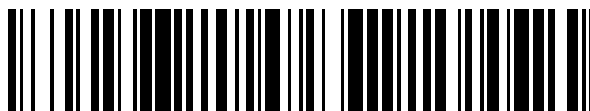


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 698**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2002 PCT/US2002/09440**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2003 WO03012406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2002 E 02715213 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 1438567**

54 Título: **Métodos y sistemas para procesamiento microfluídico**

30 Prioridad:

26.07.2001 US 307638 P
14.12.2001 US 14519
14.12.2001 US 14520
15.02.2002 US 75371

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2018

73 Titular/es:

HANDYLAB, INC. (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US

72 Inventor/es:

PARUNAK, GENE;
HANDIQUE, KALYAN;
WU, BETTY y
GANESAN, KARTHIK

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 683 698 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

Métodos y sistemas para procesamiento microfluídico

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y sistemas para procesar muestras mediante el uso de sistemas microfluídicos.

10 **Antecedentes**

Los dispositivos microfluídicos están formados normalmente de sustratos (fabricados con silicio, vidrio, cerámica, plástico y/o cuarzo) que incluyen una red de microcanales a través de los cuales fluye el fluido con el control de un mecanismo de propulsión. Los microcanales tienen normalmente al menos una dimensión que es del orden de nanómetros a cientos de micrómetros.

Los dispositivos microfluídicos ofrecen varias ventajas sobre una instrumentación a macro escala tradicional. Por ejemplo, en general, requieren muestras de fluido sustancialmente más pequeñas, usan mucho menos reactivo y procesan estos fluidos a velocidades sustancialmente superiores que el equipamiento a macro escala. Un dispositivo microfluídico puede utilizar solo cantidades mínimas de muestra para determinar propiedades químicas y físicas de la muestra, tales como sometiendo la muestra a procesamiento de fluidos.

En muchos casos, la precisión de tal procesamiento de fluidos depende de las cantidades de muestra relativas y reactivo usados. Por ejemplo, cuando una muestra se analiza para su "huella genética" de ADN, los resultados pueden depender de la concentración de reactivos usado para aumentar el ADN presente en la muestra. De este modo, si se usa una relación inadecuada de muestra con respecto a reactivo, el resultado puede ser impreciso. Puesto que los dispositivos microfluídicos procesan muestras y reactivos en cantidades mínimas, incluso las más mínima incertidumbre en la cantidad de reactivo o muestra usada puede presentar una incerteza en los resultados de un análisis microfluídico.

Las variaciones en la cantidad de muestras y reactivos procesados por un dispositivo microfluídico pueden originarse de varias fuentes. Por ejemplo, algunos dispositivos microfluídicos manipulan corrientes continuas que fluyen de líquido. Los cambios en la viscosidad del líquido pueden alterar la tasa de flujo de las corrientes y, de manera correspondiente, el tiempo requerido para introducir una cantidad predeterminada de material a un emplazamiento dado del dispositivo microfluídico. La dilución de la muestra puede producirse cuando se usa una corriente de flujo líquida para mover componentes de la muestra de un emplazamiento a otro dentro de un dispositivo microfluídico.

El análisis de micro fluidos de células dentro de fluidos corporales resulta especialmente problemático debido a la relativamente pequeña cantidad de células disponibles para su análisis y la dificultad inherente en la manipulación de tales materiales.

La manipulación de muestras puede implicar el movimiento de una muestra entre distintos emplazamientos dentro de un dispositivo microfluídico. Por ejemplo, se usan campos eléctricos como mecanismo de propulsión para algunos dispositivos microfluídicos. En tales dispositivos, se aplica un alto voltaje, del orden de kilovoltios, a través de electrodos dentro del dispositivo para generar, de este modo, un campo eléctrico en los microcanales. El campo impone una fuerza de iones dentro del fluido, propulsando, de este modo, los iones a través del microcanal. El fluido mismo también puede propulsarse por el movimiento de iones que se mueven dentro del fluido.

También se usa presión de gas para propulsar fluido a través de los microcanales. En algunos dispositivos, una fuente de gas presurizado, externa al dispositivo microfluídico, se conecta al dispositivo microfluídico para suministrar una presión de gas, que propulsa el fluido. La presión de gas también puede generarse por una cámara calentada dentro del dispositivo microfluídico mismo para propagar fluido dentro de un microcanal.

El documento WO98/22625 A1 desvela dispositivos y métodos de amplificación de ácido nucleico isotérmicos microfabricados. El documento US 6.130.098 desvela dispositivos a micro escala que permiten el movimiento y mezcla de microgotas a través de microcanales.

Sumario de la invención

El alcance de protección se define en las reivindicaciones independientes, a las cuales se debe hacer ahora referencia. Las características ventajosas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

De acuerdo con un aspecto de la invención reivindicada, se proporciona un dispositivo microfluídico para procesar una muestra microfluídica que contiene células, que comprende: un módulo de lisis configurado para recibir una muestra microfluídica que contiene células, en el que el módulo de lisis comprende una zona de lisis, en el que la muestra microfluídica es un líquido; un elemento de posicionamiento configurado para inhibir el movimiento corriente

abajo de la muestra microfluídica para posicionar la muestra microfluídica en una posición de lisis; un mecanismo de lisis dentro de la zona de lisis, para liberar contenido intracelular a partir de células dentro de la zona de lisis; y un accionador de gas dispuesto corriente arriba del elemento de posicionamiento y la zona de lisis de modo que una prima parte de la muestra microfluídica se dispone corriente arriba del accionador de gas y una segunda parte de la muestra microfluídica se dispone corriente abajo del accionador de gas y corriente arriba del elemento de posicionamiento, configurado el accionador de gas para proporcionar una presión de gas suficiente para preparar una microgota que tenga un volumen predeterminado que comprenda contenido intracelular liberado a partir de células de la muestra microfluídica que contiene células dentro de la zona de lisis mediante la separación de la segunda parte de la muestra microfluídica de la primera parte de la muestra microfluídica y moviendo la segunda parte de la muestra microfluídica a un emplazamiento corriente abajo del mecanismo de lisis y el elemento de posicionamiento.

De acuerdo con otro aspecto de la invención reivindicada, se proporciona un método microfluídico para procesar una muestra microfluídica que contiene células, que comprende: el posicionamiento, usando un elemento de posicionamiento, de la muestra microfluídica que contiene células en una posición de lisis con respecto a un mecanismo de lisis de una zona de lisis de un módulo de lisis de un dispositivo microfluídico, la muestra microfluídica que contiene células que comprende un líquido que contiene células; el accionamiento del mecanismo de lisis para liberar material intracelular de células de la muestra microfluídica que contiene células; el accionamiento de un accionador de gas dispuesto corriente arriba del elemento de posicionamiento y la zona de lisis para proporcionar una presión de gas suficiente para separar una parte de la muestra microfluídica que contiene células que se encuentra corriente abajo del accionador de gas y corriente arriba del elemento de posicionamiento desde una parte de la muestra microfluídica que contiene células que se encuentra corriente arriba del accionador de gas y mover la parte corriente abajo de la muestra microfluídica que contiene células a un emplazamiento corriente abajo del mecanismo de lisis y el elemento de posicionamiento, siendo la parte corriente abajo de la muestra microfluídica una microgota que comprende material intracelular liberado a partir de células de la muestra microfluídica que contiene células y que tiene un volumen predeterminado.

En general, un primer aspecto de la divulgación se refiere a un sistema y método para mover muestras, tales como fluidos, dentro de un sistema microfluídico. En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de una pluralidad de accionadores de gas para aplicar presión en distintos emplazamiento dentro del sistema microfluídico para suministrar, de este modo, fuerza para mover muestras. Por ejemplo, en una realización, un primer accionador de gas proporciona una presión de gas suficiente para mover una primera muestra desde un primer emplazamiento a un segundo emplazamiento del dispositivo microfluídico. Un segundo accionador de gas proporciona una presión de gas para mover otra muestra desde un tercer emplazamiento a un cuarto emplazamiento del dispositivo microfluídico.

En otro ejemplo, una pluralidad de accionadores de gas cooperan para mover la misma muestra de fluido. Un primer accionador de gas proporciona una presión de gas suficiente para mover la microgota entre la primera y segunda zona de procesamiento del dispositivo microfluídico y, un segundo accionador de gas proporciona una presión de gas para mover la microgota a una tercera zona de procesamiento.

En realizaciones preferentes, la pluralidad de accionadores son integrales con una red microfluídica a través los cuales fluyen las muestras microfluídicas. Por ejemplo, puede fabricarse una pluralidad de accionadores de gas en el mismo sustrato que forma la red microfluídica. Un tal accionador de gas de acopla a la red en un primer emplazamiento para proporcionar presión de gas para mover una muestra microfluídica dentro de la red. Otro accionador de gas de acopla a la red en un segundo emplazamiento para proporcionar presión de gas para mover adicionalmente al menos una parte de la muestra microfluídica dentro de la red.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al uso de válvulas con la pluralidad de accionadores. Por ejemplo, en una realización, se acopla una válvula a una red microfluídica de modo que, cuando la válvula está cerrada, aísla sustancialmente el segundo accionador de gas del primer accionador de gas. Tales válvulas pueden controlar la dirección de la fuerza propulsiva de los accionadores evitando que el gas en expansión viaje en determinadas direcciones, mientras que permiten que se expanda en la dirección deseada. También amplían el alcance sobre el cual un accionador puede propulsar una microgota, evitando que el gas se disipe en determinadas áreas corriente arriba de la microgota.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un sistema de microfluído y método para procesar un fluido que contiene partículas, tales como, por ejemplo, un líquido que contiene células bacterianas o células humanas.

En un aspecto, la divulgación se refiere a la preparación de una muestra de partículas enriquecida a partir del fluido que contiene partículas. Por ejemplo, un sistema microfluídico para preparar una muestra enriquecida incluye una zona de enriquecimiento y un miembro de circulación de flujo dispuesto en comunicación de fluido con la zona de enriquecimiento. El miembro de circulación de flujo permite que el flujo del fluido que contiene partículas pase a través y salga de la zona de enriquecimiento, mientras que causa que las partículas del fluido que contiene partículas se acumulen dentro de la zona, preparando, de este modo, una muestra de partículas enriquecida en la zona de enriquecimiento. El miembro de circulación de flujo puede incluir una pluralidad de vías, tales como poros,

que tengan un tamaño suficiente para permitir el pasaje del fluido a través de los mismos pero de un tamaño suficientemente pequeño para permitir el pasaje de partículas a través de los mismos. Miembros de circulación de flujo adecuados están compuestos de, por ejemplo, elementos de filtro, tales como papel de filtro, vidrios porosos y geles porosos.

5 El sistema microfluídico puede incluir un accionador que mueve la muestra de partícula enriquecida desde la zona de enriquecimiento sin esencialmente disolución de la muestra de partículas enriquecida. En una forma de realización, el accionador es un accionador de gas que mueve la muestra aumentando una presión de gas asociada con una parte corriente arriba de la zona de enriquecimiento con relación a la presión de gas asociada con el canal corriente abajo. Por ejemplo, el accionador de gas puede incluir una fuente de calor en contacto térmico con un volumen de gas. La expansión del gas cuando se acciona la fuente de calor crea una presión de gas suficiente para mover la muestra de partícula enriquecida desde la zona de enriquecimiento a otro emplazamiento dentro del sistema microfluídico, tal como un emplazamiento que contiene módulos para procesamiento de fluidos adicional.

15 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un sistema microfluídico y método para procesar una muestra de partícula enriquecida que incluye células atrapadas en un líquido. Por ejemplo, el sistema incluye una zona de lisis para recibir la muestra que contiene células enriquecida y un elemento de posicionamiento para posicionar la muestra que contiene células enriquecida en una posición de lisis en las proximidades de un mecanismo de lisis. El mecanismo de lisis libera material intracelular, tal como ADN o ARN, a partir de las células. En una forma de realización, el mecanismo de lisis incluye electrodos para generar un campo eléctrico suficiente para liberar contenido intracelular a partir de las células. Como alternativa, el mecanismo de lisis puede lisar las células usando técnicas químicas, térmicas y/o ultrasónicas o cualquier combinación de estas técnicas.

25 En una forma de realización, la zona de lisis libera contenido intracelular a partir de células del fluido que contiene células y, a continuación, prepara a partir de este fluido una microgota que contiene contenido intracelular liberador de las células. La microgota está preferentemente preparada a partir de solo una parte del fluido que contiene células. Por ejemplo, una microgota preferente incluye menos de aproximadamente el 90 por ciento del fluido que contiene células. En otra realización, la zona de lisis recibe una microgota del fluido que contiene células y libera el contenido intracelular de las células dentro de la gota.

30 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un sustrato microfluídico para procesar el contenido intracelular de células suspendidas en fluidos. El sustrato incluye una zona de enriquecimiento, un módulo de lisis, un módulo de formación de microgota, módulo de mezcla y un módulo de amplificación. La zona de enriquecimiento que prepara una muestra de partículas enriquecida a partir del fluido que contiene células. El módulo de lisis, que está acoplado a la zona de enriquecimiento para recibir la muestra de partícula enriquecida, libera material intracelular de células dentro de la muestra para, de este modo, formar una muestra lisada. El módulo de formación de microgotas forma, de este modo, una primera microgota de fluido a partir de la muestra lisada y la remite a un módulo de mezcla para mezclar con una microgota de reactivo. El módulo de amplificación amplifica material intracelular dentro de la microgota formada a partir de la mezcla.

40 Otro aspecto de la divulgación se refiere a un sistema de microfluído y método para procesar un fluido que contiene células, tales como, por ejemplo, un líquido que contiene células bacterianas o células humanas. Por ejemplo, el sistema incluye una zona de lisis para recibir la muestra que contiene células y un elemento de posicionamiento para posicionar la muestra que contiene células en una posición de lisis en las proximidades de un mecanismo de lisis. El mecanismo de lisis libera material intracelular, tal como ADN o ARN, a partir de las células. En una forma de realización, el mecanismo de lisis incluye electrodos para generar un campo eléctrico suficiente para liberar contenido intracelular a partir de las células. Como alternativa, el mecanismo de lisis puede lisar las células usando técnicas químicas, térmicas y/o ultrasónicas o cualquier combinación de estas técnicas.

50 En una forma de realización, la zona de lisis libera contenido intracelular a partir de células del fluido que contiene células y, a continuación, prepara a partir de este fluido una microgota que contiene contenido intracelular liberador de las células. La microgota está preferentemente preparada a partir de solo una parte del fluido que contiene células. Por ejemplo, una microgota preferente incluye menos de aproximadamente el 90 por ciento del fluido que contiene células. En otra realización, la zona de lisis recibe una microgota del fluido que contiene células y libera el contenido intracelular de las células dentro de la gota.

60 Los elementos de posicionamiento ayudan a colocar la muestra de fluido que contiene células en las proximidades del mecanismo de lisis de modo que el mecanismo de lisis puede liberar material intracelular de las células. Estos elementos funcionan preferentemente de forma distinta de una válvula, que podría obstruir completamente el pasaje de material entre emplazamientos corriente arriba y corriente abajo adyacentes a la válvula. En su lugar, proporcionan normalmente resistencia al flujo de fluido en un emplazamiento deseado (la posición de lisis) para controlar, de este modo, el emplazamiento del fluido.

65 En una forma de realización, el elemento de posicionamiento se dispone corriente abajo del mecanismo de lisis para posicionar una parte corriente arriba de una muestra que contiene células (tal como una microgota) en la posición de lisis. El elemento de posicionamiento aumenta preferentemente una tensión de superficie de una superficie corriente

abajo de la muestra que contiene células para inhibir, de este modo, el movimiento corriente abajo de la muestra. Por ejemplo, el elemento de posicionamiento puede incluir una cantidad de material de humectación reducida, tal como material hidrófobo, dispuesto para entrar en contacto con una parte de la superficie corriente abajo de la microgota que contiene células.

5 En otra realización, el elemento de posicionamiento se dispone corriente arriba de la zona de lisis para posicionar una parte corriente abajo de la microgota que contiene células en la posición de lisis. El elemento de posicionamiento incluye una salida de ventilación, que iguala sustancialmente una presión de gas corriente arriba de la microgota que contiene células con una presión de gas corriente abajo de la microgota que contiene células para
10 detener, de este modo, el movimiento corriente abajo de la microgota que contiene células. Cuando la microgota está en la posición de lisis. Se dispone preferentemente una válvula para obstruir posteriormente el pasaje de gas entre la zona de lisis y la salida de ventilación para permitir que una presión de gas corriente arriba mueva de nueva la gota adicionalmente corriente abajo para un procesamiento adicional. Por ejemplo, el sistema microfluídico puede incluir una zona de mezcla corriente abajo de la zona de enriquecimiento y/o zona de lisis, para mezclar la microgota
15 que emerge de estas zonas con una cantidad predeterminada de material de reactivo.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un sustrato microfluídico para procesar el contenido intracelular de células suspendidas en fluidos. El sustrato incluye un módulo de lisis, un módulo de formación de microgota, módulo de mezcla y un módulo de amplificación. El módulo de lisis libera material intracelular de células dentro de la
20 muestra para, de este modo, formar una muestra lisada. El módulo de formación de microgotas forma, de este modo, una primera microgota de fluido a partir de la muestra lisada y la remite a un módulo de mezcla para mezclar con una microgota de reactivo. El módulo de amplificación amplifica material intracelular dentro de la microgota formada a partir de la mezcla.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La presente invención se describe a continuación en relación con los siguiente dibujos, en los que:

30 la Fig. 1 muestra un sistema microfluídico según la invención;
la Fig. 2 es una vista expandida de un dispositivo microfluídico.
la Fig. 3 es un esquema de una dispositivo microfluídico del sistema microfluídico de la Fig. 1;
Fig. 4, muestra una vista superior del dispositivo microfluídico de la Fig. 3;
la Fig. 5 muestra una vista en sección transversal parcial del dispositivo microfluídico de la Fig. 4;
35 la Fig. 6 muestra una vista en sección transversal parcial de un sustrato superior del dispositivo microfluídico de la Fig. 2;
la Fig. 7 muestra una segunda vista en sección transversal parcial de un sustrato superior del dispositivo microfluídico de la Fig. 2;
la Fig. 8a muestra una vista superior de una zona de preparación de microgota del dispositivo microfluídico de la Fig. 4 antes de la preparación de una microgota;
40 la Fig. 8b muestra una vista de sección transversal de la zona de preparación de microgota de la Fig. 8a;
la Fig. 9a muestra una vista superior de una zona de preparación de microgota del dispositivo microfluídico de la Fig.4 después de la preparación de una microgota;
la Fig. 9b muestra una vista lateral de sección transversal de la zona de preparación de microgota de la Fig. 9a;
45 las Fig. 10a-10c muestran vistas en sección transversal de una barrera de fluido capilar asistida de la presente invención;
las Fig. 11a-11c muestran vistas superiores de una barrera de fluido que comprende una salida de ventilación;
las Fig. 12a-12b muestran vistas superiores del módulo de lisis del dispositivo microfluídico de la Fig. 4, antes y después de la preparación de una muestra lisada;
50 las Fig. 13a y 13b muestran una segunda realización de un módulo de lisis de la invención;
la Fig. 14 muestra un circuito de impulsos asociado con el módulo de lisis de la Fig. 4; y
las Fig. 15a y 15c muestran un segundo módulo de preparación de microgota de la invención.

Descripción detallada de una realización preferente

55 La presente invención se refiere a sistemas microfluídicos y métodos para materiales de procesamiento, tales como muestras y reactivos. De manera más específica, un aspecto de la invención se refiere a sistemas microfluídicos y métodos para mover fluidos dentro de un sistema microfluídico. En una realización descrita a continuación, el fluido incluye partículas que tienden a moverse con el fluido. El componente de fluido del fluido que contiene partículas es un gas o, preferentemente, un líquido. Las partículas del fluido que contiene partículas son preferentemente
60 partículas enteras, tales como células bacterianas o células de un animal, tal como un humano. No obstante, pueden incluir material intracelular de tales células. Por ejemplo, un sistema de la invención puede usarse para procesar una muestra de células bacterianas para determinar si las bacterias son patogénicas.

A. Visión de conjunto del sistema

65 La Fig. 1 representa un sistema microfluídico 100 que incluye un dispositivo microfluídico 110 y cartucho

correspondiente 120, que recibe una o más muestras de fluido y procesa las muestras con control por ordenador 127 y adquisición de datos y cuadro de control (DAQ) 126.

5 El ordenador 127 realiza preferentemente funciones de alto nivel, tales como suministrar una interfaz de usuario que permite al usuario seleccionar operaciones deseadas, notificando al DAQ 126 para las operaciones seleccionar y mostrando al usuario los resultados de tales operaciones. Estas operaciones incluyen, por ejemplo, someter una muestra a etapas de procesamiento dentro de diversas zonas de procesado del dispositivo microfluídico. El ordenador 127 puede ser un ordenador portátil para facilitar el transporte del sistema microfluídico.

10 El ordenador 127 se conecta al DAQ 126 mediante conexión 128, que proporciona datos I/O, conexión eléctrica, de tierra, reinicio y otra conectividad funcional. Como alternativa, puede proporcionarse un enlace sin cables 132 entre el ordenador 127 y el DAQ 126 para el intercambio de datos y señal de control a través de elementos sin cables 132(a) y 132(b). Cuando el enlace de datos es un enlace sin cables, por ejemplo, el DAQ 126 puede tener una fuente energética separada, tal como una batería.

15 En general, el DAQ 126 controla el funcionamiento del dispositivo microfluídico 110 de acuerdo con el alto nivel de instrucciones recibidos del ordenador 127. De manera más específica, para implementar una operación deseada requerida por el ordenador 127, el DAQ 126 suministra las señales de control eléctricas adecuadas al cartucho 120 a través de contactos 125.

20 El cartucho 120 proporciona conexiones eléctricas y ópticas 121 para señales eléctricas y ópticas entre el DAQ 126 y el sustrato microfluídico 110, permitiendo, de este modo, que el DAQ 126 controle el funcionamiento del sustrato.

25 El cartucho portador de chip 120 se muestra siendo insertado dentro de (o retirado de) un recipiente de hardware de interfaz del DAQ 126 que tiene contactos eléctricos y ópticos 125 estandarizados para corresponderse con contactos correspondientes 121 del cartucho portador de chip 120. La mayoría de contactos son para señales eléctricas, mientras que unos determinados son para señales ópticas (IR, visibles, UV, etc.) en caso de procesadores microfluídicos ópticamente excitados u ópticamente controlados. De modo alternativo (no se muestra), el DAQ 126 completo puede ser un chip ASIC único que se incorpora en el cartucho portador de chip 120, en el que los
30 contactos 121, 125 se convertirían en vías conductivas sobre una placa de circuito impresa.

B. Dispositivo microfluídico

35 La Fig. 2 ilustra la estructural general de un tipo preferente de dispositivo microfluídico. El dispositivo incluye un sustrato superior 130, que está enlazado a un sustrato inferior 132 para formar una red de fluidos.

El sustrato superior 130 representado en la FIG. 2 está preferentemente formado de vidrio y tiene una red microfluídica 134 en su superficie inferior 136. Los expertos en la técnica reconocerán que los sustratos compuestos de silicio, vidrio, cerámica, plástico y/o cuarzo son todos aceptables en el contacto de la presente invención.

40 La red microfluídica incluye una pluralidad de zona. El número de zonas, así como la topología completa de la red microfluídica, dependerá de la aplicación particular para la que el dispositivo microfluídico está diseñado para realizar. Las zonas del dispositivo microfluídico pueden tener cualquier forma de sección transversal, tal como generalmente arqueada o generalmente poligonal. Por ejemplo, una zona puede incluir canales, cámaras u otros espacios sustancialmente encerrados. Por "sustancialmente encerrados" se refiere que los materiales entran o salen de las zonas solo a través de vías predeterminadas. Ejemplos de tales vías incluyen canales, microcanales y similares, que se interconectan con diversas zonas. Las zonas preferentemente tienen al menos una dimensión a micro escala, tal como inferior a aproximadamente 250 μm o, de manera más preferente, inferior a aproximadamente
45 75 μm .

50 Los canales y cámaras de la red microfluídica se graban al aguafuerte en la superficie inferior 136 del sustrato superior 130 usando técnicas fotolitográficas conocidas. De manera más específica, plantillas o máscaras transparentes que contienen diseños opacos se usan para foto-definir objetos sobre la superficie del sustrato. Los patrones sobre las plantillas se generan con programas de diseño con ayuda de ordenador y pueden delinear estructuras con anchuras de trazo inferiores a un micrómetro. Una vez se ha generado una plantilla, puede usarse casi indefinidamente para producir estructuras de réplicas idénticas. En consecuencia, incluso redes microfluídicas extremadamente complejas pueden reproducirse en cantidades en masa a un coste unitario gradual mínimo. Como alternativa, si se usa un material plástico, el sustrato superior puede formarse usando técnicas de moldeo por inyección, en el que se forman microcanales durante el proceso de moldeo.

60 El sustrato inferior 132 puede incluir una base de vidrio 138 y una capa de óxido 140. Dentro de la capa de óxido 140, se forman calentadores resistivos 142 y conducciones eléctricas 144 usando técnicas fotolitográficas. Las conducciones 144 se conectan a terminales 146 que se exponen en el borde del sustrato para permitir la conexión eléctrica al cartucho 120, permitiendo, de este modo, que el DAQ 126 controle los calentadores. De manera más específica, para activar un calentador 142, el DAQ 126 aplica un voltaje a través de un par de terminales 146 (a través del cartucho 120) para suministrar corriente a través de las conducciones 144 y el calentador 142, calentando,
65

de este modo, el elemento calentador resistivo 142.

Se posicionan elementos calentadores de metal 142 de modo que, cuando los sustratos superiores e inferiores se enlazan juntos, los calentadores residen directamente por debajo de determinadas regiones de la red de fluidos del sustrato superiores para ser capaces de calentar el contenido de estas regiones. La capa de óxido de silicio 140 evita que los elementos de calentamiento 142 entren en contacto directamente con material en la red microfluídica.

La capa de óxido 140, los elementos de calentamiento 142 y conducciones resistivas 144 han sido fabricados usando técnicas fotolitográficas bien conocidas, tales como las usadas para grabar al aguafuerte la red microfluídica.

La Fig. 3 ilustra una vista de arriba a abajo del dispositivo microfluídico 110. Como se muestra, el sustrato tiene un módulo de entrada de muestras 150 y un módulo de entrada de reactivos 152 para permitir que los materiales de muestra y de reactivo, respectivamente, se introduzcan en el dispositivo 110. Preferentemente, los módulos de entrada 150, 152 están dispuestos para permitir la entrada de material automática usando un robot de laboratorio controlado por ordenador 154.

El sustrato también incluye módulo de procesamiento 156, 158, 160, 166 y 162 para procesar los materiales de muestra y de reactivo. Dentro de estos módulos de procesamiento, puede someterse una muestra diversas etapas de procesamiento físicas y químicas. Por ejemplo, el módulo de enriquecimiento 156 prepara una muestra de fluido que tiene una concentración relativamente alta de partículas de células, el módulo de lisis 160 libera material intracelular a partir de las partículas de células el módulo de mezcla 166 mezcla la muestra resultante con determinados reactivos. Como otro ejemplo, puede usarse un módulo de procesamiento de amplificación 162 para amplificar y detectar cantidades mínimas de ADN dentro de una muestra.

Diversos módulos del dispositivo microfluídico 110 están conectados, tal como mediante canales 164, para permitir que los materiales se muevan de un emplazamiento a otro dentro del dispositivo 110. Los accionadores 168, 170, 172 asociados con el dispositivo microfluídico proporcionan una fuerza motriz, tal como una presión de gas, para mover el material de muestra y de reactivo junto con los canales y zonas. Por ejemplo, un primer accionador 168 mueve material corriente abajo a partir del módulo de procesamiento 156 al módulo de procesamiento 158. Cuando se finaliza el procesamiento dentro del módulo de procesamiento 158, un segundo accionador 170 mueve material corriente abajo para mezclar el módulo de procesamiento 160. Posteriormente, el accionador 170 o un accionador adicional mueve el material al módulo de mezcla 166, en el que el material se mezcla con un reactivo movido por el accionador 172. Finalmente, el accionador 172 u otro accionador, mueve el material mezclado al módulo 162.

Puesto que cada accionador es preferentemente responsable de mover materiales dentro de solo un subconjunto de los módulos del dispositivo 110, los materiales de muestra pueden controlarse de forma más precisa que si un solo accionador fuera responsable de mover material por todo el dispositivo entero. Las diversos elementos funcionales, del dispositivo microfluídico 110, que incluyen los accionadores, están preferentemente bajo control informático para permitir el procesamiento y análisis de muestras automático.

C. Múltiples accionadores

Los diversos accionadores del dispositivo microfluídico 110 cooperan para mover material entre distintos emplazamiento del dispositivo microfluídico 110. Por ejemplo, el accionador 168 mueve material, tal como una muestra enriquecida, entre una zona de enriquecimiento 931 y un módulo de preparación de microgotas 158. El accionador 170 prepara una microgota a partir de la muestra enriquecida y, al hacerlo, mueve la microgota a la zona de lisis 950. El accionador 170 se usa para mover material desde la zona de lisis 950 al módulo de mezcla 166. Cabe destacar, sin embargo, que puede disponerse otro accionador en el intermedio entre la zona de lisis 950 y la zona de preparación de microgota para mover la muestra lisada corriente abajo al módulo de mezcla 166.

Los accionadores del dispositivo 110 también pueden cooperar en el movimiento de dos cantidades de material simultáneamente. Por ejemplo, tal como se ha descrito anteriormente, el accionador 172 y el accionador 170 cooperan para mezclas reactivo y gotas lisadas. Tales accionadores cooperativos pueden controlarse de forma independiente entre sí para asegurar un mezclado adecuado. Por ejemplo, si un material es conocido por ser viscoso, la fuerza motriz que puede ese material puede aumentarse de forma independiente de la fuerza motriz que mueve el otro material.

Los accionadores múltiples y módulos de dispositivo microfluídico 110 son preferentemente conectables de forma operativa y aislables mediante las válvulas del dispositivo microfluídico. Por ejemplo, un estado cerrado de cualquiera de las válvulas 915, 216 aísla de forma operativa el módulo de preparación de microgota 170 del módulo de enriquecimiento 156. De este modo, pueden usarse uno o más accionadores para mover materiales entre emplazamientos predeterminados dentro de un dispositivo microfluídico 110, sin perturbar o poner en contacto material presente en un módulo aislado de forma operativa. La capacidad de conectar y aislar de forma operativa módulos deseados resulta ventajoso en dispositivos microfluídicos que tienen muchas funciones de procesamiento. Asimismo, estas válvulas también controlan la dirección de la fuerza propulsiva de los accionadores evitando que el gas en expansión viaje en determinadas direcciones, mientras que permiten que se expanda en la dirección

deseada. Esto también amplía el alcance sobre el cual un accionador puede propulsar una microgota, evitando que el gas se disipe en determinadas áreas corriente arriba de la microgota.

Lo siguiente demuestra que el funcionamiento cooperativo de tales múltiples accionadores es una realización ilustrativa que tiene una pluralidad de módulos de procesamiento, a saber, una zona de enriquecimiento 915, un módulo de preparación de microgota 158, un módulo de lisado de células 160, un módulo de mezcla 166 y un módulo de manipulación de ADN 167.

1. Módulo de enriquecimiento

a. Estructura de módulo de enriquecimiento.

En cuanto a las Fig. 4 y 5, un dispositivo microfluídico 901 incluye un módulo de enriquecimiento 156 para concentrar muestras que se reciben en el mismo. Estas muestras incluyen fluidos que contienen partículas, tales como fluidos que contienen células bacterianas. En general, el módulo de enriquecimiento 156 recibe un flujo de fluido que contiene partículas desde un puerto de entrada 180 del módulo de entrada 150 y permite que el fluido pase a través de la zona mientras que acumula partículas dentro de la zona. De este modo, cuanto más fluido fluya a través de la zona, la concentración de partículas aumenta dentro del módulo. La muestra de fluido concentrada resultante se denomina en el presente documento como una muestra de partícula enriquecida.

El módulo de enriquecimiento incluye una zona de enriquecimiento 931 (Fig. 5), un miembro de circulación de flujo 900, válvulas 915, 919 y un canal de introducción de muestra 929. La válvula 919 se conecta entre el miembro de circulación de flujo 900 y el accionador 168 como se muestra y la válvula 915 se conecta entre el miembro de circulación de flujo y un canal corriente abajo 937 que conduce al módulo de procesamiento 158. Estas válvulas pueden ser de cualquier tipo adecuado para su uso en un dispositivo microfluídico, tales como válvulas térmicamente accionadas, tal como se describe en la solicitud pendiente de publicación n.º 09/953.921, presentada el 9 de septiembre de 2001. Las válvulas pueden ser reversibles entre los estados abierto y cerrado para permitir la reutilización del módulo de enriquecimiento 931.

El miembro de circulación de flujo también se conecta al módulo de entrada de muestra 150 a través del canal de introducción de muestra 929 para permitir que el fluido fluya dentro de la zona de enriquecimiento. La válvula 913 está conectada a este canal de introducción de muestra para controlar el flujo de entrada y el flujo de salida del puerto de entrada.

La Fig. 5 es una vista en sección transversal de la zona de enriquecimiento que muestra el miembro de circulación de flujo en mayor detalle. Como se muestra, el miembro de circulación de flujo 900 tiene primera y segunda superficies 941, 943. La primera superficie 941 está preferentemente adyacente a la cámara de enriquecimiento 931. La segunda superficie 941 está preferentemente separada de la cámara de enriquecimiento 931 por el miembro de circulación de flujo 900. El miembro de circulación de flujo 900 está formado preferentemente de un material que tiene vías más pequeñas que el diámetro de las partículas a enriquecer, tal como poroso o inferior a aproximadamente 2 micrómetros de diámetro, por ejemplo, aproximadamente 0,45 micrómetros. Materiales adecuados para construir el miembro de circulación de flujo 900 incluyen, por ejemplo, medios de filtro tales como papel o tejidos, polímeros que tienen una red de vías y materiales vídriosos, tales como fritas de vidrio.

Las Fig. 6 y 7 representan vistas de sección transversal del sustrato superior 130 que ilustran una zona de enriquecimiento 931. Como se muestra, el fluido sale de la zona de enriquecimiento 931 a través de la superficie 941, pasa a través del miembro 900 y entra en un espacio 400. El espacio 400 puede incluir un material absorbente 402 para absorber el fluido saliente. De este modo, el espacio 400 proporciona preferentemente una región sustancialmente auto-contenida en la que se puede recoger fluido que sale de la zona de enriquecimiento sin entrar en contacto con partes exteriores del sistema microfluídico 100.

El espacio 400 se forma durante la fabricación del sustrato superior 130. Como se ha tratado anteriormente, características microfluídicas, tales como zonas y canales, se fabrican en la superficie 136 del sustrato 130. El espacio 400, sin embargo, se fabrica en una superficie 137, que se dispone preferentemente sobre el otro lado del sustrato 130, superficie opuesta 136. De este modo, incluso cuando la superficie 136 se corresponde con el sustrato inferior 132, el fluido puede salir de la zona de enriquecimiento 931 a través del miembro de circulación de flujo 900.

El miembro de circulación de flujo 900 y el material absorbente 402 no requieren adhesivos ni otras sujeciones para posicionarse dentro del sustrato 130. En cambio, el miembro de circulación de flujo 900 y el material absorbente 402 puede estar formado de una forma y tamaño que se corresponde sustancialmente con el espacio 400. La fricción mantiene, de este modo, el miembro de circulación de flujo 900 y el material absorbente 402 en su lugar una vez se han colocado en el espacio 400. Cualquier hueco residual en los emplazamientos 404 entre el miembro de circulación de flujo 900 y el sustrato 130 debe ser lo suficientemente pequeño para evitar que las partículas salgan de la zona de enriquecimiento 931 a través del hueco 404. Naturalmente, puede usarse adhesivo u otro medio de sujeción para asegurar el miembro de circulación de flujo 900 o material absorbente 402.

En una realización alternativa, un miembro de circulación de flujo se forma integralmente con un sustrato mediante el uso de técnicas de microfabricación, tales como atacado químico, que introducen poros u otras vías en el sustrato. Los poros proporcionan el pasaje de fluido entre la zona de enriquecimiento 931 y una parte externa del sustrato.

5 b. Funcionamiento de módulo de enriquecimiento

Para enriquecer una muestra, el dispositivo 901 funciona de la siguiente manera. Haciendo referencia a la Fig. 4, las válvulas 915, 919 están inicialmente cerradas y la válvula 913 está abierta. Se introduce un fluido que contiene partículas en el puerto de entrada 180. Puesto que la válvula 913 está abierta, permite que la muestra pase a lo largo del canal 929 en la zona de enriquecimiento 931. Como alternativa, la zona de enriquecimiento 931 puede configurarse para recibir muestras directamente, tal como mediante inyección. Puesto que las válvulas 915 y 919 están cerradas, se evita que el fluido se escape en el accionador 977 y el canal corriente abajo 937.

De este modo, el miembro de circulación de flujo 900 proporciona solo una trayectoria para que salga el fluido del canal de enriquecimiento. El fluido pasa a través de la superficie 941 y sale de la zona de enriquecimiento 931 a través de la segunda superficie 943, mientras que las partículas se acumulan dentro de la zona. La zona de enriquecimiento 931 puede, por lo tanto, recibir un volumen de fluido que es más grande que el volumen de la cámara de enriquecimiento 931. De este modo, según fluye el fluido a través de la cámara, la concentración de partículas dentro de la cámara aumenta en relación con la concentración en el fluido que contiene partículas suministrado en la entrada de muestras. Cuando las partículas son células, la concentración o número de células en la zona 931 preferentemente se vuelve lo suficientemente grande para realizar un análisis de reacción en cadena de polimerasa (PCR) de polinucleótidos liberados de las células en un módulo de procesamiento corriente abajo.

la zona de enriquecimiento 931 prepara, de este modo, una muestra de partícula enriquecida a partir de partículas de fluidos que contienen partículas recibidas en la misma. La muestra de partícula enriquecida tiene una relación sustancialmente superior de partículas por volumen de fluido (PPVF) que la relación correspondiente de fluido que contiene partículas recibido por la zona de enriquecimiento. Las PPVF de la muestra de partícula enriquecida es preferentemente al menos aproximadamente 25 veces, preferentemente aproximadamente 250 veces, más preferentemente aproximadamente 1.000 veces superior que las PPVF del fluido que contiene partículas.

Después de que un volumen suficiente de fluido que contiene partículas se haya recibido por la zona de enriquecimiento 931, la válvula 913 se cierra bloqueando más, de este modo, el flujo de fluido en la zona de enriquecimiento y evitando que el material en la zona 931 vuelva al puerto de introducción de muestra 180. A continuación se abren las válvulas 915, 919, preferentemente cuando se accionan las fuentes de calor asociadas con las mismas. Cuando se abren, la válvula 919 permite al accionador 168 empujar la muestra enriquecida y, la válvula 915 permite que la muestra enriquecida se mueva corriente abajo.

El accionador 168 proporciona una fuerza motriz que mueve la muestra de partícula enriquecida desde la zona de enriquecimiento 931. El accionador 168 es preferentemente un accionador de gas, que proporciona una presión de gas cuando se acciona una fuente de calor 975, que está en comunicación térmica con un volumen de gas 977. El accionamiento de la fuente de calor 975 aumenta la temperatura y, por lo tanto, la presión, de gas 977. El miembro de circulación de flujo y el fluido en el mismo evita sustancialmente que el gas se escape de la zona de enriquecimiento. De este modo, la presión de gas resultante mueve la muestra de partícula enriquecida corriente abajo de la zona de enriquecimiento 931.

El accionador de gas puede incluir elementos para facilitar técnicas de generación de presión alternativas tales como generación de presión química. En otra realización, el accionador puede disminuir un volumen de gas asociado con una parte corriente arriba de la zona de enriquecimiento para, de este modo, crear un diferencial de presión a través de la muestra que mueve la muestra desde la zona de enriquecimiento. Un ejemplo de tal elemento es un accionador mecánico, tal como un pistón o diagrama.

En lugar de generar una presión positiva corriente arriba de la zona de enriquecimiento, el accionador de gas puede disminuir una presión corriente abajo de la zona en relación con una presión corriente arriba. Por ejemplo, el accionador de gas puede incluir un elemento refrigerante en contacto térmico con un volumen de gas asociado con una parte corriente abajo de la zona. La contracción del gas cuando se acciona el elemento refrigerante crea una diferencia de presión de gas entre las parte de corriente arriba y corriente abajo de la zona enriquecida para mover la muestra de partícula enriquecida de la zona de enriquecimiento. Como alternativa, se puede usar un accionador mecánico para aumentar un volumen de gas asociado con una parte corriente abajo de la zona de enriquecimiento para, de este modo, disminuir la presión del gas y mover la muestra de partícula enriquecida desde la zona de enriquecimiento.

La muestra de partícula enriquecida se mueve preferentemente corriente abajo sin esencialmente dilución de la misma, *es decir*, la concentración de las partículas enriquecidas no disminuye sustancialmente cuando se mueve desde la zona de enriquecimiento 931. De este modo, la retirada de partículas del canal de enriquecimiento de la presente invención no requiere diluir ni, de otro modo, poner en contacto las partículas con un fluido distinto del fluido del fluido que contiene partículas introducido en el canal de enriquecimiento. En contraposición, en sistemas

que concentran sustancias mediante adsorción de superficie, la retirada de las sustancias adsorbidas requiere un fluido de elución, que entra en contacto y, de este modo, diluye las sustancias.

5 Cuando se retira de la zona de enriquecimiento de la presente invención, la muestra de partícula enriquecida se recibe preferentemente por el canal corriente abajo 937. El canal corriente abajo 937 conduce a otros módulos de procesamiento, que realizan el procesamiento adicional de la muestra de partícula enriquecida. En la realización de la Fig. 3, la muestra de partícula enriquecida se recibe mediante un módulo de preparación de microgota 158, que prepara una muestra de microgota que comprende una parte de la muestra de partícula enriquecida.

10 2. Módulo de preparación de microgota

a. Características de una microgota

15 Una microgota 802 es una muestra discreta que tiene un volumen predeterminado entre, por ejemplo, aproximadamente 1,0 picolitro y aproximadamente 0,5 microlitros. De este modo, microgotas preparadas mediante el módulo de preparación de microgota proporciona una cantidad conocida de muestra para procesamiento adicional. El volumen de la microgota preparada mediante el módulo de preparación de microgota es preferentemente esencialmente independiente de la viscosidad, conductividad eléctrica y fuerza osmótica del fluido de la microgota.

20 La microgota 802 está preferentemente definida por límites corriente arriba y corriente abajo cada uno formado por una interfaz líquida de gas respectiva 804, 806. El líquido de la interfaz se forma por una superficie de un líquido que forma la microgota. El gas de la interfaz es gas presente en los canales microfluídicos del dispositivo microfluídico 901.

25 b. Estructura y funcionamiento del módulo de preparación de microgota

Haciendo referencia a las Fig. 8a-8b y 9a-9b, el módulo de preparación de microgota 158 prepara una microgota 802 a partir de una muestra microfluídica recibida en el mismo. Este módulo incluye una zona de preparación de microgota 800, un elemento de posicionamiento 979, un accionador de gas 170 y una válvula 216 que coopera para preparar la microgota 800 a partir de muestras microfluídicas recibidas desde la zona de enriquecimiento.

30 Como se explicó anteriormente, el accionador 168 de la zona enriquecida empuja la muestra enriquecida en la zona de preparación de microgota 800. La muestra enriquecida se mueve hasta que alcanza el elemento de posicionamiento 979. En general, un elemento de posicionamiento inhibe el progreso corriente abajo de una muestra microfluídica para posicionar, de este modo, la muestra en un emplazamiento deseado. No obstante, como se explica con más detalle a continuación, el elemento de posicionamiento no inhibe de forma permanente el progreso de la muestra. En su lugar, permite que la muestra microfluídica continúe corriente abajo en un tiempo posterior predeterminado.

40 El borde de ataque de la muestra microfluídica 808 que alcanza el elemento de posicionamiento 979 se posiciona corriente abajo desde una abertura 820 del accionador de gas 170. En consecuencia, una primera parte 821 de la muestra microfluídica 808 se dispone corriente arriba desde la abertura 820 y una segunda parte 822 de muestra microfluídica 808 se dispone corriente abajo de la abertura 820.

45 Haciendo referencia a las Fig. 8a-8b, se acciona el accionador de gas 170, tal como mediante DAQ 126, para generar, de este modo, una presión de gas suficiente para separar la microgota 802 de la segunda parte 822 de la muestra microfluídica 808. La presión de gas se proporciona preferentemente por el accionamiento de una fuente de calor 958, que calienta un volumen de gas asociado con un accionador de gas 957. Según aumenta la presión, el gas se expande, separando, de este modo, una microgota 802 del resto de la muestra 808. La microgota 802 puede comprender solo una parte, tal como menos de aproximadamente el 75 % o menos de aproximadamente el 50 %, de la muestra microfluídica 808 recibida por la zona de preparación de microgota 800. Las dimensiones de la microgota 802 se determinan por el volumen del canal entre la barrera de fluido 979 y la abertura 820. Por ejemplo, para un canal que tiene un área de sección transversal uniforme, una longitud l_1 de la microgota 802 se corresponde con una distancia d_4 entre el elemento de posicionamiento 979 y la abertura 820. De este modo, puede configurarse un dispositivo microfluídico para preparar microgotas de cualquier volumen variando la longitud entre la barrera de fluido y la abertura de accionador correspondiente.

60 El accionamiento continuado del accionador de gas 170 sobrepasa el efecto inhibitor del elemento de posicionamiento 979, conduciendo, de este modo la microgota 802 a un emplazamiento corriente abajo de la zona de preparación de microgota 800 mientras que la segunda parte 822 de la muestra microfluídica se mueve corriente arriba desde la microgota 802 hasta el módulo de lisis de células 160.

3. Módulo de lisis de células

65 Haciendo referencia de nuevo a la Fig. 3, un módulo de lisis 160 recibe la microgota 802 preparada por la zona de preparación de microgota 800. En general, el módulo de lisis 160 libera material desde el interior de las partículas, tal

como mediante la liberación de material intracelular de células.

Tal como se muestra en las Fig. 4 y 12, el módulo de lisis 160 incluye una zona de lisis 950, un mecanismo de lisis dentro de la zona de lisis (tal como electrodos 954) y un elemento de posicionamiento ventilado 200 posicionado corriente arriba de la zona de lisis. El mecanismo de lisis preferentemente incluye un conjunto de electrodos u otras estructuras para generar campos eléctricos dentro de la zona de lisis. El elemento de posicionamiento ventilado incluye preferentemente una salida de ventilación 202, una válvula 204 y un segundo elemento de posicionamiento 206 para inhibir fluido que fluye en la salida de ventilación.

Como se explicó anteriormente, el accionador 170 del módulo de preparación de microgota 158 conduce una microgota dentro del módulo de lisis de células 160. Según la microgota se mueve dentro del módulo 160, el elemento de posicionamiento ventilado 200 posiciona la microgota 802 en una posición de lisis con respecto a electrodos 954. De manera más específica, según la microgota llega a un módulo de lisis 160 pasa la abertura del elemento de posicionamiento 200, puesto que el segundo elemento de posicionamiento 206 impide que la microgota fluya dentro de la salida de ventilación 202. Cuando el extremo posterior de la microgota pasa la abertura de la barrera 200, el gas de propulsión desde el accionador 170 se disipa a través de la salida de ventilación 202, igualando sustancialmente, de este modo, la presión de gas corriente arriba de la microgota 802 con una presión corriente abajo de la microgota 802. De este modo, la microgota detiene el movimiento en una posición de lisis justo corriente abajo de la barrera 200. Preferentemente, en la posición de lisis, sustancialmente toda la microgota 802 se dispone entre un borde corriente arriba 212 y un borde corriente abajo 214 de los electrodos 954.

Después de colocar la microgota 802 en la posición de lisis de células, un circuito de impulsos de DAQ 126 suministra una señal de voltaje pulsada a través de los electrodos 954. En respuesta, los electrodos 954 generan un campo eléctrico pulsado en las proximidades de los electrodos. Puesto que la microgota está posicionada en sus proximidades, las células dentro de la microgota se someten al campo pulsado. Preferentemente, sustancialmente todas las células, tal como superior a aproximadamente el 75 %, de la microgota se someten a un campo eléctrico suficiente para liberar material intracelular del mismo. El módulo de lisis prepara, de este modo, una microgota lisada que comprende una cantidad predeterminada de muestra.

Se muestra un circuito de impulsos preferente en la Fig. 14. En general, este circuito genera una secuencia de impulsos de voltaje que proporciona una secuencia correspondiente de pulsos de campo eléctrico en las proximidades de los electrodos 954 que tiene una amplitud y duración suficiente para liberar una cantidad deseada de material intracelular de células dentro de la microgota.

Material intracelular presente en la microgota lisada es accesible para etapas de procesamiento adicionales. Por ejemplo, ADN y/o ARN liberado de células se encuentra accesible para su amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa. Como se usa en el presente documento, el término lisis no requiere que las células se rompan completamente. En su lugar, lisis se refiere a la liberación de material intracelular. Por ejemplo, en lugar de romper las células, el campo eléctrico puede aumentar la porosidad de las membranas celulares por una cantidad que permita la liberación de material sin una ruptura permanente de las membranas.

También pueden emplearse otros mecanismos de lisis para liberar material intracelular de células. Por ejemplo, puede liberarse material sometiéndolo a otras fuerzas que incluyen, por ejemplo, choque o presión osmótica. Los productos químicos, seleccionados entre el grupo de tensioactivos, disolventes y antibióticos pueden ponerse en contacto con las células. también se pueden usar métodos de cizallamiento mecánico para liberar materiales intracelulares.

La microgota lisada puede moverse corriente abajo hasta el módulo de mezcla 160 para un procesamiento adicional. Para mover la microgota lisada corriente abajo, la válvula 216, que está depositada corriente arriba de la zona de lisis 950, se cierra. La válvula 204 también se cierra para evitar que el gas salga de la zona de lisis 950 a través de la salida de ventilación. El accionador 170 se acciona a continuación, tal como se ha descrito anteriormente, para proporcionar una presión de gas suficiente para mover la microgota lisada corriente abajo de la zona de lisis 950.

En una realización alternativa, un módulo de lisis 300, como se muestra en las Fig. 13a, 13b, incluye una zona de lisis 302 que está configurada para preparar una microgota lisada 304 de volumen predeterminado a partir de una muestra microfluídica 306, que puede tener un volumen indeterminado. La zona de lisis 302 incluye preferentemente un mecanismo de lisis tal como electrodos 308. Las conducciones eléctricas 310 proporcionan una conexión a un circuito de impulsos de DAQ 126, a través de contactos 112, portador de chip 120 y contactos 125. Un elemento de posicionamiento 312 se dispone corriente abajo de la zona de lisis 302. Un accionador 314 se dispone corriente arriba de la zona de lisis. El accionador 314 incluye preferentemente un segundo elemento de posicionamiento 316 para evitar que el fluido de la muestra microfluídica entre en el mismo.

La zona de lisis 302 funciona de la siguiente manera. La muestra microfluídica 306 entra en la zona de lisis 302 y se mueve corriente abajo hasta que una interfaz corriente abajo 316 de la muestra microfluídica 306 se encuentra con el elemento de posicionamiento 312. El elemento de posicionamiento 312 aumenta preferentemente una tensión de superficie de la interfaz corriente abajo de la muestra microfluídica 306, inhibiendo, de este modo, un movimiento

corriente abajo adicional y posicionando una parte de la muestra microfluídica en una posición de lisis con respecto a electrodos 308. La posición de lisis se define como el emplazamiento de la parte de la muestra microfluídica dispuesta corriente abajo del accionador 314 y corriente arriba del elemento de posicionamiento 312. Preferentemente, el accionador 314 y el elemento de posicionamiento 312 se disponen adyacentes a los electrodos 308 de modo que todo el material presente en la posición de lisis se somete al capo eléctrico cuando se accionan los electrodos 308.

El accionamiento de electrodos 308 en la realización descrita anteriormente, proporciona un campo eléctrico suficiente para liberar material intracelular a partir de células presentes en la parte de la muestra microfluídica en la posición de lisis. Una vez se ha liberado una suficiente cantidad de material intracelular, el accionador 314 se acciona para preparar la microgota lisada 304 a partir de la muestra microfluídica 306. El accionador 314 proporciona preferentemente una presión de gas suficiente para mover la microgota lisada 304 a una parte corriente abajo de un dispositivo microfluídico tal como un módulo de mezcla 166.

4. Módulo de mezcla y módulo de entrada de reactivo

Haciendo referencia de nuevo a la Fig. 4, una muestra lisada preparada por el módulo de lisis 160 se recibe por el módulo de mezcla 166. El módulo de mezcla 166 incluye una zona de mezcla 958. En esta zona, la muestra de célula lisada se pone en contacto, tal como por mezcla, con una cantidad de reactivo recibido desde el módulo de fuente de reactivo 152. El módulo de fuente de reactivo 152 incluye una zona de preparación de microgota de reactivo (ZPMR) 434, que funciona preferentemente para preparar una microgota que tiene un volumen predeterminado de reactivo.

a. Módulo de entrada de reactivo

El módulo de entrada de reactivo 152 es esencialmente el mismo que el módulo de formación de microgota 158, sin embargo, está específicamente diseñado para la formación de una microgota de reactivo que tiene un volumen predeterminado que proporcionara una relación deseada de reactivo con respecto a muestra cuando se mezcle con la microgota del módulo de lisis de células 160. El módulo 152 incluye un puesto de entrada 420, una válvula 422 y un accionador 172, cada uno de los cuales une un canal de fuente de reactivo 428. Un canal de desbordamiento 424, que también une el canal de fuente de reactivos 428, puede proporcionarse. El accionador 172 puede incluir un segundo elemento de posicionamiento 432 para evitar que el líquido entre en el mismo.

Los materiales reactivos, que comprenden preferentemente al menos un líquido, se introducen a través del puerto de entrada 420, tal como con una pipeta o una jeringa. Ejemplos de materiales reactivos adecuados incluyen sustancias para facilitar el procesamiento adicional de la muestra de célula lisada, tales como enzimas y otros materiales para amplificar ADN en el mismo mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). El material reactivo se mueve corriente abajo dentro del canal de fuente de reactivo 428 hasta que una parte corriente abajo del material reactivo entra en contacto con un elemento de posicionamiento 426. Cualquier material reactivo adicional que continua recibiendo dentro del módulo de fuente de reactivo entra preferentemente en el canal de desbordamiento 424. Cuando se finaliza la introducción del reactivo, la válvula 422 se cierra para evitar que el reactivo salga del canal de fuente de reactivo a través del puerto de fuente de reactivo 420.

b. Módulo de mezcla

La zona de mezcla 958 del módulo de mezcla incluye adjunto primer y segundo canales 410, 412. Materiales que se mueven corriente abajo hacia la zona de mezcla 958 entran en contacto entre sí y preferentemente se mezclan en la misma. Debido a las dimensiones a micro escala de la zona de mezcla 958, la muestra y los materiales reactivos se mezclan preferentemente mediante difusión incluso en ausencia de otras fuentes de transporte en masa, tal como agitación mecánica. Sin embargo, se debe entender que, las fuerzas de agitación, tales como ondas acústicas pueden aplicarse para mejorar la mezcla dentro de la zona de mezcla 958.

c. Funcionamiento de módulo de mezcla y módulo de entrada de reactivo

El módulo de fuente de reactivo 152 y el módulo de mezcla 166 funciona preferentemente del siguiente modo. Cuando una muestra lisada de la zona de lisis 950 está lista para mezclarse con un material reactivo, se acciona el accionador 172 para preparar una microgota de reactivo. La microgota de reactivo se prepara a partir de la parte de material reactivo corriente abajo de una abertura 430 del accionador 172 y corriente arriba del elemento de posicionamiento 427. De este modo, asumiendo que las dimensiones del canal de fuente de reactivo 428 son constantes, el volumen de la microgota de reactivo se determina por la distancia entre el elemento de posicionamiento 426 y la abertura del accionador 430.

La microgota de reactivo se mueve corriente abajo hacia el canal 412 de la zona de mezcla de reactivo. Mientras tanto, una muestra de material lisado, tal como una microgota lisada, se mueve corriente abajo desde la zona de lisis 950 hacia el canal 410 de la zona de mezcla 958. El accionador 170 puede proporcionar la fuerza motriz para mover la microgota lisada corriente abajo. Como alternativa, como se trató con anterioridad, puede disponerse otro

accionador corriente arriba de la zona de lisis 950 pero corriente abajo del accionador 170 para proporcionar la fuerza motriz necesaria.

5 La muestra y material reactivo entran en un canal corriente abajo 438 de la zona de mezcla 958, cuando los materiales entran en contacto y se mezclan. Puesto que tanto la muestra lisada como el material reactivo se mezclan en forma de microgotas, la zona de mezcla 958 prepara una cantidad de material mezclado que tiene una relación predeterminada de muestra con respecto a reactivo. Los volúmenes de microgotas preparadas dentro del dispositivo microfluídico 110 son preferentemente independientes de las propiedades físicas, tales como la viscosidad, la conductividad eléctrica y fuerza osmótica, de las microgotas. De este modo, la zona de mezcla 958 prepara una
10 cantidad de material mezclado que tiene una muestra con respecto a material reactivo que también es independiente de las propiedades físicas y químicas de los materiales mezclados. Una salida de ventilación 440, que se encuentra corriente abajo de las diversas zonas del dispositivo microfluídico 110 asegura que la acumulación de presión corriente abajo no inhibe el movimiento corriente abajo de muestra dentro del dispositivo microfluídico 110.

15 **5. Módulo de manipulación de ADN**

La muestra de célula lisada mezclada y reactivo se reciben dentro de una zona de manipulación de ADN 971 del módulo de manipulación de ADN 162. El módulo 162 puede realizar, por ejemplo, la restricción, digestión, ligación, hibridación y amplificación de material de ADN. En una forma de realización, la zona de manipulación de ADN 971
20 está configurada para realizar la amplificación de PCR de ácidos nucleicos presentes dentro de la muestra de célula lisada. La salida de ventilación 440 evita que aumente la presión dentro de la zona 971 según la muestra de célula lisada y el reactivo están siendo introducidos a la misma. Las válvulas 972 y 973 del módulo de manipulación de ADN 162 pueden cerrarse para evitar que los sustratos dentro de la zona salgan, tal como mediante evaporación, durante la amplificación de PCR. La zona de manipulación de ADN está configurada con fuentes de calor bajo el control de ordenador 127 para permitir el ciclo térmico de la zona de manipulación de ADN durante la amplificación,
25 tal como entiende un experto en la técnica.

El sistema 901 también incluye un detector 981 para detectar la presencia de polinucleótidos amplificados producidos mediante PCR. El detector 981 es preferentemente un detector óptico en comunicación óptica, tal como
30 por una fibra óptica 981, con la zona 971. Una fuente de luz, tal como un diodo láser, introduce luz a la zona de manipulación de ADN 971 para generar fluorescencia indicadora de la cantidad de polinucleótidos amplificados presentes en la misma. La fluorescencia aparece a partir de etiquetas fluorescentes, incluidas en el reactivo y asociadas con los polinucleótidos cuando se amplifican.

35 **D. Elementos de posicionamiento preferentes**

A continuación se comentan elementos de posicionamiento preferentes.

40 **1. Elementos de posicionamiento no humectantes**

Puede formarse un elemento de posicionamiento 979 mediante un material no humectante dispuesto para entrar en contacto con una muestra microfluídica. Las propiedades físico-químicas del material no humectante se escogen en consideración del tipo de líquido que forma la muestra microfluídica. Por ejemplo, cuando la muestra es una muestra microfluídica en una muestra acuosa, el elemento de posicionamiento comprende preferentemente un material hidrófobo. Un material hidrófobo ejemplar incluye un compuesto orgánico no polar, tal como un silano alifático, que
45 puede formarse modificando una superficie interna del dispositivo microfluídico 901. Para muestra microfluídicas formadas de disolventes orgánicos, el material no humectante puede comprender un material hidrófilo.

Cuando una muestra microfluídica 808 se encuentra con el elemento de posicionamiento 979, el líquido de muestra microfluídica experimenta una tensión de superficie aumentada en la interfaz corriente abajo 810, cuya tensión de superficie aumentada inhibe el movimiento corriente abajo continuado de la muestra microfluídica 808. Aumentar la diferencia de presión de gas entre las partes corriente arriba y corriente abajo de la muestra microfluídica supera la resistencia y mueve la muestra microfluídica corriente abajo.
50

55 **2. Elementos de posicionamiento capilares asistidos**

Haciendo referencia a las Fig. 10a-10c, otro tipo de elemento de posicionamiento puede formarse modificando las dimensiones del canal microfluídico para formar un elemento de posicionamiento capilar asistido (EPCA) 700. Un EPCA comprende una zona alimentada corriente arriba 702, una zona de carga 704 y una zona de detención 704.
60 Una muestra microfluídica 720 que se encuentra el EPCA se mueve corriente abajo hasta que una interfaz corriente abajo 710 de la muestra microfluídica entre en contacto con superficies corriente arriba 714 de la zona de carga 706. En este punto, la acción capilar causa que la muestra microfluídica se mueva corriente abajo hasta que la interfaz de muestra corriente abajo 710 se encuentra con la abertura 712 entre la zona de carga 704 y la zona de detención 706. La tensión de superficie resiste que la tendencia de la muestra microfluídica continúe corriente abajo pasada la abertura 714. De este modo, la muestra microfluídica 720 se posiciona en un emplazamiento predeterminado a lo largo del eje del canal con respecto al elemento de posicionamiento 700.
65

El volumen de la muestra microfluídica que se encuentra con el EPCA tiene preferentemente un volumen más grande que el volumen de la zona de carga 704 para asegurar que la muestra microfluídica avanzará completamente hasta la abertura. Para fluidos que tienen tensiones de superficie similares y propiedades de interfaz como el agua, la profundidad d_1 de la zona de carga 704 es preferentemente de aproximadamente el 50 % o menos de las profundidades respectivas d_2 , d_3 de las zonas de detención y alimentación.

La tendencia de una muestra microfluídica en moverse en una dirección dada se rige por la relación entre el radio de curvatura medio (RCM) de la parte frontal de la muestra microfluídica y el RCM de la parte trasera de la muestra microfluídica. Las curvaturas dependen del ángulo de contacto del fluido de la muestra y las dimensiones de la zona en la que la microgota se está moviendo. Un RCM r_1 de una interfaz de microgota en la zona de carga es preferentemente inferior al RCM r_2 de una interfaz de microgota dentro de la zona de alimentación o un RCM r_3 de una interfaz de gota dentro de la zona de detención. El RCM r_2 es preferentemente más grande que el RCM r_3 . De este modo, El radio de curvatura de la interfaz de microgota corriente abajo aumenta cuando se encuentra con la zona de detención inhibiendo, de este modo, el movimiento corriente abajo adicional. Preferentemente, el ángulo de contacto del fluido con la pared está sustancialmente constante por toda la zona de carga capilar asistida.

3. D. Elementos de posicionamiento ventilados

Haciendo referencia a las Fig. 11a-11c, un elemento de posicionamiento 500 funciona para posicionar una muestra microfluídica 502 reduciendo la presión de gas que actúan con una parte corriente arriba 504 de la muestra microfluídica en relación con la presión de gas que actúa con una parte corriente abajo 506 de la muestra microfluídica. El elemento de posicionamiento 500 incluye una salida de ventilación 508 dispuesta en comunicación gaseosa con una zona 510 a lo largo de la cual se mueve muestra microfluídica 502. La salida de ventilación 508 se comunica preferentemente con la zona 510 a través de un pasaje 526. La zona puede ser, por ejemplo, un canal o un conducto. El elemento de posicionamiento 500 puede incluir también un segundo elemento de posicionamiento 516, tal como un material no humectante, para sustancialmente evitar que el fluido de la muestra microfluídica entre en contacto con la salida de ventilación.

Un estado abierto de una salida de ventilación 512 permite el pasaje de gas entre la zona 510 y la salida de ventilación 508. Un estado cerrado de la válvula 512 evita tal pasaje de gas. La válvula 514 está preferentemente accionada térmicamente e incluye una masa 514 de TRS.

Un accionador 518 se dispone corriente arriba del elemento de posicionamiento 500. El accionador 518 es preferentemente un accionador de gas y puede incluir una fuente de calor 520 para calentar gas asociado con un accionador 518. El accionador 518 puede incluir un elemento de posicionamiento 522, tal como un material no humectante, para sustancialmente evitar que el fluido de la muestra microfluídica entre en el mismo.

El elemento de posicionamiento 500 funciona preferentemente del siguiente modo. Haciendo referencia a la Fig. 11a, la muestra microfluídica 502 se mueve corriente abajo en la dirección de la flecha 524. La muestra microfluídica se mueve preferentemente por una presión de gas proporcionada a partir de un accionador corriente arriba, que no se muestra en las Fig. 9a-9c. La presión de gas actúa con la parte corriente arriba 504.

Haciendo referencia a la Fig. 11b, cuando la parte corriente arriba 504 pasa la abertura de la salida de ventilación 508, el gas corriente arriba se disipa a través de la salida de ventilación 508, reduciendo, de este modo, la presión corriente arriba. La reducción de presión, que preferentemente iguala las presiones corriente abajo y corriente arriba, reduce o elimina la fuerza motriz tendiendo a impulsar la muestra microfluídica corriente abajo.

Haciendo referencia a la Fig. 11c, la salida de ventilación 512 está encerrada para evitar el pasaje de gas entre la zona 510 y salida de ventilación 508. Preferentemente, el TRS 514 se mueve en el pasaje 526. Cuando se cierra la válvula 512, el accionamiento del accionador 518 proporciona una fuerza motriz para mover la muestra microfluídica 502 corriente abajo en la dirección de la flecha 528 para procesamiento adicional.

4. Elementos de posicionamiento de fluido activo

Haciendo referencia a las Fig. 15a-15c, un módulo de preparación de microgota 652 tiene una zona de preparación de microgota 650, un elemento de posicionamiento de fluido activo 654, un accionador 656 y una válvula 658. Un segundo accionador 660 está operativamente asociado con el elemento de posicionamiento activo 654 para introducir una muestra microfluídica 666 a la zona de preparación de microgota 650. Un segundo accionador 660 se ubica preferentemente corriente arriba de la válvula 658. Un módulo de preparación de microgota 652 prepara una microgota 668, que tiene un volumen predeterminado a partir de la muestra microfluídica 666 recibida en el mismo.

Durante su funcionamiento, el módulo de preparación microfluídico 652 recibe la muestra microfluídica 666, que se mueve corriente abajo debido a la fuerza motriz proporcionada por el segundo accionador 660. La fuerza motriz es preferentemente una presión de gas corriente arriba, que es más grande que una presión de gas corriente abajo que actúa con la muestra microfluídica 666. La muestra microfluídica se mueve corriente abajo hasta que una parte corriente abajo de la misma 670 se encuentra con el elemento de posicionamiento activo 654, que comprende

preferentemente un sensor 672 que tiene conducciones eléctricas 674. Las conducciones 674 están en comunicación eléctrica con pasadores I/O del dispositivo microfluídico para permitir que las señales del sensor 672 se reciban por un DAQ.

- 5 El elemento sensor 672 es preferentemente un par de contactos eléctricos. Para detectar la presencia del líquido, el DAQ 126 aplica un pequeño voltaje a través de las conducciones 674 y mide la corriente resultante. Según el líquido de la muestra microfluídica entra en contacto con el primer y segundo contactos, la corriente que pasa entre los mismos cambia, indicando, de este modo, al DAQ 126 que el líquido ha llegado al sensor 672.
- 10 Cuando se reconoce que el líquido ha llegado al sensor 672, el DAQ ordena al segundo accionador 660 que disminuya una fuerza motriz corriente abajo que actúa con la muestra microfluídica 666. Por ejemplo, el DAQ puede reducir una corriente que fluye a través de una fuente de calor 676 asociada con un segundo accionador 660 reduciendo, de este modo, una temperatura de un gas en el mismo. La reducción de temperatura reduce la presión de gas que actúa con una parte corriente arriba 678 de muestra microfluídica inhibiendo, de este modo, el movimiento corriente abajo de la muestra microfluídica 666. La muestra microfluídica se posiciona de modo que la primera parte 680 se ubica corriente abajo del accionador 656 y una segunda parte 682 se ubica corriente arriba del accionador 656.
- 20 Para preparar la microgota 668, el DAQ 126 acciona el accionador para proporcionar una fuerza motriz que prepara la microgota 668 a partir de la primera parte 680 de la muestra microfluídica 666. La microgota 668 se mueve corriente abajo mientras que la segunda parte 682 de la muestra microfluídica 666 se mueve corriente arriba del accionador 656. Durante la preparación de microgota, la válvula 658 puede estar cerrada para aislar sustancialmente el accionador 656 del segundo accionador 660 y otras partes corriente arriba del dispositivo microfluídico.
- 25 El elemento de posicionamiento activo funciona preferentemente como un bucle cerrado que proporciona retroalimentación del sensor 672 al DAQ. La retroalimentación se indica cuando una muestra microfluídica ha alcanzado una posición predeterminada dentro del dispositivo microfluídico. Cuando se recibe la retroalimentación, el DAQ cambia el estado del accionador que proporciona la fuerza motriz para mover la microgota.
- 30 Mientras que la anterior invención se ha descrito con referencia a determinadas realizaciones preferentes, debe tenerse en cuenta que el alcance de la presente invención no queda limitado a estas. De este modo, un experto en la técnica puede encontrar variaciones de estas realizaciones preferentes que, sin embargo, que se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluídico (110) para procesar una muestra microfluídica que contiene células, que comprende:

5 un módulo de lisis (300) configurado para recibir una muestra microfluídica que contiene células, en el que el módulo de lisis comprende una zona de lisis (302), en el que la muestra microfluídica es un líquido;
 un elemento de posicionamiento (312) configurado para inhibir el movimiento corriente abajo de la muestra microfluídica para posicionar la muestra microfluídica en una posición de lisis;
 un mecanismo de lisis (308) dentro de la zona de lisis (302), para liberar contenido intracelular a partir de células
 10 dentro de la zona de lisis; y
 un accionador de gas (314) dispuesto corriente arriba del elemento de posicionamiento (312) y la zona de lisis (302) de modo que una prima parte de la muestra microfluídica se dispone corriente arriba del accionador de gas (314) y una segunda parte de la muestra microfluídica se dispone corriente abajo del accionador de gas (314) y corriente arriba del elemento de posicionamiento (312), configurado el accionador de gas (314) para proporcionar una presión de gas suficiente para preparar una microgota (304) que tenga un volumen predeterminado que comprenda contenido intracelular liberado a partir de células de la muestra microfluídica que contiene células dentro de la zona de lisis (302) mediante la separación de la segunda parte de la muestra microfluídica de la primera parte de la muestra microfluídica y moviendo la segunda parte de la muestra microfluídica a un emplazamiento corriente abajo del mecanismo de lisis (308) y el elemento de posicionamiento (312).

2. El dispositivo microfluídico (110) según la reivindicación 1, en el que el dispositivo comprende un sustrato (130, 132) y en el que el mecanismo de lisis (308) y el accionador de gas (314) son integrales con el sustrato.

3. El dispositivo microfluídico (110) según la reivindicación 1 o 2, en el accionador de gas (314) comprende una fuente de calor para calentar una cantidad de gas aumentando, de este modo, una presión de gas.

4. El dispositivo microfluídico (110) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el elemento de posicionamiento (312) comprende una salida de ventilación para igualar sustancialmente una presión de gas corriente arriba de la muestra microfluídica que contiene células con una presión de gas corriente abajo de la muestra microfluídica que contiene células cuando la muestra microfluídica que contiene células se encuentra en la posición de lisis para inhibir, de este modo, el movimiento corriente abajo de la muestra microfluídica de que contiene células corriente abajo desde la posición de lisis.

5. Un método microfluídico para procesar una muestra microfluídica que contiene células, que comprende:

35 el posicionamiento, usando un elemento de posicionamiento (312), de la muestra microfluídica que contiene células en una posición de lisis con respecto a un mecanismo de lisis (308) de una zona de lisis (302) de un módulo de lisis (300) de un dispositivo microfluídico (110), la muestra microfluídica que contiene células que comprende un líquido que contiene células;
 40 el accionamiento del mecanismo de lisis (308) para liberar material intracelular de células de la muestra microfluídica que contiene células;
 el accionamiento de un accionador de gas (314) dispuesto corriente arriba del elemento de posicionamiento (312) y la zona de lisis (302) para proporcionar una presión de gas suficiente para separar una parte de la muestra microfluídica que contiene células que se encuentra corriente abajo del accionador de gas (314) y corriente arriba del elemento de posicionamiento (312) desde una parte de la muestra microfluídica que contiene células que se encuentra corriente arriba del accionador de gas (314) y mover la parte corriente abajo de la muestra microfluídica que contiene células a un emplazamiento corriente abajo del mecanismo de lisis (308) y el elemento de posicionamiento (312), siendo la parte corriente abajo de la muestra microfluídica una microgota (304) que comprende material intracelular liberado a partir de células de la muestra microfluídica que contiene células y que tiene un volumen predeterminado.

6. El método microfluídico según la reivindicación 5, en el que la etapa de posicionamiento comprende poner en contacto la superficie corriente abajo de la muestra microfluídica con un material hidrófobo.

7. El método microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la etapa de posicionamiento comprende aumentar un radio de curvatura de la muestra microfluídica.

8. El método microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la etapa de posicionamiento comprende igualar sustancialmente una presión de gas corriente arriba de la muestra microfluídica con una presión de gas corriente abajo de la muestra microfluídica.

9. El método microfluídico según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la segunda parte de la muestra microfluídica comprende menos de aproximadamente el 90 por ciento de la muestra microfluídica que contiene células.

65

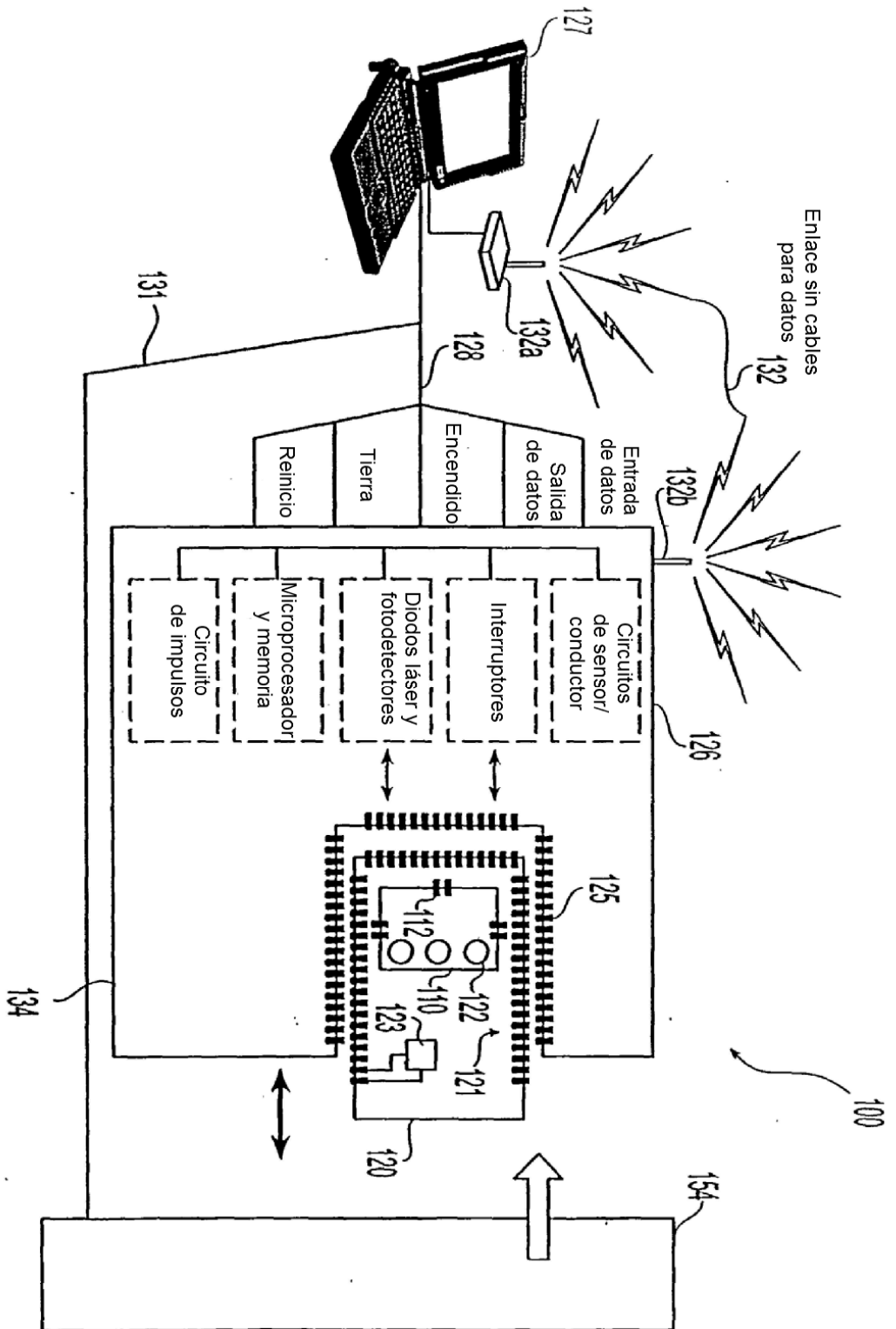
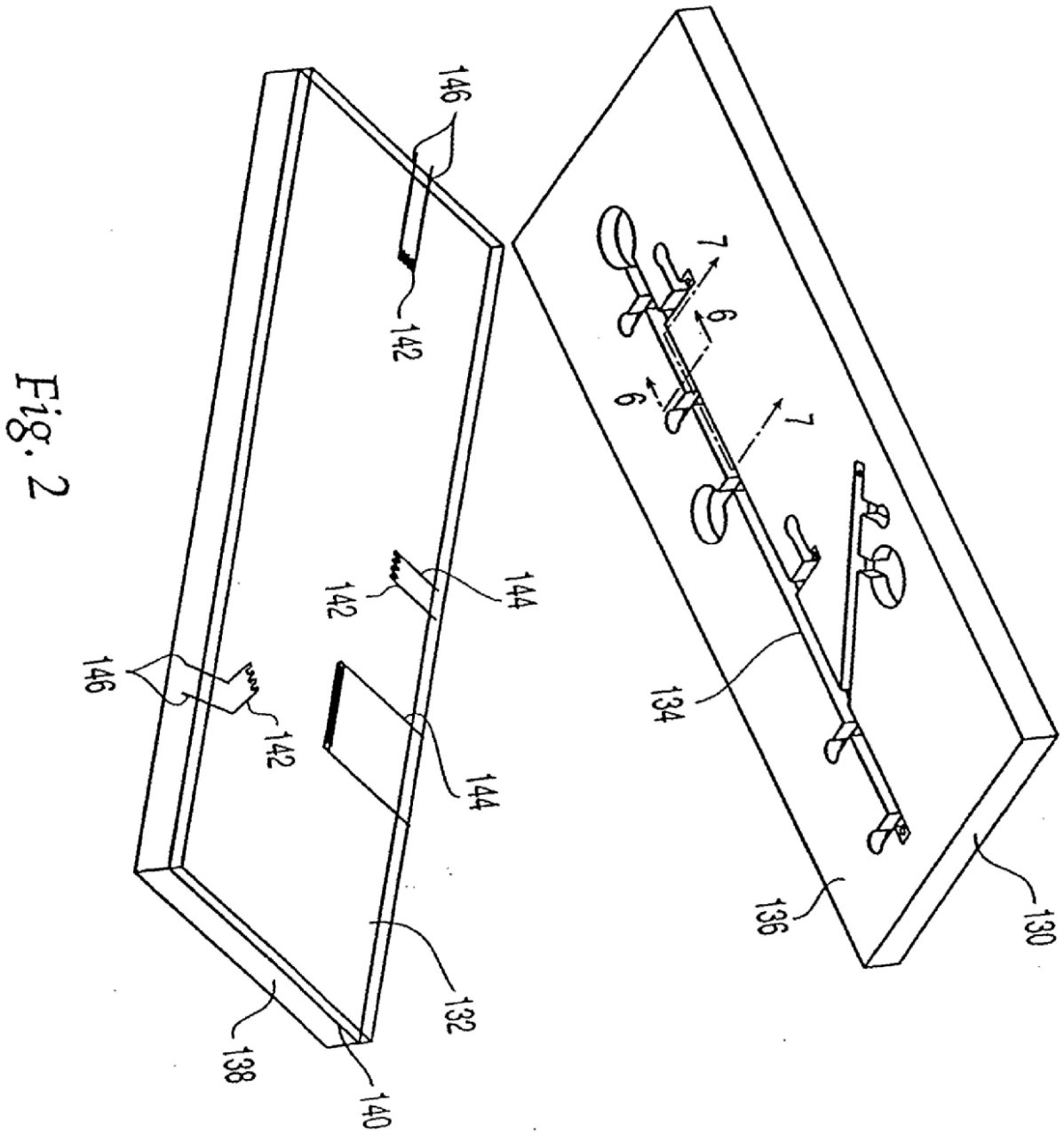


Fig. 1



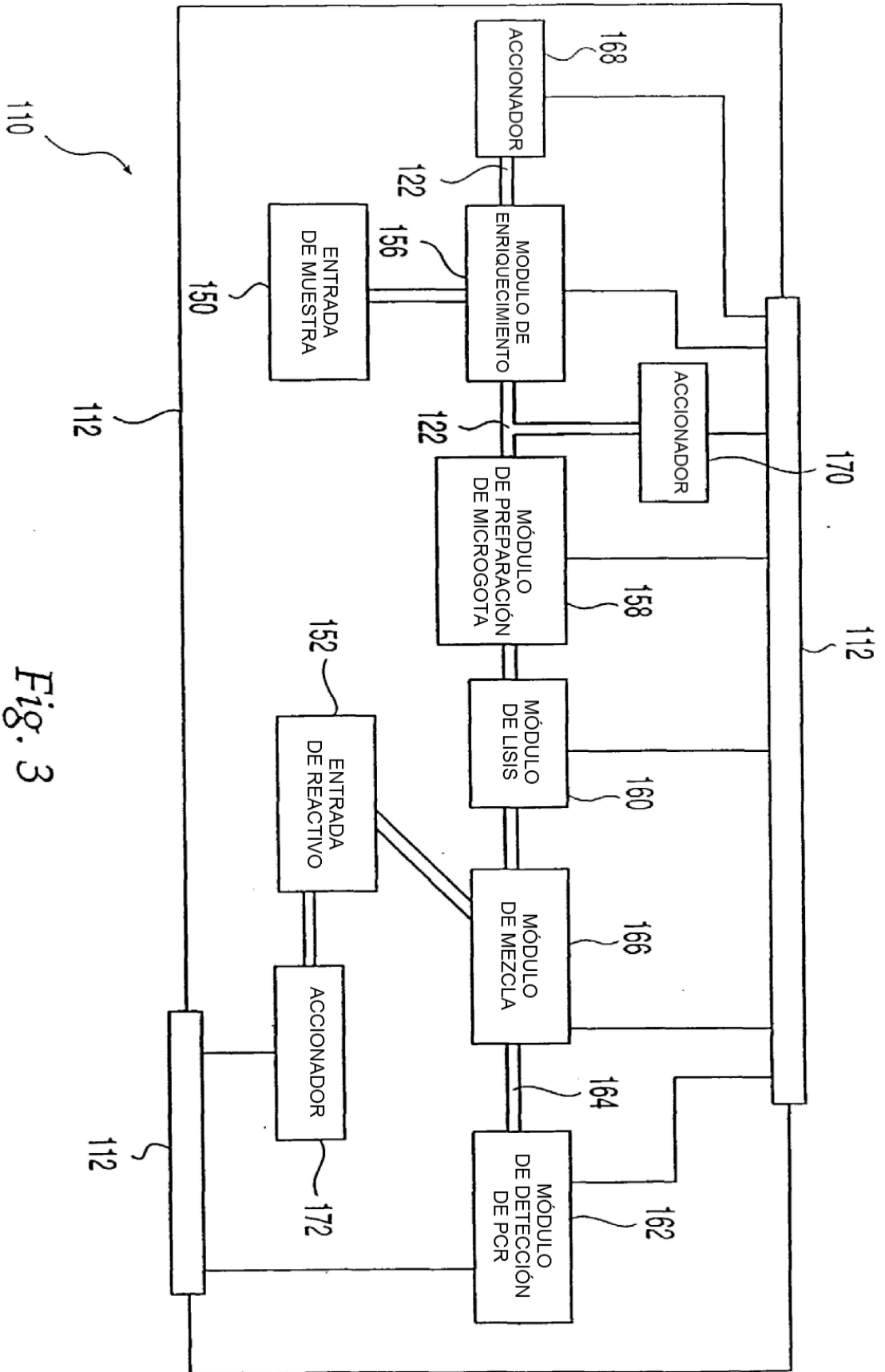


Fig. 3

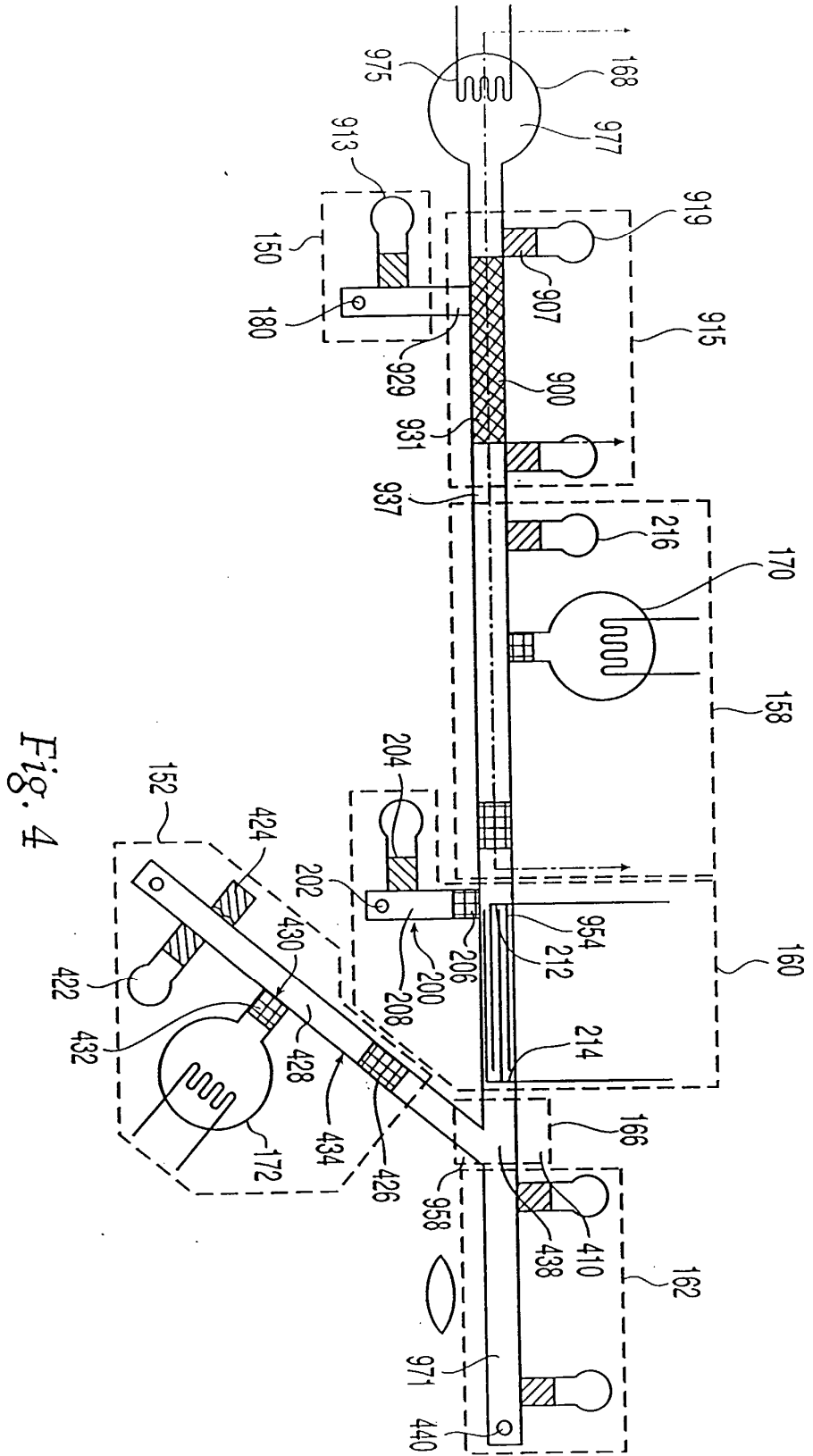


Fig. 4

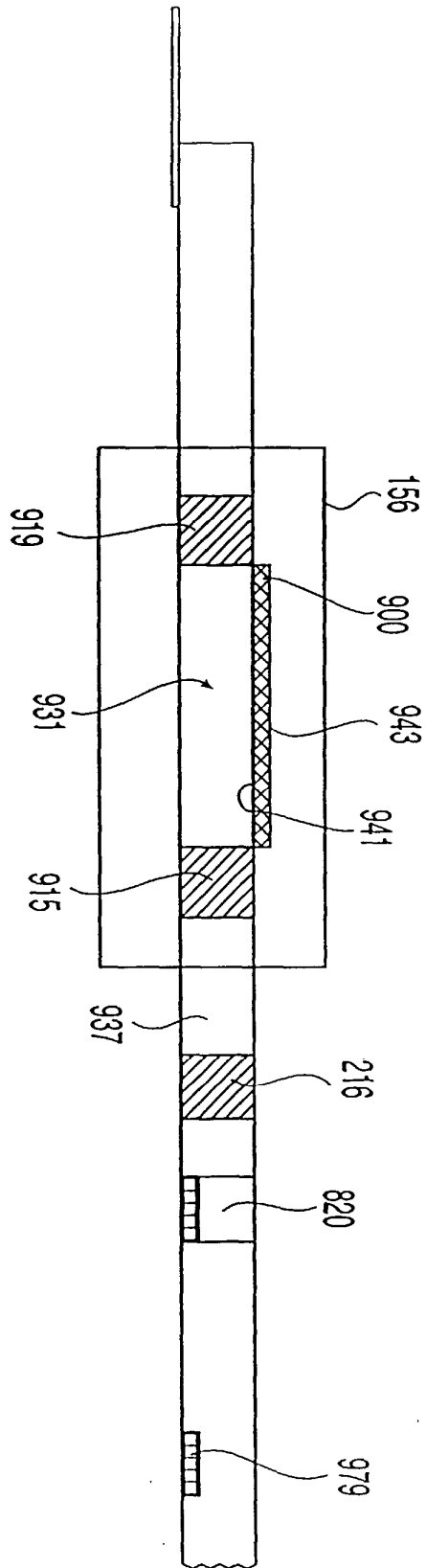


Fig. 5

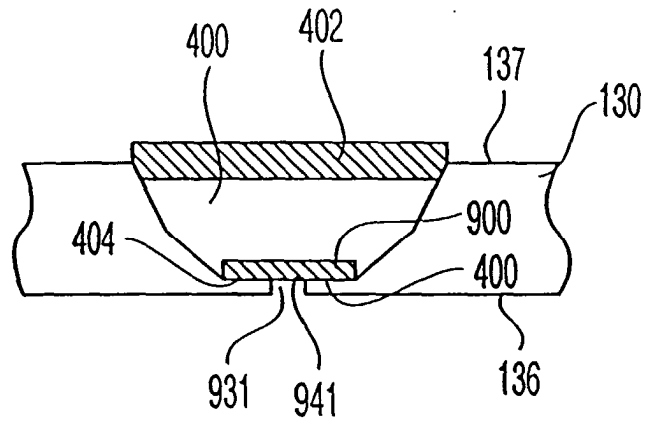


Fig. 6

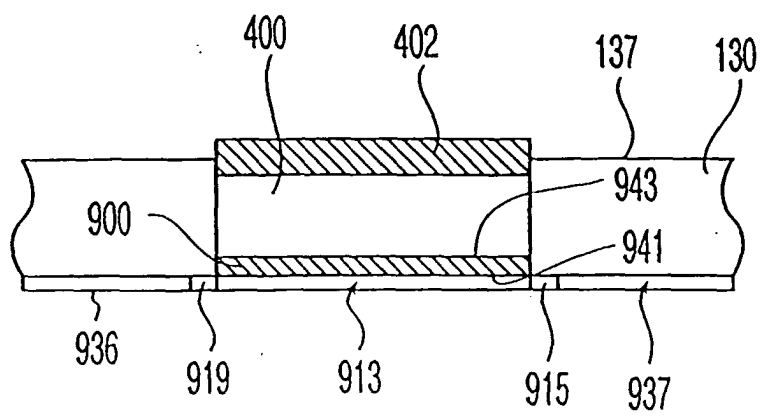


Fig. 7

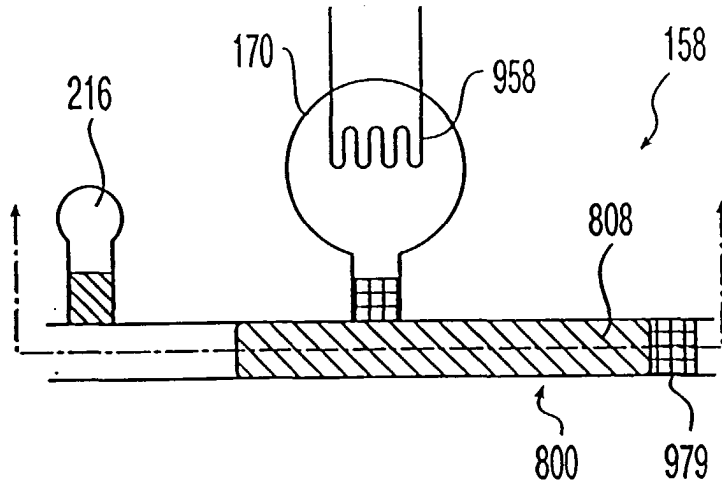


Fig. 8a

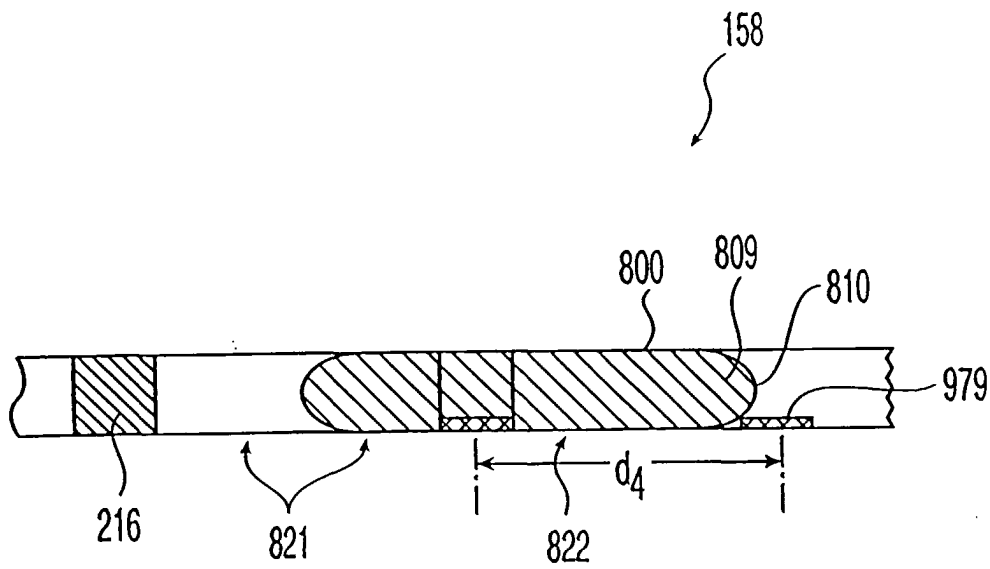


Fig. 8b

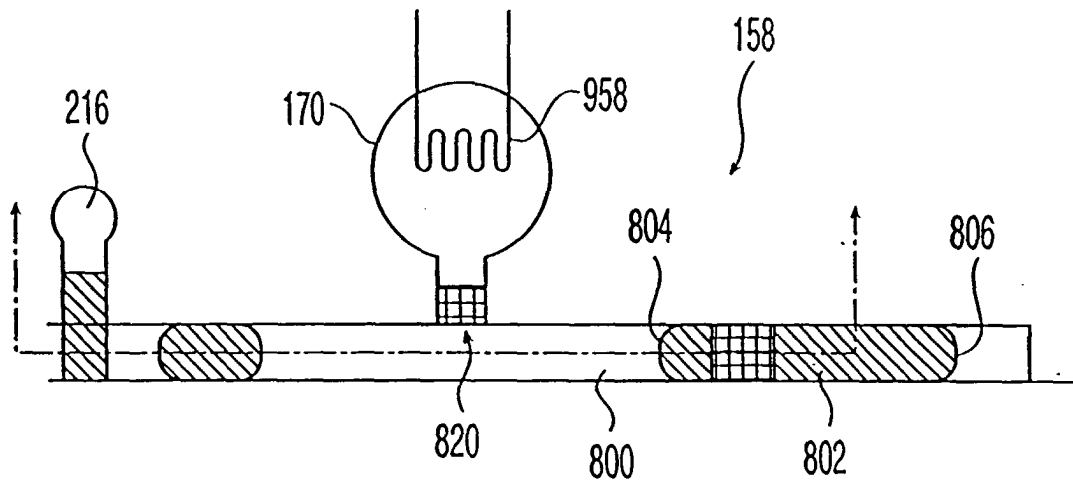


Fig. 9a

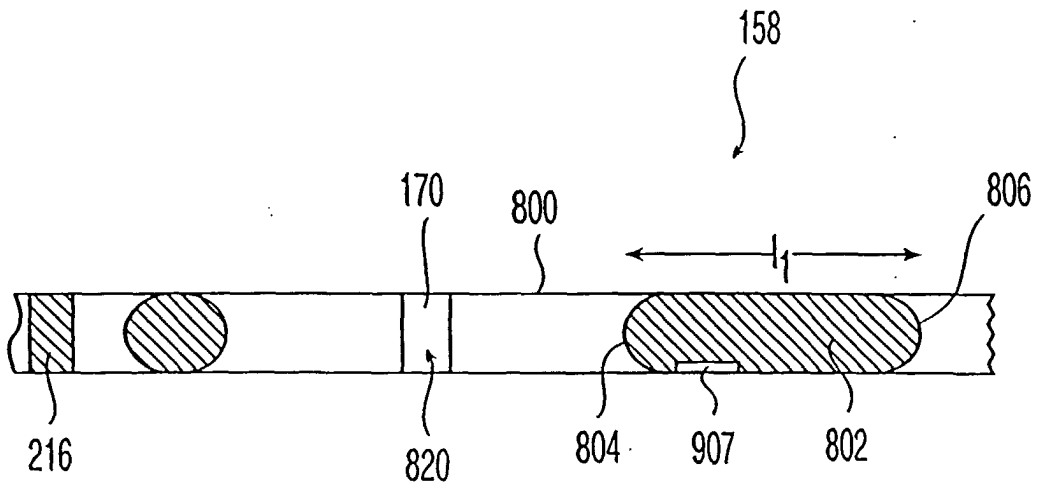


Fig. 9b

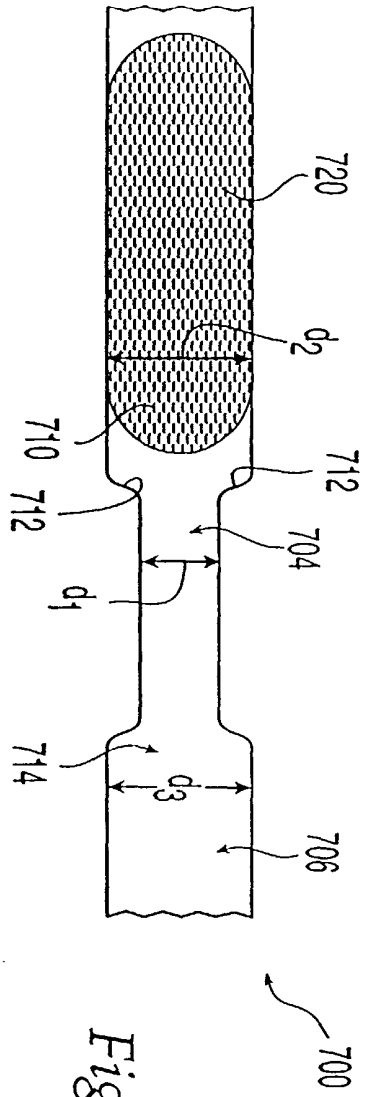


Fig. 10a

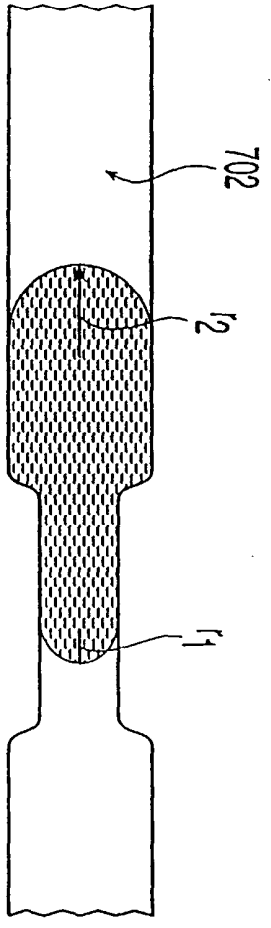


Fig. 10b

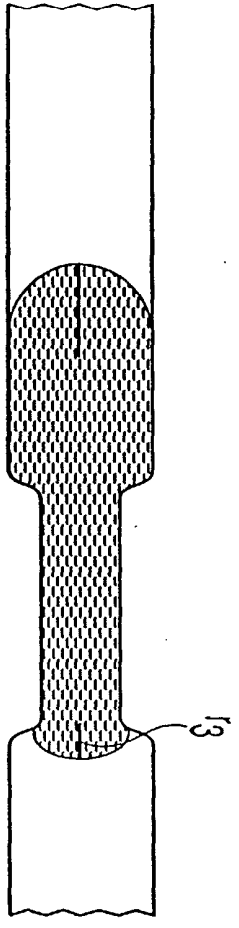


Fig. 10c

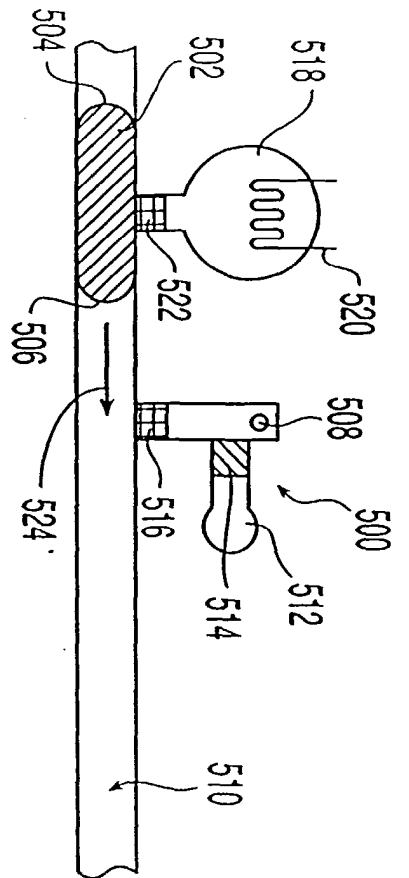


Fig. 11a

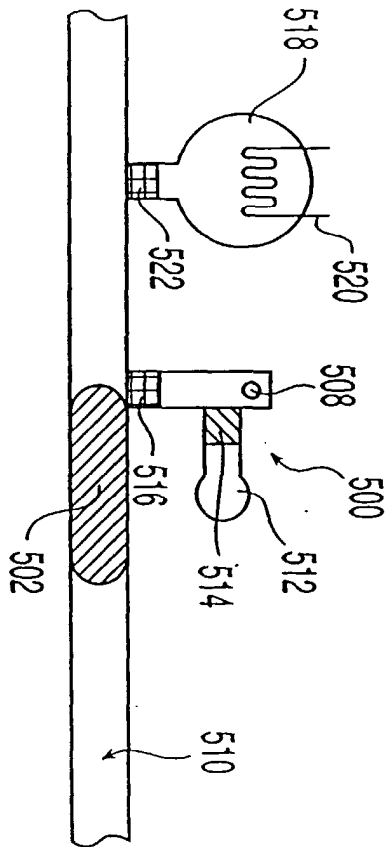


Fig. 11b

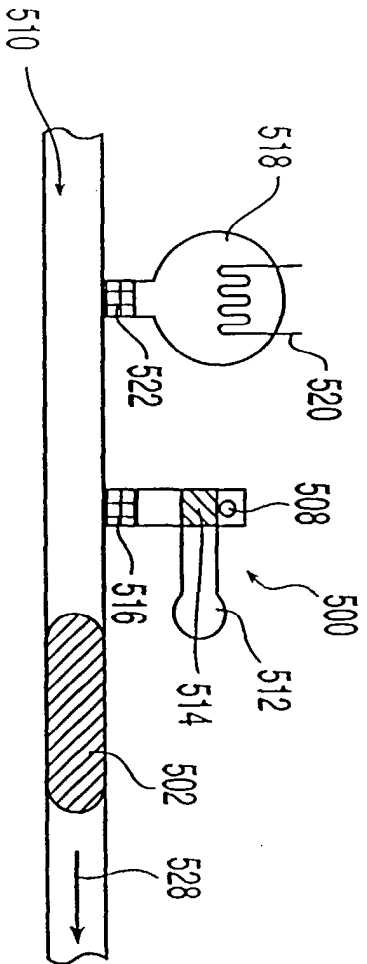


Fig. 11c

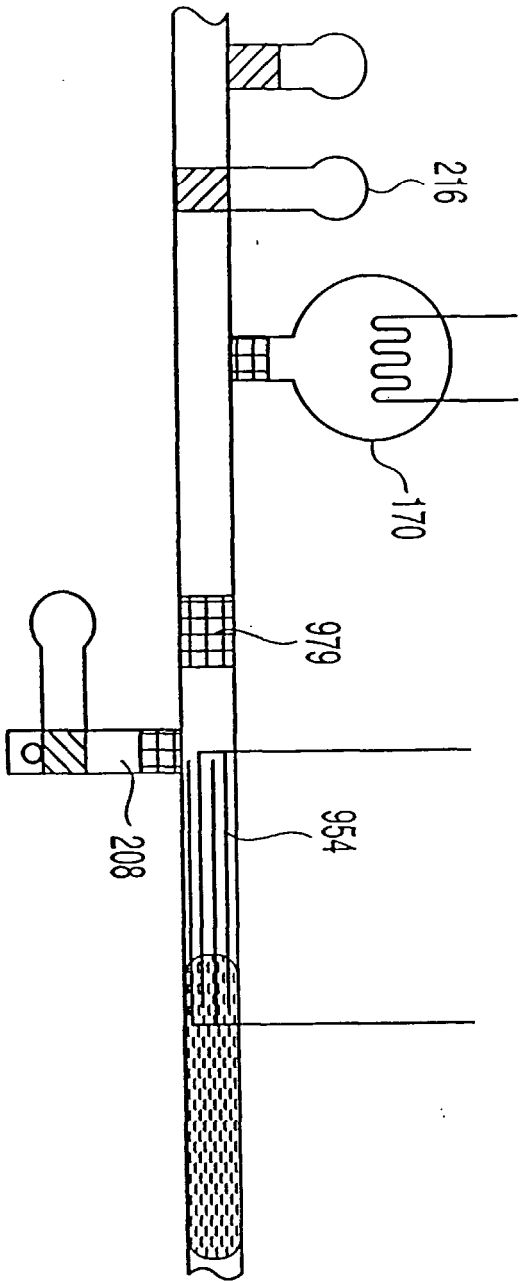


Fig. 12b

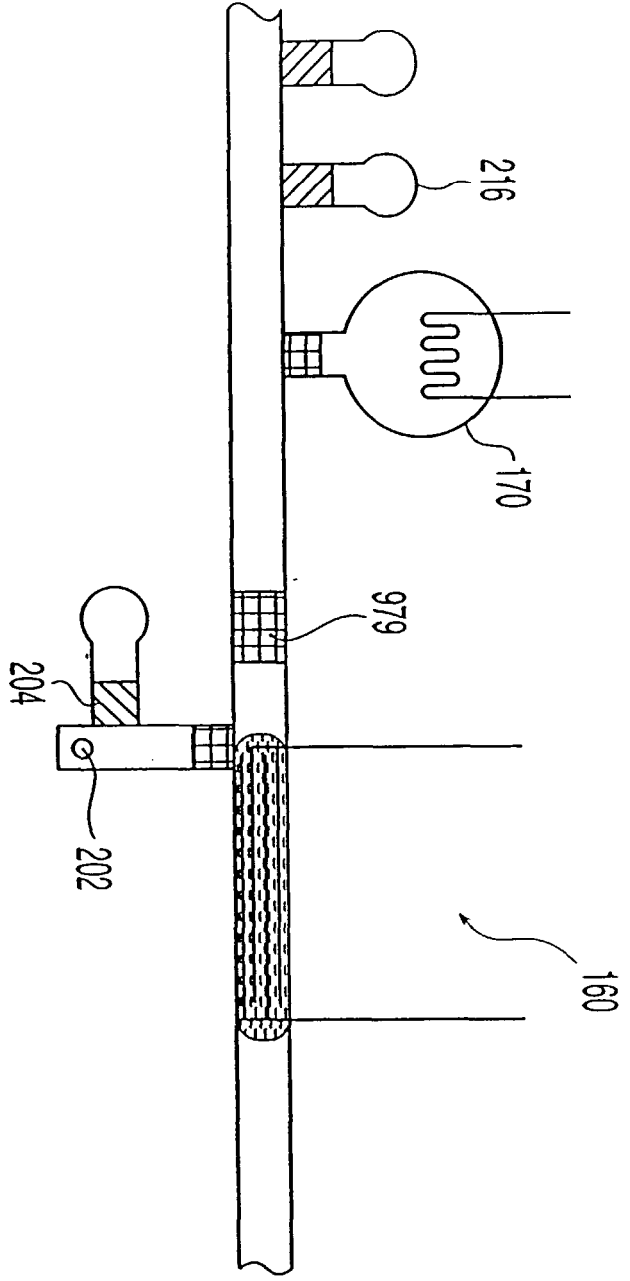


Fig. 12a

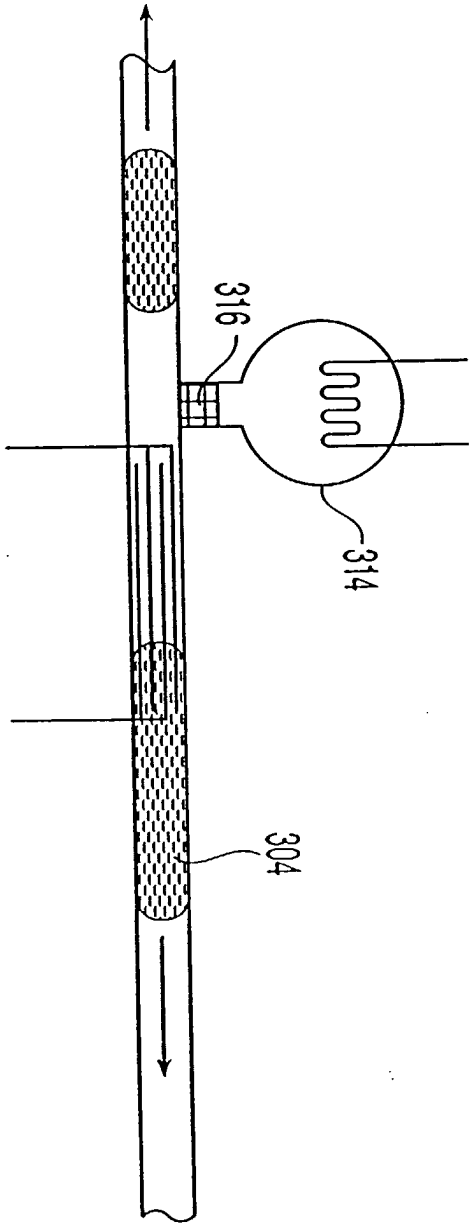


Fig. 13b

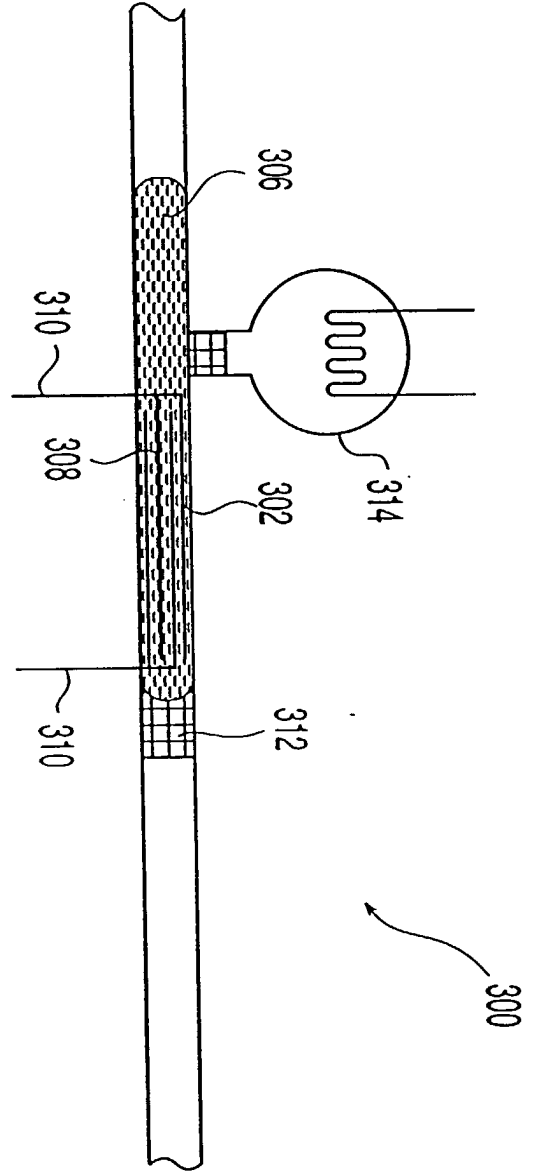


Fig. 13a

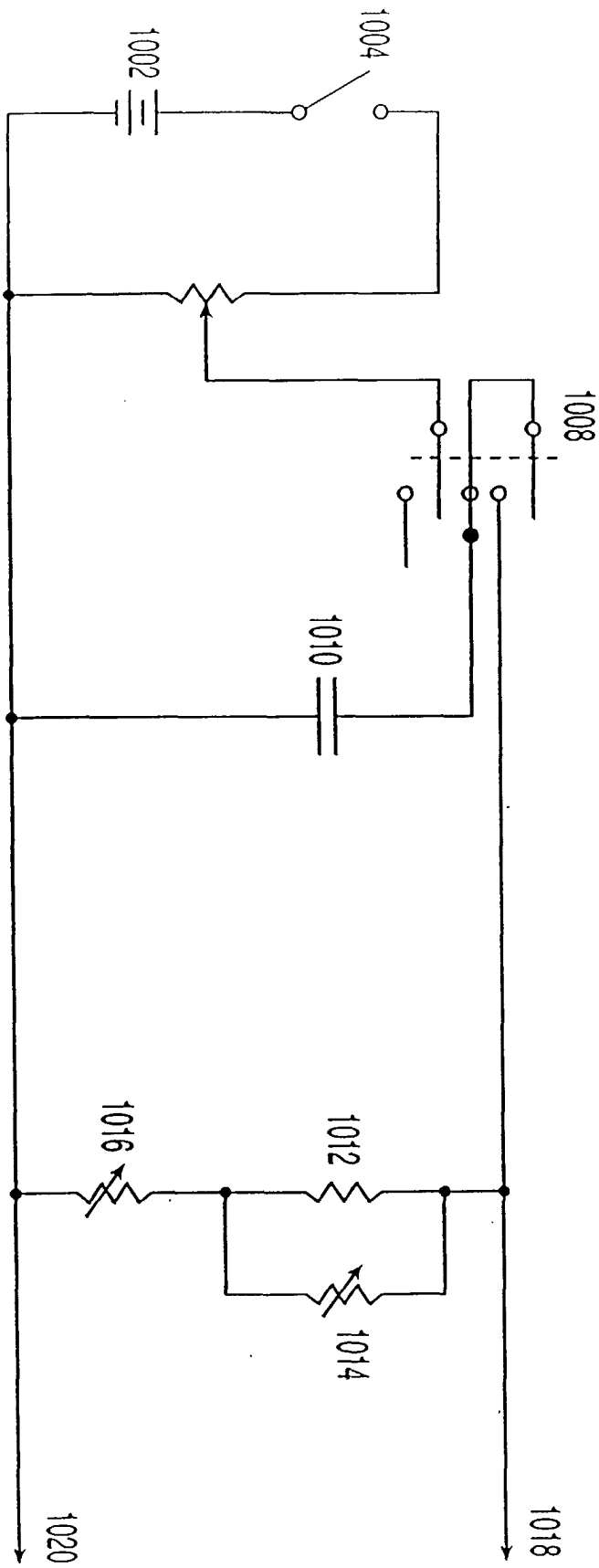


Fig. 14

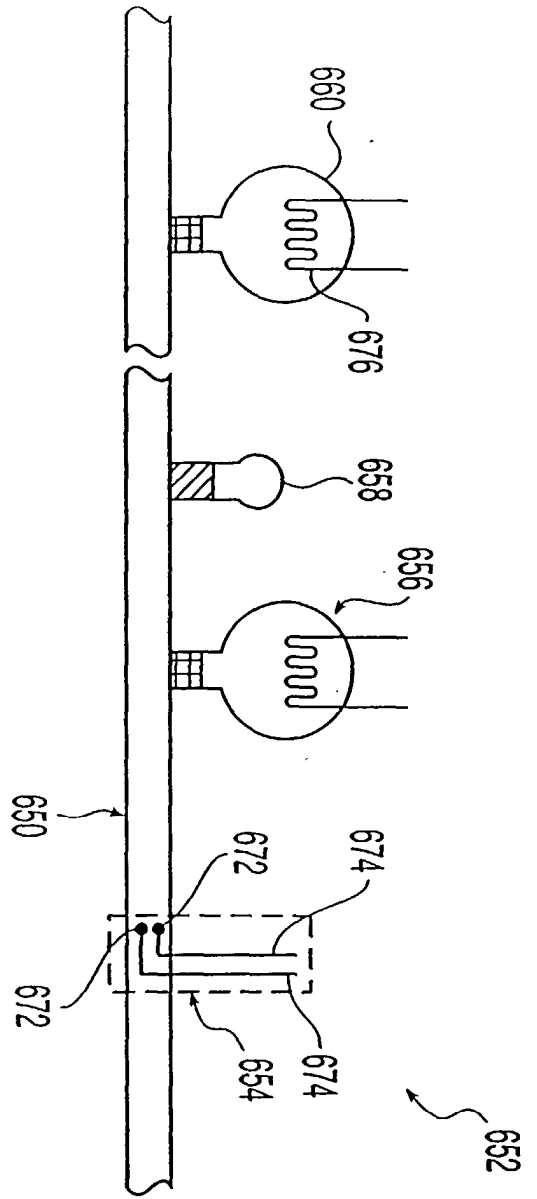


Fig. 15a

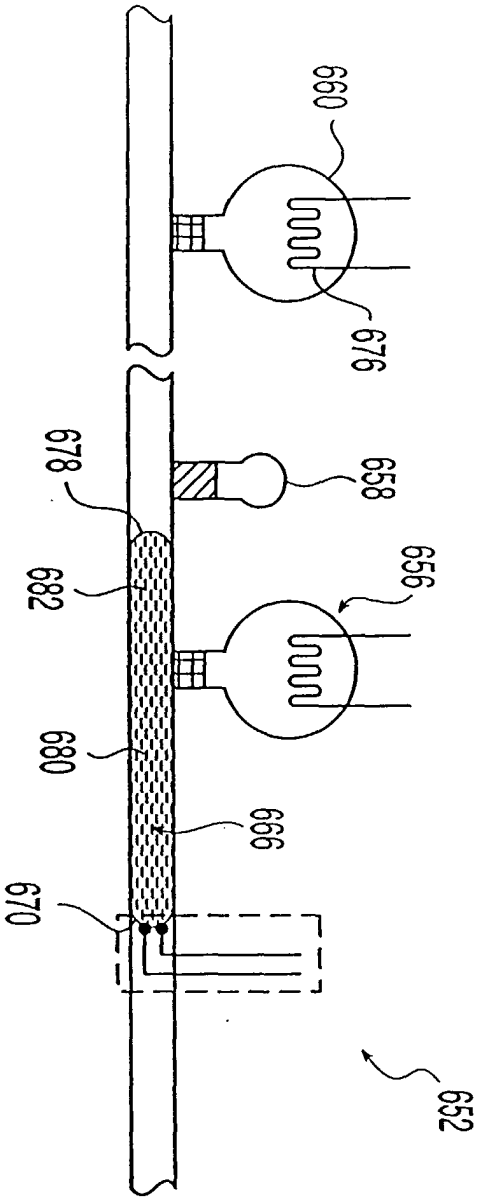


Fig. 15b

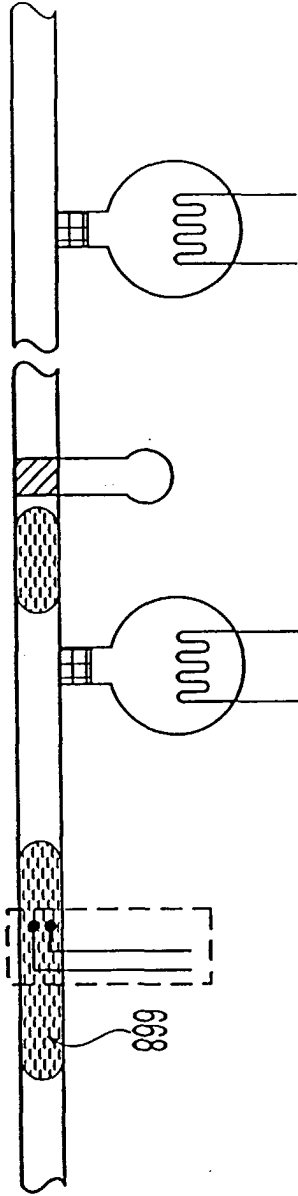


Fig. 15c