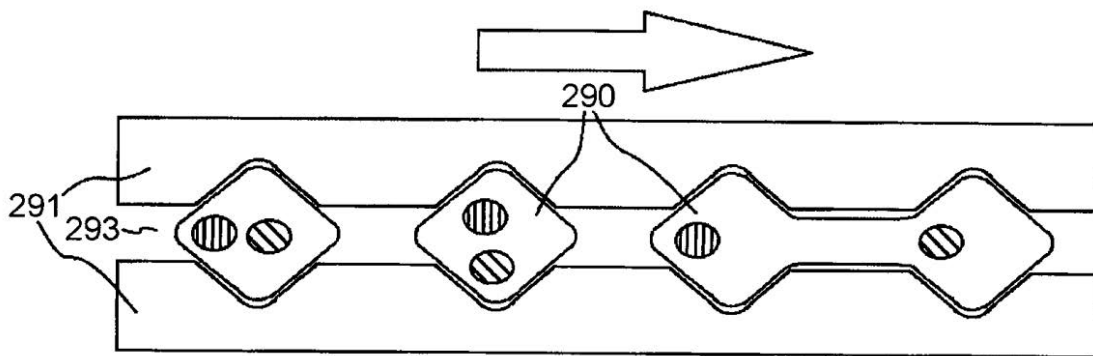


FIG. 19B

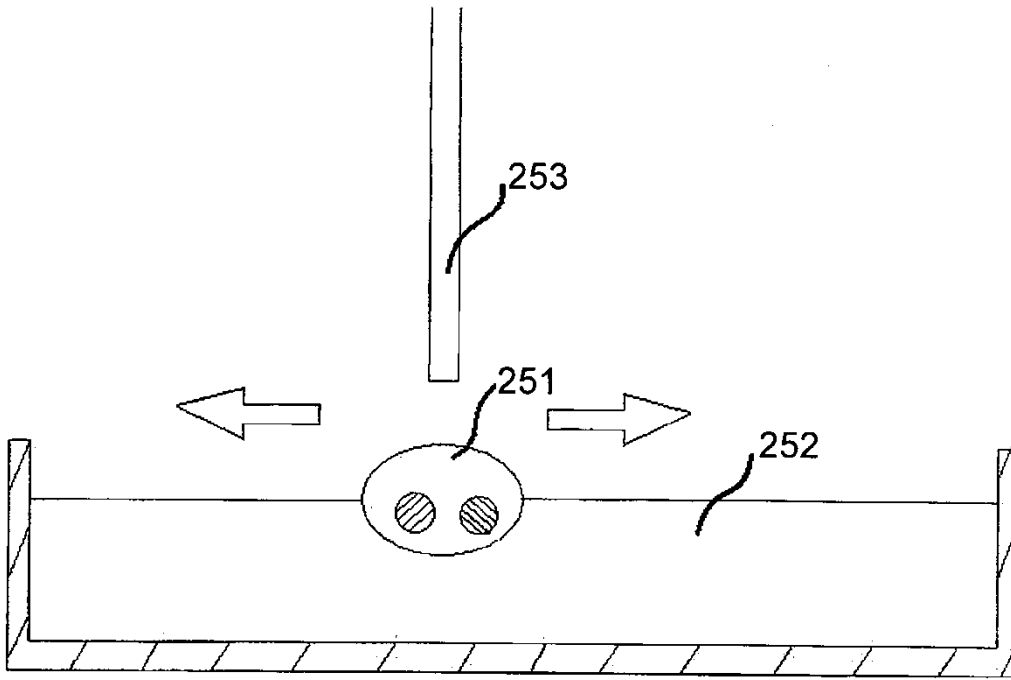


FIG. 20

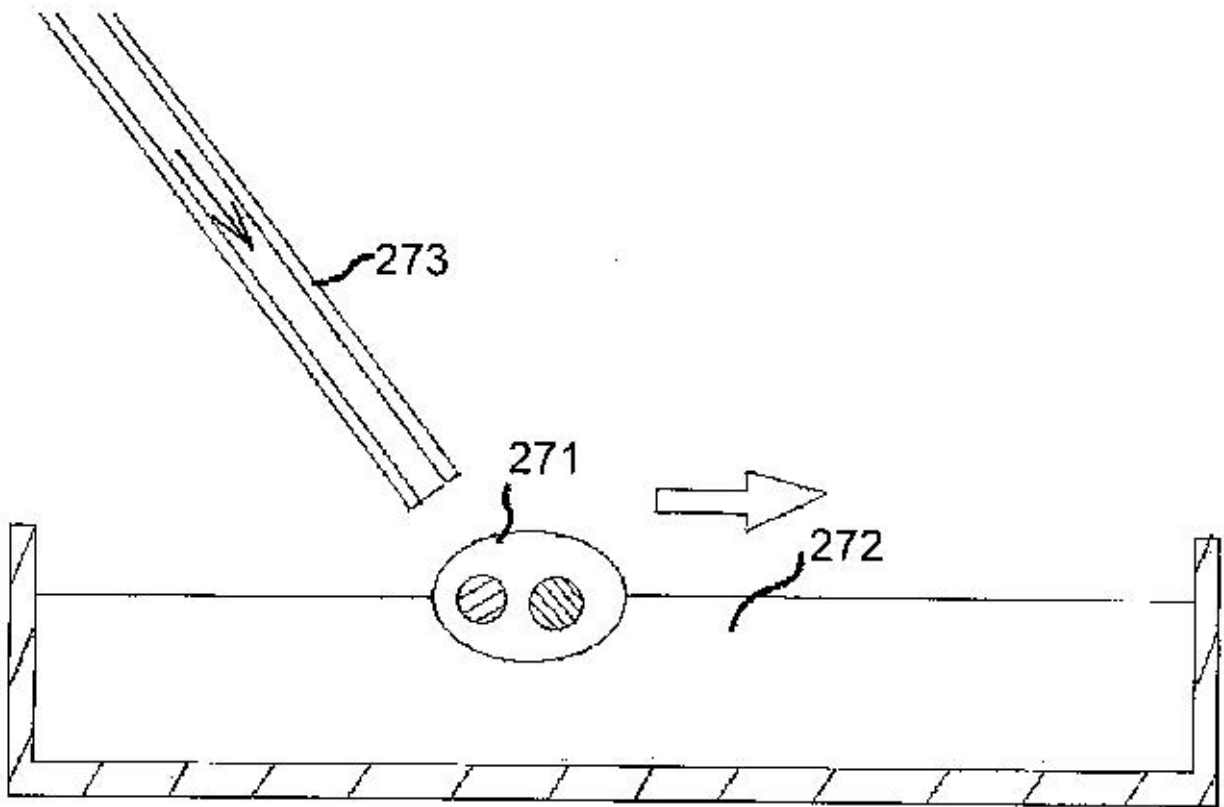


FIG. 21

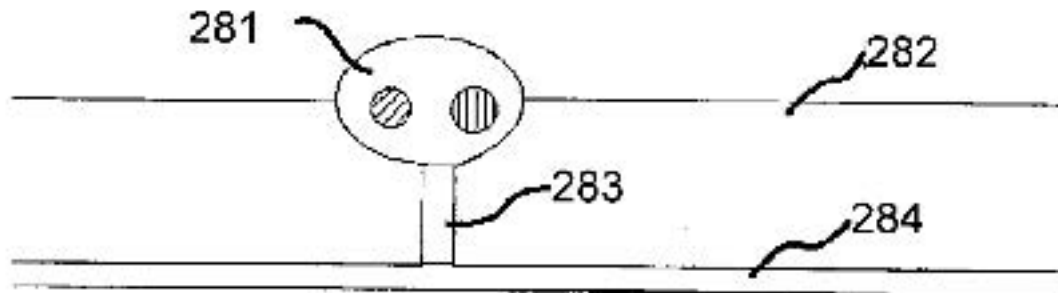
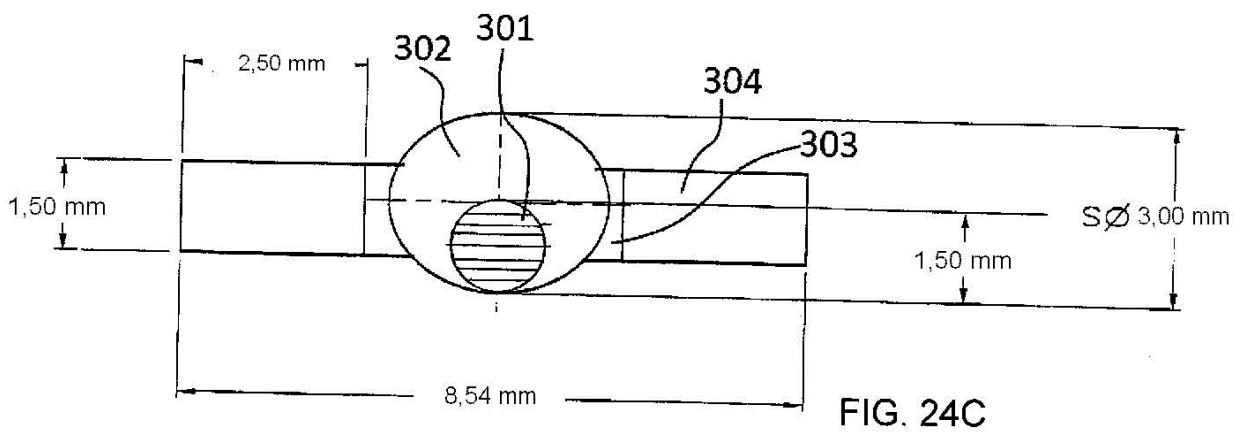
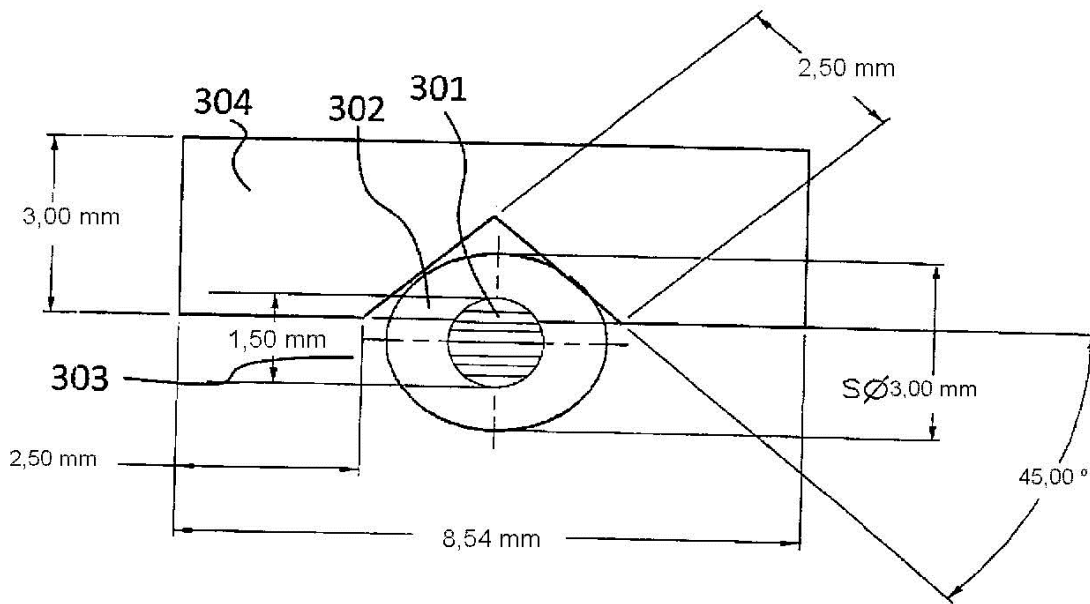
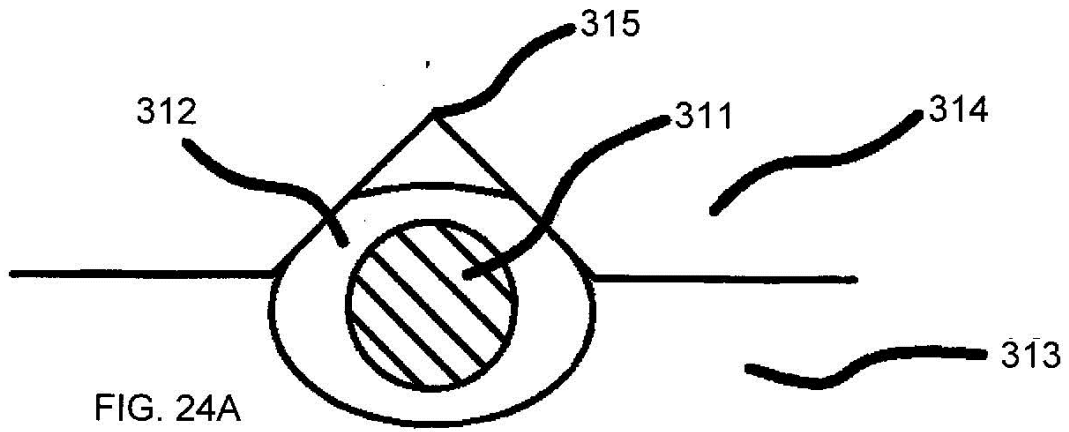
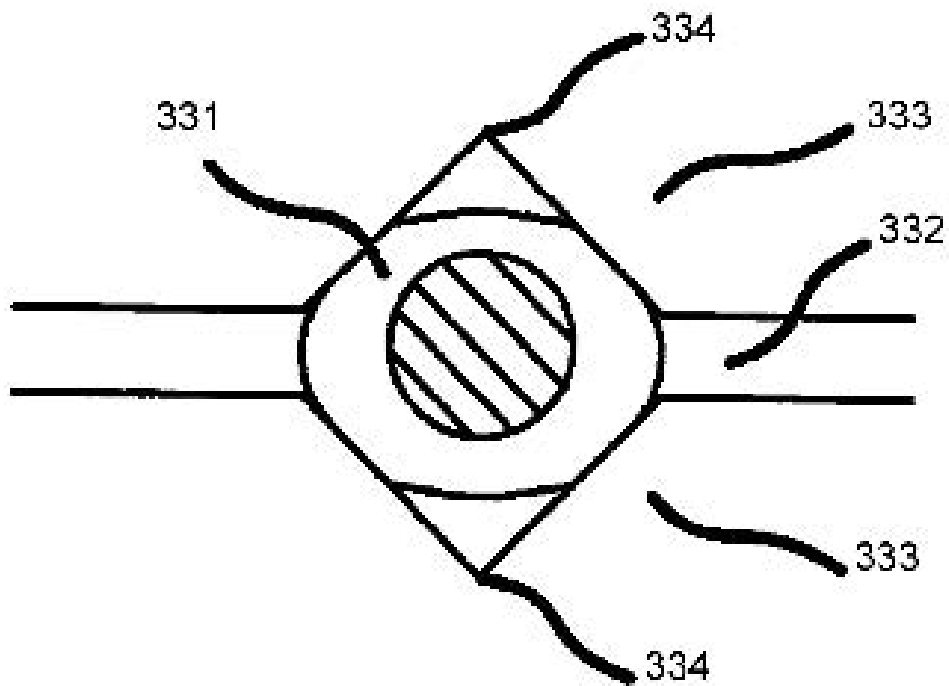
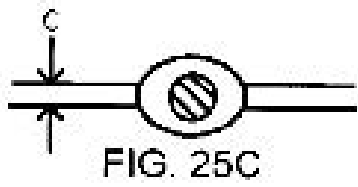
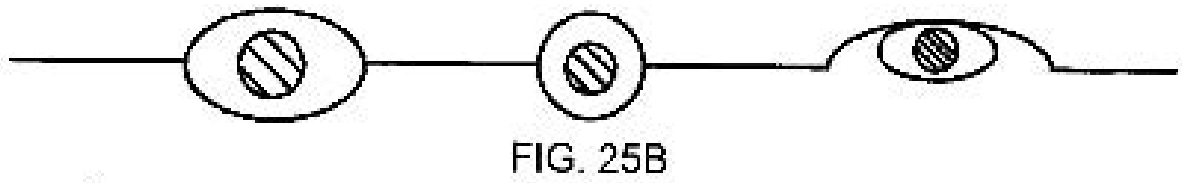
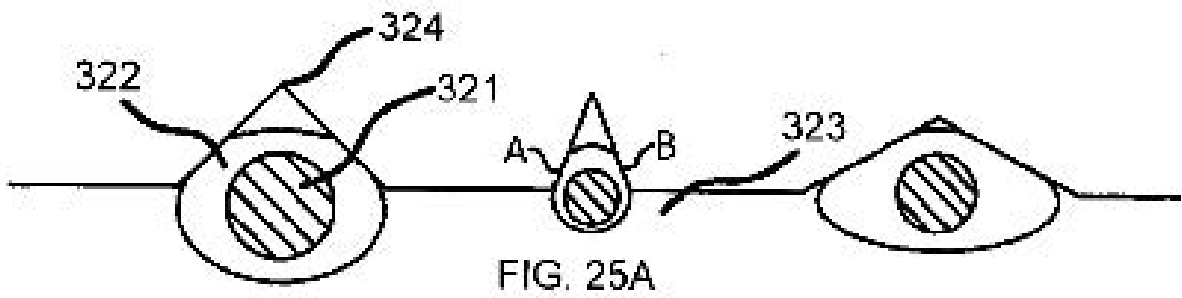
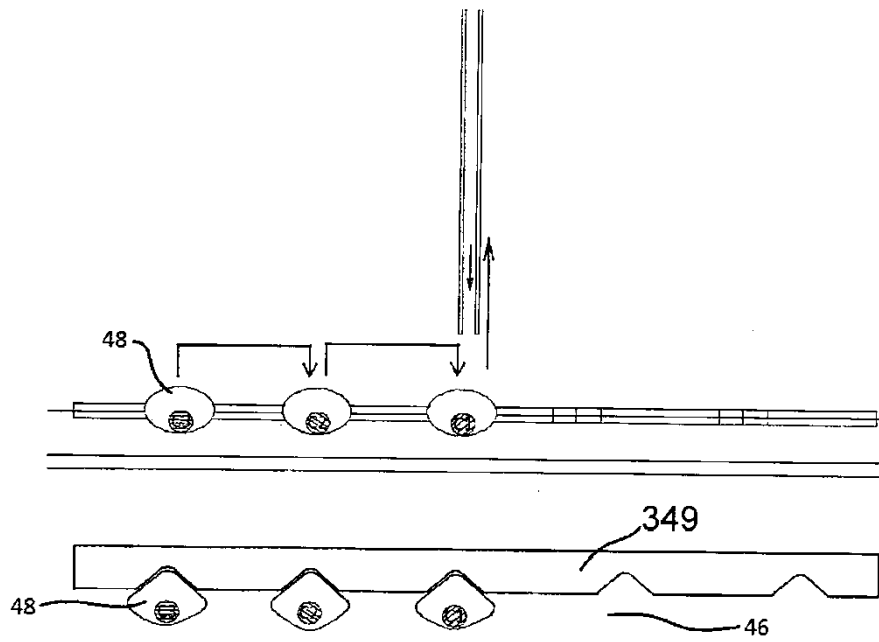
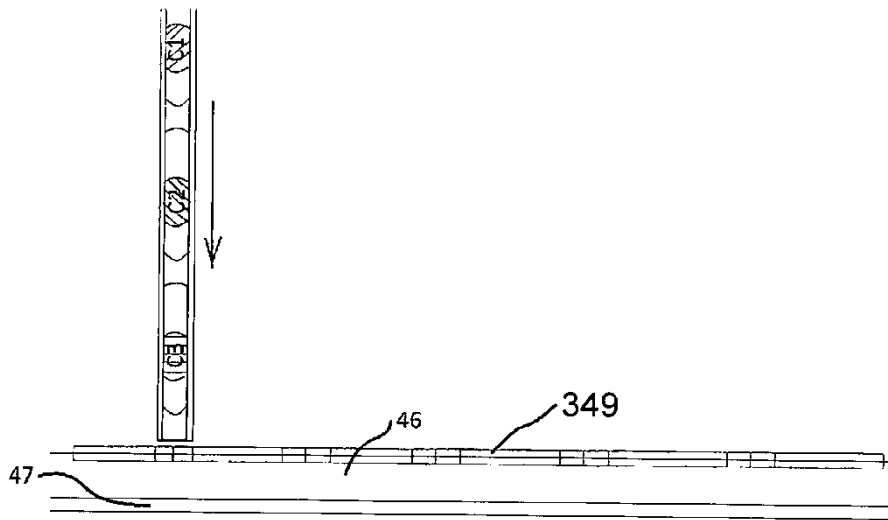


FIG. 22











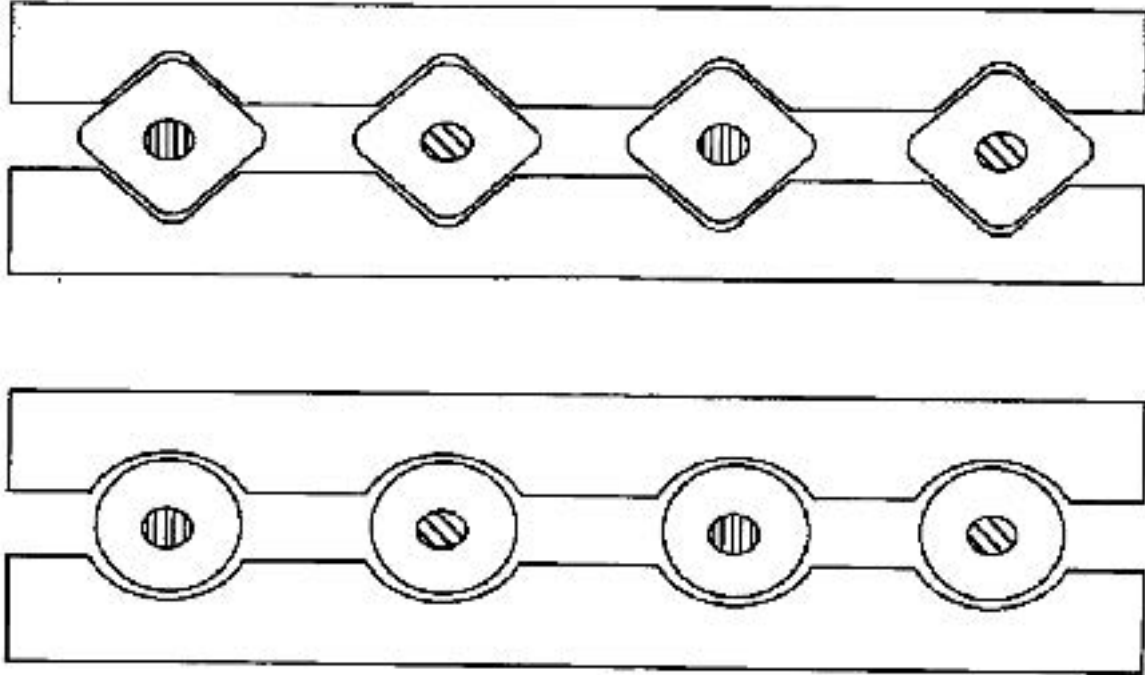


FIG. 28

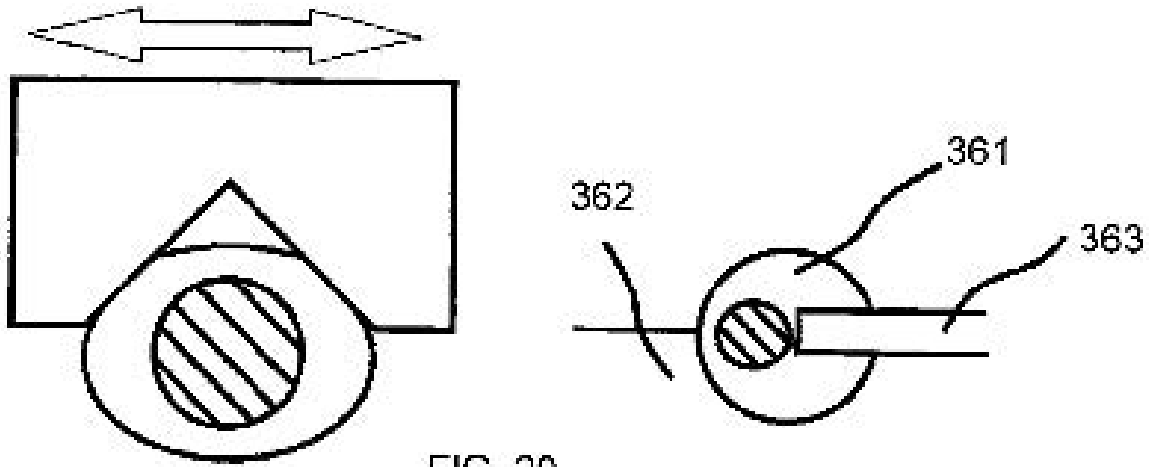


FIG. 29

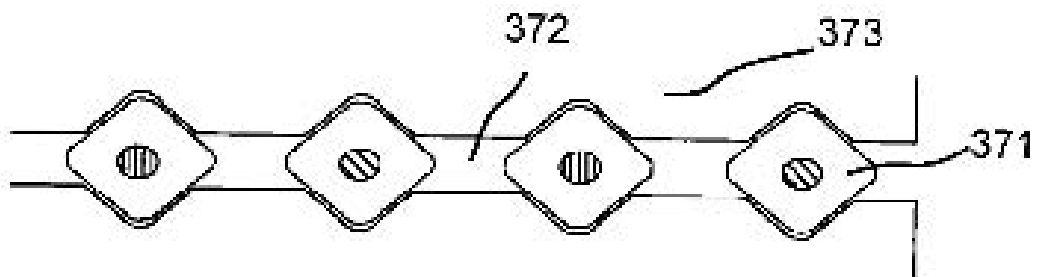


FIG. 30A

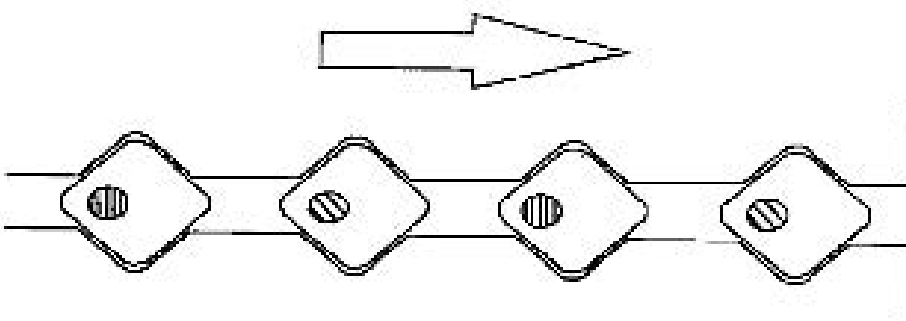


FIG. 30B

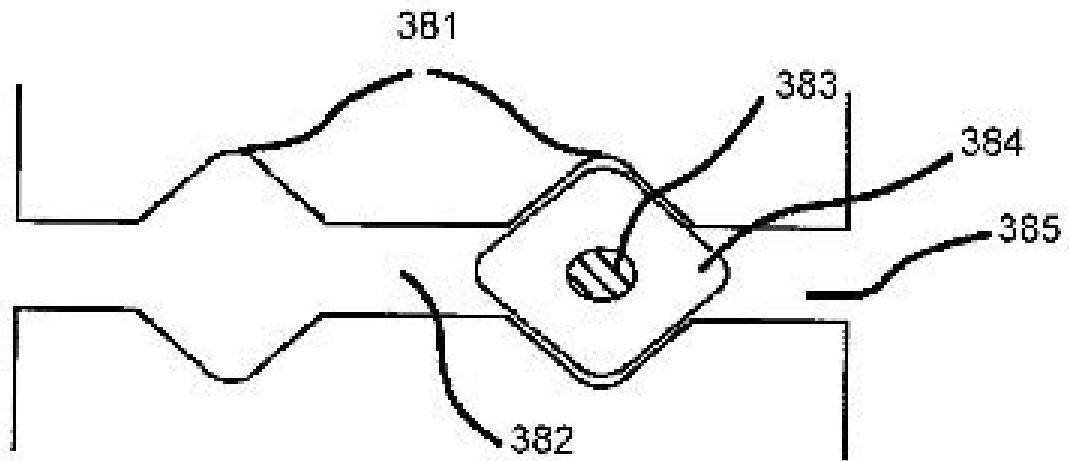


FIG. 31

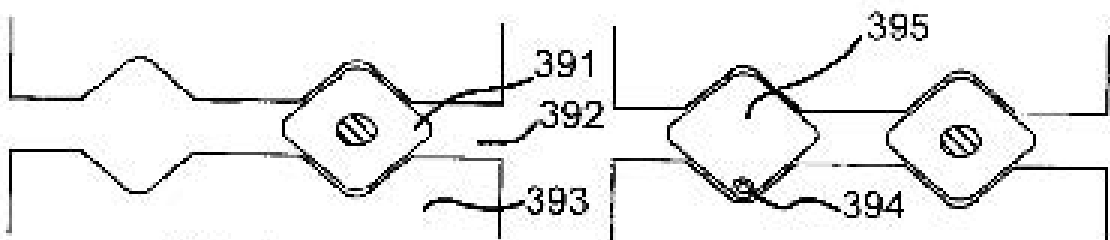


FIG. 32A

FIG. 32B

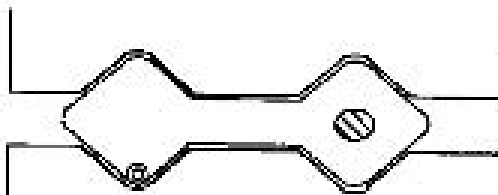


FIG. 32C

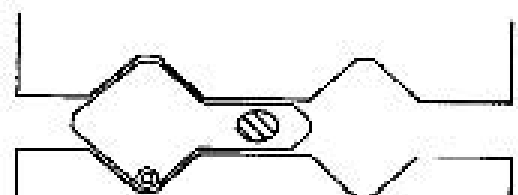


FIG. 32D

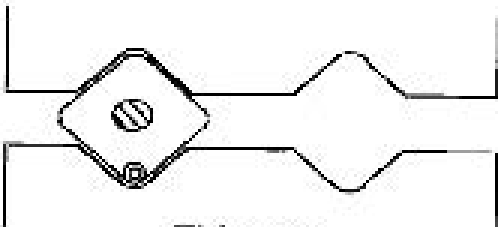


FIG. 32E

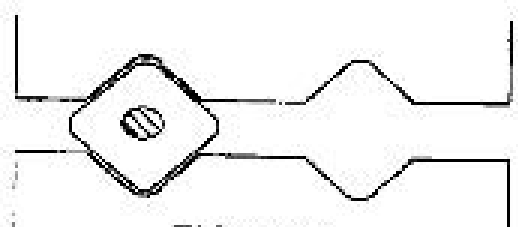


FIG. 32F

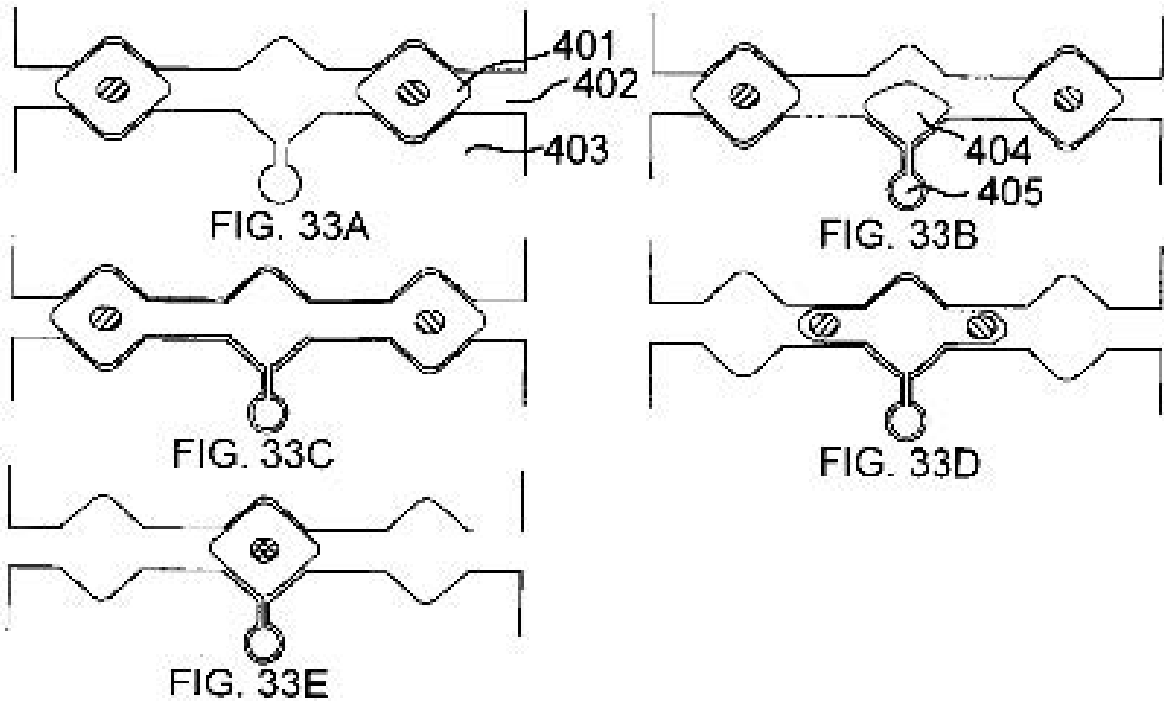




FIG. 34A



FIG. 34B

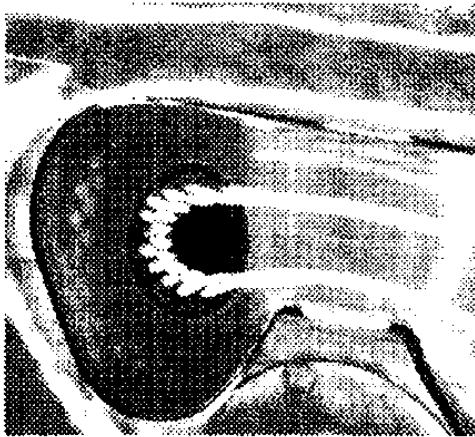


FIG. 35A

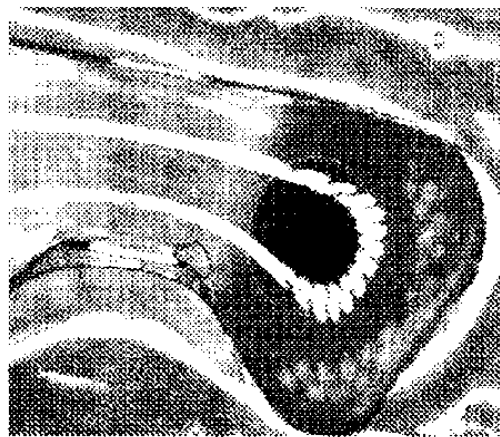


FIG. 35B

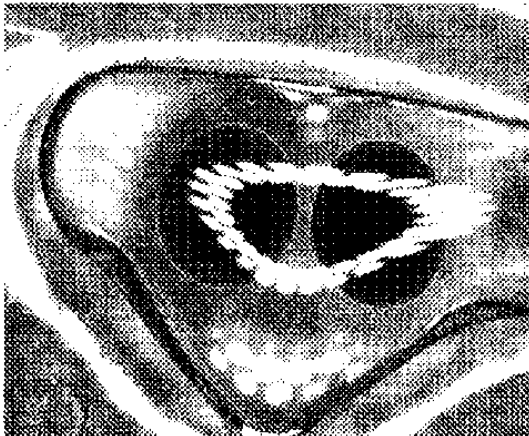


FIG. 35C

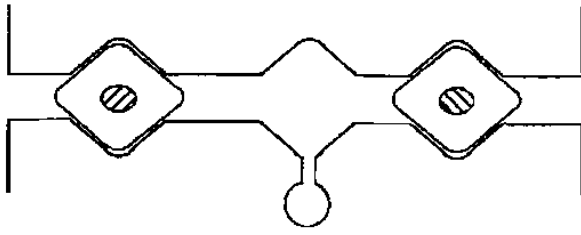


FIG. 36A

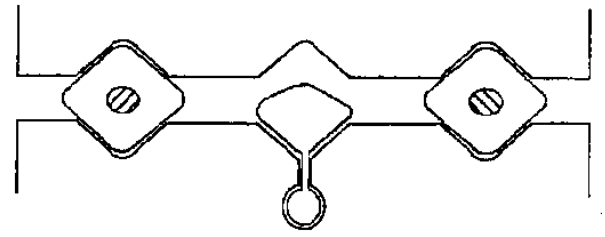


FIG. 36B

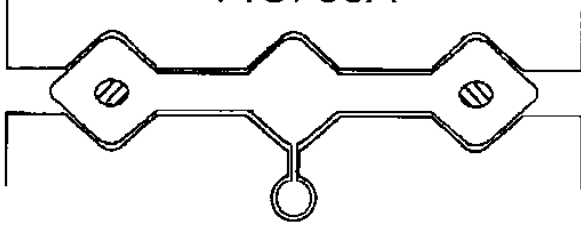


FIG. 36C

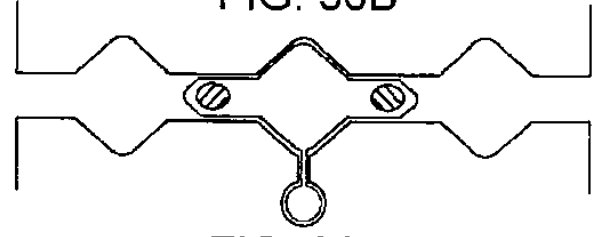


FIG. 36D

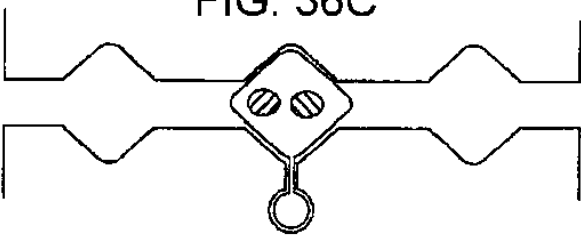


FIG. 36E

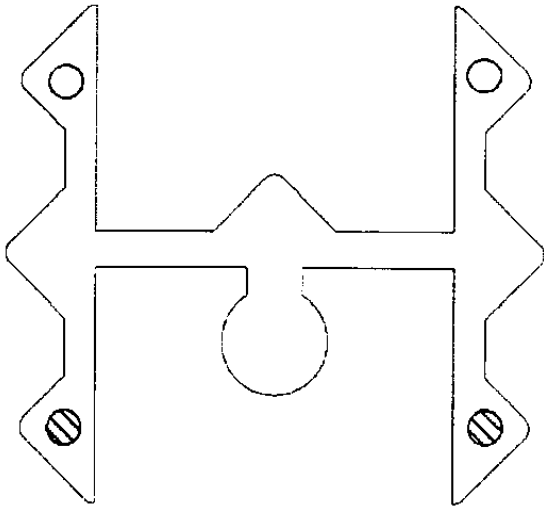


FIG. 37A

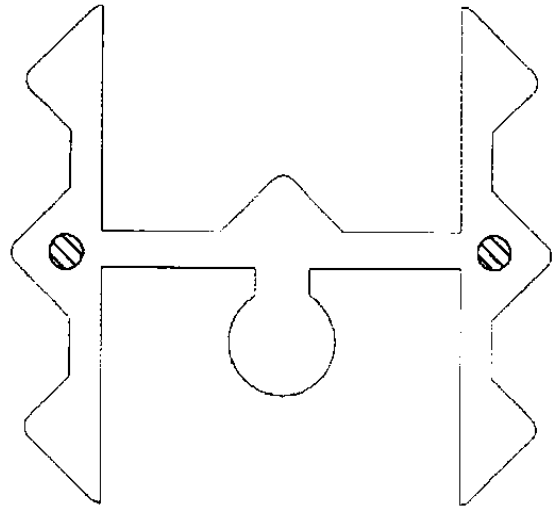


FIG. 37B

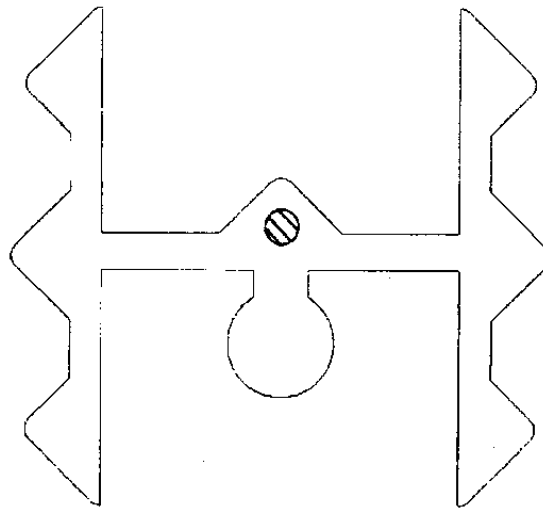


FIG. 37C

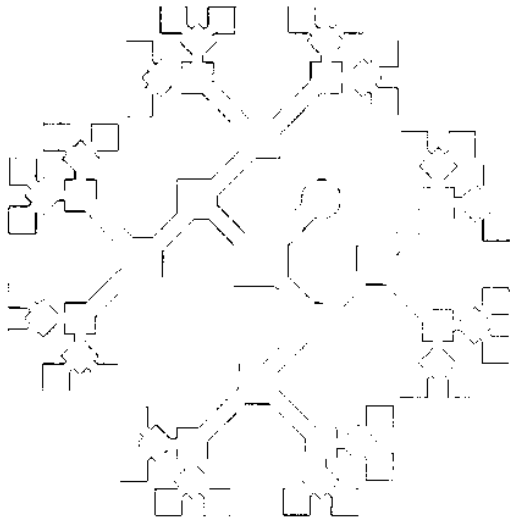


FIG. 38A

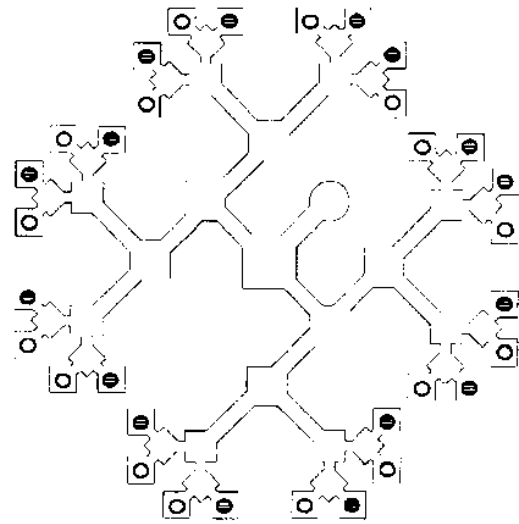


FIG. 38B

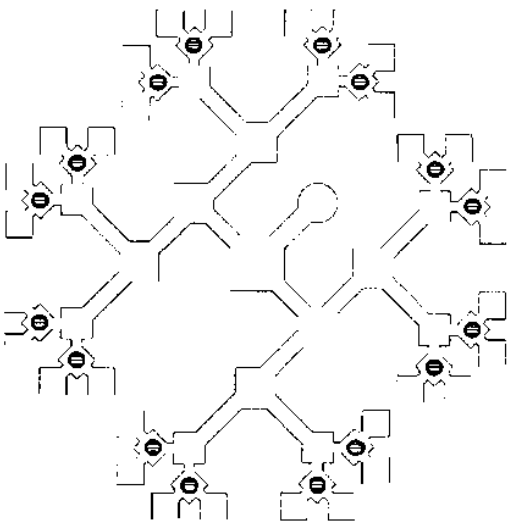


FIG. 38C

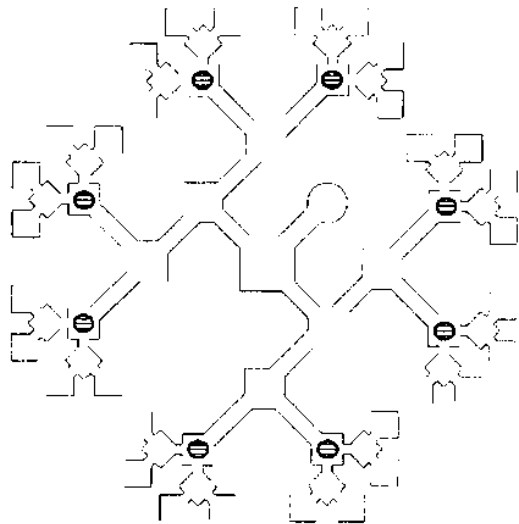


FIG. 38D



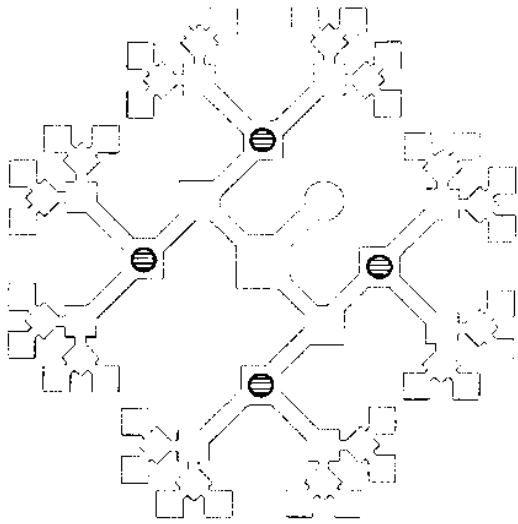


FIG. 38E

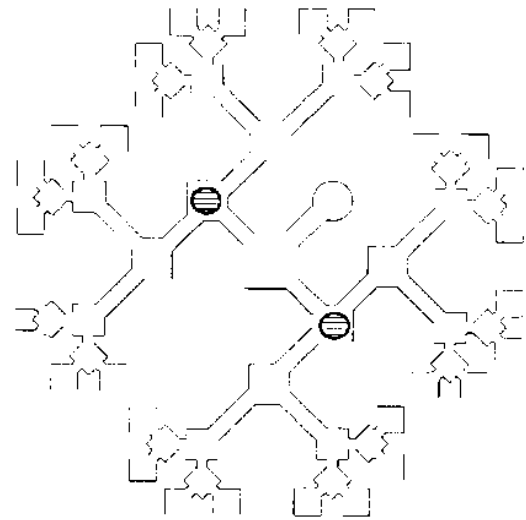


FIG. 38F

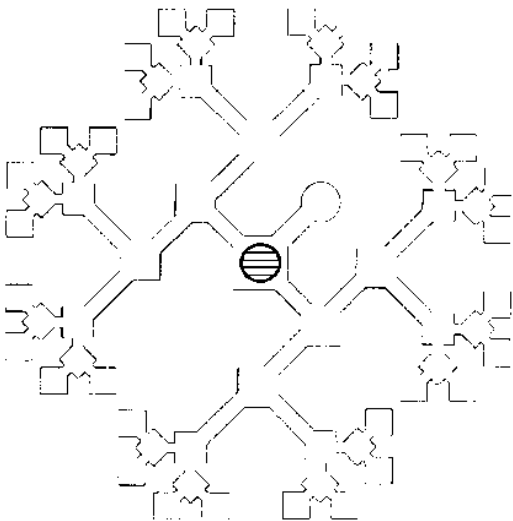


FIG. 38G

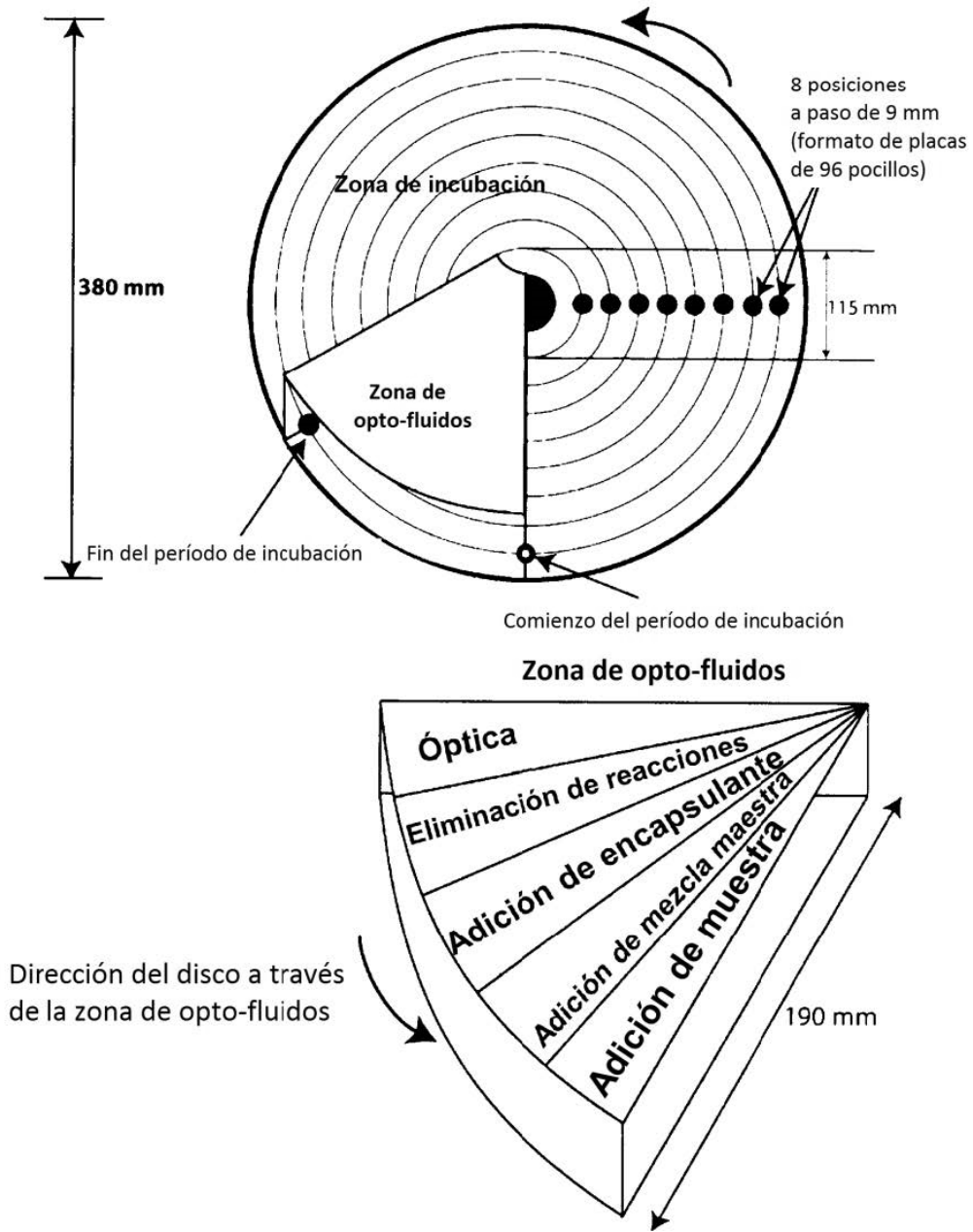


FIG. 39

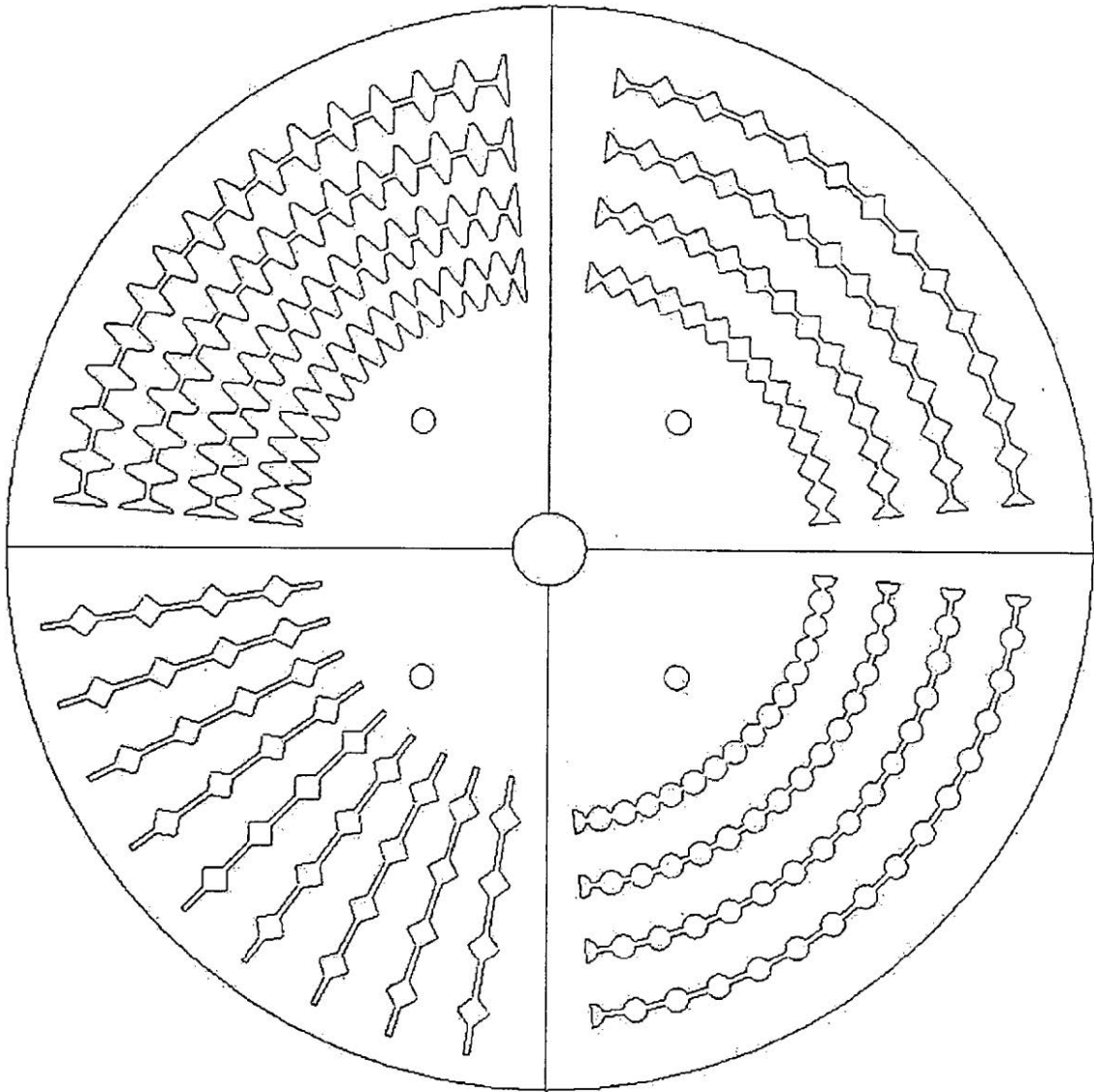


FIG. 40

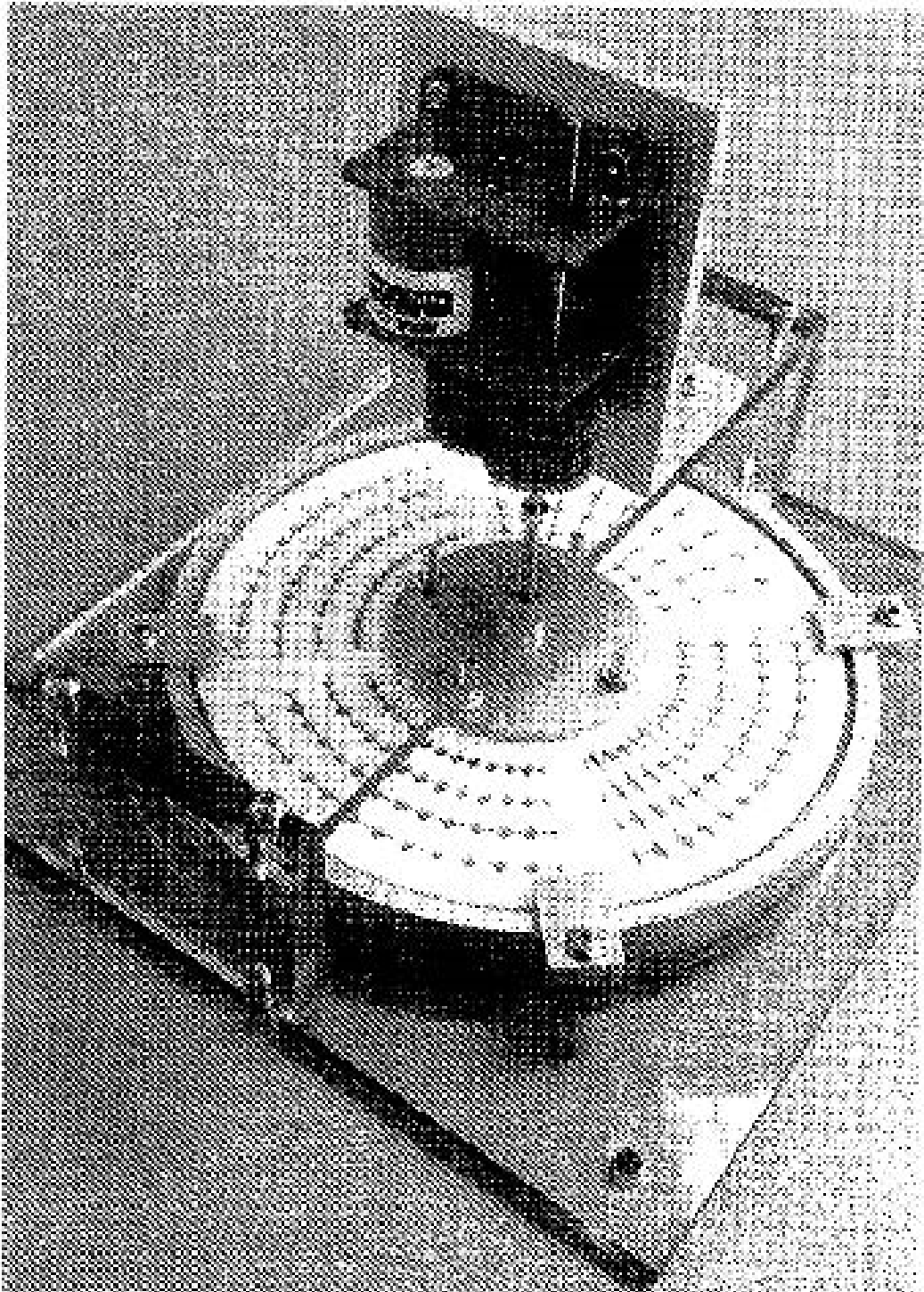


FIG 40A

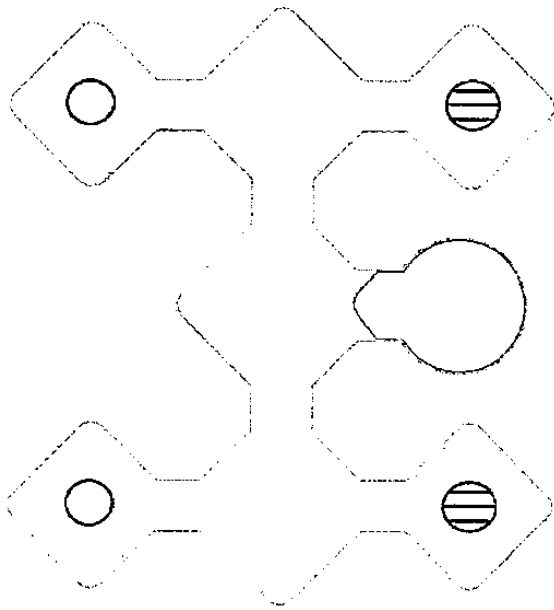


FIG. 41A

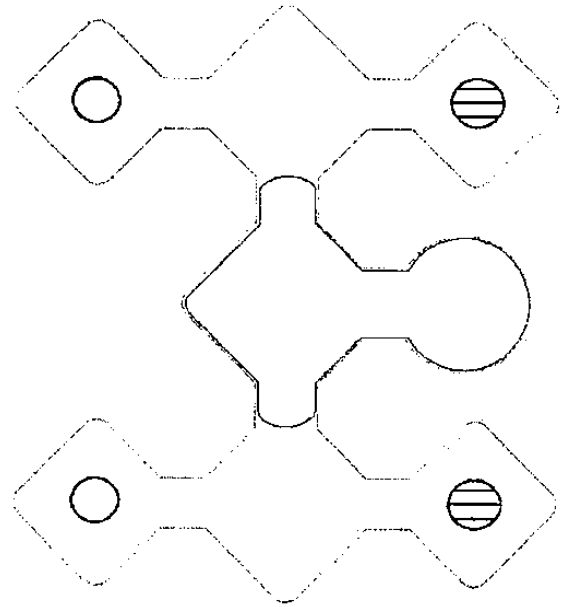


FIG. 41B

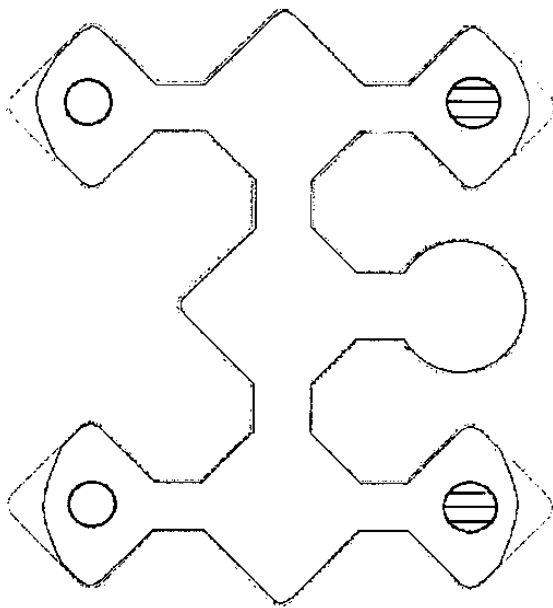


FIG. 41C

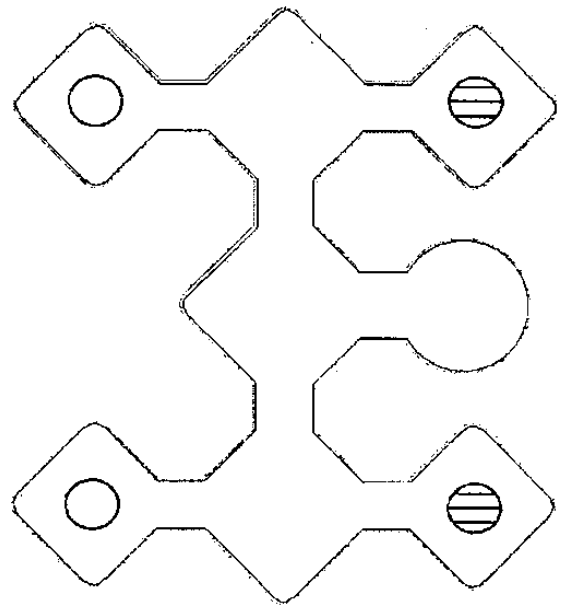


FIG. 41D

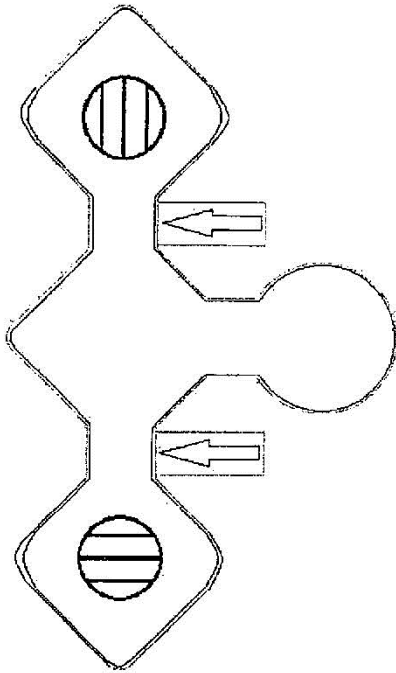


FIG. 42A

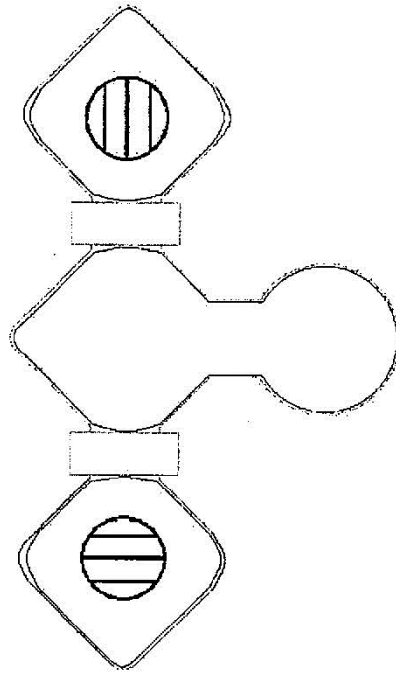


FIG. 42B

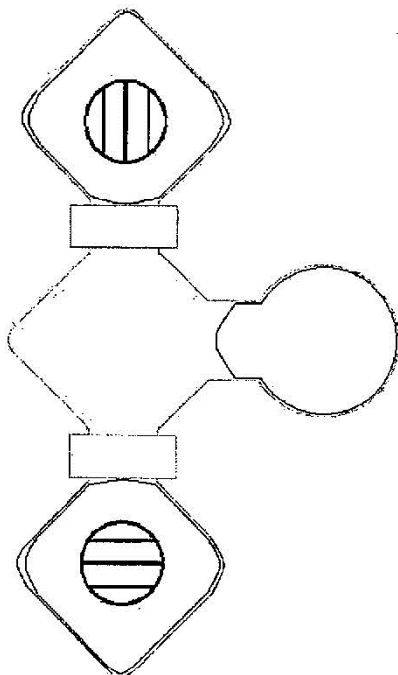


FIG. 42C

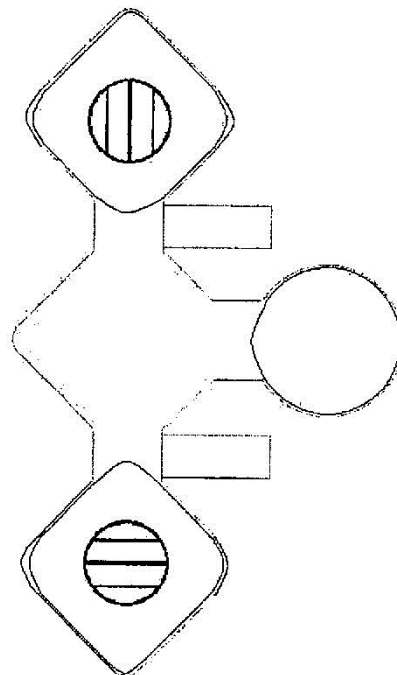


FIG. 42D

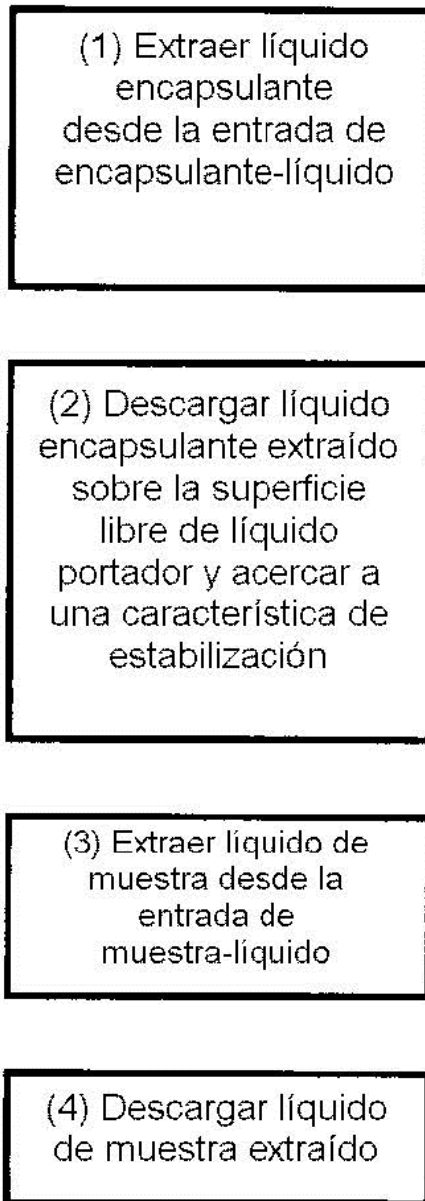


FIG. 43

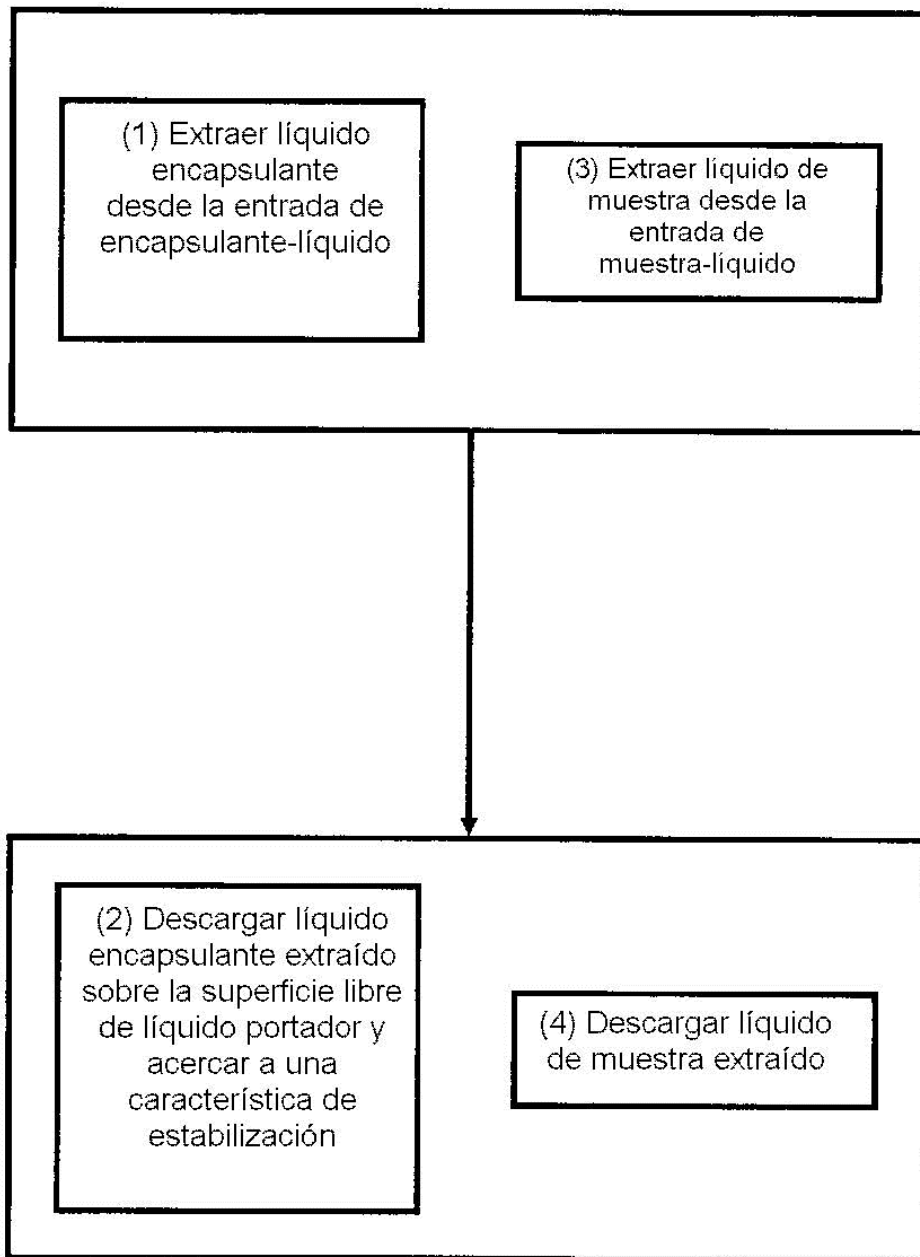
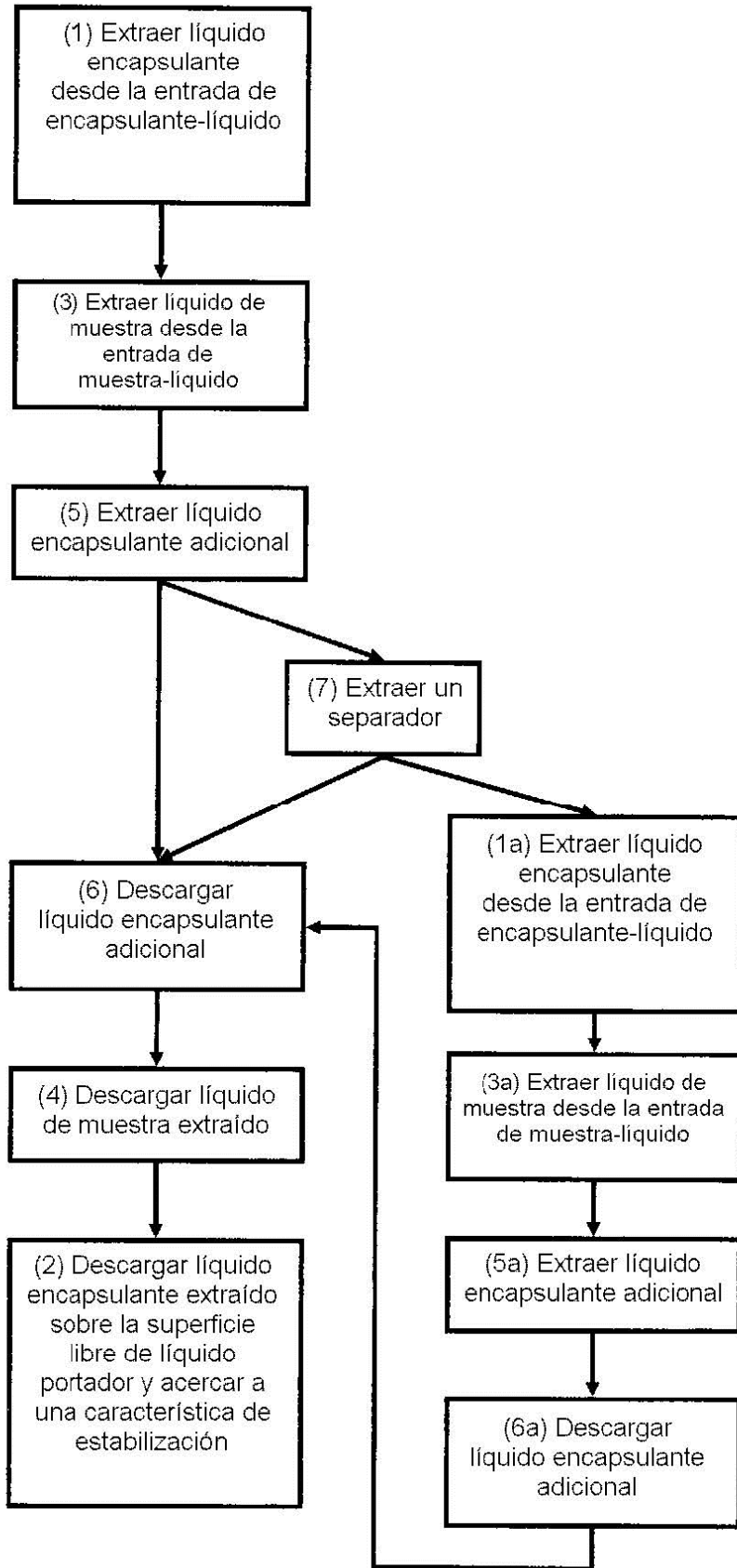


FIG. 44



FIG. 45



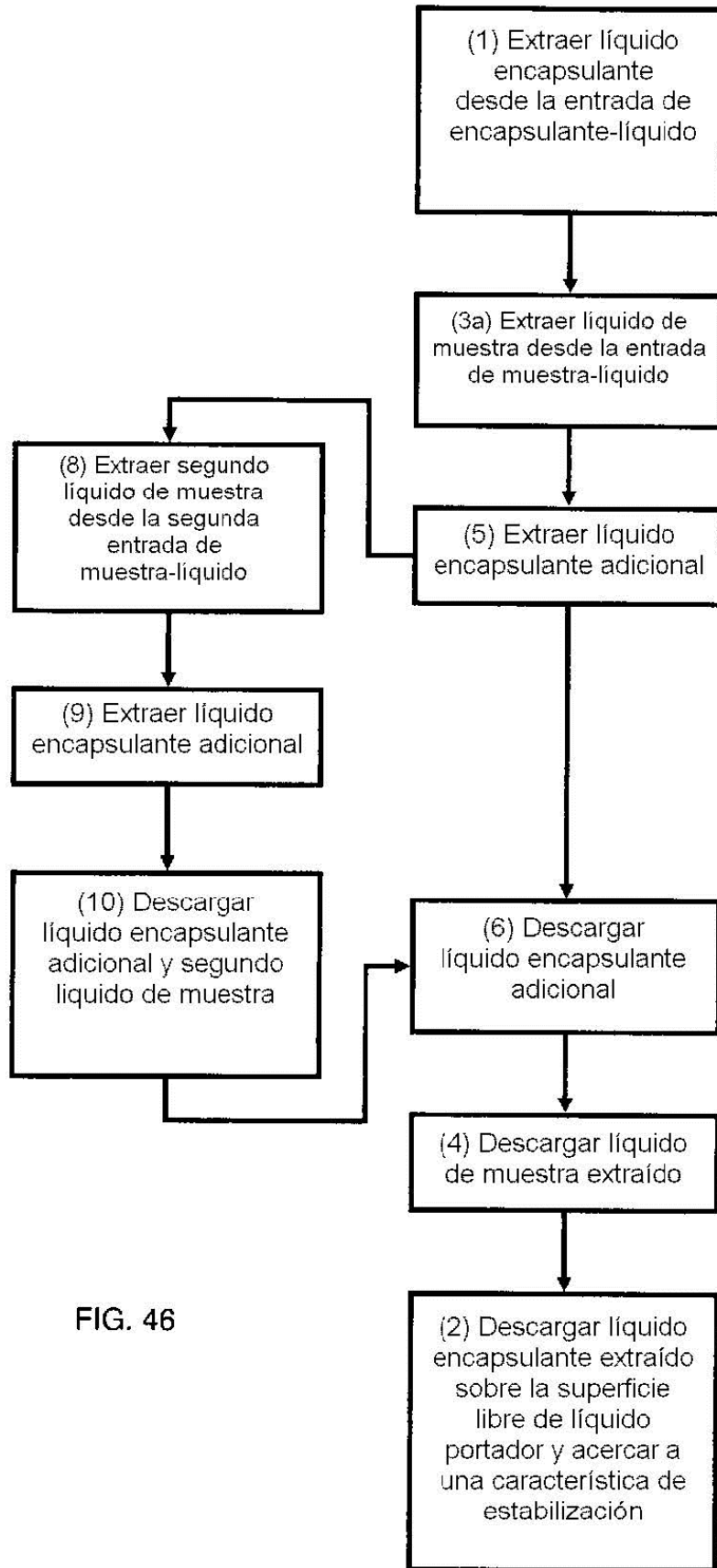


FIG. 46

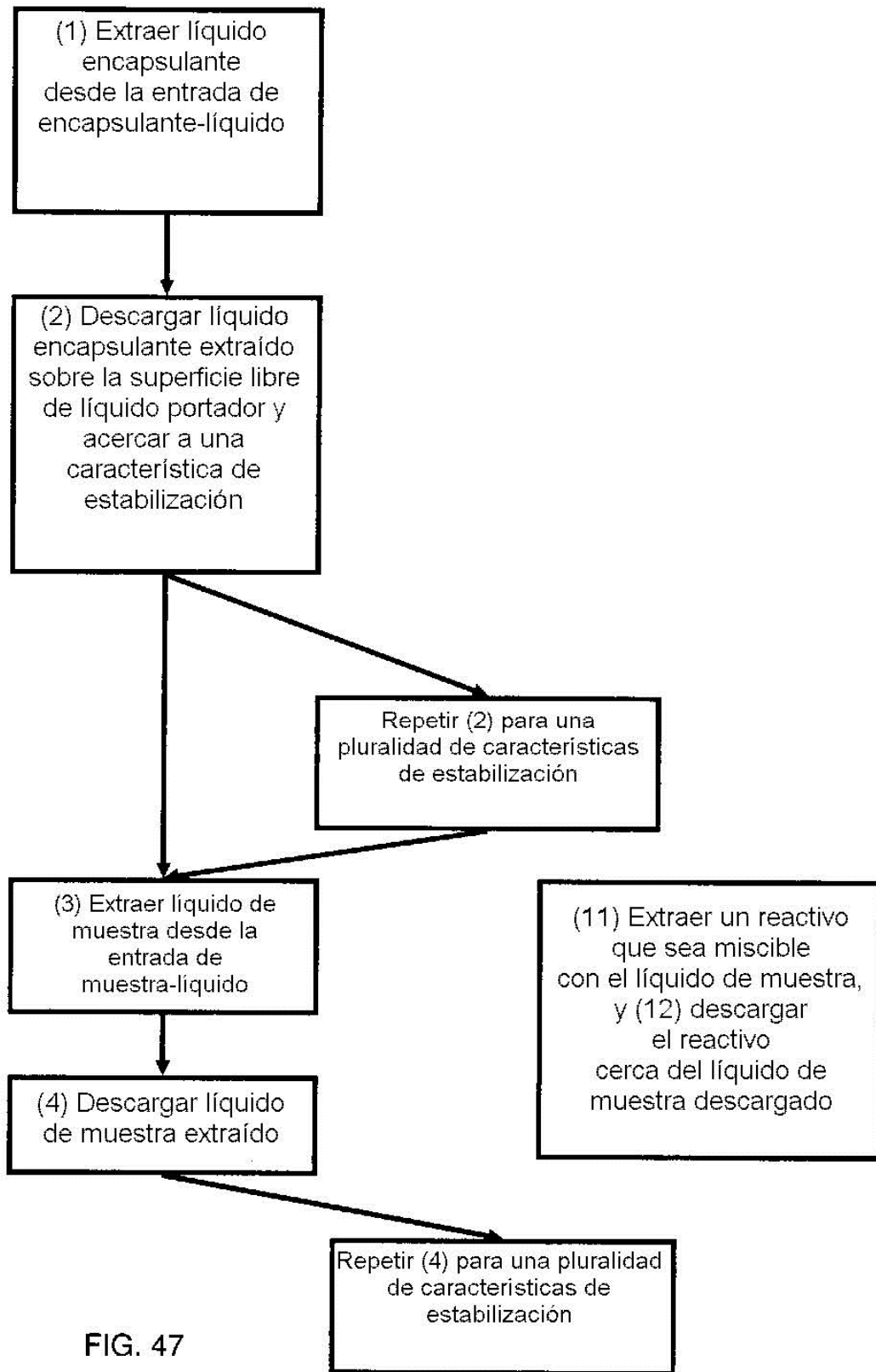


FIG. 47