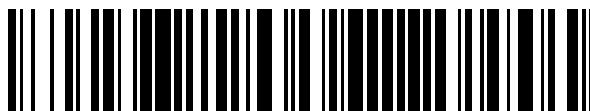


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 567**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01L 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2014 PCT/US2014/021832**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14159070**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2014 E 14714061 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2969215**

54 Título: **Dispositivo microfluídico**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201313803208**

**14.03.2013 US 201313803303**

**18.10.2013 US 201361892746 P**

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

**25.05.2020**

73 Titular/es:

**QIAGEN SCIENCES, LLC (100.0%)**

**19300 Germantown Rd**

**Germantown, MD 20874, US**

72 Inventor/es:

**YAMANA, KABIR JAMES;**

**YAMANA-HAYES, SEAN;**

**STEVENSON, JEREMY y**

**YOUNG, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 762 567 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**

Dispositivo microfluídico

**Campo**

5 Los aspectos de la presente descripción se refieren generalmente a métodos y aparatos para manipulación microfluídica.

**Exposición de la técnica relacionada**

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta versátil para aplicaciones en biología molecular. La PCR puede utilizarse para amplificar la cantidad de un gen específico presente en una muestra de ADN que por lo demás puede contener numerosos genes diferentes. Como tal, la PCR puede utilizarse para un gran número de experimentos, incluidos los ensayos genéticos, análisis forense, etc. Pueden utilizarse variantes de PCR para determinar cuantitativamente qué cantidad de un determinado gen de interés está presente en una muestra de ADN extraído. Esto puede servir, por ejemplo, para determinar si la muestra es homocigótica o heterocigótica para un gen específico de interés.

15 Los experimentos modernos de laboratorio a menudo requieren varias series de reactivos para combinarse según cada permutación posible. Un ejemplo de dicho experimento es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR utiliza generalmente una muestra de ADN, la PCR generalmente conlleva la utilización de un cebador de ADN que es complementario a una muestra de ADN en posiciones génicas específicas, y una solución de "mezcla patrón" que contiene ADN polimerasa y varios reactivos (por ejemplo, nucleótidos) que facilitan la PCR.

20 Cuando se exponen a una temperatura relativamente alta (por ejemplo, mayor de 90°C), las moléculas de doble hélice de una muestra de ADN se separan en cadenas individuales. A una temperatura relativamente inferior (por ejemplo, 50-70°C), los cebadores de ADN unidos a cada una de las cadenas de la muestra de ADN. En un intervalo intermedio de temperatura (por ejemplo, 70-80°C), la polimerasa facilita el alargamiento de los fragmentos de ADN formados a partir de la unión inicial de los cebadores a las moléculas de ADN monocatenario. Los productos de ADN bicatenarios de un ciclo de PCR pueden dividirse entonces en un intervalo de temperatura relativamente alto y unirse posteriormente a las nuevas cadenas de cebador, duplicando la cantidad de ADN de cada ciclo, hasta que los reactivos se agoten. Por lo tanto, la concentración de una muestra de ADN que contiene una secuencia diana de ADN, cuando se somete a PCR, puede aumentar exponencialmente.

25 La PCR se utiliza con frecuencia para análisis combinatorio de soluciones de muestras de ADN múltiples y cebadores múltiples. Por ejemplo, diez muestras diferentes en las que se está probando la presencia de cinco genes diferentes requerirán cincuenta reacciones diferentes. Debido a que los cebadores se fabrican con frecuencia especialmente para cada gen diana, la utilización de dichos cebadores puede ser costosa. Además, los sistemas microfluídicos existentes que combinan grupos múltiples de reactivos juntos son generalmente de diseño y fabricación complicados. Como resultado, la combinación de dichos reactivos para probar cada permutación se hace convencionalmente mediante pipeteado manual o con un sistema robótico y puede ser tanto costosa como llevar mucho tiempo.

30 La PCR digital puede servir para determinar la concentración de un gen determinado de interés dentro de una muestra de ADN. La PCR digital conlleva dividir una muestra de ADN en un gran número de alícuotas independientes. Como resultado, alguna fracción de las alícuotas contendrá una secuencia de ADN correspondiente al gen de interés, y alguna fracción de las alícuotas no contendrá la secuencia de ADN de interés. Las alícuotas se amplifican a continuación para determinar si la molécula de ADN que contiene el gen de interés estaba presente dentro de cada alícuota. En base al número de alícuotas que han experimentado crecimiento exponencial, puede determinarse la concentración original de ADN antes de la dilución. Los sistemas convencionales que emplean PCR digital son generalmente costosos y complejos.

35 Existe necesidad de sistemas microfluídicos más sencillos, menos costosos que conservan la solidez de sistemas más costosos a la vez que minimizan el coste por reacción.

40 El documento US 2004/0171170 A1 describe un sustrato de muestra con una cámara de muestra dividida y un método de carga del mismo. Sin embargo, el documento US 2004/0171170 A1 no describe que una compresión de una primera capa y una segunda capa relativas a otra produce relleno sustancial del primer y segundo canales con un material sellador, donde al menos un material de separación comprende un material sellador.

**50 Compendio de la invención**

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo microfluídico según la reivindicación 1.

Las ventajas, nuevas características y objetivos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención cuando se considera junto con los dibujos adjuntos, que son esquemáticos y que no están dibujados a escala. Por claridad, no está marcado cada componente en cada figura, ni se muestra cada componente

de cada realización de la invención donde no es necesaria la ilustración para permitir comprender la invención a cualquier experto en la técnica.

**Breve descripción de los dibujos**

5 No hay intención de que los dibujos adjuntos estén dibujados a escala. En los dibujos, cada componente idéntico o casi idéntico que se ilustra en varias figuras está representado por un número similar. Se describirán a continuación varias realizaciones, a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos.

La Figura 1 presenta una vista desde arriba de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;

la Figura 2 ilustra una vista en perspectiva despiezada del dispositivo microfluídico de la Figura 1;

las Figuras 3A-3C representa diferentes capas del dispositivo microfluídico de la Figura 1;

10 la Figura 4 presenta una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 1;

la Figura 5 representa una vista desde arriba del dispositivo microfluídico en uso de acuerdo con algunas realizaciones;

la Figura 6 representa una vista desde arriba del dispositivo microfluídico que tiene una capa rellena según algunas realizaciones;

15 la Figura 7A representa una vista desde arriba del dispositivo microfluídico que tiene dos capas rellenas según algunas realizaciones;

la Figura 7B ilustra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 7A;

la Figura 8A representa una vista desde arriba del dispositivo microfluídico con cavidades aisladas según algunas realizaciones;

20 la Figura 8B ilustra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 8A;

la Figura 9A muestra una vista desde arriba que indica una sección transversal de un dispositivo microfluídico;

la Figura 9B ilustra una serie de vistas en sección transversal de un dispositivo microfluídico donde los canales se están sellando según algunas realizaciones;

25 la Figura 9C ilustra una serie de vistas en sección transversal de otro dispositivo microfluídico donde los canales se están sellando según algunas realizaciones;

la Figura 9D representa una serie de vistas en sección transversal de otro dispositivo microfluídico en el que los canales se están sellando según algunas realizaciones;

la Figura 10A muestra una vista desde arriba de un dispositivo microfluídico con cavidades combinadas según algunas realizaciones;

30 la Figura 10B ilustra una vista en sección transversal de un dispositivo microfluídico con un material de separación diluido según algunas realizaciones;

la Figura 10C representa una vista en sección transversal de un dispositivo microfluídico con cavidades correspondientes combinadas según algunas realizaciones;

35 la Figura 10D representa otra vista en sección transversal de un dispositivo microfluídico con cavidades correspondientes combinadas según algunas realizaciones;

la Figura 10E muestra otra vista en sección transversal de un dispositivo microfluídico con cavidades correspondientes combinadas según algunas realizaciones;

la Figura 10F ilustra otra vista en sección transversal de un dispositivo microfluídico con el que los ingredientes líquidos en las cavidades correspondientes se mezclan según algunas realizaciones;

40 la Figura 11A muestra una vista en perspectiva despiezada de partes de otro dispositivo microfluídico adicional según algunas realizaciones;

la Figura 11B ilustra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 11A;

la Figura 12A muestra una vista en perspectiva despiezada de partes de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;

45 la Figura 12B ilustra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 12A;

- la Figura 13A muestra una vista desde arriba en primer plano de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 13B representa una vista en perspectiva en primer plano de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- 5 la Figura 14 representa una vista en perspectiva en primer plano de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 15 ilustra un dispositivo microfluídico acoplado con un conjunto de ciclo térmico según algunas realizaciones;
- 10 la Figura 16A representa una vista en perspectiva despiezada de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 16B muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 16A;
- la Figura 16C muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 16A con canales sellados;
- 15 la Figura 17A representa una vista en perspectiva despiezada de otro dispositivo microfluídico adicional según algunas realizaciones;
- la Figura 17B muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 17A;
- la Figura 17C muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 17A con canales sellados;
- 20 la Figura 18A representa una vista en perspectiva despiezada de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 18B muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico montado de la Figura 18A;
- la Figura 19A representa una vista en perspectiva despiezada de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 19B muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico montado de la Figura 19A;
- 25 la Figura 20A representa una vista en perspectiva despiezada de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 20B muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico montado de la Figura 20A;
- la Figura 21 representa una vista en perspectiva despiezada de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- 30 la Figura 22A representa una vista en perspectiva despiezada de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 22B muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico montado de la Figura 22A;
- la Figura 22C muestra una vista en sección transversal del dispositivo microfluídico montado de la Figura 22B en un estado diferente;
- 35 la Figura 23 muestra una vista en sección transversal de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 24 muestra una vista en sección transversal de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 25 muestra una vista en planta desde arriba de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- la Figura 26 muestra una vista en planta desde arriba de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- 40 la Figura 27 muestra una vista en planta desde arriba de otro dispositivo microfluídico más según algunas realizaciones;
- la Figura 28A muestra una vista en planta desde arriba de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;
- las Figuras 28B-28D muestran unas vistas en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 28A según algunas realizaciones;
- la Figura 28E muestra una vista en sección transversal de otro dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;

la Figura 29 muestra una vista en planta desde arriba de una parte del fondo de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;

la Figura 30 muestra una vista en perspectiva de una parte del fondo del dispositivo microfluídico de la Figura 29 según algunas realizaciones;

5 la Figura 31A muestra una vista en planta desde arriba de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;

la Figura 31B muestra una vista en perspectiva de una parte de arriba del dispositivo microfluídico de la Figura 31A según algunas realizaciones;

la Figura 32A muestra una vista en planta desde arriba de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones;

10 las Figuras 32B-32F muestran vistas en sección transversal del dispositivo microfluídico de la Figura 32A según algunas realizaciones;

las Figuras 33A-33C muestran vistas en sección transversal de varios dispositivos microfluídicos según algunas realizaciones;

la Figura 34 muestra una vista en sección transversal de un dispositivo microfluídico según algunas realizaciones.

### Descripción detallada

15 Los inventores han apreciado que un dispositivo microfluídico que proporciona la capacidad de facilitar múltiples combinaciones de pequeños volúmenes de reactivos de manera controlada pero no costosa, sería conveniente, especialmente en instalaciones científicas (por ejemplo, detección por PCR, PCR combinatoria). Los inventores han apreciado además que sería beneficioso desarrollar un sistema rápido y rentable para dividir en un ingrediente líquido uniformemente en una gran serie de cámaras separadas y sometiendo cada una de las cámaras a aislamiento del líquido desde otra (por ejemplo, para PCR digital).

20 La presente descripción también se refiere a dispositivos microfluídicos y a sus métodos de utilización y construcción. Dichos dispositivos pueden utilizarse para proporcionar múltiples series de reacciones químicas o biológicas combinatorias y/o de alto rendimiento más fácilmente que las técnicas o métodos existentes.

25 En una realización, se proporciona un dispositivo microfluídico. El dispositivo incluye una primera capa que define una primera cavidad; un primer canal dispuesto para proporcionar la entrada de líquido a la primera cavidad; una segunda capa que define una segunda cavidad; un segundo canal dispuesto para proporcionar la entrada de líquido a la segunda cavidad; y al menos un material de separación que proporciona la separación del líquido entre la primera cavidad y la segunda cavidad, en donde la compresión de la primera y segunda capas entre sí da lugar al sellado del primer canal y del segundo canal produciendo la obstrucción de la primera cavidad y de la segunda cavidad a partir de la entrada posterior del líquido, y en donde la manipulación de al menos un material de separación da lugar a la eliminación de la separación del líquido lo que permite la comunicación fluida entre la primera cavidad y la segunda cavidad.

30 En otra realización, se proporciona un método de manipulación microfluídica. El método incluye llenar una primera cavidad definida por una primera capa con líquido por un canal; llenar una segunda cavidad definida por una segunda capa con líquido por un canal; proporcionar una suspensión del líquido entre la primera cavidad y la segunda cavidad; comprimir la primera y segunda capas afines entre sí para producir el sellado de los canales dando como resultado la obstrucción de la primera cavidad y la segunda cavidad desde la entrada posterior del líquido y eliminar la separación del líquido y permitir la comunicación fluida entre la primera cavidad y la segunda cavidad.

35 En otra realización más, se proporciona un dispositivo microfluídico. El dispositivo incluye una primera capa que define una primera cavidad; un primer canal dispuesto para proporcionar la entrada de líquido a la primera cavidad; una segunda capa que define una segunda cavidad; un segundo canal dispuesto para proporcionar la entrada de líquido a la segunda cavidad; y al menos un material de separación que proporciona la separación del líquido entre la primera cavidad y la segunda cavidad, en donde el primer y segundo canales se adaptan para sellarse produciendo la obstrucción de la primera cavidad y de la segunda cavidad a partir de la entrada posterior del líquido, y en donde el calentamiento o la disolución de al menos un material de separación da lugar a la eliminación de la separación del líquido lo que permite la comunicación fluida entre la primera cavidad y la segunda cavidad.

40 En otra realización, se proporciona un método de manipulación microfluídica. El método incluye llenar una primera cavidad definida por una primera capa con líquido por un canal; llenar una segunda cavidad definida por una segunda capa con líquido por un canal; proporcionar al menos un material de separación como una separación del líquido entre la primera cavidad y la segunda cavidad; sellar los canales de la primera y segunda capas produciendo la obstrucción de la primera cavidad y la segunda cavidad de más entrada de líquido; y calentar o disolver al menos un material de separación para eliminar la separación del líquido y permitir la comunicación fluida entre la primera cavidad y la segunda cavidad.

5 En otra realización aún, se proporciona un dispositivo microfluídico. El dispositivo incluye una primera capa que define un gran número de cavidades; un gran número de canales dispuestos para proporcionar la entrada de líquido al gran número de cavidades; una segunda capa dispuesta junto a la primera capa; y en donde la compresión de la primera y segunda capas entre sí produce el sellado de los numerosos canales produciendo la obstrucción de las numerosas cavidades de más entrada de líquido.

10 En otra realización aún, se proporciona un dispositivo microfluídico. El dispositivo microfluídico incluye una primera capa que define al menos un canal; una segunda capa que tiene numerosas protuberancias dispuestas junto a al menos un canal; y un material sellador colocado junto a al menos un canal, en donde las numerosas protuberancias se adaptan para forzar al menos a una parte del material sellador dentro de al menos un canal tras la aplicación de la presión hacia al menos un canal, dando lugar a la división de la menos un canal en numerosas cavidades independientes.

15 En otra realización, se proporciona un método de manipulación microfluídica. El método incluye suministrar un líquido al menos a un canal definido por una primera capa, al menos un canal colocado junto a un material sellador y una segunda capa que tiene numerosas protuberancias, presionando las numerosas protuberancias al menos hacia un canal; y forzando al menos una parte del material sellador dentro de al menos un canal para el reparto a al menos un canal dentro de diversas cavidades separadas que contienen el líquido.

20 En otra realización, se proporciona un método de aislamiento con líquido aislando diversas cavidades conectadas a un canal unido por un material sellador. El método incluye el llenado de dicho gran número de cavidades con un ingrediente líquido que contiene ácidos nucleicos; y forzar dicho material sellador dentro de dicho canal de modo que las cavidades adyacentes aisladas con líquido en serie una tras otra.

25 En otra realización, se proporciona un método de aislamiento con líquido de un gran número de cavidades formadas por una superficie de una primera capa y se conecta al menos a un pocillo de entrada formado por una segunda superficie de dicha primera capa, poniendo en contacto dicha primera capa con un material sellador. El método incluye el llenado de dicho gran número de cavidades con un ingrediente líquido que contiene ácidos nucleicos; y comprimir dicho material sellador a fin de obstruir más la circulación de líquido entre dicho gran número de cavidades.

30 En otra realización más, se proporciona un dispositivo microfluídico. El dispositivo incluye un gran número de cavidades; al menos un pocillo de entrada que proporciona la entrada de líquido a dicho gran número de cavidades; y en donde dicho gran número de cavidades y dicho pocillo de entrada están situados en diferentes superficies de una capa.

35 La presente descripción se refiere a dispositivos microfluídicos que proporcionan múltiples combinaciones preparadas a partir de una serie de grupos de ingredientes líquidos, económica y eficientemente. Por ejemplo, en un laboratorio, un usuario se enfrenta a múltiples grupos de reactivos que deben combinarse en cada posible permutación para análisis combinatorio (por ejemplo, detección por PCR) puede realizar fácilmente realizaciones de dispositivos microfluídicos expuestos en la presente memoria para lograr este objetivo.

La presente descripción se refiere también a dispositivos microfluídicos que permiten que un ingrediente líquido se divida en partes iguales en volúmenes por separado (por ejemplo, a través de cavidades divididas). Esos volúmenes separados pueden aislarse con líquido de uno a otro de manera rápida y fácil.

40 En algunas realizaciones, cuando se usan, un dispositivo microfluídico puede realizar un análisis combinatorio entre diferentes grupos de reactivos líquidos (por ejemplo, un grupo de muestras de ADN y un grupo de cebadores de ADN). Dicho análisis combinatorio puede realizarse mediante una serie de cámaras donde cada cámara incluye al menos dos cavidades que están, inicialmente, separadas con líquido. Por ejemplo, un gran número de primeras cavidades de una capa pueden estar separadas por un material de separación de un gran número de segundos cavidades de otra capa. El gran número de primeras cavidades puede estar debidamente relleno con líquido de un primer grupo de depósitos de líquido (por ejemplo, muestras de ADN). El gran número de primeras cavidades puede estar debidamente relleno con líquido de un segundo grupo de depósitos de líquido (por ejemplo, muestras de ADN).

50 Por consiguiente, el dispositivo puede facilitar cada combinación entre los diferentes grupos de reactivos líquidos (por ejemplo, muestras de ADN y cebadores de ADN). Una vez que las cavidades respectivas se llenan adecuadamente, cada cavidad de cada cámara se aísla de manera fluida entre sí. Posteriormente, se elimina la separación de líquidos entre las cavidades correspondientes de cada cámara, permitiendo que los líquidos situados dentro de las cavidades correspondientes se mezclen. Tras la mezcla, pueden realizarse diversas condiciones que conducen a reacciones apropiadas (por ejemplo, PCR, reacciones biológicas, reacciones químicas, etc.).

55 Los dispositivos microfluídicos de la presente descripción pueden incluir varias capas en las que cada capa define varias cavidades. Se pueden disponer varios canales para proporcionar entrada de líquido a las cavidades. En algunas realizaciones, algunas capas pueden definir tanto las cavidades como los canales. En algunas realizaciones, capas separadas pueden definir cavidades y canales separados. Además, en algunos casos, un material de separación puede proporcionar separación de líquidos entre varias cavidades, tales como cavidades que corresponden a una cámara de reacción.

5 Cuando las cavidades se suministran adecuadamente con el (los) ingrediente(s) líquido(s) apropiado(s), los canales que inicialmente proporcionan conexión líquida entre las cavidades pueden sellarse para evitar más entrada de líquido en las cavidades. En algunas realizaciones, las capas del dispositivo se pueden comprimir una con respecto a la otra (por ejemplo, debido a la sujeción externa, sondeo o rodadura del dispositivo) para hacer que los canales se sellen. Por ejemplo, dicha compresión puede hacer que un material sellador se deforme en el espacio definido por el canal.

10 En situaciones donde un material de separación divide las cavidades correspondientes de una cámara de reacción y se desea que los contenidos dentro de esas cavidades se mezclen, el material de separación puede manipularse adecuadamente para que se elimine la separación de líquido entre las cavidades. Dicha eliminación permite mezclar los respectivos ingredientes líquidos de las cavidades correspondientes. En algunas realizaciones, partes del material de separación pueden calentarse o disolverse de modo que se elimine la separación de líquido entre las cavidades correspondientes de una cámara.

15 Los dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria pueden incluir una serie de cámaras de reacción. Inicialmente, cada cámara puede incluir una o más separaciones de líquido (por ejemplo, un material de separación, tal como una película, una membrana, etc.) entre varias cavidades. En algunas realizaciones, un material de separación está dispuesto entre capas que definen cavidades y/o canales, permitiendo el confinamiento de líquido dentro de las cavidades y canales. El material de separación puede dividir además las cámaras de reacción del dispositivo en las cavidades correspondientes, evitando que el líquido circule entre las cavidades correspondientes de cada cámara. Por lo tanto, aunque cada una de las cavidades de cada cámara puede llenarse con un ingrediente líquido, los ingredientes líquidos situados dentro de cada una de las cavidades correspondientes de la cámara no pueden mezclarse siempre que haya separación de líquido para dividir las cavidades.

20 Antes de la eliminación de la separación de líquidos entre las cavidades correspondientes de la misma cámara, si la eliminación se produce completamente, las cavidades vecinas (por ejemplo, cavidades definidas por una capa apropiada del dispositivo) pueden aislarse con líquido (por ejemplo, sellar u obstruir la entrada de más líquido) uno de otra. Dicho aislamiento con líquido puede ocurrir mediante la deformación (por ejemplo, deformación plástica) de un material sellador adecuado dentro de canales que de otro modo proporcionarían una conexión de líquido entre las cavidades.

25 En algunas realizaciones, el material de separación en sí mismo puede ser el material sellador que se deforma para hacer que cada una de las cavidades del dispositivo esté aislada de manera fluida una de la otra. Por ejemplo, las porciones apropiadas del material de separación, que también actúan como material sellador, pueden deformarse en canales haciendo que un sello obstruya la circulación del líquido entre las cavidades vecinas conectadas por los canales. El material de separación puede deformarse además para crear una abertura entre las cavidades correspondientes de cada cámara de reacción. Una vez que se crea una abertura entre las cavidades correspondientes de una cámara, la cámara ya no está bajo separación de líquidos y, como resultado, pueden combinarse los contenidos situados dentro de cada una de las cavidades correspondientes.

30 Los aspectos de la presente descripción proporcionan disposiciones y/o técnicas para hacer que el proceso de combinar diferentes grupos de reactivos en cámaras de reacción separadas sea rápido y eficiente. Los aspectos presentados en la presente memoria también proporcionan una división o reparto uniforme de un ingrediente líquido en pequeños volúmenes y junto con el aislamiento con líquido de esos pequeños volúmenes. Se puede apreciar que los dispositivos microfluídicos descritos en el presente documento pueden incluir cualquier número adecuado de capas, componentes, materiales de separación, materiales de sellado, adhesivos, etc., en cualquier disposición o configuración apropiada, y que no se pretende que cada uno de los ejemplos de la presente descripción sean restrictivos.

35 La Figura 1 representa una realización de un dispositivo microfluídico 10 que tiene una serie de cámaras 12 donde cada cámara se divide en las cavidades correspondientes 102, 112 (las cavidades independientes 102, 112 se ilustran además en las Figuras 3A y 3C) Las entradas 20 y 30 y los venteos 22 y 32 proporcionan el llenado apropiado de ingredientes líquidos en los respectivos grupos de cavidades, como se describe con más detalle más adelante, para la reacción posterior.

40 La Figura 2 representa una vista despiezada de esta realización que muestra el dispositivo microfluídico 10 para incluir una primera capa 100, una segunda capa 110 y una capa intermedia 150 situada entre la primera y la segunda capa. La capa intermedia 150 actúa como un material de separación que proporciona separación de líquidos entre las cavidades correspondientes que forman cada cámara. Como se describe más adelante, la capa intermedia 150 también puede actuar como un material sellador para aislar con líquido cada una de las cavidades entre sí.

45 La Figura 3A representa la primera capa 100 que define una serie de cavidades 102 que se dividen en subconjuntos de cavidades. Cada subconjunto de cavidades incluye una entrada 20 respectiva, para el suministro de un ingrediente líquido a cada una de las cavidades, y el venteo 22, para el escape del exceso de líquido (por ejemplo, aire, ingrediente(s), etc.) cuando proceda. Ilustrado en la Figura 3A, se proporcionan diez depósitos de líquido diferentes como entradas respectivas para llenar cada uno de los subconjuntos de cavidades. Es decir, la primera

capa tiene diez entradas 20a, 20b, 20c, 20d, 20e, 20f, 20g, 20h, 20i, 20j donde cada entrada está en conexión de líquido con cinco cavidades 102 y venteos 22. Respectivas entradas 20, cavidades 102 y venteos de un subconjunto están, a su vez, conectados entre sí a través de un gran número de canales 104.

5 Por ejemplo, un ingrediente líquido puede ser suministrado a través de la entrada 20a a cada cavidad del subconjunto de cavidades 102a<sub>1</sub>, 102a<sub>2</sub>, 102a<sub>3</sub>, 102a<sub>4</sub>, 102a<sub>5</sub> por un canal 104, que permite que las cavidades 102a<sub>1</sub>, 102a<sub>2</sub>, 102a<sub>3</sub>, 102a<sub>4</sub>, 102a<sub>5</sub> estén en comunicación fluida durante el llenado. Por consiguiente, se pueden suministrar diferentes ingredientes líquidos a cada subconjunto de cavidades correspondientes a las entradas 20a, 20b, 20c, 20d, 20e, 20f, 20g, 20h, 20i, 20j. Las entradas 30 y los orificios de venteo correspondientes 32 también se proporcionan en la primera capa 100 a fin de alcanzar la segunda capa 110 para proporcionar líneas de líquido adecuadas para suministrar cavidades dentro de la segunda capa.

10 Como se proporciona en la presente memoria, los canales 104 pueden incluir cualquier parte del paso a través del cual el líquido puede circular, por ejemplo, entre una entrada 20 y un venteo 22, o entre dos o más de las cavidades 102. Por lo tanto, se puede considerar que un solo canal incluye múltiples cavidades en virtud de que las cavidades están en comunicación fluida. Por ejemplo, un canal 104 puede incluir cada una de las cavidades 102a<sub>1</sub>, 102a<sub>2</sub>, 15 102a<sub>3</sub>, 102a<sub>4</sub>, 102a<sub>5</sub> que están en comunicación fluida.

La Figura 3B muestra una capa intermedia 150 que incluye un material de separación que tiene orificios que forman parte de las entradas 30 y venteos 32 que conducen a la segunda capa 110. Es decir, los orificios de la capa intermedia 150 permiten la conexión de líquido entre los respectivos depósitos de alimentación de líquido que se proporcionan como entradas 30 que se originan en la primera capa 100 y las cavidades respectivas 112 y los 20 canales 114 de la segunda capa. Por consiguiente, en esta realización, el ingrediente líquido puede suministrarse a través de la primera capa 100 para llenar las cavidades y canales apropiados 112 y 114 de la segunda capa 110. Además, los venteos 32 pueden permitir que el exceso de líquido de la segunda capa escape a través de la primera capa.

La Figura 3C representa la segunda capa 110 que, similar a la primera capa 100, define varias cavidades 112 25 divididas en subconjuntos de cavidades. Cada subconjunto de cavidades incluye una entrada 30 y un venteo 32 respectivas de manera que los ingredientes líquidos puedan suministrarse adecuadamente a cada una de las cavidades. Como se muestra en la Figura 3C, la segunda capa tiene cinco entradas 30a, 30b, 30c, 30d y 30e donde cada entrada está en comunicación fluida con diez cavidades 112 y venteos 32 que están conectados, a su vez, a través de los respectivos canales 114.

30 Por ejemplo, un ingrediente líquido puede suministrarse a través de la entrada 30a a cada cavidad de un subconjunto de cavidades 112a<sub>1</sub>, 112a<sub>2</sub>, 112a<sub>3</sub>, 112a<sub>4</sub>, 112a<sub>5</sub>, 112a<sub>6</sub>, 112a<sub>7</sub>, 112a<sub>8</sub>, 112a<sub>9</sub>, 112a<sub>10</sub> por el canal 114. Durante el llenado, el canal 114 proporciona una conexión fluida entre cada una de las cavidades 112a<sub>1</sub>, 112a<sub>2</sub>, 112a<sub>3</sub>, 112a<sub>4</sub>, 112a<sub>5</sub>, 112a<sub>6</sub>, 112a<sub>7</sub>, 112a<sub>8</sub>, 112a<sub>9</sub>, 112a<sub>10</sub>. De ello se deduce que se pueden suministrar diferentes ingredientes líquidos a cada subconjunto de cavidades correspondientes a las entradas 30a, 30b, 30c, 30d y 30e.

35 De manera similar a la descrita anteriormente con respecto a los canales 104, los canales 114 pueden incluir cualquier parte del paso por el que el líquido puede circular, por ejemplo, entre una entrada 30 y un venteo 32, o entre dos o más de las cavidades 112. Por ejemplo, un canal 114 puede incluir cada una de las cavidades 112a<sub>1</sub>, 112a<sub>2</sub>, 112a<sub>3</sub>, 112a<sub>4</sub>, 112a<sub>5</sub>, 112a<sub>6</sub>, 112a<sub>7</sub>, 112a<sub>8</sub>, 112a<sub>9</sub>, 112a<sub>10</sub> que están en comunicación fluida.

40 Se puede apreciar que la realización anterior se presenta solo a modo de ejemplo y no pretende limitar la presente descripción. Por ejemplo, los dispositivos microfluídicos descritos en el presente documento pueden incluir cualquier configuración adecuada de capas y componentes que proporcionen una disposición apropiada de cavidades y/o canales que puedan facilitar reacciones separadas en las cavidades, o cámaras que incluyen una o más cavidades.

45 En algunas realizaciones, algunas zonas de la capa intermedia 150 o la propia capa completa proporcionan adherencia o unión de las capas primera y segunda juntas. Por ejemplo, la capa puede incluir uno o más materiales (por ejemplo, adhesivos, adhesivos sobre un soporte, etc.) que facilitan la unión entre las capas. En algunas realizaciones, se usa una capa y/o material diferente no mostrado explícitamente en las figuras para adherir varias capas entre sí.

50 En algunas realizaciones, las partes de la capa intermedia 150 pueden formar una barrera en un lado (por ejemplo, el fondo) de la primera capa 100 para que contenga apropiadamente las cavidades 102 y los canales 104. A la inversa, partes de la capa intermedia 150 pueden formar una barrera en un lado (por ejemplo, la parte superior) de la segunda capa 110 a fin de proporcionar un recinto adecuado para las cavidades 112 y los canales 114. Por consiguiente, la capa intermedia 150 (por ejemplo, material de separación) puede proporcionar separación de líquidos de una cámara en las cavidades correspondientes (por ejemplo, una primera cavidad de la primera capa y una segunda cavidad de la segunda capa que están alineadas entre sí).

55 La vista en sección transversal representada en la Figura 4 muestra una realización que incluye varias cámaras con cavidades correspondientes de cada cámara.



Los canales conectan cavidades asociadas con las capas respectivas juntas. Como se muestra, una primera capa 100 y una segunda capa 110 están unidas respectivamente a la capa intermedia 150 a cada lado. La capa intermedia 150 proporciona un material de separación que forma una separación fluida entre las cavidades correspondientes de cada cámara. En algunas realizaciones, las capas primera y segunda son generalmente más rígidas (por ejemplo, relativamente más rígidas) que la capa intermedia. En otras realizaciones, las capas primera y segunda son de una rigidez similar, o menos rígida, que la capa intermedia. Las capas primera y segunda, en comparación entre sí, pueden tener una rigidez similar o diferente.

Como se muestra en la Figura 4 y se indica con el círculo discontinuo, la cámara 101 incluye una primera cavidad 102 de la primera capa y una segunda cavidad 112 de la segunda capa, dividida por el material de separación de la capa intermedia. El canal 104 proporciona una conexión fluida entre otras cavidades 102 de la primera capa. De manera similar, el canal 114 (que no se muestra expresamente, ya que pasa a través del plano de la sección transversal) proporciona una conexión fluida entre otras cavidades 112 de la segunda capa.

Mientras que la capa intermedia 150 se representa como una única membrana monolítica que sirve como material de separación entre las cavidades correspondientes de cada cámara, así como formando una barrera para formar un recinto adecuado para las cavidades respectivas 102, 112 y los canales 104, 114, se puede apreciar que la capa intermedia puede incluir varios componentes que están separados entre sí. En algunas realizaciones, la capa intermedia puede incluir componentes de material de separación que están colocados en posiciones discretas con respecto a las cavidades y canales respectivos de las capas primera y segunda. Por ejemplo, la capa intermedia puede incluir un material de separación, o partes del mismo, que están colocados apropiadamente para definir las cavidades, y un material de separación diferente, o partes del mismo, que definen los canales. Dicha disposición puede ser beneficiosa cuando se prefiere que varias zonas del material de separación presenten propiedades diferentes (por ejemplo, más rígidas, más blandas) dependiendo de si el material está situado directamente junto a una cavidad o un canal.

Un material de separación puede estar compuesto por cualquier material o composición adecuados. En algunas realizaciones, el material de separación incluye un plástico/polímero, tal como polietileno, polipropileno, etilenoacetato de vinilo, un elastómero tal como caucho de silicona, o una cera tal como parafina o cera microcristalina, o combinaciones de los mismos. Como tal, el material de separación puede incluir una mezcla de varias composiciones diferentes o puede proporcionarse en varias configuraciones, tales como en capas o disposiciones más discretas, donde se colocan diferentes piezas del material de separación en varios lugares. Como se expone más adelante, durante el uso, el material de separación también puede usarse como material sellador para evitar la circulación de líquido entre cavidades a través de canales de conexión. O puede usarse un material sellador diferente en combinación con un material de separación distinto.

Las capas de dispositivos microfluídicos descritos en este documento pueden incluir cualquier material adecuado y pueden estar compuestos de materiales similares o diferentes. En algunas realizaciones, una capa está hecha de un plástico relativamente rígido, por ejemplo, polipropileno, polietileno, policarbonato, PTFE, etc. Alternativamente, una capa puede incluir un material flexible similar al caucho, como silicona u otro elastómero. Otros materiales potenciales incluyen vidrio, cerámica, silicio o similares. Como tal, una capa puede ser rígida o deformable. Dichos materiales pueden ser translúcidos o transparentes para permitir fácilmente mediciones ópticas de los contenidos dentro de las cámaras/cavidades.

Cada una de las capas del dispositivo microfluídico se puede preparar por cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, las capas se fabrican mediante moldeo por inyección, estampando las cavidades y canales en una lámina delgada de plástico, grabado o cualquier otro método adecuado. Por ejemplo, pueden formarse espacios que definen las cavidades y los canales (por ejemplo, moldearse, grabarse) en un plástico/polímero o material elastomérico que forma la capa.

En algunas realizaciones, diferentes capas pueden definir cavidades y canales que están inicialmente en comunicación fluida. Por ejemplo, una primera capa puede definir varias cavidades sin definir los canales que conectan las cavidades entre sí; una capa adicional junto a la primera capa puede definir aquellos canales que conectan las cavidades. Dichos canales pueden sellarse adecuadamente, por ejemplo, por compresión de las dos capas entre sí.

Como tal, una capa puede definir una o más cavidades y/o canales del dispositivo, como en las realizaciones que representan las capas primera y segunda 100 y 110. O, como también se expuso anteriormente, una capa puede incluir un material de separación y/o un material sellador, tal como la capa intermedia 150.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, una capa puede incluir adhesivo acrílico, adhesivo de caucho natural o adhesivo de silicona. Dichos materiales pueden ser adecuados para deformarse en canales del dispositivo (por ejemplo, como material sellador) cuando se someten a compresión. En algunas realizaciones, los adhesivos pueden colocarse en una capa relativamente rígida, o alternativamente, en un soporte separado. Ejemplos de soportes adecuados pueden incluir polipropileno, polietileno, policarbonato y/u otros plásticos adecuados.

Varios componentes (por ejemplo, capas, adhesivos, etc.) de los dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria pueden adherirse entre sí mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, se puede usar un adhesivo para unir uno o más componentes, tal como para unir un material de separación/sellado y la primera y/o segunda capa. En algunas realizaciones, los componentes del dispositivo microfluídico se comprimen entre sí (por ejemplo, mediante sujeción, laminación u otra fuerza aplicada externamente) para dar como resultado una unión uniformemente distribuida entre superficies de diferentes capas.

Para algunos materiales, la aplicación de una cantidad adecuada de compresión y/o calor puede dar como resultado algunas características del material de separación/sellado, u otros componentes del dispositivo, a cambiar. Por ejemplo, a temperaturas elevadas, algunos materiales como la cera se volverán cada vez más pegajosos y/o adhesivos, lo que dará como resultado una fuerte adherencia entre los componentes del dispositivo. Por consiguiente, las diferentes capas del dispositivo, incluida una capa de cera, pueden montarse y luego someterse a compresión y calentamiento durante un período de tiempo apropiado, permitiendo que la cera cree una unión. En algunas realizaciones, se pueden usar uno o más disolventes apropiados para facilitar la unión entre capas.

Como se expuso anteriormente, los dispositivos microfluídicos según la presente descripción pueden servir para facilitar múltiples combinaciones de diferentes grupos de reactivos. En algunas realizaciones, una vez que los ingredientes líquidos de las cavidades correspondientes en varias cámaras se combinan/mezclan, la(s) cámara(s) pueden estar sometidas a ciclos térmicos. Por ejemplo, una fuente de calor configurada para ciclos térmicos (por ejemplo, para facilitar la PCR) puede ponerse en contacto, o si no acoplarse, con la primera y/o segunda capa. En algunos casos, la capa en la que la fuente de calor está en contacto puede ser relativamente delgada y/o puede incluir un material termoconductor para facilitar la transferencia de calor.

Refiriéndose a la realización de las Figuras 1-4, la primera capa 100 proporciona diez entradas 20 con cinco cavidades 102 conectadas de manera fluida a cada entrada respectiva 20 y la segunda capa 110 proporciona cinco entradas 30 con diez cavidades 112 conectadas de manera fluida a cada entrada 30 respectiva. Por consiguiente, el dispositivo puede proporcionar un total de cincuenta reacciones diferentes basadas en mezclas de diferentes combinaciones de reactivos, dependiendo del suministro de diversos ingredientes líquidos. Tomando las reacciones de PCR combinatorias descritas previamente como ejemplo, cada una de las entradas 20 de la primera capa 100 puede proveerse de diez muestras de ADN diferentes para analizar y, por lo tanto, cada una de las entradas 30 de la segunda capa 110 puede proveerse de cinco mezclas de cebadores de ADN diferentes como sondas diana para el análisis de las muestras de ADN respectivas.

Las Figuras 5-10F ilustran realizaciones de la presente descripción donde cada una de las cavidades del dispositivo se suministra con los respectivos ingredientes líquidos antes del aislamiento con líquido de las cavidades, y después del aislamiento con líquido de las cavidades, la mezcla posterior de los contenidos dentro de las cavidades correspondientes.

La Figura 5 muestra una realización de un dispositivo microfluídico montado donde se proporcionan una serie de depósitos de alimentación de líquido como entradas 20, 30. Un grupo de depósitos de alimentación de líquido 20 está dispuesto para proporcionar el llenado de las cavidades respectivas de la primera capa 100 con el ingrediente líquido 500. Y otro grupo de depósitos de alimentación de líquido 30 están dispuestos para llenar las cavidades respectivas de la segunda capa 100 con el ingrediente líquido 502. A modo de explicación, los ingredientes líquidos 500a, 500b, 500c, 500d, 500e, 500f, 500g, 500h, 500i y 500j que llenan las entradas 20 de la primera capa 100 se ilustra que son de color más claro que los ingredientes líquidos 502a, 502b, 502c, 502d y 502e que llenan las entradas 30 de la segunda capa 110. La Figura 6 ilustra las cavidades de la segunda capa 110 que se han llenado con los ingredientes líquidos 502a, 502b, 502c, 502d y 502e de los respectivos depósitos de alimentación de líquido.

La Figura 7A muestra las cavidades de la primera capa 100 que se han llenado con los ingredientes líquidos 500a, 500b, 500c, 500d, 500e, 500f, 500g, 500h, 500i y 500j de los respectivos depósitos de alimentación de líquido. Los depósitos de alimentación de líquido se proporcionan como entradas 20 y están dispuestos para llenar las cavidades 102 respectivas.

Pueden suministrarse ingredientes líquidos a las respectivas entradas, cavidades y canales por cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, una máquina o usuario pipetea reactivos apropiados en los pocillos de entrada. O bien, se pueden conectar apropiadamente recipientes separados a las entradas respectivas para suministrar líquido retenido por los recipientes a las entradas. Las cavidades y los canales pueden proveerse de los respectivos ingredientes líquidos, por ejemplo, por acción capilar, gravedad, centrifugación, succión desde los orificios de venteo, succión al vacío, presión en los pocillos de entrada y/o de cualquier otra manera adecuada. Por lo tanto, cualquier método de impulsar o extraer se puede usar para suministrar adecuadamente cavidades y canales con los ingredientes líquidos apropiados. Los ingredientes líquidos 500 y 502 pueden suministrarse a las cavidades 102 y 112 sucesiva o simultáneamente.

Cada pocillo de entrada 20 de la primera capa 100 de este ejemplo puede ser adecuado para proporcionar el llenado de cinco cavidades y los canales de conexión entre esas cavidades. En algunos casos, puede sobrar una cantidad de ingrediente líquido adicional. Del mismo modo, cada entrada 30 de la segunda capa 110 puede ser adecuada para proporcionar el llenado de diez cavidades y los canales de conexión de esas cavidades. Los orificios de venteo

- 5 pueden permitir que el exceso de aire y/o ingrediente líquido se escape de los canales y/o cavidades cuando los canales y cavidades se llenan con los ingredientes líquidos respectivos y se expulsan del sistema. Por ejemplo, la compresión de la primera y segunda capas entre sí puede reducir la cantidad de espacio disponible y/o aumentar la presión del líquido dentro del dispositivo (por ejemplo, dentro de las cavidades y canales) dando como resultado el desplazamiento del líquido; por lo tanto, pueden proporcionarse orificios de venteo para que se produzca una cantidad adecuada de rebose.
- 10 La vista en sección transversal representada en la Figura 7B muestra las cavidades correspondientes de cada cámara llena de ingredientes líquidos 500 y 502. Como se indica por el círculo discontinuo, la cámara 101 incluye la primera cavidad 102 y la segunda cavidad 112 que, en esta etapa, se dividen por el material de separación de la capa intermedia 150 de modo que el líquido no puede circular entre las cavidades, por lo tanto, se evita la mezcla de los ingredientes líquidos 500 y 502 entre sí. Como se muestra más adelante en la Figura 7B, el canal 104 proporciona una conexión fluida entre otras cavidades de la primera capa que ha recibido el ingrediente líquido desde una entrada 20 respectiva. De manera similar, el canal 114 (no mostrado expresamente) proporciona una conexión fluida entre otras cavidades 112 de la segunda capa que han recibido el ingrediente líquido desde una entrada 30 respectiva.
- 15 Una vez que las cavidades se llenan con los ingredientes líquidos apropiados, las cavidades se aíslan entre sí de tal manera que el líquido no puede derramarse o circular de una cavidad a otra. Al provocar este aislamiento de líquido, en algunas realizaciones, hace que se deforme un material sellador y llene sustancialmente el espacio definido por los canales de modo que la circulación de líquido que anteriormente se permitía entre cavidades ahora se bloquea.
- 20 Para producir dicho sellado de los canales entre cavidades, en algunas realizaciones, se aplica una fuerza externa (por ejemplo, compresión) y/o calor al dispositivo. Por ejemplo, el dispositivo (por ejemplo, en las superficies exteriores de las capas) puede sujetarse, enrollarse o sondearse para someterse a una fuerza de compresión adecuada. Además, el dispositivo puede calentarse para producir la deformación del material sellador en sí mismo, que, en algunas realizaciones, también resulta ser el material de separación.
- 25 Las Figuras 8A-8B muestran una realización en la que la aplicación de un grado apropiado de fuerza de compresión y/o calor presiona algunas partes del material de separación/sellado (por ejemplo, zonas del material de separación/sellado alineadas con los canales) en los canales, lo que produce el sellado de los canales y, por lo tanto, el aislamiento con líquido de las cavidades entre sí.
- 30 En algunas realizaciones, la cantidad de fuerza de compresión ejercida sobre el dispositivo suficiente para producir el cierre de los canales puede estar entre aproximadamente 100 Newtons y aproximadamente 10.000 Newtons (por ejemplo, 100-1.000 N; 1.000-5.000 N; 5.000-10.000 N), dependiendo del tamaño total del dispositivo y la naturaleza del material de separación/sellado. Por ejemplo, cuanto más grande es el dispositivo (es decir, más cavidades y canales), se puede requerir más fuerza de compresión para sellar los canales de la circulación entre las cavidades. O, cuanto más blando sea el material, menos fuerza de compresión puede ser necesaria para deformar el material en los canales respectivos del dispositivo.
- 35 En algunas realizaciones, el material de separación/sellado se puede calentar a una temperatura elevada para provocar un reblandecimiento del material suficiente para que el material se deforme en canales adyacentes. Dicha temperatura elevada puede depender del punto de reblandecimiento del material, por ejemplo, entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 90°C (por ejemplo, entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 70°C) para algunas composiciones poliméricas o de cera.
- 40 Se puede apreciar que puede usarse cualquier método adecuado para crear un sello dentro de los canales de modo que las cavidades estén aisladas de manera fluida entre sí. Por ejemplo, piezas separadas de un material sellador pueden distribuirse por todo el dispositivo y colocarse directamente junto a cada canal. Tras la aplicación de calor o irradiación con láser, localmente (por ejemplo, con una sonda de calor) y/o globalmente (por ejemplo, con una placa calentada) al dispositivo general, el material sellador puede derretirse, ablandarse o si no deformarse en el canal para producir el sellado del canal dando lugar a la obstrucción de la circulación de líquido entre las cavidades. Por ejemplo, el material sellador puede adaptarse para fundir, al menos parcialmente, ablandarse o si no deformarse de otro modo en el canal tras la aplicación de fuerza de compresión externa y/o calor a determinadas zonas del dispositivo, o al dispositivo en su conjunto.
- 45 La vista en sección transversal proporcionada por las Figuras 9A-9B muestran un proceso de sellado de un canal 114 tras la actuación apropiada (por ejemplo, compresión, calentamiento y/u otro método adecuado) del material sellador. La Figura 9A muestra dónde está tomada la sección transversal para ilustrar la Figura 9B. En la Figura 9B, la capa intermedia 150 dispuesta entre la primera y la segunda capas 100 y 110 incluye un material de separación/sellado.
- 50 Las capas primera y segunda 100 y 110 se comprimen una con respecto a la otra de tal manera que una parte 151 del material de separación/sellado se deforma en el espacio definido por el canal a través del cual el líquido podría circular de otra manera. Como se muestra, otras partes del material de separación/sellado también se deforman por compresión, representado por la reducción en el espesor  $t$  de la capa intermedia 150. En algunas realizaciones, algo
- 55

de la parte 151 del material de separación/sellado que se deforma en el canal 114 se suministra separando/sellando el material desplazado de las áreas que rodean los canales, lo que contribuye a la reducción general del espesor  $t$  de la capa intermedia 150. La parte del material de separación 151 que bloquea el canal, sin embargo, evita que el líquido circule por el canal 114 entre las cavidades que previamente estaban en comunicación fluida.

5 En otra realización, una parte de la(s) primera(s) o segunda(s) capa(s) puede deformarse en el canal para provocar el sellado. Por ejemplo, la primera o segunda capa puede estar compuesta de un material deformable, como silicona, un elastómero o similar. Dicho material puede actuar como un material sellador. O, la primera y/o segunda capa pueden incluir un material que se ablanda sustancialmente después de la aplicación de calor para que el material se deforme en los canales.

10 En algunas realizaciones, las capas adyacentes se comprimen entre sí y el material de una de las capas se comporta como un material sellador y se deforma en el espacio del canal. Como se muestra en la Figura 9C, la actuación apropiada de la primera o segunda capa(s) puede causar el colapso del canal, es decir, la deformación de una parte del material sellador 116 en el espacio que previamente permitía la circulación de líquido a través de él. Dicho colapso evita que el líquido circule a través del canal 114 entre las cavidades. Por consiguiente, el líquido  
15 situado dentro de las cavidades vecinas que previamente habían estado en comunicación fluida ya no puede circular entre las cavidades.

En otra realización, la capa intermedia 150 puede incluir un material de separación distinto 152 y un material sellador 154 para sellar los canales 104 y 114. La Figura 9D representa un ejemplo en el que el material sellador 154 está dispuesto directamente junto a los canales entre el material de separación 152 y el canal 114.

20 La actuación apropiada del material sellador 154 (por ejemplo, la aplicación de fuerza de compresión, calentamiento, fuerza magnética, etc.) puede hacer que una parte del material sellador 154 se deforme en el canal 114 de manera que el líquido no pueda circular a través del canal 114 y entre cavidades. En algunos casos, dicho material sellador 154 puede ser más susceptible a la deformación (por ejemplo, puede tener un umbral de compresión y/o térmico para ablandamiento/deformación más bajo) que el material de separación 152. Por ejemplo, cuando las capas están  
25 sometidas a compresión entre sí (por ejemplo, debido a una fuerza aplicada externamente), para esta realización, la fuerza de compresión aplicada hace que la parte del material sellador 156 se deforme en el canal mientras el material de separación 152 de la capa intermedia 150 permanece en gran medida sin ninguna deformación, en todo caso.

30 En algunas realizaciones, el proceso de sellar los canales es irreversible. Por ejemplo, un material sellador puede ser plásticamente, por lo tanto, deformado permanentemente en el espacio del canal a través del cual el líquido podría circular. Por consiguiente, sin desmontaje del dispositivo microfluídico para eliminar el material sellador de los canales, dicho sellado de canales no es una característica reversible.

Se puede apreciar que los métodos alternativos de actuación pueden hacer que un material sellador se deforme en el canal, sellando la circulación de líquido entre cavidades.

35 Si bien se pueden usar composiciones separadas y distintas como material de separación y material sellador, como se describió anteriormente, la misma composición se puede usar tanto como material de separación como material sellador. Por ejemplo, una capa intermedia 150 puede incluir una membrana compuesta de una composición adecuada (por ejemplo, polímero, cera o combinaciones de los mismos) que puede servir para sellar los canales entre las cavidades (por ejemplo, por deformación en los canales) así como para separar una de otra las cavidades  
40 correspondientes de una cámara de reacción antes de mezclar. O, como también se expuso con referencia a la Figura 9C, una capa que define cavidades y/o canales puede incluir una composición que sirve como material sellador para evitar la circulación de líquido entre las cavidades vecinas.

En algunos casos, cualquier parte de la capa intermedia 150, tal como el material de separación 152 y/o el material sellador 154, puede usarse como adhesivo para unir capas del dispositivo entre sí.

45 Para los casos en que los canales se sellan debido a la deformación de un material sellador en canales vecinos, se puede usar cualquier método adecuado para provocar la deformación. Como se expuso anteriormente, se puede hacer que un material sellador se deforme apropiadamente debido a la compresión de las capas del dispositivo (por ejemplo, compresión aplicada externamente, sujeción/rodadura de las superficies exteriores de la(s) capa(s), aplicando una sonda local a varias zonas, etc.), calentando porciones apropiadas del dispositivo (por ejemplo,  
50 usando una placa térmica, una sonda de calor, un láser, etc.), actuando magnéticamente en algunas zonas del dispositivo, o cualquier otro método adecuado. Se puede apreciar que diferentes zonas del dispositivo pueden activarse selectivamente. Por ejemplo, el calor y/o la compresión pueden dirigirse a determinadas zonas donde se desea el sellado de los canales, en lugar de a toda la superficie del dispositivo.

55 Una vez que las cavidades están selladas entre sí, el material de separación que divide las cavidades correspondientes de cada cámara puede manipularse de manera apropiada para permitir que los ingredientes líquidos 500 y 502 dentro de las cavidades que forman una cámara puedan combinarse. La Figura 10A muestra una realización en la que se crean aberturas en el material de separación que dan como resultado una mezcla 504 de ingredientes líquidos de cavidades correspondientes de cada cámara (mostrada por el sombreado de las cámaras).

En algunas realizaciones, la resistencia del material de separación puede reducirse sustancialmente cuando se somete a un determinado intervalo de temperatura (por ejemplo, por encima de la temperatura ambiente), por ejemplo, entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 100°C, o entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 90°C. Por lo tanto, cuando el dispositivo, o determinadas secciones del material de separación, se calientan a una temperatura elevada, la parte del material de separación que divide cada cámara puede ser propensa a rasgarse (por ejemplo, rasgarse al aplicar una cantidad relativamente pequeña de tensión), permitiendo que los contenidos dentro de las cavidades correspondientes de cada cámara se mezclen.

En algunas realizaciones, el material de separación puede debilitarse adecuadamente durante la fabricación/montaje del dispositivo microfluídico. Por ejemplo, el material de separación puede estar pretensado (por ejemplo, como sería el caso con una película retráctil) o adelgazado antes del montaje de varias partes del dispositivo microfluídico. O, un material de separación que incluye un polímero (por ejemplo, polietileno, poliéster, polipropileno) y/o cera de parafina se puede estirar adecuadamente antes de la unión de las diferentes capas/capas del dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones, el material de separación está unido a diferentes capas adyacentes mientras está en su estado estirado, de modo que el material está bajo tensión en el conjunto. Alternativamente, algunas características que sirven para debilitar el material de separación (por ejemplo, configuraciones de puntuación/corte/perforadas) mientras se conserva la separación del fluido entre las cavidades se pueden añadir en determinados sitios (por ejemplo, zonas que dividen cada cámara en las cavidades correspondientes).

En algunas realizaciones, en virtud de que se comprimen diferentes capas del dispositivo durante el sellado de los canales, el material de separación puede debilitarse en el borde de cada cámara. Por ejemplo, en la Figura 10B, la capa intermedia 150 incluye un material de separación/sellado que sirve para sellar los canales entre cavidades y también para proporcionar una separación de líquido inicial entre las cavidades correspondientes de una cámara de reacción. Cuando los canales entre cavidades están sellados, el material de separación se representa en la Figura 10B al ser relativamente más delgado en las zonas que rodean las cavidades, por ejemplo, debido a la compresión de las capas entre sí, el calentamiento y/o cualquier otro método. Es decir, a medida que partes del material de separación se comprimen durante el sellado de los canales, el material de separación puede hacerse relativamente más delgado en los bordes de las cámaras en comparación con el centro de la cámara donde no se aplica fuerza de compresión. Por consiguiente, el material de separación en el centro de la cámara permanecerá en su espesor original.

Como resultado, el material de separación puede ser más propenso a desgarrarse en los bordes de las cavidades. Por lo tanto, cuando el material de separación se calienta, disuelve, comprime y/o manipula adecuadamente, pueden formarse aberturas en el material de separación (por ejemplo, por desgarro) en las secciones más delgadas/debilitadas cerca de los bordes de las cámaras. Dichas aberturas permiten que los ingredientes líquidos 500 y 502 se combinen formando una mezcla 504, como se muestra además en las Figuras 10C-10F. En algunas realizaciones, una parte desgarrada del material de separación 156 permanece dentro de la cámara.

En algunas realizaciones, para facilitar el rasgado, como se expuso anteriormente, el material de separación se puede estirar antes de la adherencia a las capas primera y segunda. Colocar el material de separación bajo una tensión previa puede permitir la manipulación posterior del material para estirar, rasgar y/o deformar de manera controlada. Para algunos materiales, como la película retráctil, el material puede estirarse durante la fabricación. Por ejemplo, con la aplicación de calor, el material se contrae. Dicha contracción puede facilitar el desgarro del material y también puede servir para ensanchar las aberturas en el material, facilitando una comunicación fluida adicional entre la primera y la segunda cavidad. Alternativamente, si el material de separación está en un estado estirado mientras está unido a diferentes capas adyacentes, se pueden crear aberturas más grandes que las que de otra forma se formarían tras la manipulación apropiada (por ejemplo, calentamiento, disolución). Dicha tensión puede promover aún más el desgarro del material de separación.

Cuando proceda, el material de separación puede estirarse previamente en zonas separadas de algunos canales del dispositivo, o separarse previamente de tantos canales como sea posible, para disminuir la posibilidad de que se formen rasgaduras indeseables a lo largo o sobre canales que romperían el sello entre las cavidades. En algunas realizaciones, la dirección de estiramiento en el material de separación se puede elegir de modo que no se extienda sustancialmente paralela a los canales seleccionados para reducir el plegado/doblado del material en estos canales.

Como se expuso anteriormente, el material de separación puede ser una lámina o membrana continua. Sin embargo, el material de separación también puede incluir una serie de componentes individuales que están separados y son distintos entre sí. Como tal, cada uno de los componentes del material de separación pueden incluir diferentes composiciones de material. Por ejemplo, como se expuso anteriormente, la parte de un material de separación que se encuentra entre las cavidades correspondientes de una cámara puede incluir una composición sensible al calor que es susceptible a la deformación (por ejemplo, desgarro) al exponerse a temperaturas elevadas.

Alternativamente, la parte de un material de separación que se encuentra entre las cavidades correspondientes de una cámara puede incluir una composición reabsorbible (por ejemplo, polietilenglicol, PLA, PLGA, etc.) que puede disolverse, al menos parcialmente, cuando se expone a un ambiente apropiado (por ejemplo, acuoso, disolvente). Por ejemplo, las partes del material de separación pueden ser solubles en algunas soluciones, de modo que al

exponerse a la solución, la parte soluble se disuelve, dejando una abertura entre las cavidades previamente divididas de una cámara de reacción. En algunas realizaciones, la solución que estimula la disolución del material de separación puede ser el ingrediente o ingredientes líquidos suministrados a las propias cavidades. En algunas realizaciones, el material de separación, o partes del mismo, puede ser sustancialmente soluble cuando se expone a determinados líquidos por encima de una determinada temperatura; por lo tanto, el calentamiento del material puede aumentar su solubilidad.

Se puede apreciar que pueden usarse varios tipos diferentes de materiales de separación.

En algunas realizaciones, el material de separación puede incluir una composición adhesiva. Si bien las zonas del material de separación que proporcionan separación de líquidos entre las cavidades correspondientes de una cámara pueden eliminarse, las áreas circundantes del material de separación pueden incluir un adhesivo (por ejemplo, adhesivo de silicona) que ayuda a unir las capas entre sí. Dicho adhesivo también puede circular tras la compresión del dispositivo para sellar los canales.

En algunas realizaciones, el material de separación está incrustado en un material ferromagnético o magnético. Por consiguiente, después de llenar y aislar el líquido de las cavidades, el material de separación puede colocarse bajo un campo magnético externo para crear una tensión que produzca la creación de una abertura en el material de separación que permita combinar los ingredientes líquidos contenidos dentro de las cavidades correspondientes de una cámara.

En algunas realizaciones, puede usarse irradiación con láser para formar aberturas en el material de separación. Por ejemplo, el material de separación puede adaptarse para absorber una mayor intensidad de radiación en un intervalo de longitud de onda determinado (por ejemplo, ultravioleta, infrarrojo, visible) que las longitudes de onda fuera de este intervalo. En algunos casos, el material que define los canales y cavidades (por ejemplo, el material de una capa que tiene el espacio relativo de cavidades y/o canales grabados) puede ser sustancialmente menos absorbente de radiación en longitudes de onda dentro de este intervalo, permitiendo que pase la radiación a través del material sin calentamiento o deformación sustancial. Dicha característica permite que la mayoría de la radiación sea absorbida por el material de separación, en lugar de haber sido atenuada por un material absorbente diferente. En algunos casos, el tratamiento del material de separación con un colorante con una alta relación de absorción dentro de un intervalo de longitud de onda determinado puede impartir al material propiedades de absorción selectiva. Por consiguiente, cuando un material de separación tratado con un colorante sensible a la longitud de onda se expone a la irradiación con láser en un intervalo de longitud de onda correspondiente a la absorción relativamente alta para el material de separación tratado con colorante, pueden formarse aberturas en esas partes del material de separación expuesto a la irradiación con láser.

En diversas realizaciones, el sellado de canales entre cavidades tiene lugar antes de que se creen aberturas entre las cavidades correspondientes de cada cámara. Es decir, después de que las cavidades conectadas de forma fluida definidas por la misma capa se llenen apropiadamente, las cavidades se aíslan de forma fluida una de otra, así como otras cavidades en la misma capa. En algunas realizaciones, dicho aislamiento de líquido de las cavidades tiene lugar antes de la combinación de líquido dentro de las cavidades correspondientes de una cámara. Este orden de proceso puede resultar conveniente porque si se forman aberturas en el material de separación entre las cavidades correspondientes de una cámara antes de que las cavidades vecinas se aíslan de manera fluida entre sí, entonces el líquido de esas cavidades puede filtrarse indeseablemente en las cavidades circundantes.

En algunos casos, el sellado de canales para aislar de manera fluida las cavidades vecinas de la misma capa (por ejemplo, por deformación de un material de separación/sellado) y la creación de aberturas (por ejemplo, desgarro) del material de separación entre las cavidades correspondientes de las diferentes capas pueden ocurrir simultáneamente, o el aislamiento de líquidos puede ocurrir poco después de combinar las cavidades correspondientes de la cámara. Sin embargo, para mitigar la contaminación cruzada de los ingredientes del líquido, el sellado de los canales entre las cavidades de la misma capa ocurriría antes de que los respectivos ingredientes del líquido puedan difundirse o mezclarse indeseablemente en las cavidades vecinas.

Volviendo al ejemplo de la Figura 4, una vez que se forman aberturas en el material de separación de cada cámara para permitir la mezcla de los contenidos de las dos cavidades correspondientes, se crean cincuenta combinaciones separadas de los reactivos suministrados a las respectivas entradas 20 y 30. Para una serie de reacciones de PCR, una vez que se produce la mezcla adecuada, el dispositivo está listo para el ciclo térmico. En este ejemplo, solo se usan tres capas (es decir, la primera capa 100, la segunda capa 110 y la capa intermedia 150) para producir cincuenta combinaciones de reactivos (se puede hacer cualquier conjunto apropiado de combinaciones de reactivos) donde cada cámara también está en aislamiento de líquido de las demás cámaras.

Con una construcción tan sencilla, se puede fabricar fácilmente un dispositivo microfluídico desechable, rápidamente y a bajo coste. En algunas realizaciones, una o más de las capas del dispositivo microfluídico es desechable; o una o más capas pueden ser reutilizables después de un lavado adecuado para eliminar los reactivos/productos residuales.

El dispositivo microfluídico puede incluir, sin limitación, cualquier número apropiado de cámaras de reacción y cavidades correspondientes a cualquier número apropiado de reactivos para combinarse. Por ejemplo, otro formato de cámaras puede incluir 12×96 (1152 cámaras de reacción) o 12×32 (384 cámaras de reacción) conjuntos de cámaras y cavidades. Debe entenderse que este dispositivo puede diseñarse para incluir cualquier número deseado de cámaras y cavidades, correspondiente a cualquier número deseado de muestras de ADN y cualquier solución, ya que la presente descripción no está limitada a este respecto.

Cada cámara y cada cavidad correspondiente a la cámara pueden definir cualquier volumen adecuado. Por ejemplo, el volumen de las cámaras de los dispositivos microfluídicos descritos puede ser inferior a aproximadamente 10 microlitros, inferior a aproximadamente 1 microlitro, inferior a aproximadamente 500 nanolitros, inferior a aproximadamente 200 nanolitros (por ejemplo, aproximadamente 150 nanolitros), inferior a aproximadamente 100 nanolitros, menos de aproximadamente 50 nanolitros, menos de aproximadamente 20 nanolitros, menos de aproximadamente 10 nanolitros, menos de 5 nanolitros, menos de aproximadamente 1 nanolitro, o cualquier otro volumen apropiado. El volumen definido por las cavidades correspondientes a una cámara particular también puede variar. Por consiguiente, el volumen de las cavidades correspondientes de una cámara puede ser aproximadamente igual o puede diferir sustancialmente.

En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico proporciona la capacidad de combinar tres o más reactivos en lugar de dos. Por consiguiente, el dispositivo microfluídico puede construirse en una serie de cámaras donde cada cámara incluye tres o más cavidades correspondientes. Cada una de las cavidades correspondientes puede llenarse, someterse a aislamiento de líquido de las cavidades vecinas, y las cavidades correspondientes que previamente estaban separadas entre sí pueden estar conectadas de manera fluida para permitir la mezcla de los contenidos dentro.

Ejemplos de dispositivos que pueden combinar tres reactivos diferentes dentro de una cámara de reacción se muestran en las Figuras 11A-12B. Sin embargo, puede apreciarse que los dispositivos microfluídicos según la presente descripción pueden configurarse y disponerse para mezclar cualquier número adecuado de reactivos distintos en diferentes combinaciones.

Las Figuras 11A-11B representan una realización de un dispositivo microfluídico que facilita la combinación de tres reactivos diferentes en cada cámara de reacción. En la presente memoria, el dispositivo incluye una primera capa 200, una segunda capa 210 y una tercera capa 220. Mostradas en la Figura 11B, se proporcionan capas intermedias 250, 260 a cada lado de la segunda capa 210; la primera capa intermedia 250 está colocada entre la primera capa 200 y la segunda capa 210, y la segunda capa intermedia 260 está colocada entre la segunda capa 210 y la tercera capa 220.

En esta realización, las cámaras en las que se contempla que ocurran reacciones están formadas por tres cavidades correspondientes a través de tres capas donde cada una de las capas y, por lo tanto, las cavidades están separadas por materiales de separación respectivos antes de conectarse fluidamente.

Como se muestra, la primera capa 200 se forma para incluir varias entradas 20 para llenar cavidades 202 que están en conexión fluida a través de los canales 204. Cada entrada con las cavidades 202 y los canales 204 también está conectada a un venteo 22 para proporcionar el posible rebose del ingrediente líquido y para agotar el exceso de gas.

Además, la primera capa 200 y la segunda capa 210 incluyen entradas 30 y venteos 32 para el suministro apropiado de las cavidades 212 que están en comunicación fluida a través de los canales 214. Las entradas 30 se extienden a través de la primera capa 200 hasta la segunda capa 210, de modo que se pueden agregar ingredientes líquidos apropiados en la superficie de la primera capa 200 desde los depósitos de alimentación de líquido y circular hacia las cavidades y canales de la segunda capa 210.

Además, la primera capa 200, la segunda capa 210 y la tercera capa 220 incluyen las entradas 40 y los venteos 42 para el aporte apropiado de las cavidades 222 que están en comunicación fluida a través de los canales 224. Las entradas 40 se extienden a través de la primera capa 200 a través de la segunda capa 210 y hasta la tercera capa 220, de modo que se pueden agregar ingredientes líquidos apropiados en la superficie de la primera capa 200 desde los depósitos de alimentación de líquido y circular hacia las cavidades de la tercera capa 220.

La vista en sección transversal de la Figura 11B muestra una cámara de reacción 201, indicada por la zona circular discontinua, que tiene las cavidades correspondientes 202, 212, 222 que están inicialmente separadas por las capas 250, 260. En funcionamiento, el ingrediente líquido se aporta a través de la entrada 20 a las cavidades 202 de la primera capa 200. Se aporta ingrediente líquido adicional a través de la entrada 30 a las cavidades 212 de la segunda capa 210. Se aporta ingrediente líquido adicional a través de la entrada 40 a las cavidades 222 de la tercera capa 220. Una vez que las cavidades y canales de cada una de las capas se han aportado adecuadamente con los respectivos ingredientes líquidos, los canales de cada capa se sellan por cualquier método adecuado (por ejemplo, los métodos descritos anteriormente que implican un material sellador), lo que da como resultado el aislamiento con líquido de las cavidades. A continuación, se forman aberturas en el material de separación de las capas 250 y 260 que inicialmente habían dividido las cavidades correspondientes 202, 212, 222. Dichas aberturas permiten que se mezclen los contenidos dentro de esas cavidades correspondientes a la cámara 201.

Las Figuras 12A-12B representan otra realización de un dispositivo microfluídico que puede combinar tres reactivos diferentes en una cámara de reacción. En esta realización, una capa intermedia 350 que incluye un material de separación/sellado está dispuesta entre una primera capa 300 y una segunda capa 310. Similar a la realización mostrada en las Figuras 11A-11B, las cámaras en las que se prevé que ocurran reacciones están formadas por tres cavidades correspondientes. Sin embargo, una de las cavidades correspondientes de cada cámara está definida por la primera capa 300 y las otras dos cavidades están definidas por la segunda capa 310. La capa intermedia 350 se usa para separar las cavidades correspondientes a una cámara, por lo que solo una capa intermedia (que tiene un material de separación/sellado) y dos capas (por ejemplo, capas más rígidas) dispuestas en cada lado se usan para las cámaras de tres cavidades, a diferencia de las dos capas intermedias y las tres capas (por ejemplo, capas que son más rígidas) en una disposición alterna, como se proporciona en la realización de las Figuras 11A-11B.

Como se muestra, las cavidades 302 de la primera capa 300 tienen un volumen mayor que las cavidades 312 y 322 de la segunda capa 310. Puede apreciarse que la forma (por ejemplo, profundidad, contorno, etc.) de las cavidades 302, 312 y 322 puede determinarse adecuadamente para permitir cualquier proporción adecuada de combinación de los diferentes ingredientes líquidos. Se proporcionan varias entradas 20 para llenar las cavidades 302 a través de los canales 304, con venteos 22 asociados para proporcionar el posible rebose del ingrediente líquido y el exceso de gas. La segunda capa 310 incluye entradas 30 y venteos 32 que están dispuestos para suministrar a las cavidades 312, que forman una conexión fluida con los canales 314, con ingrediente líquido. La segunda capa 310 también incluye entradas 40 y venteos 42 que están dispuestas para suministrar a las cavidades 316 a través de canales 318 con ingrediente líquido.

La Figura 12B muestra una vista en sección transversal del dispositivo de la Figura 12A, donde una de las cámaras de reacción 301 está indicada por la zona circular discontinua. La cámara tiene las cavidades correspondientes 302, 312, 316, que están inicialmente separadas por el material de separación de la capa 350. En uso, el ingrediente líquido se proporciona a través de la entrada 20 a las cavidades 302 de la primera capa 300. Se proporciona un ingrediente líquido adicional a través de la entrada 30 a las cavidades 312 de la segunda capa 310. Se proporciona un ingrediente líquido adicional a través de la entrada 40 a las cavidades 316 de la segunda capa 310.

Cuando las cavidades y los canales de cada una de las capas se llenan apropiadamente con los ingredientes líquidos respectivos, los canales de cada capa se sellan por cualquier procedimiento adecuado, dando como resultado el aislamiento de las cavidades. A continuación, se forman aberturas en partes del material de separación que divide las cavidades correspondientes 302, 312, 316 entre sí para permitir que se mezclen los contenidos dentro de las tres cavidades.

Se puede apreciar que las realizaciones de la presente descripción no pretenden ser restrictivas en su configuración o disposición particular. Por consiguiente, se puede combinar cualquier número adecuado de grupos de reactivos, ya que la presente descripción no está limitada a este respecto.

En algunas realizaciones, los canales que conectan cavidades adyacentes se encaminan de tal manera que limitan el área ocupada por los canales en el dispositivo. Por ejemplo, los canales pueden estar dispuestos para incorporar múltiples curvas, lo que permite un control preciso de la distancia de los canales y entre las cavidades. El control sobre la distancia entre canales puede ayudar a controlar la calidad de la unión entre las capas del dispositivo, por ejemplo, al proporcionar espacio para que el material (por ejemplo, material sellador, líquido, etc.) sea desplazado de manera que el material desplazado no interfiera con otros componentes/características del dispositivo.

En algunas realizaciones, las capas que definen canales que están espaciados más juntos pueden presentar una mayor calidad de unión entre capas en comparación con las capas que definen canales que están más separados, por ejemplo, debido al posible rebose de material desde los canales tras la compresión. Es decir, los canales que están espaciados para absorber más material sellador (por ejemplo, más cerca) después de la compresión pueden proporcionar una unión generalmente uniforme entre las capas, mientras que los canales más separados pueden llevar menos material sellador, lo que hace que el material sellador sea más propenso a agruparse, por lo tanto, disminuyendo la calidad general de la unión. Como se expone más adelante, el dispositivo puede incluir espacios adicionales (por ejemplo, cámaras de alivio, cavidades adicionales) que proporcionan espacio en el que pueden ingresar materiales en exceso (por ejemplo, ingrediente líquido, material sellador, aire, etc.).

En algunas realizaciones, varias cavidades del dispositivo están conectadas a una cámara de alivio que funciona para reducir la presión del líquido dentro de las cavidades, particularmente si el dispositivo está comprimido.

La Figura 13A representa una serie de cámaras de alivio 106, en las cuales no se pretende que se produzcan reacciones (por ejemplo, PCR), cada cámara 106 está conectada a una cavidad 102 a través de un canal 108. Cada cámara de alivio 106 tiene un volumen compresible de aire que permanece dentro de la cámara de alivio a medida que el líquido se llena en las cavidades. En algunas realizaciones, la cámara de alivio 106 tiene solo un canal para la entrada y salida de líquido, lo que evita sustancialmente que escape el volumen compresible de aire contenido dentro de la cámara, es decir, la cámara de alivio es efectivamente un callejón sin salida. Por consiguiente, el volumen compresible de aire dentro de las cámaras de alivio proporciona un mecanismo incorporado que disuade el llenado de la(s) cámara(s) de alivio con ingrediente líquido mientras las cavidades 102 se están llenando



inicialmente, pero también proporciona espacio de rebose para el ingrediente líquido desde las cavidades 102 tras la compresión del dispositivo.

5 En realizaciones en las que las capas del dispositivo se comprimen entre sí de manera que los canales del dispositivo se sellan con un material sellador, el volumen dentro de las cavidades se puede reducir, dejando menos espacio de ocupación para el líquido dentro de las cavidades. Para una cavidad 102 conectada a una cámara de alivio 106 y llena de ingrediente líquido, durante la compresión, un exceso de líquido puede desbordarse de la cavidad 102 a la cámara de alivio 106. La capacidad para que el exceso de volumen de líquido se desborde desde la cavidad hacia la cámara de alivio comprime el aire situado dentro de la cámara de alivio, pero también permite que se produzca la reducción de la presión y/o la acumulación de resistencia dentro del dispositivo.

10 En algunas realizaciones, la profundidad de los canales puede afectar si un sello se forma adecuadamente dentro de un canal que de otra manera conecta fluidamente las cavidades vecinas. Cuando el dispositivo está sometido a una tensión por compresión aplicada externamente, es más probable que un canal poco profundo dé como resultado un sello formado adecuadamente que evite la circulación de líquido en su interior en comparación con un canal más profundo. Es decir, se requiere relativamente menos deformación (por ejemplo, proporcionada por la compresión aplicada) del material sellador para crear un sellado adecuado en un espacio más pequeño, lo que permite un alto grado de control del sellado del canal. Por consiguiente, la profundidad de los canales puede diseñarse para favorecer o disuadir el sellado.

20 En algunas realizaciones, los canales que conectan las cavidades con otras cavidades pueden ser más profundos que los canales que están más cerca de los depósitos de la alimentación de líquido o aquellos que conectan las cavidades con las cámaras de alivio de presión. Por consiguiente, los canales que conectan las cavidades entre sí pueden sellarse más fácilmente que los canales que están conectados a otras características del dispositivo.

25 En algunas realizaciones, la profundidad del canal puede variar a lo largo del mismo canal. Por ejemplo, un canal que conecta la primera cavidad a lo largo de un canal con un depósito de alimentación de líquido en un subconjunto de cavidades puede requerir que se forme un sellado especialmente hermético cerca de la cavidad, pero dicho sello hermético podría no ser necesario más cerca del depósito de alimentación de líquido. Como resultado, la zona del canal más cercano a la cavidad puede ser más superficial que la zona del canal más cercano al depósito de la alimentación de líquido. O, en algunas realizaciones, las zonas más profundas de un canal pueden permanecer sustancialmente sin llenar por un material sellador tras la compresión del dispositivo, y las áreas menos profundas pueden quedar obstruidas y llenas por el material sellador tras la compresión del dispositivo.

30 Los canales que requieren sellado pueden tener una cantidad suficiente de material sellador situado alrededor o si no cerca de los canales para que una cantidad suficiente de material sellador pueda deformarse en los canales durante la actuación del sellado (por ejemplo, compresión y/o calentamiento). Por consiguiente, los canales de sellado, como los que conectan fluidamente las cavidades entre sí, pueden construirse para que sean más largos o están lejos de otras características (por ejemplo, depósitos de alimentación de líquido, cámaras de alivio) para que haya más material sellador disponible para deformarse en los canales. Y para los canales donde no es preferible el sellado, como aquellos que conectan cavidades con cámaras de alivio, los canales pueden ser relativamente cortos y profundos para que el sellado de estos canales no se produzca tan fácilmente.

40 En algunas realizaciones, el dispositivo puede formarse para que incluya más cavidades, o bolsillos, en posiciones apropiadas que están dispuestas para recoger el exceso de líquido y/o material sellador que puede desplazarse de varias cavidades o canales durante el calentamiento y/o compresión del dispositivo. Dichas cavidades adicionales generalmente no están destinadas a albergar una reacción, y pueden conectarse a venteos para permanecer sin presión después de las etapas de compresión/calentamiento del dispositivo. Otras cavidades pueden estar situadas en zonas del dispositivo que de otro modo se llenarían parcial o completamente con material sellador, por ejemplo, cavidades o canales en el borde de un conjunto donde es más probable que se produzca un rebose.

45 La Figura 13B muestra cavidades adicionales 103, 105 del dispositivo que pueden ser adecuadas para recoger el material sellador en exceso. Por ejemplo, la cavidad adicional 103 puede acumular material sellador en exceso que se desborda como resultado de la compresión de la zona entre un borde del dispositivo y la cavidad. Las cavidades adicionales 105 situadas entre depósitos de entrada de líquido pueden ser adecuadas para recoger el material sellador en exceso resultante de la compresión de la zona entre una cavidad y los depósitos de entrada de líquido, o los venteos.

55 En algunas realizaciones, las interfases del dispositivo pueden proporcionar una transición suave de circulación de líquido entre canales y cavidades. Por ejemplo, la Figura 14 muestra la interfase gradual 107 entre canales y cavidades que son redondeadas, lo que permite que el líquido circule uniformemente entre canales y cavidades. De lo contrario, las esquinas agudas entre canales y cavidades pueden provocar un aumento general de la resistencia a la circulación del líquido dentro del dispositivo, por ejemplo, debido a la resistencia capilar por la tensión superficial del líquido o al flujo turbulento de líquido.

En algunos casos, las interfaces suaves entre canales y cavidades pueden reducir la presión general requerida para que el líquido llene las cavidades. Lo que es más, las interfases suaves entre canales y cavidades pueden permitir que los canales se llenen más fácilmente con material sellador de lo que surgiría de una interfase más nítida.

5 En algunas realizaciones, el dispositivo puede incluir una o más protuberancias, tales como costillas, inserciones, bultos, rebordes, etc., que reducen eficazmente la cantidad de fuerza de compresión que de otro modo se requeriría para sellar los canales apropiados. Dichas protuberancias pueden, por ejemplo, estar dispuestas en alineación con los canales de modo que, tras la aplicación de la fuerza de compresión, los esfuerzos de compresión se concentren en las zonas del canal para facilitar mejor el sellado de los canales.

10 Esta concentración de tensión puede facilitar la deformación del material sellador en la zona o zonas apropiadas, lo que da como resultado que el material sellador sea forzado a entrar en los canales. Es decir, las protuberancias pueden reducir la fuerza de compresión global requerida para sellar las cavidades. Durante la compresión, esta disposición también puede dar como resultado una menor cantidad de tensiones de compresión en zonas distintas a los canales que de otra manera estarían presentes, como las zonas sobre la cavidad. Por consiguiente, al mitigar las concentraciones de tensión de compresión en zonas tales como las zonas sobre la cavidad, se reduce la cantidad  
15 total de rebose/desplazamiento de líquido a otras áreas del dispositivo debido a la compresión.

En algunas realizaciones, dichas protuberancias pueden estar integradas con el material sellador o en contacto con el material sellador. Alternativamente, las protuberancias pueden ser parte de una o más capas del dispositivo. O bien, las protuberancias pueden formar parte de un dispositivo/componente externo que puede utilizarse para comprimir capas del dispositivo. Por ejemplo, las protuberancias pueden estar incluidas como parte de un conjunto de termociclador, o una capa completamente separada que se usa principalmente para deformar el material sellador.  
20

Como se expuso anteriormente, una vez que los canales del dispositivo microfluídico están sellados de manera que las cavidades están aisladas y los contenidos de las cavidades correspondientes de cada cámara se pueden mezclar, se puede iniciar un proceso de reacción. En algunos casos, una vez que se combinan los reactivos, la reacción tiene lugar inmediatamente. En otros casos, se produce una secuencia de ciclo térmico para iniciar varias partes de la reacción, como en el caso de la PCR.  
25

Una vez que se completan las reacciones deseadas, se recogen los resultados. Un método preferido para recopilar los resultados es a través de técnicas ópticas. La recogida óptica puede realizarse usando cualquier método adecuado, tal como a través de absorbancia, fluorescencia y/o luminiscencia de los contenidos de las cámaras de reacción. O bien, cada cámara puede tomar una imagen por microscopía y un operador puede observar manualmente las características específicas que resultan de las reacciones dentro de las cámaras.  
30

En el contexto de la PCR, una vez que se combinan los reactivos, el dispositivo microfluídico estaría sometido a ciclos térmicos. En algunos casos, cuando proceda, el termociclador puede ser el mismo dispositivo que proporciona calor y/o presión de compresión al dispositivo para sellar los canales y deformar (por ejemplo, rasgar) los materiales de separación/sellado.

35 Por consiguiente, un usuario podría llenar el dispositivo con los reactivos apropiados, los pasos de aislamiento de la cavidad y la combinación de ingredientes líquidos juntos que se separaron inicialmente se pueden realizar (manual o automáticamente), y el dispositivo con los reactivos combinados puede estar sometido a ciclos térmicos (inmediatamente o después de un determinado período de tiempo).

40 En algunas realizaciones, el termociclador proporcionaría la sujeción de las capas del dispositivo microfluídico juntas para dar como resultado un buen contacto térmico y, por lo tanto, ajustes rápidos y sensibles de temperatura de forma fiable. Dicha sujeción también puede proporcionar una cantidad adecuada de compresión aplicada externamente, por ejemplo, para sellar los canales entre cavidades.

45 La realización ilustrada en la Figura 15 representa un dispositivo microfluídico 10 colocado entre las placas de sujeción 600 y 610 de un termociclador. Debajo de la placa 610, hay un elemento termoeléctrico 620 y un disipador de calor 630, que proporciona control de temperatura al sistema.

50 En algunas realizaciones, para sellar los canales, el termociclador proporciona fuerza de compresión aplicada por las placas de sujeción 600 y 610 y/o un aumento de la temperatura del dispositivo 10, o porciones del dispositivo. Sin embargo, en algunas realizaciones, en esta etapa, la temperatura no sería lo suficientemente alta como para producir el desgarro del material de separación. Una vez que los canales están sellados, el termociclador puede aumentar aún más la temperatura para producir la formación de aberturas en el material de separación. Una vez que se forman las aberturas en el material de separación, se combinan los reactivos contenidos dentro de las cavidades correspondientes de cada cámara. Una vez que los reactivos se combinan adecuadamente, el dispositivo está sometido a ciclos térmicos apropiados para que proceda la PCR.

55 En algunos casos, el ciclo térmico está precedido por un período de tiempo (por ejemplo, entre 1 y 15 minutos) de exposición a altas temperaturas para activar la enzima de la PCR. Los reactivos se pueden ciclar entre dos o más intervalos de temperatura apropiados para la PCR. Normalmente, la cantidad de ADN diana se duplica al final de cada ciclo.

La detección por PCR se puede realizar de varias maneras. Por ejemplo, en la PCR de punto final, el dispositivo se somete a varios ciclos térmicos, y después de que se completa el ciclo térmico, se mide la fluorescencia de cada cámara de reacción. En la PCR en tiempo real, la fluorescencia de cada cámara se mide periódicamente durante o después de los ciclos, lo que permite cuantificar la cantidad de ADN en cada cámara en tiempo real.

- 5 Para la detección por PCR de punto final, el conjunto de detección óptica puede estar completamente separado del conjunto de ciclo térmico. Por lo tanto, el dispositivo se puede mover desde el termociclador al conjunto de detección óptica después de que se complete el ciclo térmico.

10 Para la detección por PCR en tiempo real, se puede combinar un conjunto de detección óptica con el conjunto de ciclo térmico lo que permite analizar el dispositivo sin tener que extraerlo del termociclador. En algunas realizaciones, la placa de sujeción del termociclador puede ser translúcida para permitir que las reacciones se midan ópticamente sin tener que retirar la abrazadera.

15 En algunas realizaciones, los dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria pueden usarse para la PCR digital donde se cuantifica la cantidad de ADN en una muestra. Como se expuso anteriormente, en la PCR digital, una muestra de ADN se divide en una gran cantidad de partes alícuotas separadas. Una vez que el volumen de la muestra se divide en varias alícuotas, se amplifica por PCR, y la cantidad de ADN de la muestra original se puede calcular contando el número de alícuotas que han experimentado un crecimiento exponencial por PCR. El análisis por PCR digital es un proceso binario en el que una alícuota se somete a PCR porque al menos una molécula de ADN objetivo estaba presente dentro de la alícuota, o la alícuota no se somete a PCR porque no había ADN objetivo dentro de la alícuota. Por lo tanto, la concentración original de ADN (por ejemplo, antes de la dilución) puede determinarse basándose en una distribución calculada (por ejemplo, distribución de Poisson) de alícuotas positivas y negativas.

20 Para la PCR digital, las muestras comparten las mismas soluciones de mezcla patrón y cebador, ya que el objetivo de la PCR digital es utilizar un gran número de alícuotas en las que se proporcionan volúmenes de muestra de ADN, para determinar cuántas moléculas de ADN estaban presentes en un original muestra. Por consiguiente, no es necesario combinar diferentes soluciones de cebador con cada muestra, como suele ser el caso en la PCR no digital.

25 En una realización de un dispositivo microfluídico que puede usarse para PCR digital, que se muestra en las Figuras 16A-16C, el dispositivo microfluídico 10 comprende una primera capa 100, una segunda capa 110 y una capa intermedia 150 intercalada entre las capas. La primera capa 100 comprende una serie de cavidades 102, canales 104, entradas 20 y venteos 22. En esta realización, cada cámara de reacción incluye una sola cavidad, ya que la segunda capa 110 es un material sin canales o cavidades definidas en la misma. Aunque no pretende ser restrictiva, la primera y/o la segunda capa(s) pueden incluir un material más rígido (por ejemplo, relativamente rígido en comparación) que el material de la capa intermedia. Alternativamente, en algunas realizaciones, el material de la capa intermedia es más rígido que el material que constituye la primera y/o segunda capa. La capa intermedia 150 incluye un material sellador que está junto a cada uno de los canales 104 de la primera capa 100.

30 Aunque no es necesario, las cavidades 102 y los canales 104 se dividen además en subconjuntos que están cada uno conectado de manera fluida a una entrada respectiva 20. Por consiguiente, se puede suministrar el mismo ingrediente líquido o ingredientes líquidos diferentes a cada entrada y las cavidades asociadas con cada entrada. En algunas realizaciones, un dispositivo microfluídico adecuado para PCR digital puede incluir una sola entrada que suministra un ingrediente líquido a todas las cavidades del dispositivo a través de una red apropiada de canales interconectados entre sí y con las cavidades.

35 El material sellador está dispuesto para deformarse en los canales tras un accionamiento apropiado (por ejemplo, compresión, calentamiento, etc.) según cualquier manera adecuada para proporcionar aislamiento de líquido entre las cavidades 102. Como se muestra en la Figura 16B, antes del accionamiento apropiado del dispositivo, los canales 104 permiten la circulación de líquido entre las cavidades 102. Sin embargo, después del accionamiento, los canales 104 están sellados, lo que hace que las cavidades 102 estén aisladas de forma fluida, como se muestra en la Figura 16C. Un experto en la materia apreciaría que se puede usar cualquier método adecuado para provocar el aislamiento de las cavidades con líquidos, por ejemplo, los métodos descritos e ilustrados con respecto a las Figuras 9B-9D u otras técnicas que no se muestran explícitamente.

40 Otra realización de un dispositivo microfluídico que puede usarse para PCR digital se muestra en las Figuras 17A-17C. El dispositivo microfluídico incluye una primera capa 100 y una segunda capa 110. La primera capa 100 incluye una serie de cavidades 102, canales 104, entradas 20 y venteos 22. La segunda capa 110 en esta realización es similar a la capa intermedia 150 mostrada en las Figuras 16A-16C en que la segunda capa incluye un material sellador que rodea cada uno de los canales 104 de la primera capa 100.

45 Como se muestra en la Figura 17B, antes del accionamiento (por ejemplo, compresión y/o calentamiento) del dispositivo, los canales 104 permiten la circulación de líquido entre las cavidades 102. Sin embargo, después del accionamiento, los canales 104 están sellados, lo que hace que las cavidades 102 estén aisladas de forma fluida, como se muestra en la Figura 17C.

En algunas realizaciones, el material sellador de la segunda capa 150 puede incluir un material adhesivo dispuesto sobre un sustrato (por ejemplo, soporte de plástico). Alternativamente, esta capa puede estar dispuesta sobre la primera capa 100, o puede estar compuesta de una membrana continua.

5 Se puede apreciar que para las realizaciones según la presente descripción, no se requiere que el material sellador sea una capa monolítica continua, ni es necesario que tenga las mismas dimensiones externas que la primera capa en la que se definen las cavidades. Se puede apreciar que no se requiere que las capas del dispositivo, incluido el material sellador, tengan dimensiones donde las capas se alinean. Tampoco se requiere que la capa que define las cavidades esté por encima o por debajo del material sellador.

10 Por lo tanto, en esta realización, una vez las cavidades se llenan con una solución de muestra de ADN adecuada, la capa 150 se somete a calentamiento y/o compresión. Se puede apreciar que no se requiere que el material sellador sea una capa continua, ya que el material sellador puede incluir varios componentes separados.

15 Como se expuso anteriormente, los dispositivos microfluídicos descritos en el presente documento pueden incluir, o pueden participar con otro dispositivo/componente con, protuberancias que mejoran los efectos de la compresión en lugares seleccionados. Las protuberancias pueden ser proyecciones estructurales que se extienden/sobresalen hacia afuera desde una capa. En algunas realizaciones, las protuberancias pueden tener al menos una dimensión que se extiende a lo largo del plano paralelo a la capa que es menor que la dimensión respectiva de las cavidades del dispositivo. Por ejemplo, la relación del ancho  $w_c$ , de una cavidad al ancho  $w_p$  de una protuberancia puede estar entre 1 y 8, entre 1,5 y 5, o entre 2 y 4.

20 En algunas realizaciones, pueden proporcionarse protuberancias en alineación con determinadas zonas de canales de modo que cuando el dispositivo global se comprime, las protuberancias proporcionan una mayor cantidad de tensión a las zonas de canales en comparación con otras zonas que no están alineadas con las protuberancias. Si bien la inclusión de protuberancias en algunas zonas puede proporcionar un mayor grado de tensión de compresión en esas zonas (por ejemplo, regiones de canales a sellar), la ausencia de protuberancias en otras zonas puede producir una reducción efectiva de la tensión de compresión que podría de lo contrario, ocurrir en zonas donde se espera que ocurran reacciones (por ejemplo, cavidades, cámaras). Mitigar el estrés compresivo en zonas donde se espera que ocurran reacciones puede ser beneficioso para reducir la cantidad total de líquido desplazado por la compresión, y además reduce la presión general que actúa en las zonas selladas.

25 Las Figuras 18A-18B representan una realización de un dispositivo microfluídico 10 similar al que se muestra en las Figuras 1-4, sin embargo, incluye una capa adicional 160 que tiene protuberancias 162 que proporcionan una compresión mejorada en algunas zonas de canal del dispositivo. Como se muestra en la Figura 18B, las protuberancias 162 están alineadas con los canales 114 de la segunda capa 110 y los canales 104 de la primera capa 100, de modo que al comprimir las capas del dispositivo 10 juntas, por lo tanto presionando las protuberancias hacia los canales 104 y 114, los canales están sometidos a un mayor grado de tensión de compresión que, por ejemplo, las cavidades 102 y 112. Por consiguiente, las protuberancias permiten que los canales 104 y 114 se sellen más fácilmente, es decir, se necesita menos fuerza de compresión aplicada externamente para los canales 104 y 114 para ser sellado de lo que se requeriría si las protuberancias alineadas no estuvieran presentes. Además, se muestra que el ancho  $w_p$  de las protuberancias es menor que el ancho  $w_c$  de las cavidades.

30 Dichas protuberancias (por ejemplo, costillas, bultos, rebordes, proyecciones estampadas, etc.) para mejorar las tensiones de compresión se pueden estampar de cualquier manera adecuada. Como se expuso anteriormente, las protuberancias pueden ser parte del propio dispositivo microfluídico, un aparato de ciclado térmico separado, y/o pueden ser una capa/componente separado que se usa principalmente para la compresión. Alternativamente, se pueden formar protuberancias apropiadas en la superficie de cualquiera de las capas del dispositivo (por ejemplo, en un material de separación/sellado, en zonas apropiadas de una capa que define cavidades y/o canales, etc.).

35 Las Figuras 19A-19B muestran una realización de un dispositivo microfluídico 10 similar al ilustrado en las Figuras 16A-16C, sin embargo, incluye una capa adicional 160 que tiene protuberancias 162 que proporcionan una compresión mejorada en las zonas de canales del dispositivo.

40 Las Figuras 20A-20B representan una realización de un dispositivo microfluídico 10 similar al ilustrado en las Figuras 17A-17C sin embargo, también se incluye la capa adicional 160 que tiene protuberancias 162 que proporcionan una compresión mejorada. En la presente memoria, durante la compresión, las protuberancias 162 se colocan en contacto directo con el material sellador de la capa 150.

45 En algunas realizaciones, un material sellador puede comprimirse selectivamente para crear varias cavidades de reacción. Por ejemplo, los canales definidos por una capa pueden llenarse con un ingrediente líquido y un material sellador puede activarse de una manera que da como resultado la división del canal en cavidades de reacción que están aisladas de manera fluida entre sí.

50 En una realización mostrada en la Figura 21, las cavidades de reacción pueden formarse deformando el material sellador de la capa 150 en los canales 104 definidos por la primera capa 100 a intervalos a lo largo del canal; accionado por compresión, calor o una combinación de calor y compresión del dispositivo. La capa adicional 160, que puede ser, por ejemplo, parte del dispositivo, parte de un sistema de compresión externo o parte de un

5 dispositivo de ciclo térmico en el que se calienta el dispositivo microfluídico, contiene una serie de protuberancias 162 que dividen los canales en longitudes adecuadas, creando cavidades correspondientes a los volúmenes deseados de ingrediente líquido. En algunas realizaciones, dichas protuberancias 162 puede adaptarse para penetrar en el canal con el material sellador. O, las protuberancias pueden permanecer fuera del espacio inicialmente definido por el canal mientras se deforma adecuadamente el material sellador en el canal o canales. Alternativamente, dichas protuberancias pueden formarse en el material sellador 150, o la primera capa 100.

10 Como se expuso anteriormente, el material sellador puede incluir cualquier composición adecuada. En algunas realizaciones, el material sellador puede ser un adhesivo, por ejemplo, un adhesivo de fusión en caliente, adhesivo acrílico u otro material adhesivo apropiado, colocado sobre un soporte de plástico. Alternativamente, el material sellador puede ser una cera, elastómero u otro material relativamente deformable.

15 Dicho material sellador puede proporcionarse como una cinta adhesiva normal (por ejemplo, cinta de embalaje), lo que permite un montaje de dispositivo relativamente simple. Por consiguiente, para algunas realizaciones, una primera capa moldeada puede definir varios canales (con cavidades opcionales), pozos de entrada y orificios de venteo. Se puede unir un trozo de cinta a la capa moldeada, cubriendo los canales (y las cavidades opcionales) y el dispositivo estaría esencialmente listo para usar.

20 La realización del dispositivo microfluídico 10 mostrado en las Figuras 22A-22C es similar a la de la Figura 21 excepto que la capa adicional 160 incluye protuberancias 162 que se forman como rebordes alargados. Los rebordes alargados se proporcionan para controlar la compresión selectiva del material sellador y están dispuestas para extenderse sustancialmente perpendiculares a los canales 104. Por consiguiente, cuando el dispositivo está sometido a compresión, los rebordes actúan para concentrar la fuerza de compresión de una manera que produce la deformación del material sellador en los canales para definir una serie de cavidades de reacción en aislamiento de líquido entre sí, así como cualquier depósito de alimentación de líquido.

25 La Figura 22B muestra el dispositivo antes de la compresión donde se permite que circule líquido a través del canal 104 y las cavidades aún no se han formado. Es decir, en dicha realización, no están las cavidades formadas previamente, antes de la compresión del material sellador. Tras la compresión, las protuberancias 162 se presionan dentro del material sellador de la capa 150 dando como resultado la división del canal en las cavidades 102, mostradas en la Figura 22C. Las cavidades 102 resultantes están en aislamiento de líquido, proporcionando que las reacciones individuales (por ejemplo, PCR) se produzcan en cada una. Como se muestra, aunque no es necesario, el ancho  $w_p$  de las protuberancias es menor que el ancho  $w_c$  de las cavidades resultantes.

30 Las cavidades resultantes en las que las reacciones pueden ocurrir separadas de otras cavidades pueden definir cualquier longitud adecuada correspondiente a cualquier volumen deseado de ingrediente líquido. Como resultado, el uso de protuberancias para formar cavidades separadas en las que pueden ocurrir reacciones tiene ventajas al permitir la fabricación y el montaje simples de un dispositivo microfluídico 10 que no requiere un esfuerzo sustancial para alinear varios componentes/capas del dispositivo.

35 Por consiguiente, un material sellador adecuado puede deformarse en el espacio de los canales a través del cual el líquido podría circular si no y puede además dar como resultado una división adecuada del canal en cavidades dentro de las cuales pueden ocurrir reacciones independientes. Esta deformación puede ser plástica, por lo tanto, de naturaleza permanente. Por lo tanto, sin desmontaje del dispositivo microfluídico para eliminar el material sellador de los canales, dicho sellado de canales es irreversible.

40 Se puede apreciar que varios aspectos del sellado descritos en la presente memoria son aplicables para diferentes aplicaciones, tales como PCR digital y no digital, y/o división de canales en cavidades separadas. Como se muestra en la Figura 23, el dispositivo microfluídico también puede comprimirse con un rodillo. Por ejemplo, puede proporcionarse un rodillo 170 para desplazarse a lo largo de los canales 104 (por ejemplo, mostrado por la dirección indicada por las flechas punteadas) dando como resultado una deformación en serie del material sellador y sellado de los canales 104 y cavidades 102 conectadas por los canales. Este método puede tener ventajas porque el rodillo funcionaría eficazmente para desplazar progresivamente el líquido desde cada cavidad o canal que se comprime hacia la siguiente cavidad sin comprimir o hacia afuera a través de la venteo.

45 Como se ilustra en la Figura 23, a medida que el rodillo 170 se mueve y comprime el canal 104, el exceso de material (por ejemplo, ingrediente líquido, aire) que fluye desde el canal 104 y las cavidades 102 se desplaza a las cavidades y canales vecinos hasta que el material en exceso se ventea o se contiene en un cavidad adicional y/o cámara de alivio. Este desplazamiento secuencial reduciría la presión general que de otro modo se produciría en las cavidades y canales debido a la compresión del ingrediente líquido, y por lo tanto produciría un sellado más fuerte de los canales.

50 Los dispositivos de la presente descripción pueden servir para PCR digital y/o PCR no digital. Si bien los dispositivos ilustrados por las figuras se representan con relativamente pocas cavidades/alícuotas, puede apreciarse que se puede organizar cualquier número apropiado de cavidades/alícuotas. Por ejemplo, los dispositivos utilizados para la PCR digital pueden formar 100-10.000 partes alícuotas por entrada de muestra. En general, cuanto mayor es

el número de particiones para una aplicación de PCR digital, mayor es el intervalo dinámico y, por lo tanto, mejor la precisión estadística de cuantificación de la muestra.

5 El dispositivo microfluídico puede proporcionar cualquier volumen adecuado para cada cavidad/alícuota. En algunas realizaciones, un intervalo adecuado de volumen por partición (por ejemplo, formando cavidades de reacción) puede estar comprendido entre 10 picolitros y 300 nanolitros, entre 500 picolitros y 200 nanolitros, o entre 1 nanolitro y 100 nanolitros. Con la capacidad de producir una gran cantidad de alícuotas, el volumen de cada alícuota puede disminuirse para reducir la cantidad de reactivos necesarios y, por lo tanto, el coste total.

10 La PCR digital presenta varias ventajas sobre la PCR cuantitativa. Dado que la reacción no necesita ser representada mediante el procedimiento de amplificación, sino que solamente se representa una vez se completa la ciclación, no es necesario proporcionar un sistema que combine el uso de un dispositivo de ciclación térmica junto con un dispositivo de impresión fluorescente. Además, la PCR digital puede proporcionar resultados que no son más precisos que la PCR cuantitativa, ya que no es sensible a pequeños cambios que pueden afectar la eficiencia general de la reacción PCR.

15 La presente descripción se refiere a dispositivos microfluídicos que proporcionan la separación de un único ingrediente líquido en muchas divisiones aisladas de manera fluida, económica y eficientemente. Por ejemplo, en un laboratorio, un usuario que necesita realizar el mismo experimento muchas veces con la misma solución (por ejemplo, amplificación y detección de ácidos nucleicos por PCR digital) puede llevar a cabo fácilmente realizaciones de dispositivos microfluídicos expuestas en la presente memoria para lograr este objetivo.

20 Según varias realizaciones, se proporciona un dispositivo microfluídico para separar un único ingrediente líquido en muchas divisiones aisladas de manera fluida. Una primera superficie puede definir uno o más grupos de cavidades (por ejemplo, lado inferior/fondo) de una primera capa, conectada por uno o más canales también definidos, al menos en parte, por una primera superficie. Los canales pueden estar conectados además a un pozo de venteo en un pozo de entrada. Puede proporcionarse una segunda capa (por ejemplo, material sellador), colocarse junto a la primera superficie de la primera capa, proporcionando un límite para los canales a cara descubierta de otra manera y cavidades. La compresión de la segunda capa en la primera capa puede producir deformación irreversible de la segunda capa en los canales, ocluyendo permanentemente por esto el gran número de cavidades de más entrada o salida de líquido.

25 Según algunas realizaciones de la presente descripción, un gran número de cavidades pueden ser conectadas un gran número de canales alimentados por una sola entrada de líquido y conectados a una sola salida de líquido. En algunas realizaciones, el gran número de canales puede estar orientado en paralelo.

30 Según algunas realizaciones de la presente descripción, el dispositivo puede comprender además una segunda superficie (por ejemplo, cara más alta/superior) en la primera capa, que puede comprender una cara posterior al dispositivo. En algunas realizaciones, la cara posterior puede contener pozos de entrada y de venteo, estando conectados dichos pozos a los canales y cavidades definidos por la primera superficie en la otra cara de la otra capa por orificios que pasan a través de la primera capa.

35 Según algunas realizaciones, la segunda capa puede deformarse dentro de los canales conectando cavidades adyacentes. En algunas realizaciones, esta deformación es permanente e irreversible sin destrucción sustancial del conjunto. Esta deformación puede realizarse sucesivamente a lo largo del canal (por ejemplo, en la dirección del flujo del líquido en el canal) conectando cavidades adyacentes. Sellando y aislando cada cavidad sucesivamente puede permitirse que el exceso de aire y líquido se dirija hacia la salida del líquido, evitando que aumente el exceso de presión desde dentro de la cavidad que puede dar lugar indeseablemente a que los canales bloqueados que conectan la cavidad con cavidades adyacentes se desbloqueen. En algunas realizaciones, esta deformación puede hacerse con un rodillo dispuesto de manera que aplique sucesivamente la presión a la segunda capa a lo largo del canal que conecta numerosas cavidades de manera que las cavidades están aisladas con líquido en serie una tras otra.

40 Según aún otras realizaciones, se proporciona un método de división de una muestra de líquido en un gran número de cavidades aisladas con líquido. El método comprende la etapa de proporcionar un conjunto que contiene un gran número de cavidades conectadas por al menos un canal definido por una primera superficie de una primera capa y que contiene una segunda capa colocada junto a la primera superficie de la primera capa.

45 El método puede comprender además, según algunas realizaciones, las etapas de llenado de gran número de cavidades y de dividir las. En algunas realizaciones, la etapa de alimentación puede comprender depositar una muestra de líquido en un pozo de entrada. Preferiblemente, el pozo de entrada puede estar situado en un extremo del canal que conecta las numerosas cavidades, y el otro extremo del canal puede terminar en un pozo de venteo. La etapa de llenado puede comprender además la utilización de una pipeta o de un dispositivo automático para manipulación de líquido.

50 La etapa de división puede comprender además una segunda capa adyacente a la primera superficie. En una realización preferida, la segunda capa comprende un adhesivo. La segunda capa puede estar deformada

irreversiblemente en los canales que conectan las numerosas cavidades para ocluir las permanentemente de la entrada de más líquido.

5 La etapa de llenado puede comprender además el dispositivo de entrada de más líquido con una capa que sella la entrada y los pozos de venteo. La entrada y los pozos de venteo pueden sellarse usando un sello de placa u otro adhesivo adecuado. El sellado del dispositivo puede evitar además la contaminación del dispositivo, de cualquier equipo utilizado junto con el dispositivo y del área de trabajo que rodea al dispositivo.

10 Aspectos de la presente descripción proporcionan plan(es) y/o técnica(s) para preparar el procedimiento de división de un ingrediente líquido en cavidades separadas aisladas con fluidez rápida y eficientemente. Puede apreciarse que los dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria pueden comprender cualquier número adecuado de capas, componentes, materiales para separación, materiales selladores, adhesivos, etc., en cualquier disposición o configuración apropiada, y que determinados ejemplos de la presente descripción no pretenden ser restrictivos.

15 La Figura 24 representa una vista en sección transversal de una realización de una primera capa 100 de un dispositivo microfluídico, que tiene numerosas cavidades 12. El gran número de cavidades 12 está conectado a un pozo de entrada 20 por un canal de alimentación 14, y a un pozo de venteo 22 por un canal de salida 16. El pozo de entrada 20 y el canal de alimentación 14 permiten el llenado de las cavidades 12 con un ingrediente líquido, y el pozo de venteo 22 y el canal de salida 16 permiten la salida de presión y el ingrediente líquido en exceso.

20 En algunas realizaciones, como se muestra en la Figura 25 un canal de restricción 18 puede estar situado entre un canal de alimentación 30 y el canal de salida 16. El canal de restricción 18 puede estar caracterizado por tener un área de sección transversal reducida en relación con el canal de alimentación y/o el canal de salida. Esta longitud de canal con área de sección transversal reducida puede servir para restringir la velocidad de flujo del fluido a través del aparato para permitir los canales entre las cavidades 12, y a las propias cavidades, llenar de manera generalmente uniforme aunque a presión desde un pozo de entrada 20. De otra manera, sin el canal de restricción, en algunos casos, el flujo de fluido a través del aparato sería demasiado rápido y algunas cavidades se llenarían más rápido que otras, lo que conduciría al desperdicio del ingrediente líquido ya que el líquido procedente de las cavidades de llenado más rápido se derramaría o fugaría hacia la salida.

30 La Figura 25 representa una vista en planta superior una realización que muestra una disposición de canales 14 y 16, pozo de entrada y venteo 20 y 22 y gran número de cavidades 12. Como se expuso anteriormente, el gran número de cavidades 12 puede conectarse al canal de salida 16 por un canal de restricción 18, que tiene un área de sección transversal reducida, en comparación con el canal que conecta las cavidades 12 conjuntamente. El canal de restricción 18 puede servir para reducir la velocidad general del flujo de fluido por los canales desde el pozo de entrada 20 hacia el pozo de venteo 22, produciendo menor grado de rebose del gran número de cavidades 12 y derrame de las mismas. Cuando las cavidades son menos propensas al rebose, el ingrediente líquido se conserva mejor.

35 En algunas realizaciones, como se expuso en la presente memoria en la Figura 26, un pozo de entrada 20 puede proporcionar ingrediente líquido a un canal de entrada de alimentación 14 ramificado en múltiples canales de alimentación en paralelo donde cada canal de alimentación, a su vez, alimenta a una o más cavidades 12. Un canal de restricción 18 situado aguas debajo de un canal de alimentación 14 correspondiente puede adaptarse para permitir que el aire salga libremente desde el dispositivo para restringir la circulación de un líquido (por ejemplo, alimentado como ingrediente líquido desde un pozo de entrada).

40 Según varias realizaciones de la presente descripción, el gran número de cavidades puede proporcionarse en un área en gran parte rectangular u otra forma con dimensiones apropiadas. Las cavidades pueden disponerse dentro de un área inferior a 81 milímetros cuadrados. Preferiblemente, los canales que conectan cavidades adyacentes pueden proporcionarse como corriendo paralelos a al menos uno de los bordes del área rectangular.

45 Según se proporciona en la presente memoria, los canales 14 pueden incluir cualquier parte del paso el que puede circular el líquido, por ejemplo, entre un pozo de entrada 20 y un canal de salida 16, o entre dos o más de las cavidades 12. Por lo tanto, un solo canal puede considerarse que incluye varias cavidades en virtud de que las cavidades están en comunicación fluida. Por ejemplo, un canal 14 puede incluir varias columnas 12a y 12b. La columna 12a puede contener cada una de las cavidades 12a<sub>1</sub>, 12a<sub>2</sub>, 12a<sub>3</sub>, 12a<sub>4</sub>, 12a<sub>5</sub>, 12a<sub>6</sub>, 12a<sub>7</sub> y 12a<sub>8</sub>, que están en comunicación fluida. La columna 12b, igualmente, puede contener cada una de las cavidades 12b<sub>1</sub>, 12b<sub>2</sub>, 12b<sub>3</sub>, 12b<sub>4</sub>, 12b<sub>5</sub>, 12b<sub>6</sub>, 12b<sub>7</sub> y 12b<sub>8</sub>, que están también en comunicación fluida. Por consiguiente, el canal 14 puede considerarse que incluye cada una de las columnas 12a y 12b, así como cada una de las cavidades 12a<sub>1</sub>, 12a<sub>2</sub>, 12a<sub>3</sub>, 12a<sub>4</sub>, 12a<sub>5</sub>, 12a<sub>6</sub>, 12a<sub>7</sub>, 12a<sub>8</sub>, 12b<sub>1</sub>, 12b<sub>2</sub>, 12b<sub>3</sub>, 12b<sub>4</sub>, 12b<sub>5</sub>, 12b<sub>6</sub>, 12b<sub>7</sub> y 12b<sub>8</sub>.

55 Según varias realizaciones de la presente descripción, el dispositivo puede comprender un gran número de conjuntos, consistiendo cada uno en un gran número de cavidades, un gran número de canales, un pozo de entrada y un pozo de venteo, y todos dispuestos en la misma primera capa. Cada una de las numerosas cavidades puede estar dispuesta dentro de un área que es inferior a 81 milímetros cuadrados. En una realización preferida de la

presente descripción el gran número de conjuntos puede consistir en filas y columnas de conjuntos repetidos, siendo la distancia entre filas adyacentes de 9 milímetros, y siendo la distancia entre columnas adyacentes de 9 milímetros.

Como se muestra, en esta realización, un gran número de cavidades 12 se dividen en subconjuntos de cavidades dispuestas en columnas, que terminan en una longitud de canal con área de sección transversal reducida. Cada columna de cavidades está conectada directamente al canal de alimentación de entrada 14, y conectada al canal de salida 16 a través de un canal de restricción 18. Dicha disposición puede presentar ventajas debido a su densidad espacial de cavidades y a la velocidad en que dicha disposición puede llenarse y, como se expuso anteriormente, sellarse. Un ingrediente líquido puede suministrarse a través de la entrada 20 a cada una de las columnas de cavidades 12a, 12b, 12c, 12d, 12e, 12f, 12g, 12h, 12i, 12j, 12k, 12l, 12m, 12n y 12o por un canal de alimentación 14. En una columna de cavidades 12a, cada cavidad 12a<sub>1</sub>, 12a<sub>2</sub>, 12a<sub>3</sub>, 12a<sub>4</sub>, 12a<sub>5</sub>, 12a<sub>6</sub>, 12a<sub>7</sub> y 12a<sub>8</sub>, puede llenarse en serie con ingredientes líquidos una tras otra y, como se expuso anteriormente, sellarse en serie una tras otra. Cada una de las columnas de cavidades 12a puede conectarse al canal de salida 16 a través de un canal de restricción 18, lo que puede evitar el reboso de la columna, con lo que se conserva el ingrediente líquido. Los canales de restricción 18 pueden favorecer también el llenado uniforme de cada columna de cavidades 12a. Un ingrediente líquido suministrado a través de un canal de alimentación 14 que, debido a aberraciones en la geometría o rugosidad de la superficie, llena una columna de cavidades 12a antes que otra columna de cavidades 12b, luego estará forzada a través de una restricción 18a, que resistirá el diferencial de presión que conduce el flujo de fluido y hace que el líquido circule a través del subconjunto lleno 12a más despacio que el subconjunto sin llenar 12b, con lo que se iguala el volumen de líquido en cada subconjunto de cavidades.

Por ejemplo, si un canal de alimentación 14a llena todas sus cavidades conectadas correspondientes 12a con ingrediente líquido 500 antes que otro canal de alimentación 14b llene todas sus cavidades conectadas correspondientes 12b, puede ser conveniente obstruir o restringir más el flujo de líquido a través de los canales entre las cavidades 12a a fin de conservar el ingrediente líquido 500 que puede ser costoso o en cantidad limitada. Por consiguiente, el canal de restricción 18a puede limitar el flujo de líquido a través del canal 14a (correspondiente a un grupo de cavidades 12a) a un flujo volumétrico más pequeño que a través del canal 14b (correspondiente a otro grupo de cavidades 12b) a fin de limitar la cantidad de ingrediente líquido 500 forzado en el pozo de venteo 22 a través del canal 14a. Alternativamente, el canal de restricción 18b puede, a su vez, restringir el flujo de líquido a través del canal 14b, lo que puede ser conveniente si el canal 14b se llena con ingrediente líquido antes que el canal 14a. Como resultado, el uso de canales de restricción 18 puede limitar la cantidad de ingrediente líquido en exceso para alimenta a todas las cavidades 12 con ingrediente líquido. En algunas realizaciones, los canales de restricción 18 pueden ser de una profundidad similar que los canales 14, pero con una profundidad comparativamente más pequeña, lo que puede permitir que los canales de restricción 18 queden sin rellenar de material sellador 150 una vez que el material sellador 150 es forzado dentro de los canales 14.

Cada una de las capas de dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria pueden incluir cualquier material adecuado y pueden componerse de materiales similares o diferentes. En algunas realizaciones, se hace una capa de un plástico relativamente rígido, por ejemplo, polipropileno, polietileno, policarbonato, PTFE, etc. Alternativamente, una capa puede incluir un material flexible, como la goma tal como silicona u otro elastómero. Otros materiales potenciales incluyen vidrio, cerámica, silicio o similares. Como tal, una capa puede ser rígida o deformable. Dichos materiales pueden ser translúcidos o transparentes de modo que permitan fácilmente mediciones ópticas de los contenidos dentro de las cavidades, u opacos de modo que eviten que la luz del ambiente entre en contacto con las cavidades.

En algunas realizaciones, diferentes capas pueden definir cavidades y canales que están inicialmente en comunicación fluida. Por ejemplo, una primera capa puede definir un número de cavidades sin definir necesariamente los canales que conectan las cavidades juntas; una capa adicional adyacente a la primera capa puede definir los canales que conectan las cavidades. Dichos canales pueden sellarse apropiadamente, por ejemplo, por compresión de las dos capas entre sí.

En otras realizaciones, una parte de la propia primera capa puede estar compuesta de un material deformable, tal como silicona, un elastómero o similares. Dicho material puede actuar como material sellador. O, la primera capa puede incluir un material que sustancialmente atenúa después la aplicación de calor de modo que el material se deforma en los canales.

Cada una de las capas del dispositivo microfluídico se puede hacer por cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, las capas se fabrican mediante moldeo por inyección, repujando las cavidades y canales en una lámina delgada de plástico, grabando, o cualquier otro método adecuado. Por ejemplo, los espacios que definen las cavidades y canales pueden formarse (por ejemplo moldearse, grabarse) en un material de plástico/polímero o elastomérico que constituye la capa.

El moldeo por inyección puede ser un método preferido para proporcionar la primera capa con gran reproducibilidad y bajo coste. En algunas realizaciones, un método de moldeo por inyección puede incluir un moldeo que comprende dos mitades, una mitad que contiene características positivas que definen un gran número de cavidades conectadas por canales, y la otra mitad que contiene características positivas que definen pozos de entrada, y propiedades estructurales de la capa. En otras realizaciones, la primera capa puede en su lugar ser en relieve.



Según algunas realizaciones, el gran número de canales pueden terminar a lo largo del canal con área de sección transversal reducida. Esta longitud del canal puede servir como una restricción para permitir que los canales en el área de la cavidad llenen uniformemente bajo presurización desde un pozo de entrada.

5 La Figura 27 representa una realización de la presente descripción que comprende varios pozos de entrada 20 y pozos de venteo 22, conectado cada uno a un gran número de cavidades 12 por un canal de alimentación 14, y un canal de salida 16, y canales de restricción 18. Cada subconjunto de un pozo de entrada 20, pozo de venteo 22, canal de alimentación 14, canal de salida 16 y gran número de cavidades 12 define un subconjunto 50. La primera capa 100 puede contener gran número de dichos subconjuntos. Por ejemplo, la primera capa 100 puede contener los subconjuntos 50a, 50b, 50c y 50d, que contiene cada uno un pozo de entrada, pozo de venteo, canal de alimentación, canal de salida y gran número de cavidades. El subconjunto 50a, a modo de otro ejemplo, puede contener un pozo de entrada 20a, pozo de venteo 22a, gran número de cavidades 12a, canal de alimentación 14a, y un canal de salida 16a. El subconjunto 50a puede incluir también un gran número de canales de restricción 18a que conectan un gran número de cavidades 12a al canal de salida 16a.

15 El dispositivo microfluídico puede incluir, sin limitación, cualquier número apropiado de cavidades y cualquier número de subconjuntos. Por ejemplo, otro formato de cámaras puede incluir 8x12 (96) subconjuntos de 16x31 (496) cavidades. Se comprendería que este dispositivo puede diseñarse para que incluya cualquier número deseado de cavidades y subconjuntos, ya que la presente descripción no se está limitada a este respecto.

20 Cada cavidad puede definir cualquier volumen adecuado. Por ejemplo, el volumen de cavidades de dispositivos microfluídicos descritos puede ser menor de aproximadamente 10 microlitros, menor de aproximadamente 1 microlitro, menor de aproximadamente 500 microlitros, menor de aproximadamente 200 nanolitros, (por ejemplo, aproximadamente 150 nanolitros), menor de aproximadamente 100 nanolitros, menor de aproximadamente 50 nanolitros, menor de aproximadamente 20 nanolitros, menor de aproximadamente 10 nanolitros, menor de aproximadamente 5 nanolitros, menor de aproximadamente 1 nanolitro o cualquier otro volumen apropiado. El volumen definido por cavidades correspondientes a un subconjunto determinado también puede variar. Por consiguiente, el volumen de las cavidades correspondientes de un subconjunto puede ser aproximadamente igual o puede diferir sustancialmente.

30 En algunas realizaciones, puede proporcionarse un material sellador (por ejemplo, capa de material compatible), dispuesto para unir de otra manera la superficie abierta de un gran número de canales y cavidades. Dicho material sellador puede deformarse en los canales entre las cavidades para aislar con líquido un gran número de cavidades 12, como se describió anteriormente.

35 Las vistas proporcionadas por las Figuras 28A-28E muestran un procedimiento de sellado de un canal 14 tras una actuación apropiada (por ejemplo, compresión, calentamiento y/u otro método adecuado) de un material sellador. La Figura 28a muestra donde se toma la sección transversal para ilustrar las Figuras 28B-28E. En la Figura 28B, se proporciona un material sellador 150, colocado junto a una primera capa 100, que une la superficie abierta a un canal 14. Las Figuras 28a-28D contienen también un instrumento de compresión 70, colocado, para proporcionar fuerza de compresión al material sellador 150. En la Figura 28E, el instrumento de compresión se ha eliminado tras sellar el canal 14.

40 Según las realizaciones de la presente descripción, el material sellador puede comprender una capa adhesiva. En algunas realizaciones, el adhesivo puede seleccionarse basándose en su compatibilidad con la reacción en cadena de la polimerasa. El adhesivo puede colocarse en una capa de soporte, y puede disponerse con el adhesivo en contacto con la superficie que define el canal.

45 Un material sellador 150 y la primera capa 100 pueden estar comprimidas entre si de manera que una parte 151 de la capa del material se hace deformar plásticamente en el espacio definido por un canal 14 a través del que el líquido podría circular, como se muestra en las Figuras 28C-28E. Como se muestra, otras partes del material sellador se deforman también por compresión, representadas por la reducción de espesor  $t$  del material sellador 150. En algunas realizaciones, algo de la parte 151 del material sellador que se deforma en el canal 14 es suministrado por el material separador colocado en las áreas que rodean los canales, lo que contribuye a la reducción total del espesor  $t$  del material sellador 150. La parte del material sellador 151 que bloquea el canal 14, sin embargo, evita que el líquido circule a través del canal 14 entre las cavidades que estaban previamente en comunicación fluida.

50 Un material sellador puede estar compuesto por cualquier material o composición adecuada. En algunas realizaciones, el material separador incluye un plástico/polímero, tal como polietileno, polipropileno, etileno-acetato de vinilo, un elastómero tal como caucho de silicona o una cera tal como parafina o cera microcristalina o combinaciones de los mismos. Como tal, el material sellador puede incluir una mezcla de varias composiciones diferentes o puede proporcionarse en varias configuraciones, tal como en disposiciones en capas o más discretas, donde diferentes piezas de material sellador se colocan en varios lugares.

55 En algunas realizaciones, el procedimiento de sellado de los canales es irreversible. Por ejemplo, un material sellador puede deformarse plásticamente, por lo tanto, permanentemente en un espacio de un canal a través del

cual el líquido podría si no circular. Por consiguiente, sin desmontar el dispositivo microfluídico para retirar el material sellador de los canales, dicho sellador del canal no es una característica reversible.

5 En algunas realizaciones, la cantidad de fuerza compresora ejercida sobre el dispositivo suficiente para producir el sellado de los canales puede ser entre aproximadamente 100 Newtons y aproximadamente 10.000 Newtons (por ejemplo, 100-1.000 N; 1.000-5.000 N; 5.000-10.000 N), dependiendo del tamaño total del dispositivo y de la naturaleza del material sellador. Por ejemplo, cuanto mayor sea el dispositivo (es decir, más cavidades y canales), más fuerza compresora puede ser necesaria para sellar los canales de la circulación entre cavidades. O, cuanto más blando sea el material, menos fuerza compresora puede ser necesaria para deformar el material en los respectivos canales del dispositivo.

10 Para algunos materiales, la aplicación de una cantidad apropiada de compresión y/o calor puede dar como resultado que cambien algunas características del material sellador u otros componentes del dispositivo. Por ejemplo, a elevadas temperaturas, algunos materiales tales como la cera se volverán cada vez más pegajosos y/o adhesivos, dando como resultado fuerte adherencia entre componentes del dispositivo. Por consiguiente, las diferentes capas del dispositivo, incluida una capa de cera, puede montarse y luego someterse a compresión y calentamiento durante  
15 un periodo de tiempo apropiado, lo que permite que la cera cree un enlace. En algunas realizaciones, pueden utilizarse uno o más disolventes apropiados para estimular la unión entre capas.

Varios componente (por ejemplo, capas, adhesivos, etc.) de dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria pueden adherirse entre sí por cualquier método adecuado. Por ejemplo, puede utilizarse un adhesivo para unir uno o más compuestos, tal como para unir un material sellador y una primera capa. En algunas realizaciones,  
20 los componentes del dispositivo microfluídico se comprimen conjuntamente (por ejemplo por prensado, enrollado u otras fuerzas aplicadas externamente) para que produzcan un enlace uniformemente distribuido entre las superficies de las diferentes capas.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, una capa puede incluir adhesivo acrílico, adhesivo de caucho natural o adhesivo de silicona. Dichos materiales pueden ser adecuados para deformarse dentro de los canales del dispositivo  
25 (por ejemplo, como material sellador) cuando se someten a compresión. En algunas realizaciones, los adhesivos pueden colocarse en una capa relativamente rígida o en un soporte aparte. Ejemplos de soportes adecuados pueden incluir polipropileno, polietileno, policarbonato y/u otros plásticos adecuados.

En algunas realizaciones, el material sellador puede calentarse a una temperatura elevada para producir ablandamiento del material suficiente para deformar el material en los canales adyacentes. Dicha temperatura elevada puede depender del punto de ablandamiento del material, por ejemplo, entre aproximadamente 40°C y  
30 aproximadamente 90°C (por ejemplo, ente aproximadamente 50°C y 70°C) para algunas composiciones poliméricas o de cera. Puede apreciarse que pueda utilizarse un número diferente de tipos de materiales selladores.

Puede apreciarse que puede utilizarse cualquier método adecuado para crear un sello dentro de los canales de manera que las cavidades estén fluidamente aisladas unas de otras. Por ejemplo, pueden distribuirse piezas  
35 separadas de un material sellador por todo el dispositivo y colocarse directamente junto a cada canal. Un material sellador puede producirse para deformar apropiadamente debido a capas compresoras del dispositivo (por ejemplo, compresión aplicada externamente, prensado/enrollado de las superficies externas de las capas, aplicación de una sonda local a varias zonas, etc.), calentando partes apropiadas del dispositivo (por ejemplo usando una placa térmica, una sonda de calor, un láser, etc.), actuando magnéticamente algunas zonas del dispositivo o cualquier otro método adecuado. Puede apreciarse que diferentes zonas del dispositivo pueden actuarse selectivamente. Por  
40 ejemplo, puede dirigirse calor y/o compresión a determinadas zonas donde se desea sellar los canales, en lugar de a toda la superficie del dispositivo. El material sellador puede adaptarse, al menos en parte, a fundir, ablandar o si no deformar dentro del canal tras la aplicación de fuerzas compresoras externas y/o calor a determinadas zonas del dispositivo o a todo el dispositivo.

45 Puede apreciarse que para las realizaciones según la presente descripción, aunque las propiedades siguientes pueden ser verdaderas del dispositivo microfluídico, el material sellador no es necesario que sea una capa monolítica continua, ni es necesario para ello que tenga las mismas dimensiones externas como la primera capa en la que se definen las cavidades. Puede apreciarse que la(s) capa(s) del dispositivo, incluido el material sellador, no se necesita que tengan dimensiones donde la(s) capa(s) está(n) en alineación. Ni se necesita que la capa que define  
50 las cavidades esté encima o debajo del material sellador.

En algunas realizaciones, la profundidad de los canales puede afectar si un sello se forma adecuadamente si un canal que de otra forma conecta con fluidez las cavidades vecinas. Cuando el dispositivo se somete a un esfuerzo de compresión aplicado externamente, un canal poco profundo es más probable que dé lugar a un sello  
55 adecuadamente formado que evite la circulación de líquido por el mismo en comparación con un canal más profundo. Es decir, para crear un sello adecuado en un espacio más pequeño se requiere comparativamente menos deformación (por ejemplo proporcionada por la compresión aplicada) del material sellador, lo que permite un grado más fino de control de sellado del canal. Por consiguiente, la profundidad de los canales puede diseñarse para impulsar, o rechazar, el sellado.

En algunas realizaciones, los canales que conectan cavidades adyacentes se dirigen de tal manera para limitar el área ocupada por los canales en el dispositivo. Por ejemplo, pueden colocarse canales que incorporen muchas curvas lo que permite el control fino de la distancia de los canales y entre las cavidades. El control sobre la distancia entre los canales puede ayudar a controlar la calidad de la unión entre las capas del dispositivo, por ejemplo, proporcionando espacio para que el material (por ejemplo, material sellador, líquido, etc.) se desplace de manera que el material desplazado no interfiera con otros componentes/características del dispositivo.

En algunas realizaciones, la profundidad del canal puede variar a lo largo del mismo canal. Por ejemplo, un canal que conecta la primera cavidad a lo largo del canal con un pozo de entrada en un subconjunto de cavidades puede requerir un sello especialmente hermético que se forme cerca de la cavidad pero dicho sello hermético puede no ser necesario más cerca del depósito de la fuente de líquido. Como resultado, la zona más próxima del canal a la cavidad puede ser más superficial que la zona más próxima del canal al depósito de la fuente de líquido. O, en algunas realizaciones, las zonas más profundas de un canal pueden quedar sustancialmente sin llenar mediante un material sellador tras la compresión del dispositivo, y las áreas más superficiales pueden llegar a obstruirse y llenarse por el material sellador tras la compresión del dispositivo.

En algunas realizaciones, los canales que conectan cavidades pueden ser menos profundos que los canales que están más cerca de los pozos de entrada o de venteo. Por consiguiente, los canales que conectan cavidades entre sí pueden sellarse más fácilmente que los canales que están conectados a otras características del dispositivo.

Los canales que necesitan sellado pueden tener una cantidad suficiente de material sellador situado alrededor o si no muy cerca de los canales de manera que una cantidad suficiente del material sellador puede deformarse en los canales durante la acción de sellado (por ejemplo, compresión y/o calentamiento). Por consiguiente, los canales de sellado, como los que conectan fluidamente las cavidades entre sí, pueden construirse para que sean más largos o están lejos de otras características (por ejemplo, pozos de entrada, otros canales) de modo que está disponible más material sellador en los canales.

Según varias realizaciones de la presente descripción, el gran número de cavidades puede estar rodeado por características que comprenden más cavidades o canales no destinadas a entrada de líquido. Estas características pueden estar dispuestas para mantener un grado igual de desviación y compresión de la segunda capa, a fin de mantener un espesor uniforme de la segunda capa a través de la primera superficie. Puede disponerse de estas características para recoger el exceso de fluido y/o sellar el material que puede desplazarse desde varias cavidades o canales durante el calentamiento y/o compresión del dispositivo. En una realización preferida, estas cavidades o canales originales pueden estar colocadas junto a cavidades o canales en zonas del dispositivo que si no llegarían a estar parcial o completamente llenas con material sellador, por ejemplo, por ejemplo, cavidades o canales al borde de un subconjunto donde el rebose puede ser más probable que ocurra. En otra realización, estas cavidades o canales adicionales pueden estar colocadas entre gran número de cavidades adyacentes. Un espesor uniforme de la segunda capa puede ser beneficioso para evitar sobrellenado de los canales o llenado excesivo de las cavidades debido a un exceso de material deformado en la segunda capa durante la compresión de la primera y segunda capas con respecto a otra.

La Figura 29 muestra otros canales 40, 42, 43, 44 y 45 que pueden ser adecuados para recoger el exceso de material sellador de un dispositivo microfluídico 10 tras calentamiento y/o compresión del material sellador. Por ejemplo, los demás canales 40 pueden recoger el exceso de material sellador que rebosa resultante de la compresión de zonas entre un borde de un dispositivo y un canal de alimentación 30. Los otros canales 42 y 44 pueden recoger el exceso de material sellador que rebosa resultante de la compresión de zonas alrededor de los pozos de entrada 20 o los pozos de venteo 22. Otros canales 43 pueden recoger el exceso de material sellador que rebosa resultante de la compresión de zonas entre subconjuntos 50. Otros canales 45 pueden recoger el exceso de material sellador que rebosa resultante de la compresión de zonas entre pozos de entrada 20, pozos de venteo 22 y gran número de cavidades 12.

En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico puede comprender un faldón contra el polvo que rodea la primera superficie que sobresale detrás de dicha primera superficie. El faldón contra el polvo puede evitar que el dispositivo repose en su primera superficie, y por lo tanto evitar que se acumule el polvo y otras partículas que pueden afectar la captación de imágenes o las lecturas de fluorescencia tomadas de las cavidades. En algunas realizaciones, esta protuberancia también puede evitar que la luz del ambiente entre en las cavidades.

La Figura 30 representa una realización que proporcionan un faldón contra el polvo 80, en donde, cuando el dispositivo está colocado sobre una superficie plana, el faldón contra el polvo 80 está adaptado para evitar que la superficie que define cavidades 12 entre en contacto con la superficie plana y coja polvo o partículas de polvo que pueden contaminar las cavidades, o a la inversa evitar que las cavidades 12 entren en contacto y contaminen la superficie plana con cualquier ingrediente líquido dentro de las cavidades 12.

En varias realizaciones, el dispositivo puede cumplir con las normas ANSI/SLAS para microplacas. Por consiguiente, la primera placa puede colocarse en un área que tiene 127,76 milímetros de longitud y 85,48 milímetros de anchura. El dispositivo puede comprender filas y columnas de conjuntos que contienen numerosos canales, cavidades, un solo pozo de entrada y un solo pozo de venteo. En una realización preferida, el número de dichos conjuntos es al

menos 96, dispuestos en ocho filas por doce columnas, y la distancia entre cada fila adyacente y entre cada columna adyacente es de 9 milímetros. El dispositivo puede tener también un radio angular de 3,18 mm.

Las Figuras 31A-31B representan una realización en donde una primera capa 100 está en un formato compatible con microplacas. Según las dimensiones normales de la placa, el faldón contra el polvo 80 puede tener 85,48 milímetros de ancho por 127,76 milímetros de longitud, con cuatro ángulos exteriores que tienen un radio de 3,18 milímetros. Las nervaduras 82 forman los bordes para los pozos de venteo 22 y además añaden rigidez a la capa 100. La capa 100 puede contener también propiedades de orientación sobre uno o más pozos, tal como un ángulo biselado 83 de un pozo de venteo 22.

Las Figuras 32A-32F ilustran realizaciones de la presente descripción durante el proceso de sellado. La Figura 32A muestra donde se toma la sección transversal para ilustrar la Figura 32B. En la Figura 32B, se muestra una realización en donde los pozos de entrada 20 y los pozos de venteo 22 se colocan en una superficie de la primera capa 100, y un gran número de cavidades 12 se coloca en la superficie opuesta. Los pozos de venteo 22 pueden estar unidos por elementos de nervadura 82, que sirven para un propósito doble proporcionando rigidez a la primera capa 100. Los canales de alimentación 14 y los canales de venteo 16 pueden proporcionarse como canales mediante la primera capa 100, proporcionando un paso de líquido desde los pozos de entrada 20 y los pozos de venteo 22 en una superficie de capa 100 a un gran número de canales 12.

En la realización representada en la Figura 32C, un material sellador 150 se coloca para unir las superficies abiertas de los canales de alimentación 14, de los canales de salida 16, de los canales de restricción 18 y de gran número de cavidades 12. El material sellador 150 no obstruye inicialmente los canales 14 para alimentar el gran número de cavidades 12. De esta forma, el dispositivo 10 puede distribuirse, almacenarse o enviarse, ya que ha sido suficientemente preparado para recibir ingrediente líquidos a través de los pozos de entrada 20.

En las Figuras 32D-32F, un ingrediente líquido 500 se suministra a un gran número de cavidades 12 a través de los pozos de entrada 20. Si el dispositivo microfluidoico 10 es para utilizar para el análisis de PCR digital, este ingrediente líquido 500 puede contener una solución que contiene una muestra de ADN, ADN polimerasa y una solución "mezcla madre" que contiene nucleótidos y otros reactivos necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa. La Figura 32D representa una realización de dispositivo microfluidoico 10 en donde el ingrediente líquido 500 se ha suministrado a los pozos de entrada 20. El ingrediente líquido 500 puede evitarse que entre al canal de suministro 14 por tensión superficial.

Pueden suministrarse ingredientes líquidos a las entradas, cavidades y canales respectivos por cualquier método adecuado. En algunas realizaciones, una máquina o pipetas asigna reactivos a los pozos de entrada. O, recipientes separados pueden estar adecuadamente conectados a los respectivos pozos de entrada para suministrar líquido contenido en los recipientes a los pozos de entrada. Puede suministrarse a cavidades y canales con ingredientes líquidos respectivos, por ejemplo, por acción capilar, gravedad, centrifugación, aspiración desde los orificios de venteo, aspiración a vacío, presión sobre los pozos de entrada y/o de cualquier otra manera adecuada. Por lo tanto, puede utilizarse cualquier método de empujar o tirar para suministrar adecuadamente cavidades y canales con ingrediente(s) líquido(s) apropiado(s).

En algunos casos, las interfases lisas entre canales y cavidades pueden reducir la presión total necesaria para que el líquido llene las cavidades. Lo que es más, interfases lisas entre canales y cavidades pueden permitir que los canales se llenen más fácilmente con material sellador que de otra forma parecería en una interfase más afilada. Las interfases lisas pueden reducir también la tendencia de un material sellador a cizallar, perforar o si no rasgar, permitiendo a los ingredientes líquidos escapar de las cavidades o canales donde están contenidos. Por consiguiente, el dispositivo microfluidoico puede incorporar interfases lisas entre canales y cavidades donde se pueda.

En algunas realizaciones, un pozo de entrada puede sellarse de la entrada de más líquido utilizando una tercera capa 140 (por ejemplo, placa/sello de pozo), colocada junto a la primera capa. Esta tercera capa 140 puede utilizarse para evitar la contaminación del ingrediente líquido 500 o por éste, en un pozo de entrada 20 y/o un pozo de venteo 22. Puede desearse que el ingrediente líquido 500 no se contamine, ya que el ingrediente líquido 500 puede contener reactivo sensible. La contaminación por cuerpos extraños puede inhibir, evitar o favorecer la reactividad excesiva de los reactivos contenidos en el ingrediente líquido 500, que pueden impactar negativamente los resultados y datos de las reacciones que involucran al ingrediente. Además, después de la ampliación, en el caso de la reacción en cadena de la polimerasa, el ingrediente líquido 500 puede contener grandes concentraciones de amplicón, que surgen de muchos episodios de replicación, que pueden producir entonces un riesgo de contaminación de cualquier aparato o área de trabajo que entre en contacto con el dispositivo microfluidoico 10.

Por consiguiente, puede ser deseable obstruir o si no evitar sustancialmente que el líquido circule a o desde al pozo de entrada 20 y/o al pozo de venteo 22. Inmediatamente después de llenar el pozo de entrada 20 con ingrediente líquido 500, puede utilizarse la tercera capa 140 para sellar el pozo de entrada 20 y el pozo de venteo 22 de más circulación de líquido. Alternativamente, la tercera capa 140 puede incluir una estructura adecuada que proporcione el llenado de las cavidades 12 con ingrediente líquido 500, de modo que una membrana que tiene orificios o perforaciones autosellantes, que permitirían a la tercera capa 140 colocarse junto al pozo de entrada 20 y el pozo de

venteo 22 antes de llenar el pozo de entrada 20 con ingrediente líquido 500. La tercera capa 140 generalmente no evitaría u obstruiría la circulación de líquido en y entre los canales 14, los pozos 20 y 22 y las cavidades 12, pero también proporcionaría un sistema fluídico cerrado entre todos los elementos conectados.

5 En la realización representada en la Figura 32E, después de suministrar el ingrediente microfluídico 500 al dispositivo microfluídico 10, se utiliza una tercera capa 140 para sellar los pozos de entrada 20 y los pozos de venteo 22 de posterior entrada de líquido. La tercera capa 140 comprende una capa plana deformable con propiedades adhesivas, que se coloca a través de la superficie superior de los pozos de entrada 20 y los pozos de salida 22. Sellar los pozos de entrada 20 y los pozos de venteo 22 no evita la transferencia de líquido entre el gran número de cavidades 12, los pozos de entrada 20, los pozos de venteo 22, los canales de alimentación 14, los canales de salida 16 y/o los canales de restricción 18. La tercera capa 140 puede evitar también que el ingrediente líquido 500 se evapore y si no escape de los pozos de entrada 20 y los pozos 22, con lo que se evita la contaminación del dispositivo microfluídico 10 o su entorno.

15 Puede apreciarse que para las realizaciones según la presente descripción, no se necesita que la tercera capa monolítica continua, ni es necesario para ello que sea de las mismas dimensiones externas que la primera capa en la que se definen las cavidades. Puede apreciarse que la(s) capa(s) del dispositivo, incluido el material sellador, no es necesario que tengan dimensiones en las que la(s) capa(s) se alinea(n). No es necesario que la capa que define las cavidades por encima o debajo de la tercera capa.

20 En algunas realizaciones, después de sellar el pozo de entrada 20 y el pozo de venteo 22 de más circulación de líquido entre ambos, puede utilizarse la tercera capa 140 para forzar el ingrediente líquido 500 a entrar en las cavidades 12 proporcionando presión añadida al volumen definido por el pozo de entrada 20. La Figura 32F representa una realización en la que una herramienta de llenado 160 comprende un gran número de protuberancias 162, donde cada una de las protuberancias se coloca para la inserción en un espacio correspondiente que define un pozo de entrada 20. Cuando la herramienta de llenado 160 se presiona hacia la primera capa 100, las protuberancias del instrumento se configuran para deformar las partes correspondientes de la primera capa 140 en los respectivos pozos de entrada 20. Ya que las partes correspondientes de la tercera capa 140 se deforman en el espacio definido por los respectivos pozos de entrada 20, el volumen del espacio se reduce, dando como resultado un aumento de presión dentro de los pozos, forzando al ingrediente líquido a entrar en los canales y cavidades. Las protuberancias 162 pueden comprender extremos redondeados 164, o de cualquier otra forma adecuada, que limite el rasgado o corte de la tercera capa 140.

30 Por lo tanto, al controlar la geometría de las protuberancias 162, junto con los canales de restricción 18, el ingrediente líquido 500 puede ser forzado a llenar suficientemente un gran número de cavidades 12 mientras que da como resultado cantidades mínimas de exceso de volumen. En algunas realizaciones, el sellado de un gran número de cavidades 12 puede realizarse mientras la herramienta de llenado 160 está proporcionando presión al ingrediente líquido 500. En otras realizaciones, el sellado de gran número de cavidades 12 puede realizarse una vez que el gran número de cavidades se llenan con ingrediente líquido 500 y se retira el instrumento de llenado 160.

35 En algunas realizaciones, el llenado de gran número de cavidades y el reparto del gran número de cavidades puede realizarse con una máquina de llenado automático. La máquina de llenado automático puede presurizar los pozos de entrada al desviar una tercera capa en los pozos de entrada para forzar al líquido a entrar en el gran número de cavidades a través de una combinación de presurización y desplazamiento positivo. En una realización, esta desviación puede realizarse mediante un gran número de protuberancias dispuestas correspondientes a cada uno de los pozos de entrada. El gran número de protuberancias puede colocarse sobre una capa de soporte rígida y ser de altura suficiente para permitir que las protuberancias desplacen completamente la tercera capa sin hacer que la capa de soporte rígida entre en contacto con los pozos de entrada. La máquina de llenado automática además puede permitir sucesivamente la compresión de un material sellador en los canales que conectan cavidades adyacentes, tal como un rodillo motorizado.

40 En algunas realizaciones, una vez las cavidades están adecuadamente llenas con ingrediente líquido, el material sellador 150 puede ser forzado a entrar en el canal 14, por ejemplo, por la aplicación de un rodillo, adaptada para proporcionar presión compresiva al material sellador 150 de manera secuencial a lo largo de la dirección de circulación del líquido dentro del canal que conecta cavidades adyacentes.

50 Esto está en contraste con otras realizaciones donde el material sellador 150 es forzado dentro de los canales 14 alrededor de todas las cavidades 12 simultáneamente. Empujando el material sellador dentro de cada una de las cavidades a lo largo del canal simultáneamente puede dar lugar a que el volumen dentro de las cavidades 12 aumente la presión. El aumento de presión en las cavidades 12 puede tender a producir separación del material sellador 150 en el canal 14 (por ejemplo, aumento del material sellador en los canales y cavidades), lo que eliminaría eficazmente el aislamiento del líquido entre las cavidades 12 y permitiría a los contenidos dentro de las cavidades mezclarse indeseablemente.

55 Alternativamente, mediante compresión del material sellador en los canales y cavidades de la primera capa 100, si las cavidades 12 se aíslan sucesivamente, o si no se aíslan en serie una tras otra, a lo largo de la dirección de circulación del líquido dentro del canal de alimentación 14, el ingrediente líquido 500 presurizado puede forzarse

sucesivamente en las cavidades vecinas 12 sin sellar y por último en los pozos de venteo 22 (cuando todas las cavidades respectivas dentro del canal están selladas/aisladas). los pozos de venteo 22 tienen un volumen suficiente para recibir ingrediente líquido 500 en exceso sin que resulte un aumento de presión dentro de las cavidades que si no tendería a separar la primera capa 100 del material sellador 150 y/o de la tercera capa 140.

5 Sin embargo, si las cavidades colocadas más allá del pozo de entrada 20 a lo largo del canal 14 se sellan o aíslan antes que las cavidades más próximas al pozo de entrada 20 a lo largo del canal 14 (por ejemplo, el rodillo aplica presión al enrollar el material sellador en una dirección contra la de circulación del líquido por el canal), la presión puede aumentar con respecto a los volúmenes definidos por los canales y cavidades, conduciendo a resultados indeseables. Las Figuras 33A-33C representan varias realizaciones de la presente descripción en donde el material  
10 sellador 150 en el canal de suministro 14 la realiza un rodillo 170.

En algunas realizaciones, el rodillo 170 y/o una capa entre el rodillo y el material sellador 150 puede incluir un material que es compatible con la primera capa 100, que es adecuado para mantener la compresión uniforme del material sellador 150 con respecto a la primera capa 100. Como resultado, dicho material compatible puede proporcionar tolerancia en la adaptación de algunas irregularidades que pueden surgir entre el material sellador 150,  
15 la primera capa 100 o el rodillo 170, por ejemplo, debido a diferencias en el espesor o imperfecciones en la superficie. Por ejemplo, el rodillo 170 puede tender a forzar algunas irregularidades por protuberancias en la superficie de la primera capa 100 o surgir de la superficie de la primera capa 100.

Proporcionar el rodillo 170 con un material compatible (por ejemplo, en el perímetro del rodillo) puede minimizar el impacto de irregularidades locales en el espesor de alguna primera capa 100, del material sellador 150 o del rodillo  
20 170. La Figura 33A representa una realización donde el rodillo 170 está compuesto en gran parte de un material compatible. En la Figura 33B, el rodillo incluye un núcleo rígido 172 rodeado de un material compatible 175. En la Figura 33C, se proporcionan un material compatible 175 entre el rodillo 170 y el material sellador 150.

El algunas realizaciones, si el rodillo 170 es excesivamente compatible, puede deformarse de tal manera que el material sellador que rodea varias cavidades se comprime simultáneamente. Esto puede tener el efecto de crear un  
25 aumento de presión en aquellas cavidades similares a las que surgen cuando las cavidades no se aíslan sucesivamente en orden una tras otra. Por consiguiente, el material compatible 175 puede ser de dimensiones y composición adecuadas de manera que permita un grado apropiado de compatibilidad.

En algunas realizaciones, después de la etapa de sellado el método de reparto de una muestra de líquido puede incluir suprimir cualquier fuerza de compresión o presión del dispositivo. El dispositivo está de ese modo  
30 completamente repartido y sellado y puede manipularse y utilizarse con otros dispositivos o aparatos según se necesite.

Después de la compresión del material sellador 150 en los canales de suministro 14 y en los canales de salida 16, la mayoría de las cavidades 12 se sellan contra más entrada de líquido. El dispositivo microfluídico 10 puede entonces  
35 manipularse, almacenarse o usarse en un experimento. En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico 10 puede ciclarse térmicamente, para llevar a cabo la PCR en el ingrediente líquido 500 contenido en varias cavidades 12. La Figura 34 representa una realización de dispositivo microfluídico 10 que se ha llenado con ingrediente fluido 500 y sellado con material sellador 150 y la tercera capa 140. Las áreas 142 de la tercera capa 140 continúan deformadas plásticamente después de la supresión de la herramienta de llenado 160 y de las protuberancias 162.

En el marco de la PCR, una vez los reactivos se han combinado, el dispositivo microfluídico puede someterse a  
40 ciclado térmico. En algunos casos, cuando proceda, el termociclador puede ser el mismo dispositivo que proporciona calor y/o presión de compresión al dispositivo para sellar los canales y deformar el material sellador. El gran número de cavidades puede proporcionarse con los reactivos necesarios para la reacción en cadena de la polimerasa antes de este ciclo térmico. Estos reactivos pueden comprender una muestra de ADN, un cebador de ADN formulado para complementar la muestra de ADN en posiciones del gen específicas y una solución de "mezcla madre" que contiene  
45 ADN polimerasa y varios reactivos (por ejemplo, nucleótidos) que facilitan las actividades de la polimerasa.

Por consiguiente, el usuario podría llenar el dispositivo con los reactivos apropiados, las etapas de llenado de las cavidades con un ingrediente líquido y el aislamiento de las cavidades puede realizarse (manual o automáticamente), y el dispositivo puede someterse a ciclado térmico (inmediatamente o después de un determinado periodo de tiempo).

50 En algunas realizaciones, el termociclador proporcionaría fijación de las capas del dispositivo microfluídico juntas para dar lugar a buen contacto térmico y, por consiguiente, ajustes sensibles y rápidos de temperatura según fuentes fidedignas. Dicha fijación puede proporcionar también una cantidad adecuad de compresión aplicada externamente, por ejemplo, para sellar los canales entre las cavidades.

En algunos casos, el ciclado térmico está precedido por un periodo (por ejemplo, entre 1 y 15 minutos) de exposición  
55 a alta temperatura con el fin de activar la enzima de la PCR. Los reactivos pueden ciclarse entonces entre dos o más intervalos de temperatura apropiados para la PCR. Generalmente la cantidad de ADN diana se duplica en la conclusión de cada ciclo.

La detección por PCR puede realizarse por numerosas vías. Por ejemplo, en la PCR de criterio de valoración, el dispositivo experimenta un número de ciclos térmicos, y una vez el ciclo térmico se completa, se mide la fluorescencia de cada cámara de reacción. En la PCR en tiempo real, se mide periódicamente la fluorescencia de cada cámara durante o después de los ciclos, permitiendo que se cuantifique la cantidad de ADN en cada cámara en tiempo real.

En la PCR de criterio de valoración, una vez terminadas las reacciones deseadas, se recogen los resultados. Un método preferido de recoger los resultados es mediante técnicas ópticas. La recogida óptica puede realizarse utilizando un método adecuado, tal como por absorbancia, fluorescencia y/o luminiscencia de los contenidos de las cámaras de reacción. O, cada cámara puede representarse por microscopía y un operador puede observar manualmente las características específicas que proceden de las reacciones dentro de las cámaras. El conjunto para detección óptica puede estar completamente separado del conjunto del ciclo térmico. Por lo tanto, el dispositivo puede moverse desde el termociclador al conjunto para detección óptica una vez concluido el ciclo térmico.

En algunas realizaciones, la captación de imágenes del dispositivo puede realizarse según la disposición de cada gran número de cavidades conectadas a distintos pozos de entrada y pozos de venteo. En una realización, las imágenes del dispositivo pueden tomarse en ocho filas y doce columnas, estando cada fila separada de las filas adyacentes por una distancia de 9 milímetros y estando cada columna separada de las columnas adyacentes por una distancia de 9 milímetros. Según algunas realizaciones, la toma de imágenes puede realizarse mediante un sistema de captación de imágenes automático, compuesto de una cámara orientada perpendicular al plano de recorrido definido por una etapa de dos ejes. En algunas realizaciones, la luz de excitación la puede proporcionar una luz colocada fuera del paso óptico desde el dispositivo de la cámara. En algunas realizaciones, la luz puede proporcionarla una LED controlada por un programa informático.

En una realización, el dispositivo puede captarse en imágenes con un aparato de microscopía fluorescente. Puede proporcionarse una fuente de luz de excitación que produzca fluorescencia en moléculas fluorescentes en la solución contenida en el gran número de cavidades. La luz de emisión fluorescente procedente de las moléculas en la solución contenida en el gran número de cavidades puede captarse entonces con una cámara. La luz de excitación proporcionada puede ser a una longitud de onda diferente de la luz de emisión a fin de mejorar la relación señal-ruido de la luz de emisión. Las longitudes de onda de la luz de excitación y emisión pueden controlarse mediante el uso de filtros ópticos. En algunas realizaciones, el dispositivo puede captarse en imágenes con una o más series de filtros. Puede añadirse a la solución una sonda fluorescente dentro de las numerosas cavidades que es independiente de la reacción de amplificación y por lo tanto brilla uniformemente independientemente de si la reacción de amplificación de ácidos nucleicos contenía los reactivos necesarios. Esta sonda fluorescente puede usarse como colorante de referencia pasivo para calibrar el análisis por ordenador mostrando diferencias en los volúmenes contenidos en las numerosas cavidades y/o las diferencias en la iluminación de las cavidades por la luz de excitación. Por ejemplo, dicho colorante de referencia pasivo que puede utilizarse es el colorante de referencia ROX.

En algunas realizaciones, en la misma reacción pueden utilizarse dos o más colorantes fluorescentes. Esto puede servir para detectar la presencia de varios genes, que pueden dar lugar a ahorros de costes y aumento de eficiencias debido a la reducción en el número de reacciones necesarias. Dos o más colorantes fluorescentes pueden captarse en imágenes secuencialmente y compararse a un colorante de referencia pasivo a fin de normalizar cualquier iluminación o volumen de ingrediente líquido desiguales en las cavidades. Cada colorante fluorescente puede captarse en imágenes utilizando un filtro de excitación y un filtro de emisión diferentes. En algunas realizaciones, la captación de imágenes puede realizarse una cámara con capacidad para cambiar automáticamente los filtros de excitación y emisión.

Puede incorporarse un imán con al menos una cámara y el marco de la misma. Los filtros de emisión y excitación pueden estar colocados por parejas en un conjunto de un solo filtro, que entonces puede conectarse si se desea. Según algunas realizaciones, la captación de imágenes de las cavidades puede hacerse en diferentes configuraciones para cada colorante o molécula fluorescente, según se necesite para la fluorescencia de la solución en las cavidades.

En algunas realizaciones, el análisis por ordenador del dispositivo puede comprender el empleo de una plantilla correspondiente a la disposición y el tamaño conocidos de las cavidades. Esta plantilla puede estar dividida en numerosas áreas correspondientes al área de la primera superficie que define las cavidades ("áreas positivas") y a un área correspondiente al área de la primera superficie que no define características negativas ("áreas negativas"). Esta plantilla puede estar colocada y orientada sobre la imagen maximizando la relación de la suma total de todos los valores de los píxeles dentro de las áreas positivas a la suma de todos los valores de los píxeles dentro de las áreas negativas.

Los dispositivos de la presente descripción pueden servir para la PCR digital y/o la PCR no digital. Aunque los dispositivos ilustrados en las figuras se describen por tener relativamente pocas cavidades/alícuotas, puede apreciarse que cualquier número apropiado de cavidades/alícuotas puede aplicarse. Por ejemplo, los dispositivos empleados para PCR digital pueden formar 100 a 10.000 alícuotas por cada entrada de muestra. En general, cuanto

mayor es el número de divisiones para una aplicación de PCR digital, mayor es el intervalo dinámico y, por consiguiente, mejor es la precisión estadística de la cuantificación de la muestra.

5 En algunas realizaciones, los dispositivos microfluídicos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para la PCR digital donde la cantidad de ADN en una muestra está cuantificada. Como se expuso anteriormente, en PCR digital una muestra de ADN se divide en un gran número de alícuotas independientes. Una vez dividido el volumen de muestra en varias alícuotas, se amplifica por PCR, y la cantidad de ADN de la muestra original puede calcularse entonces contando el número de alícuotas que han experimentado crecimiento exponencial por PCR. El análisis para la PCR digital es un proceso binario donde una alícuota o bien experimenta PCR porque al menos una molécula de ADN diana estaba presente en la alícuota, o la alícuota no experimenta PCR porque ningún ADN diana estaba presente en la alícuota. Por lo tanto, la concentración original de ADN (por ejemplo, antes de la dilución) puede determinarse basándose en una distribución calculada (por ejemplo, distribución de Poisson) de alícuotas positivas y negativas.

10 El dispositivo microfluídico puede proporcionar un volumen adecuado para cada cavidad/alícuota. En algunas realizaciones, un intervalo adecuado de volumen por reparto (por ejemplo, formando cavidades de reacción) puede estar comprendido entre 10 picolitros y 300 nanolitros, entre 500 picolitros y 200 nanolitros o entre 1 nanolitro y 100 nanolitros. Con capacidad para producir un gran número de alícuotas, el volumen de cada alícuota puede reducirse tanto como se necesite reducir la cantidad de reactivos y, por consiguiente, el coste total.

20 Con dicha construcción sencilla, puede fabricarse fácilmente, rápidamente y a bajo coste un dispositivo microfluídico desechable. En algunas realizaciones, una o más de las capas de dispositivo microfluídico es desechable; o una o más de las capas puede ser reusable después del lavado adecuado para eliminar los reactivos/productos residuales.



**REIVINDICACIONES**

1. Un dispositivo microfluídico, que comprende:  
una primera capa (100) que define una primera cavidad (102);  
un primer canal (104) dispuesto para proporcionar entrada de líquido a la primera cavidad (102);
- 5 una segunda capa (110) que define una segunda cavidad (112);  
un segundo canal (114) dispuesto para proporcionar entrada de líquido a la segunda cavidad (112); y
- 10 al menos un material de separación (150) que proporciona la separación del líquido entre la primera cavidad (102) y la segunda cavidad (112) en donde la compresión de la primera (100) y la segunda (110) capas entre sí da lugar al sellado del primer canal (104) y del segundo canal (114) produciendo la obstrucción de la primera cavidad (102) y de la segunda cavidad (112) a partir de la entrada posterior del líquido, en donde la manipulación de al menos un material de separación (150) da lugar a la eliminación de la separación del líquido lo que permite la comunicación fluida entre la primera cavidad (102) y la segunda cavidad (112), en donde la compresión de la primera (100) y la segunda (110) capas entre sí da lugar al relleno sustancial del primer (104) y segundo (114) canales con un material sellador, y en donde al menos un material de separación (150) comprende el material sellador.
- 15 2. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la primera capa (100) define numerosas primeras cavidades (102) y la segunda capa (110) define numerosas segundas cavidades (112), correspondiendo las numerosas primera y segunda cavidades a una serie de cámaras (12), y en donde cada cámara se adapta para alojar una reacción tras la eliminación de la separación del líquido según una combinación de ingredientes líquidos proporcionada por numerosos depósitos de origen líquido.
- 20 3. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la compresión de la primera (100) y segunda (110) capas entre sí da lugar al aislamiento del líquido de la primera (102) y la segunda (112) cavidades de la primera (102) y la segunda (112) cavidades adyacentes.
4. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde al menos un material de separación (150) y el material sellador comprenden una sola película deformable.
- 25 5. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la compresión de la primera (100) y segunda (110) capas entre sí produce la deformación plástica del material sellador.
6. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde el calentamiento del material sellador favorece el relleno sustancial del primer (104) y segundo (114) canales con el material sellador.
- 30 7. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la manipulación del material sellador produce la eliminación irreversible de la separación del líquido en la primera (102) cavidad y la segunda (112) cavidad.
8. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde el lagrimeo de al menos un material de separación produce la eliminación de la separación del líquido entre la primera (102) cavidad y la segunda (112) cavidad.
- 35 9. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 8, en donde al menos un material de separación (150) y un estado con sobrecarga o estiramiento que, tras la manipulación, favorece el lagrimeo de al menos un material de separación.
10. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 8, en donde al menos un material de separación (150) tiene una ranura o al menos está parcialmente cortado que, tras la manipulación, favorece el lagrimeo de al menos un material de separación.
- 40 11. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde al menos un material de separación (150) está adaptado para contraerse por aplicación de calor.
12. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde la manipulación de al menos un material de separación (150) comprende la aplicación de al menos uno de entre calor, una fuerza compresiva, una fuerza impulsada magnéticamente, irradiación de láser y centrifugación.
- 45 13. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, que comprende además al menos una cavidad de alivio conectada fluidamente a una cavidad correspondiente y adaptada para recibir un rebose de líquido de la cavidad correspondiente.
14. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, que comprende además al menos una cavidad de de almacenamiento adaptada para evitar el exceso de material sellador a partir del llenado de la primera cavidad (102) y la segunda cavidad (112).

15. El dispositivo microfluídico de la reivindicación 1, en donde el primer (104) y segundo (114) canales están alineados con numerosas protuberancias que se extienden desde al menos una de entre la primera capa (100), la segunda capa (110) y una capa adicional (220).

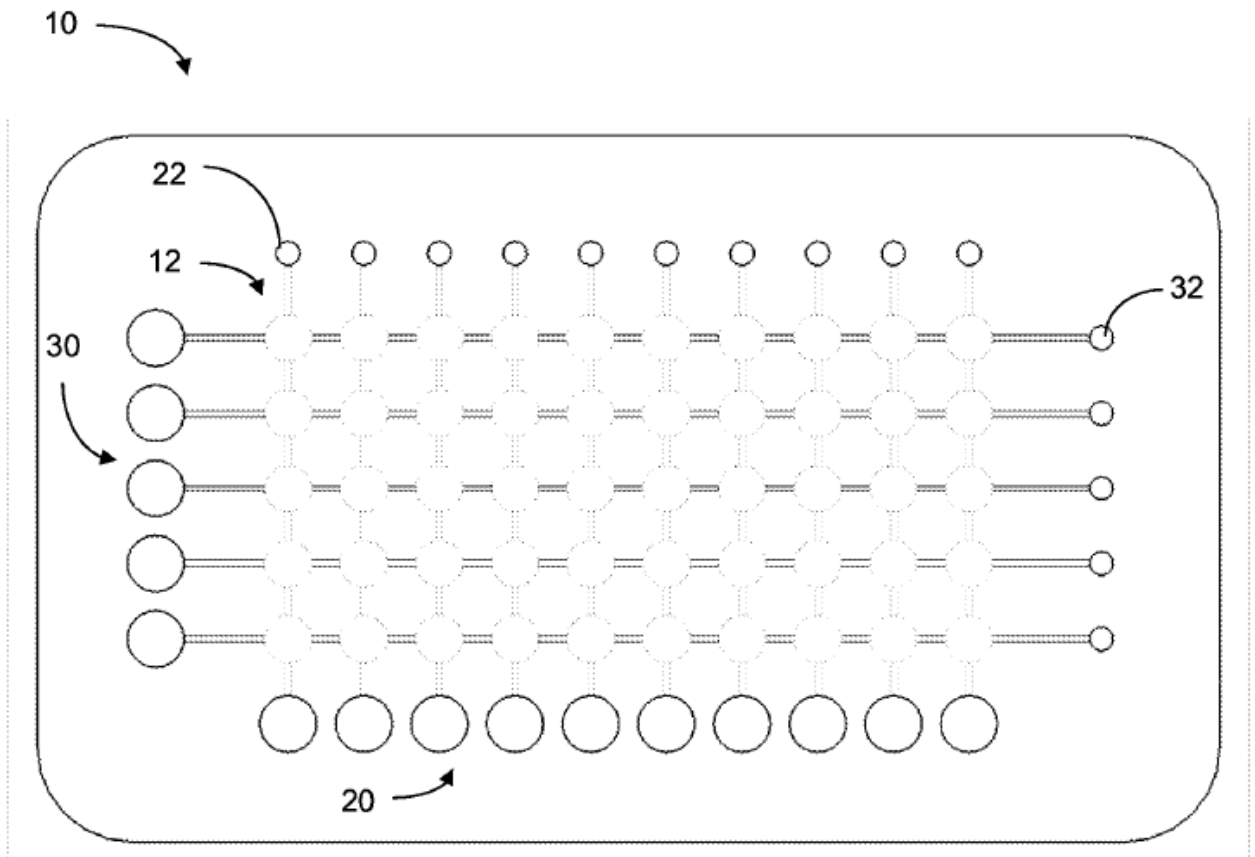


Fig. 1

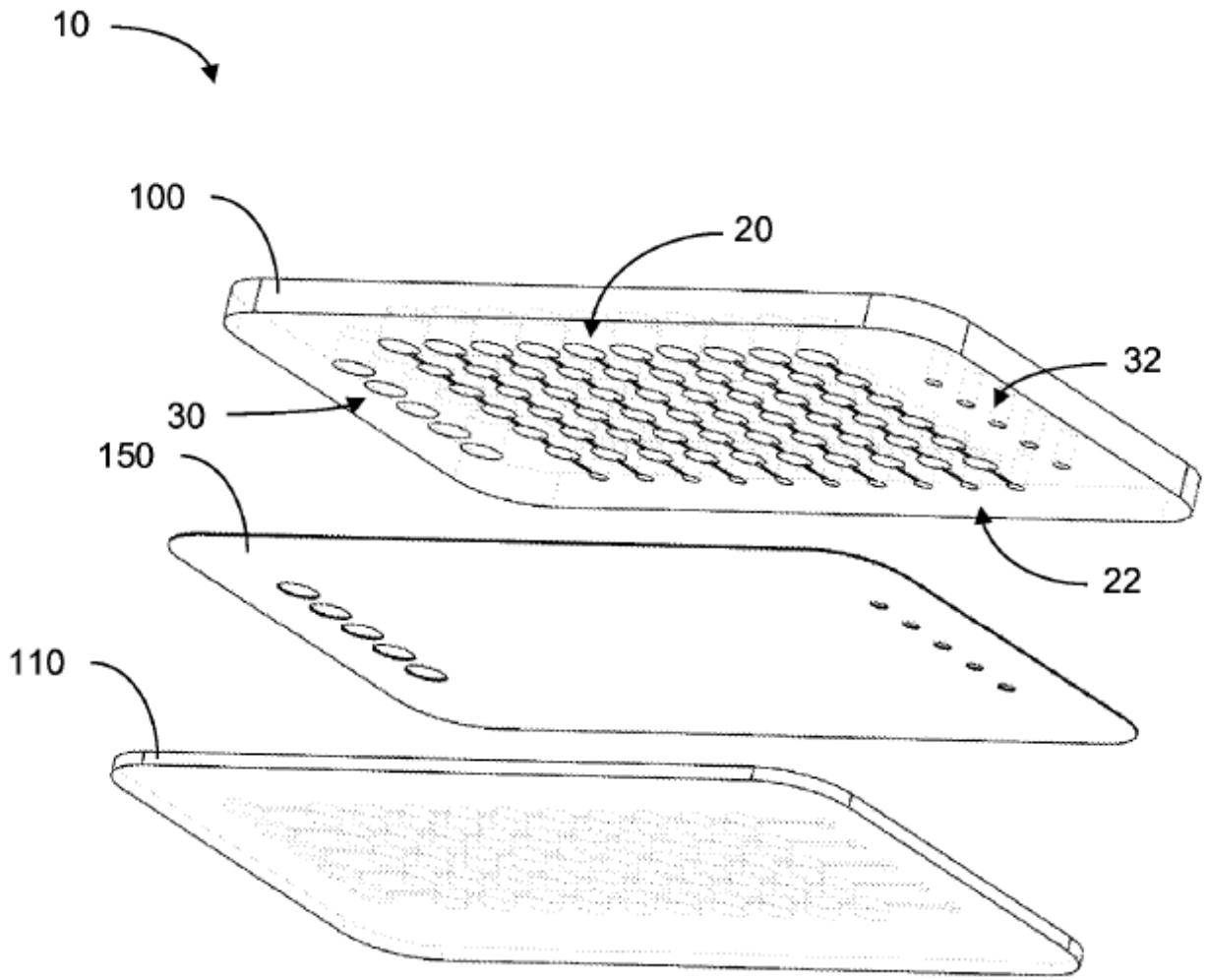


Fig. 2

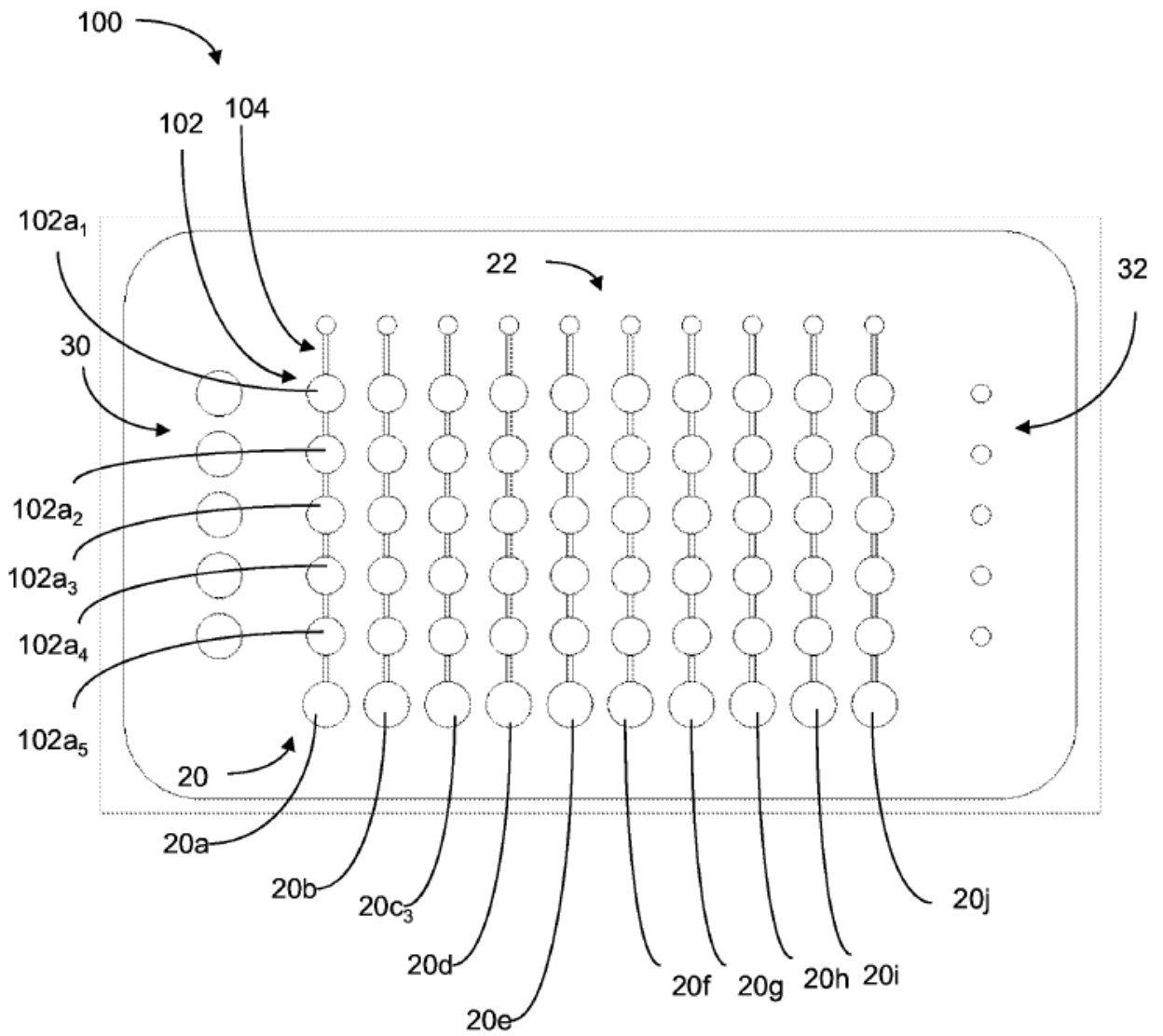


Fig. 3A

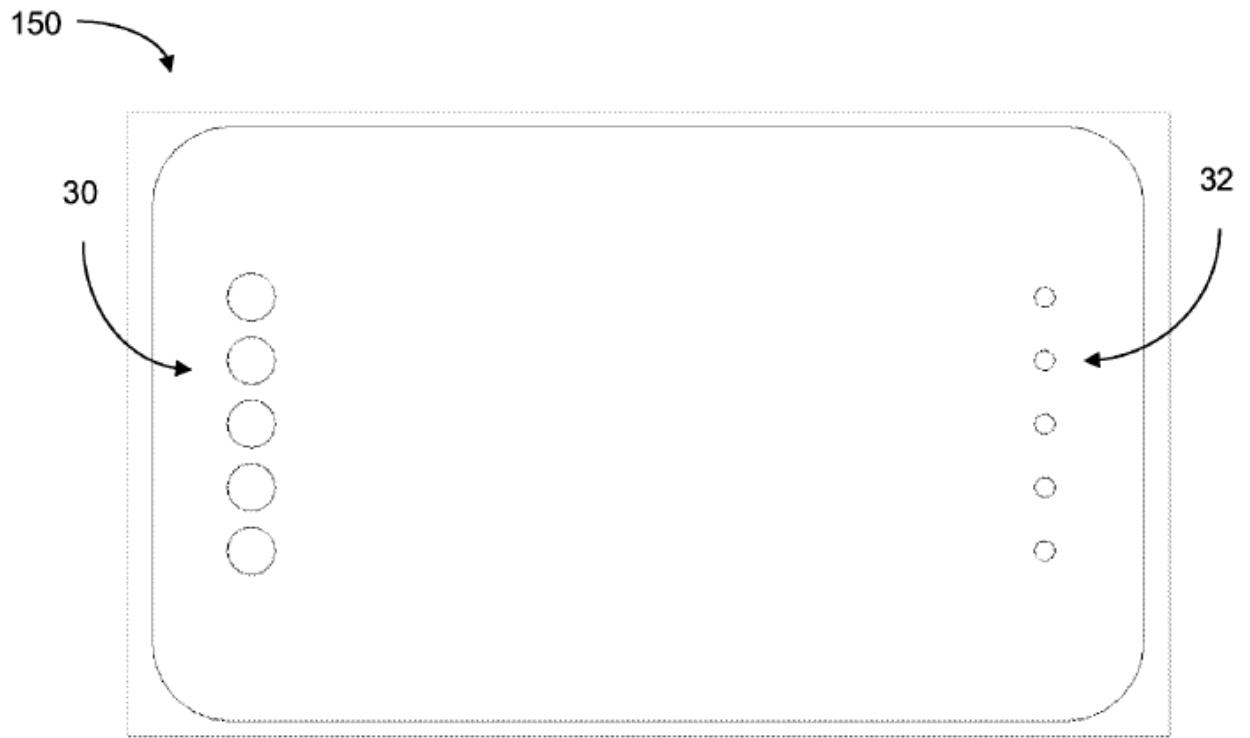


Fig. 3B

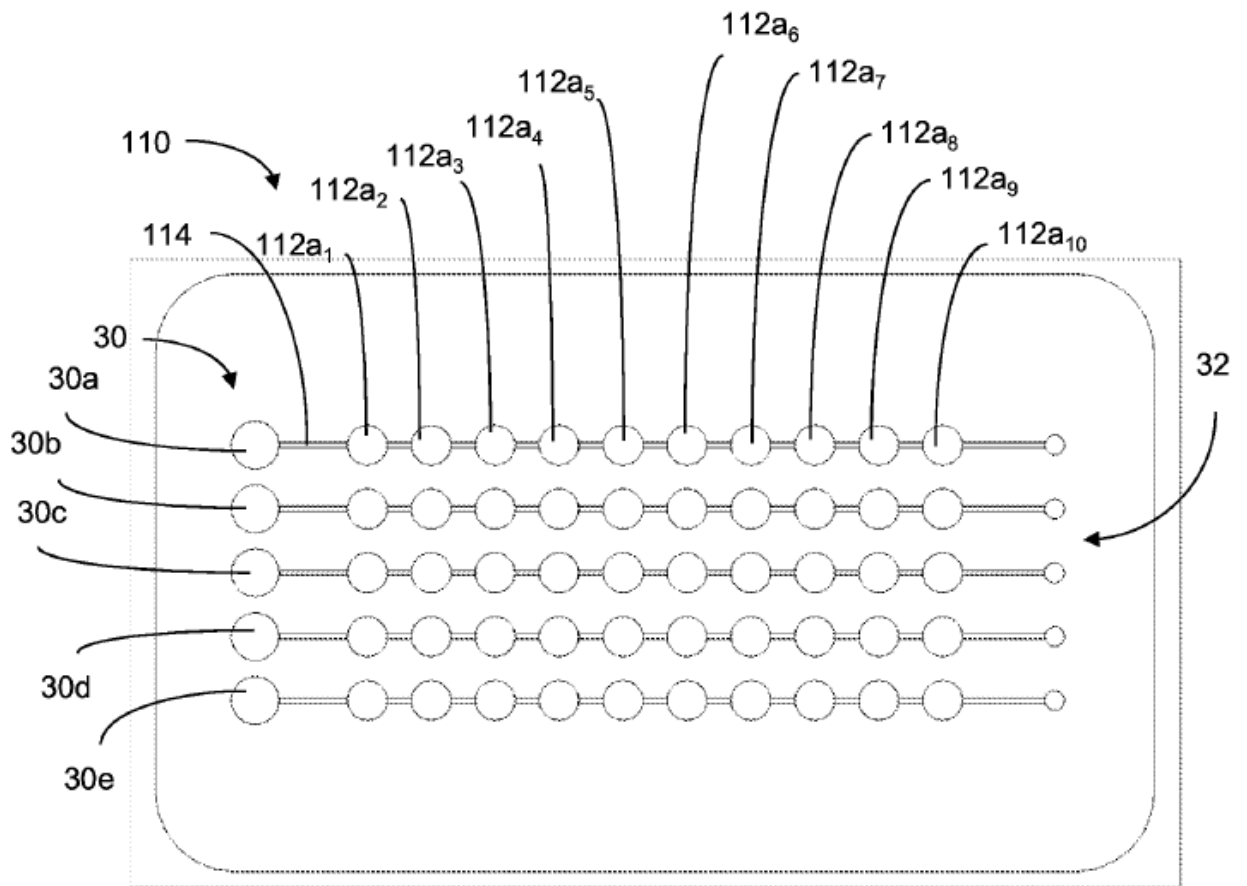


Fig. 3C

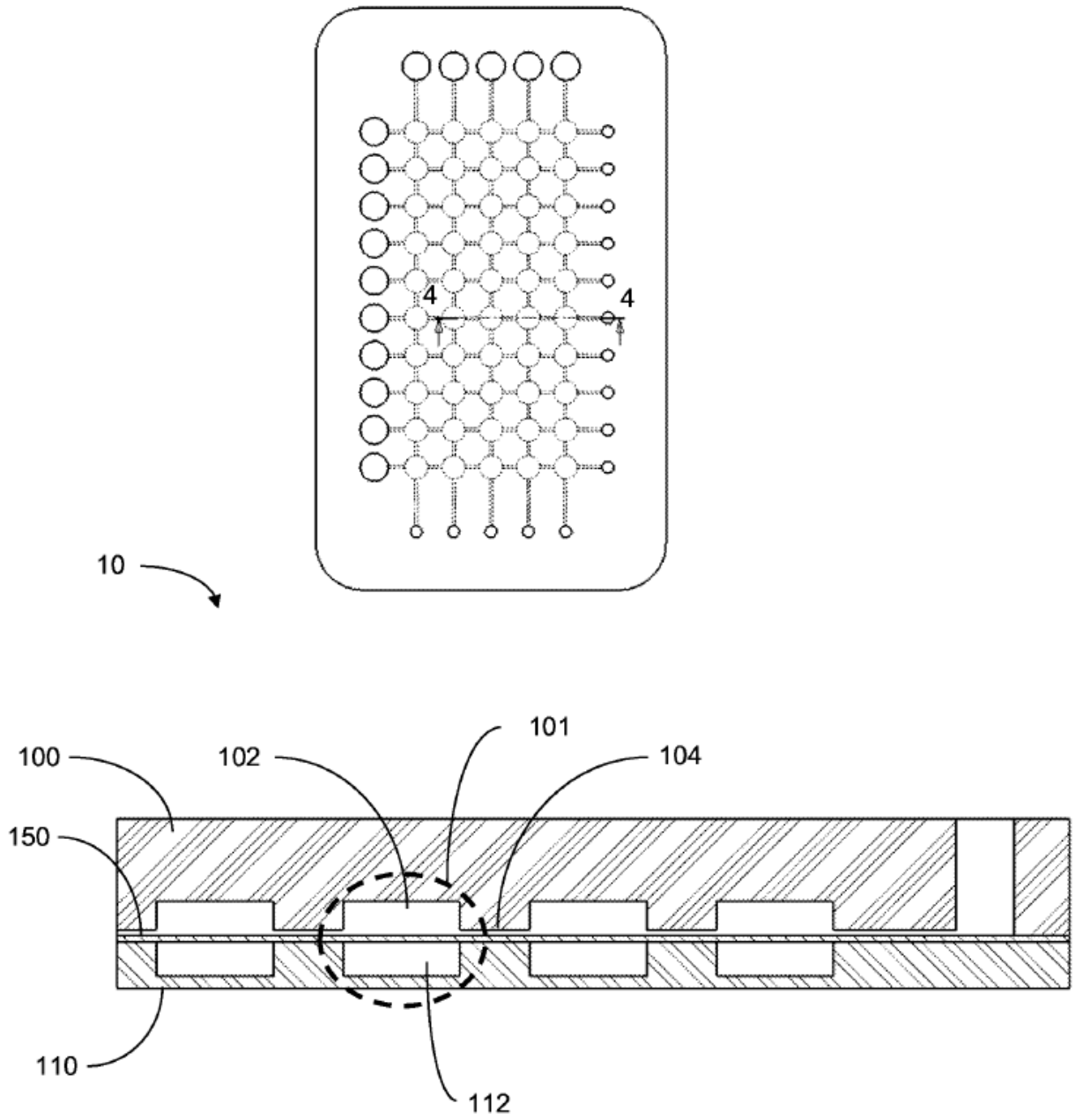


Fig. 4



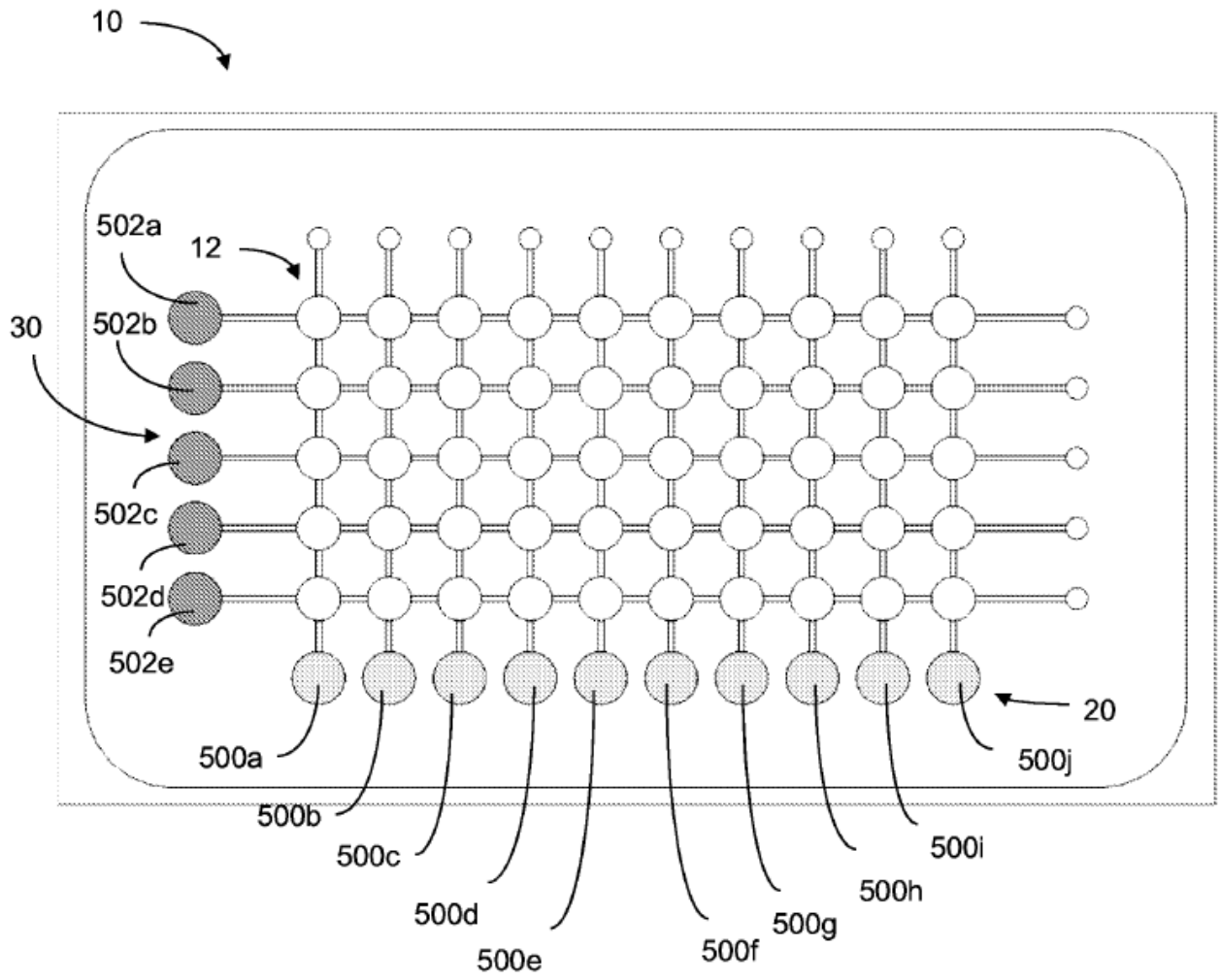


Fig. 5

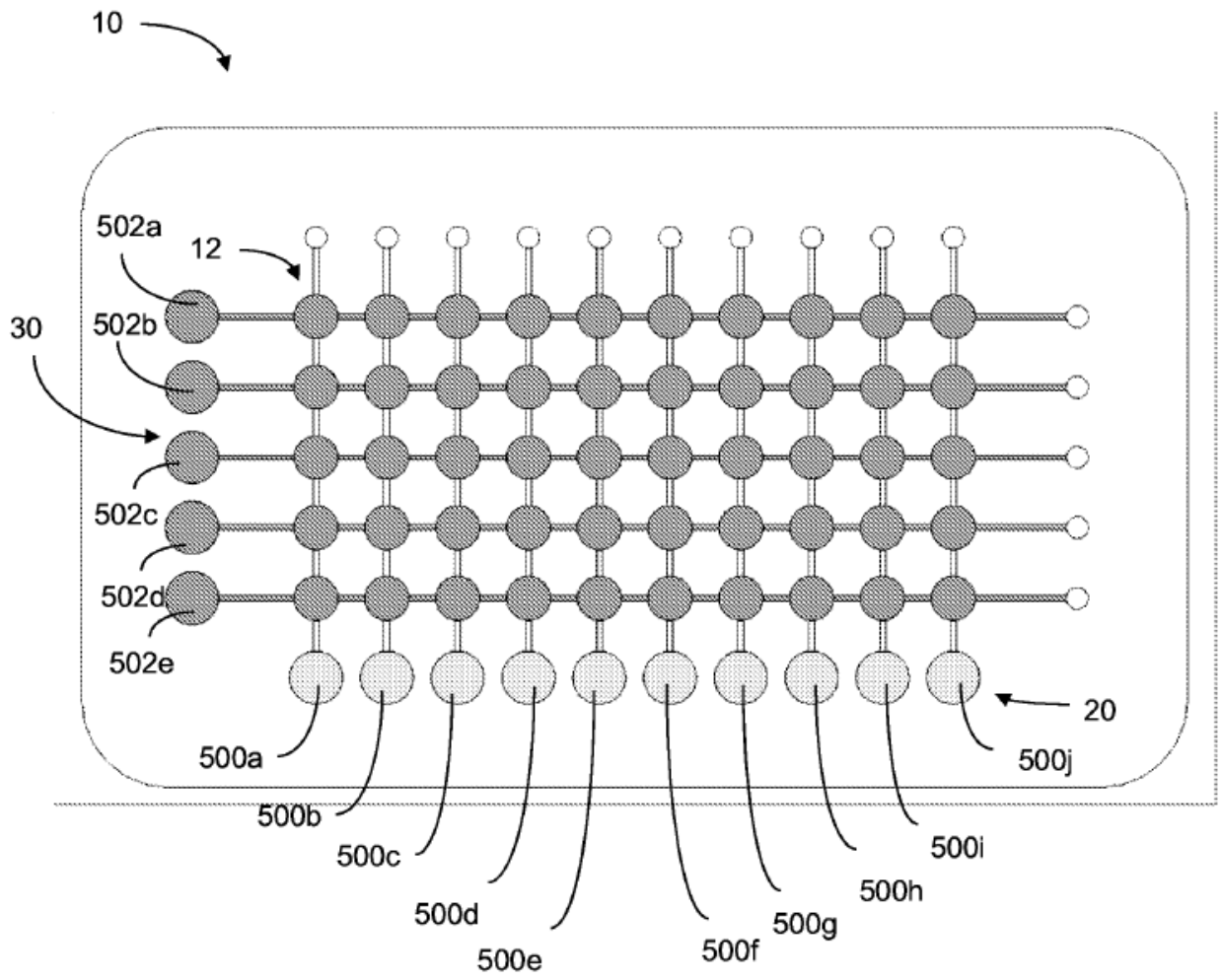


Fig. 6

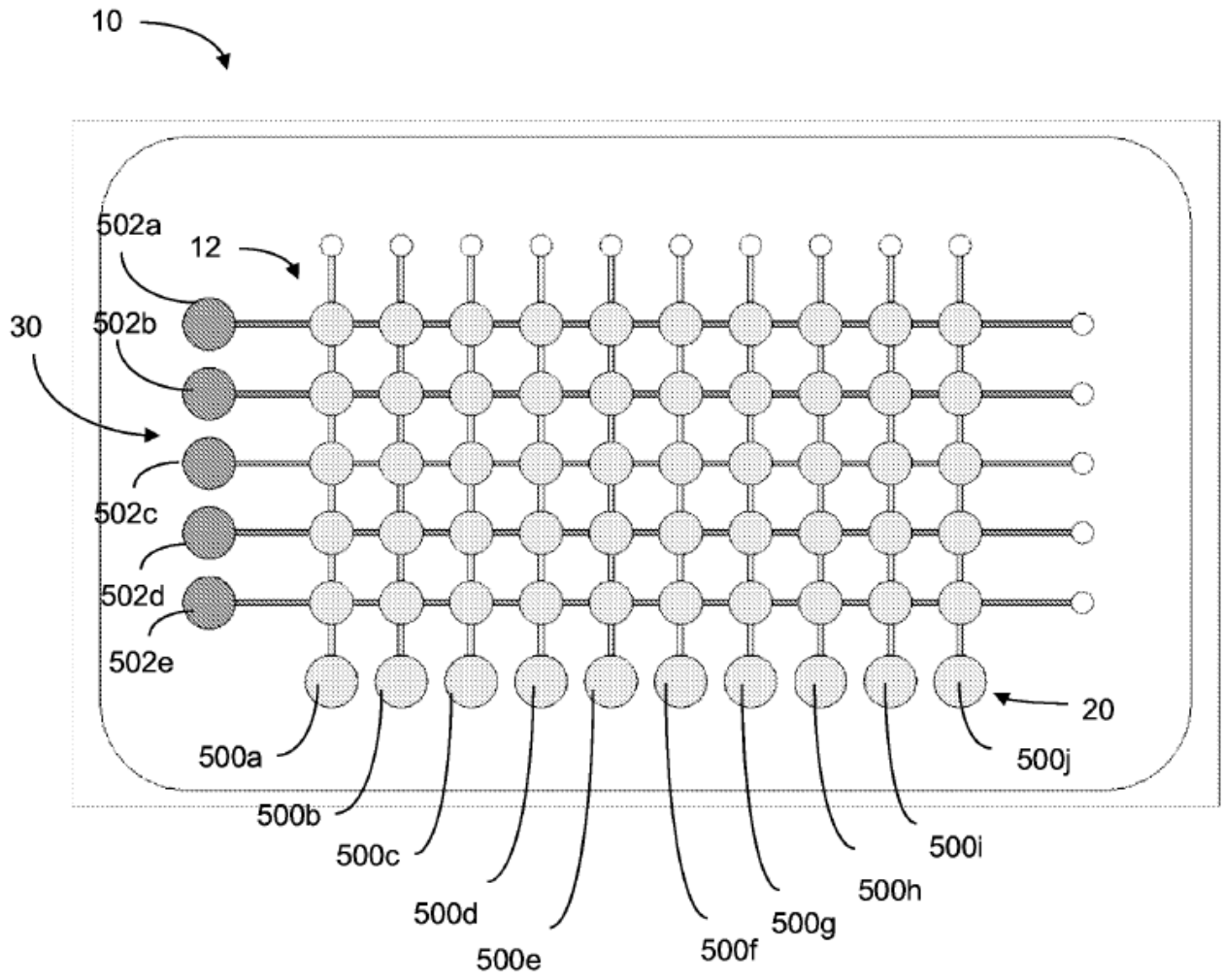


Fig. 7A

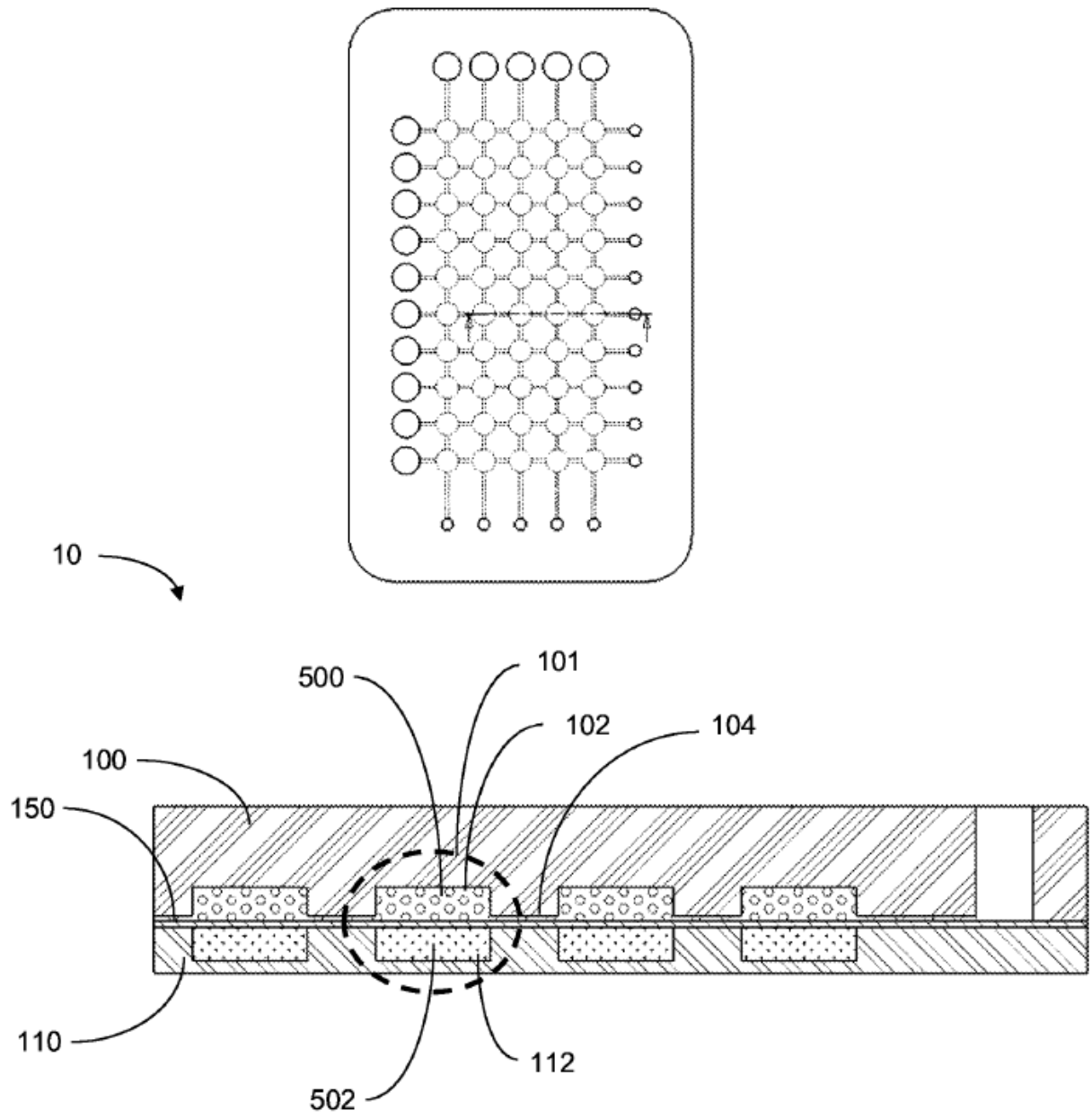


Fig. 7B

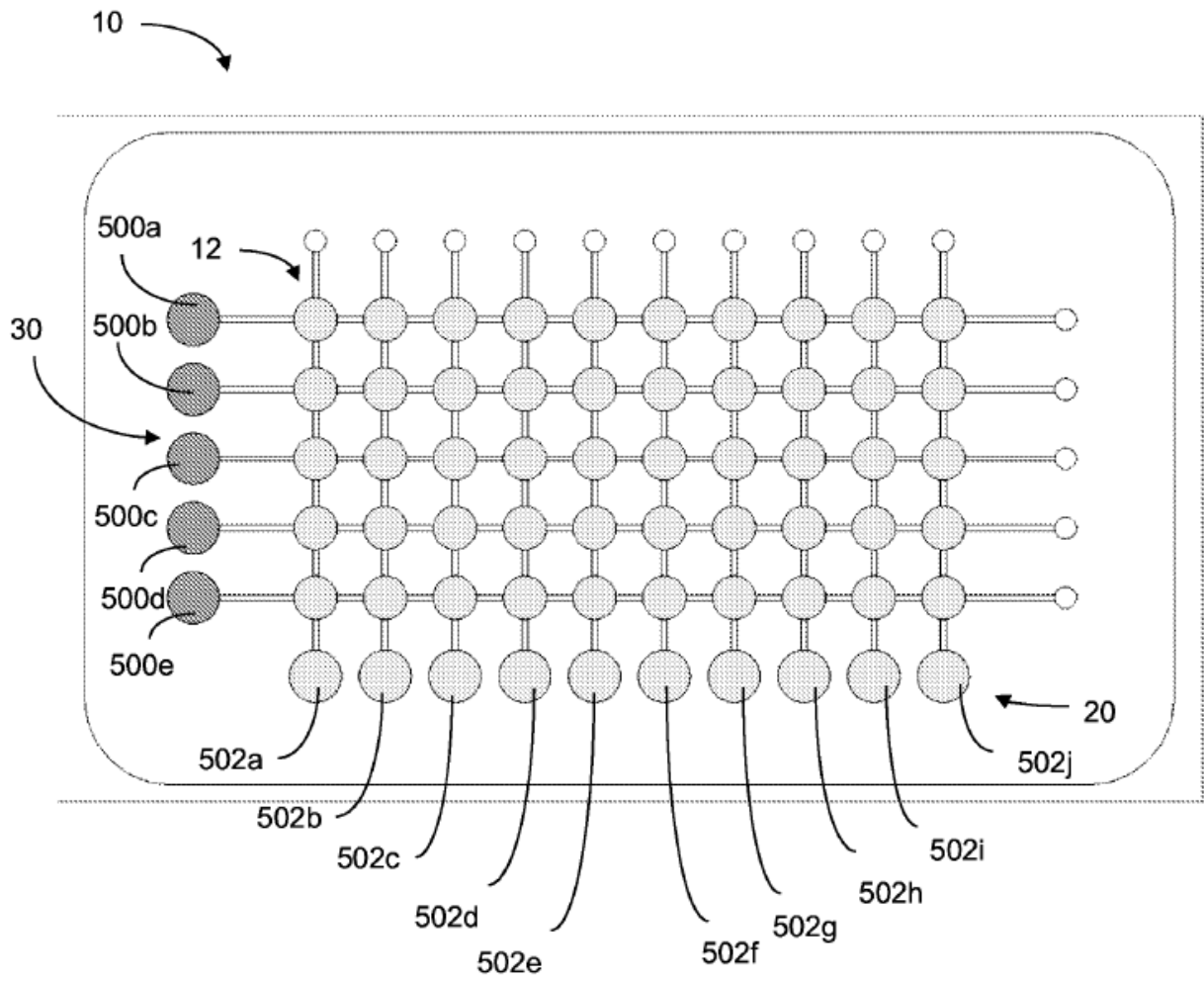


Fig. 8A

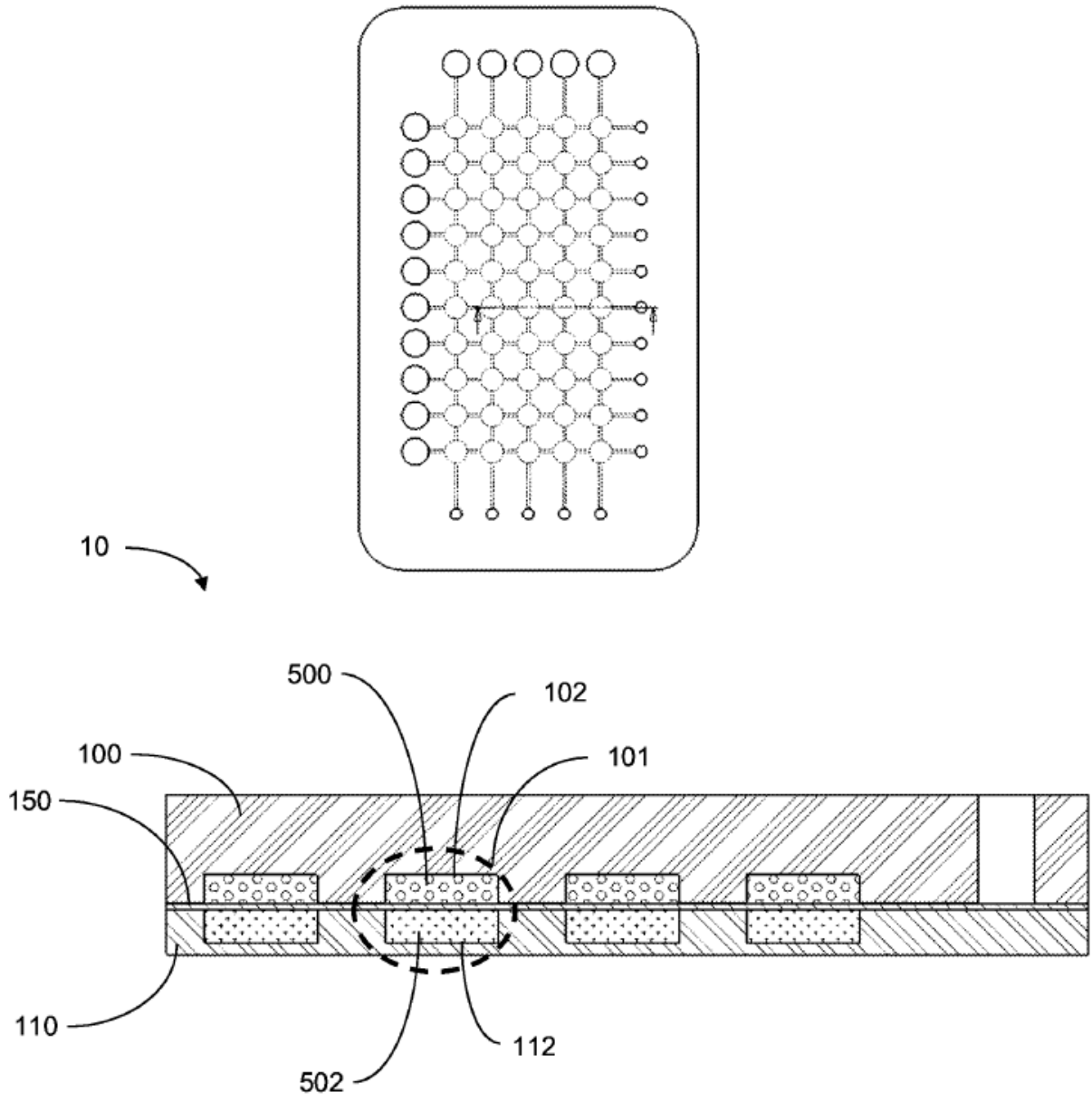


Fig. 8B

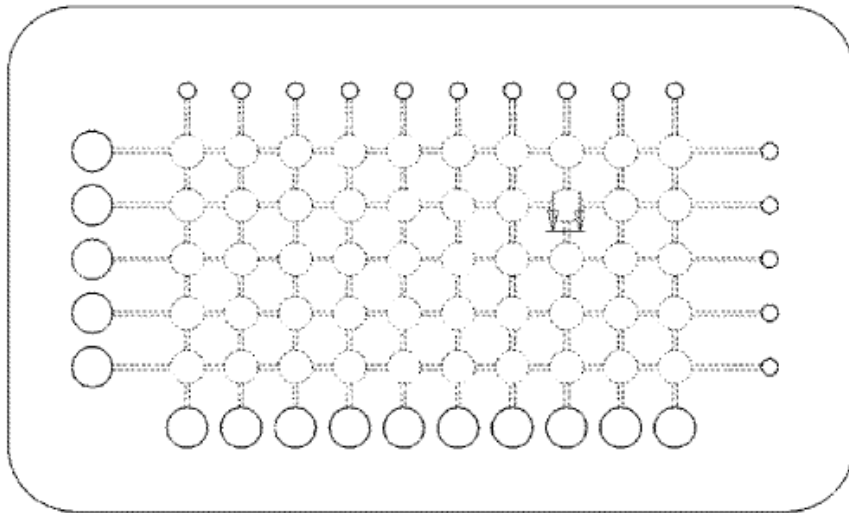


Fig. 9A

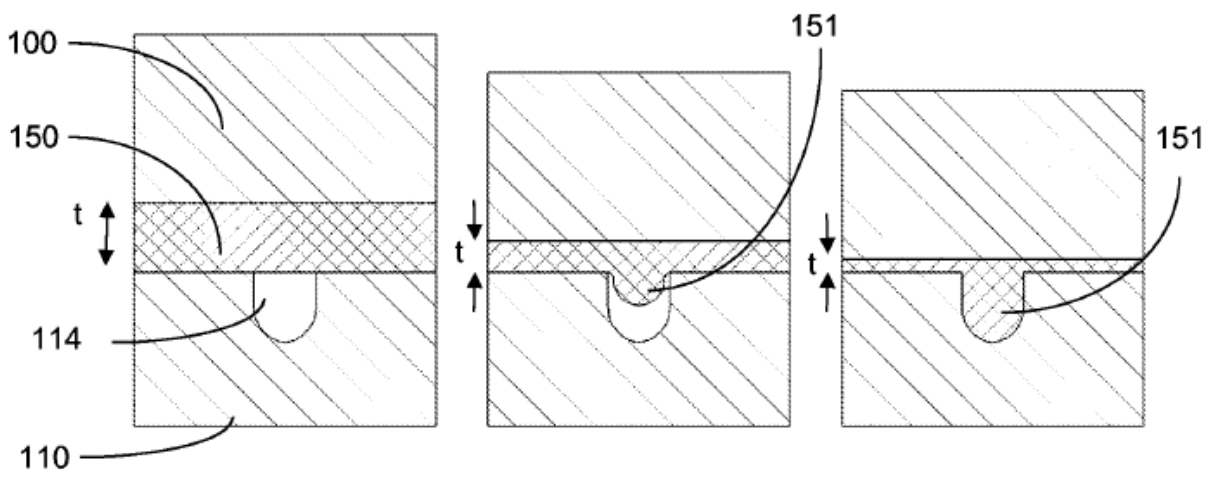


Fig. 9B

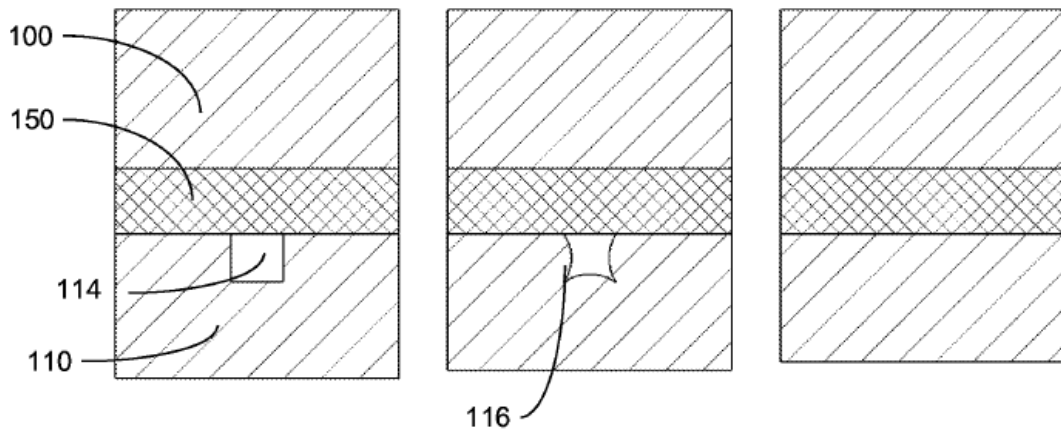


Fig. 9C

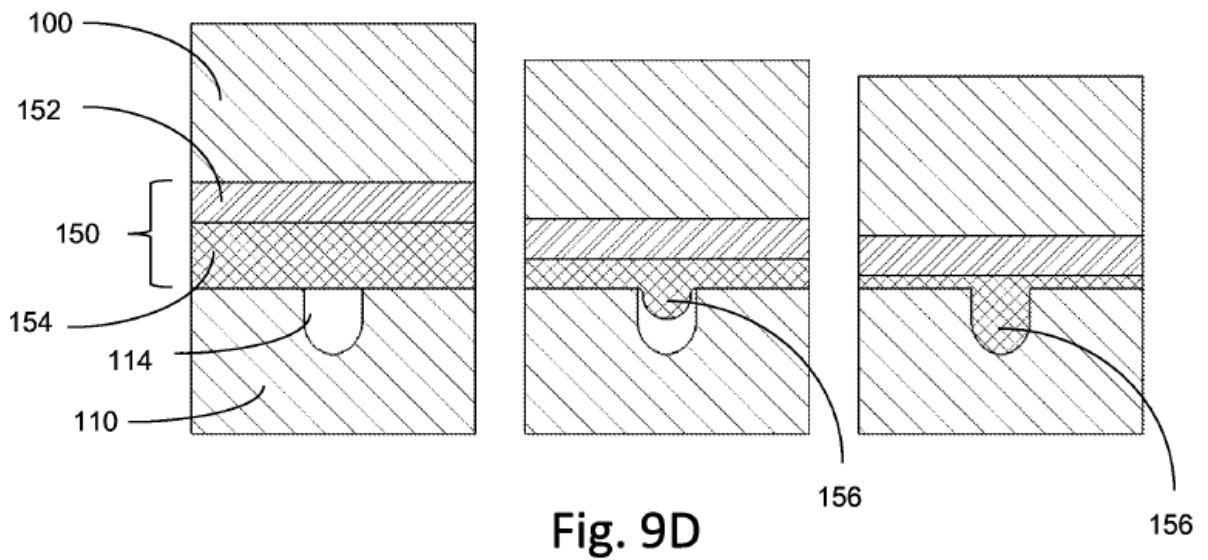


Fig. 9D



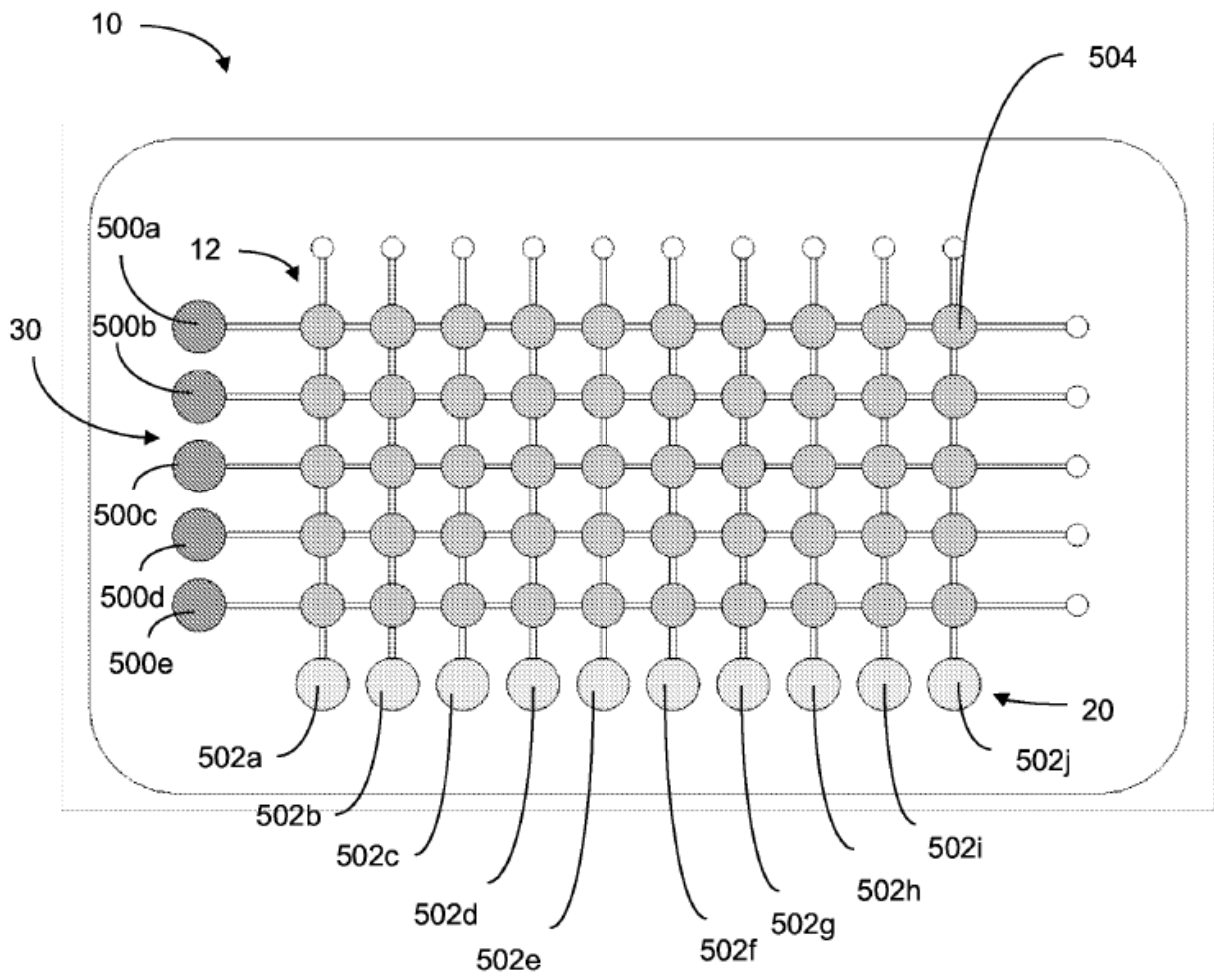
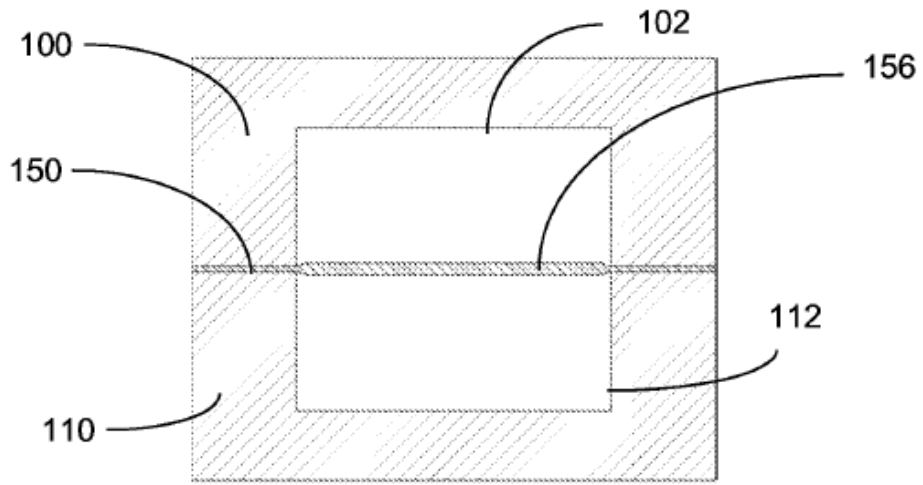
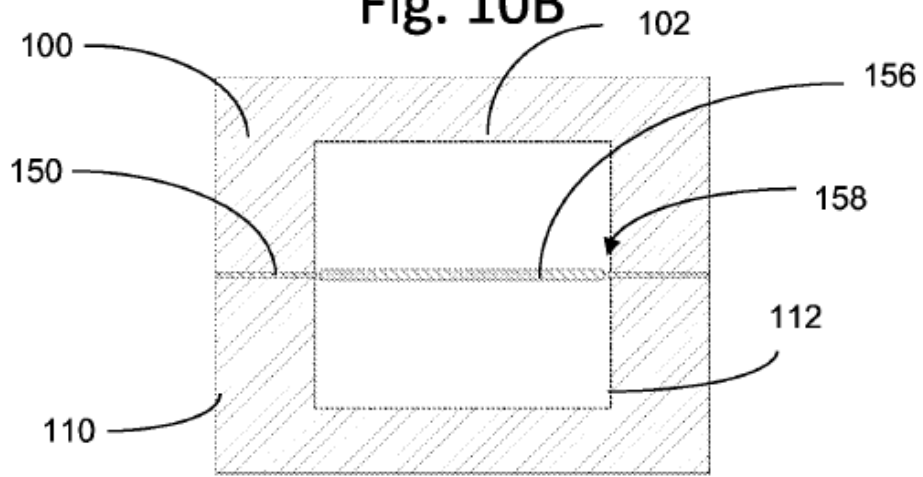


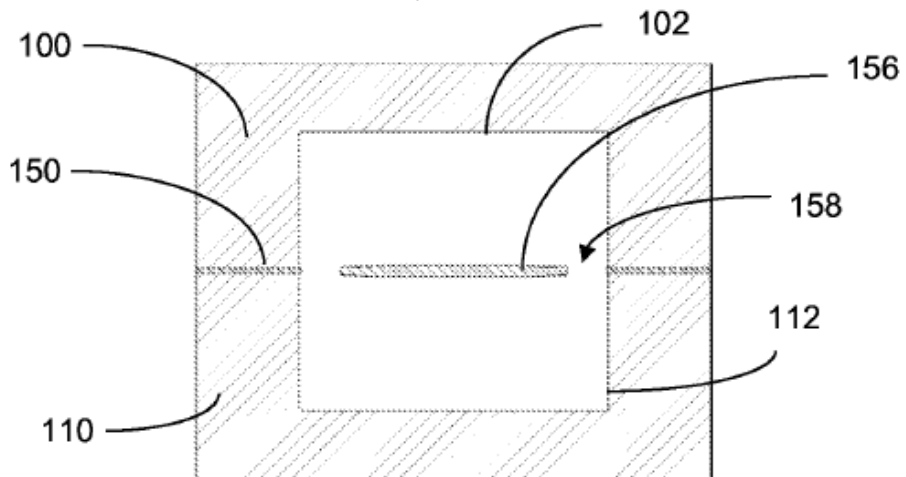
Fig. 10A



**Fig. 10B**



**Fig. 10C**



**Fig. 10D**

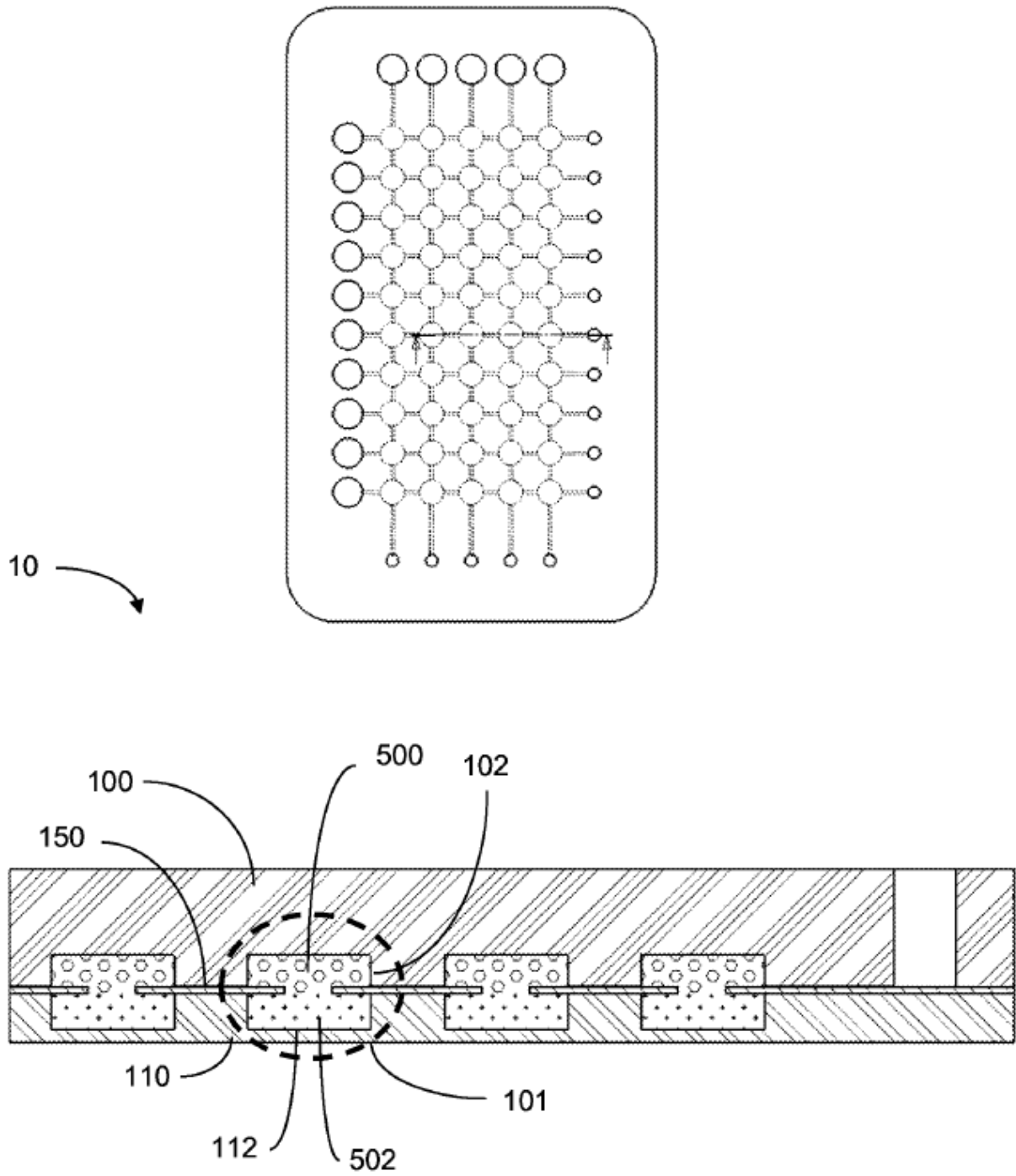


Fig. 10E

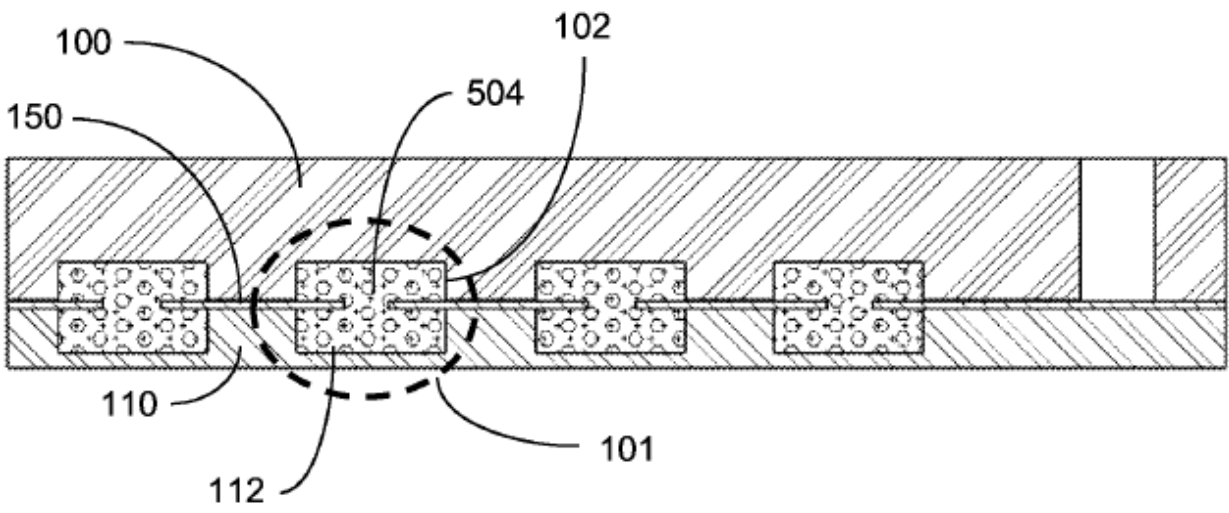
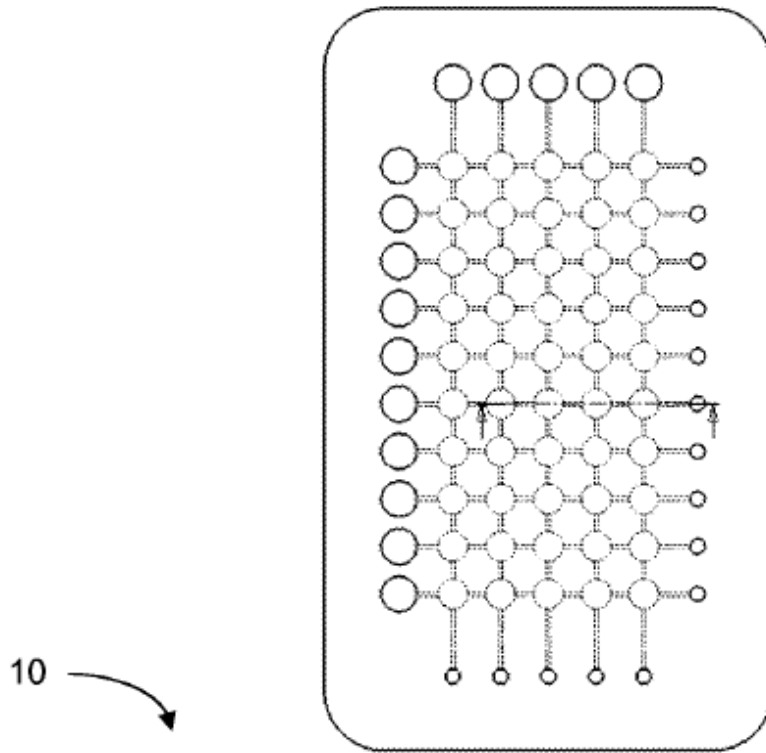


Fig. 10F

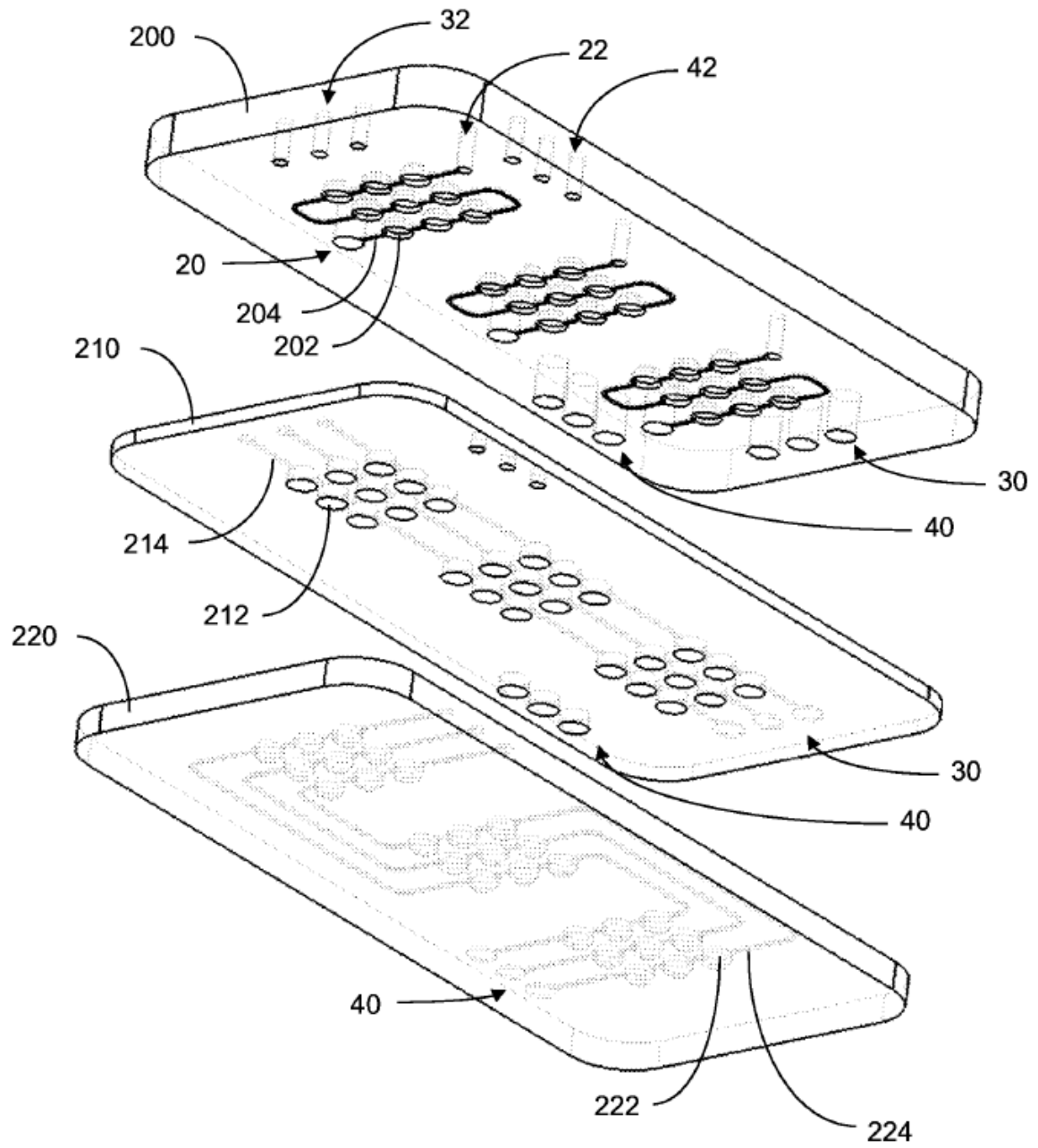


Fig. 11A

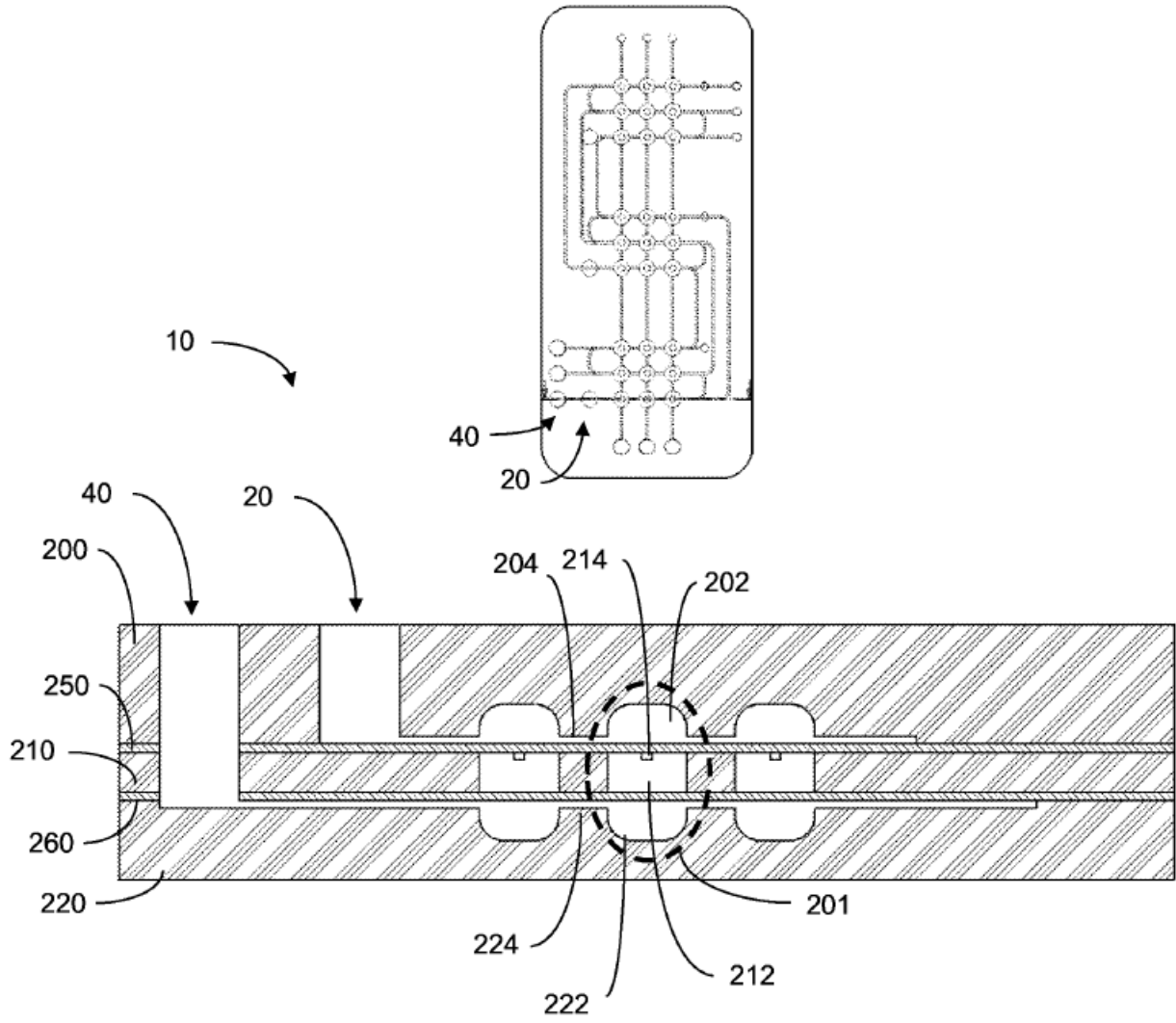


Fig. 11B

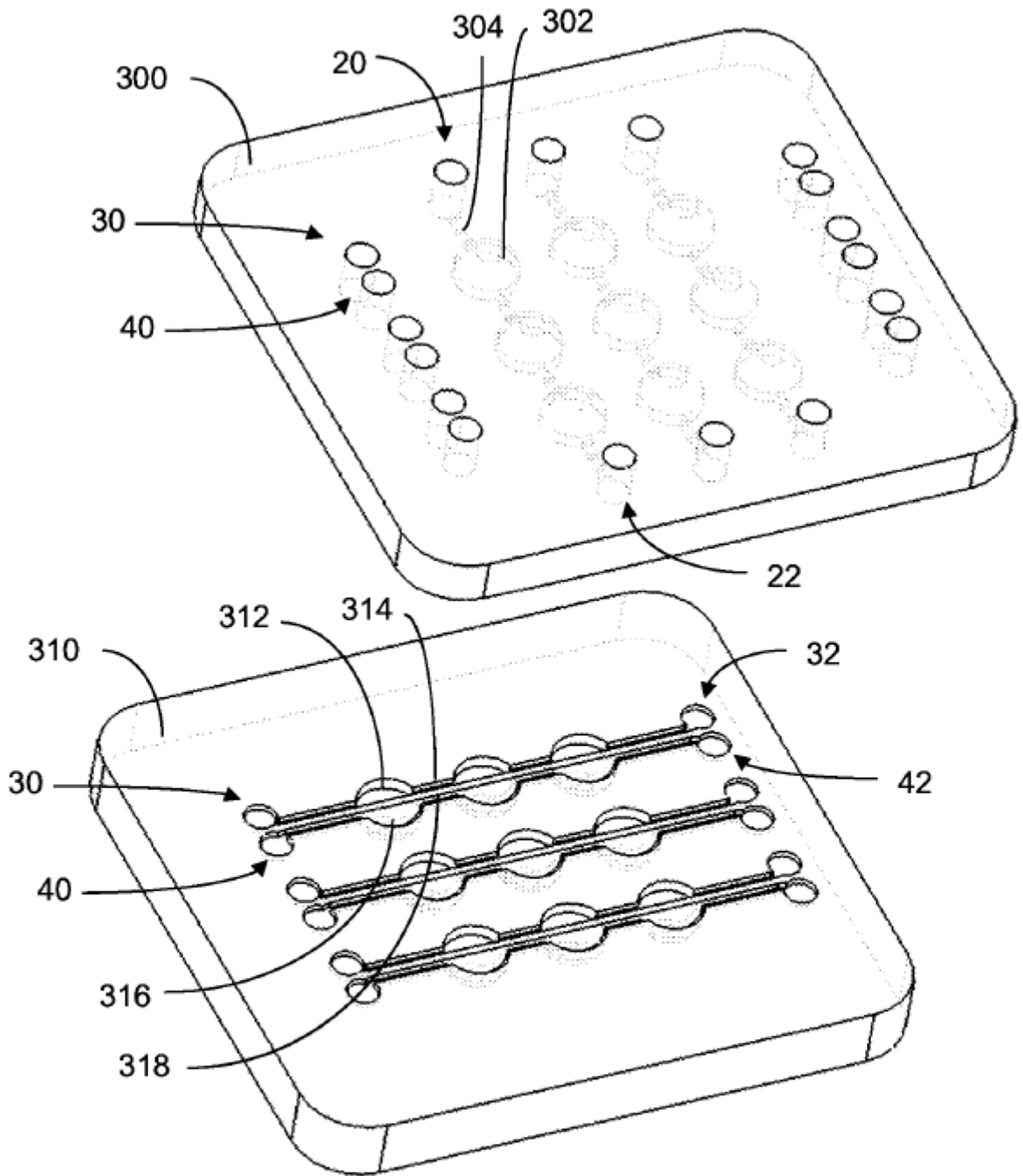


Fig. 12A

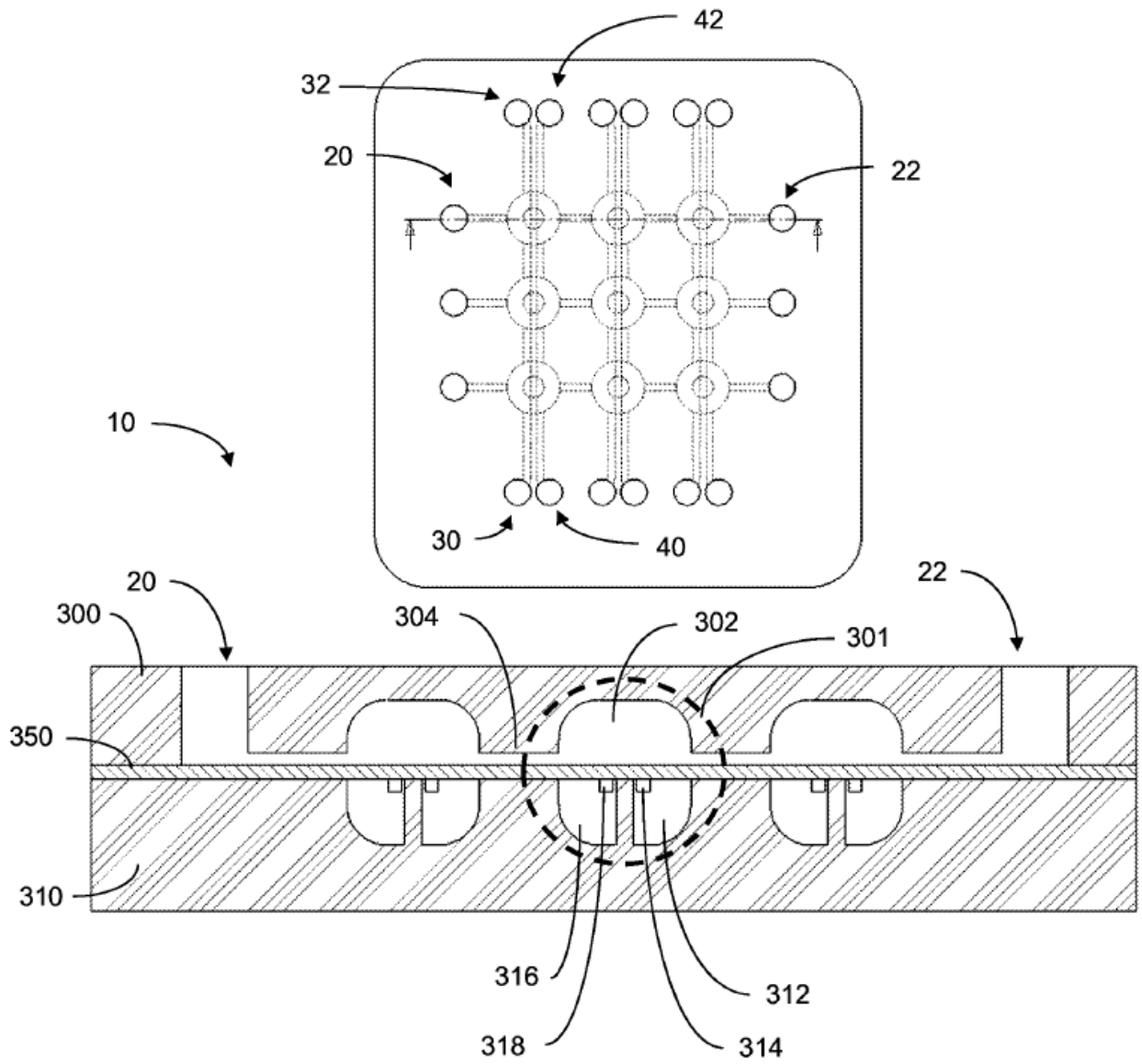
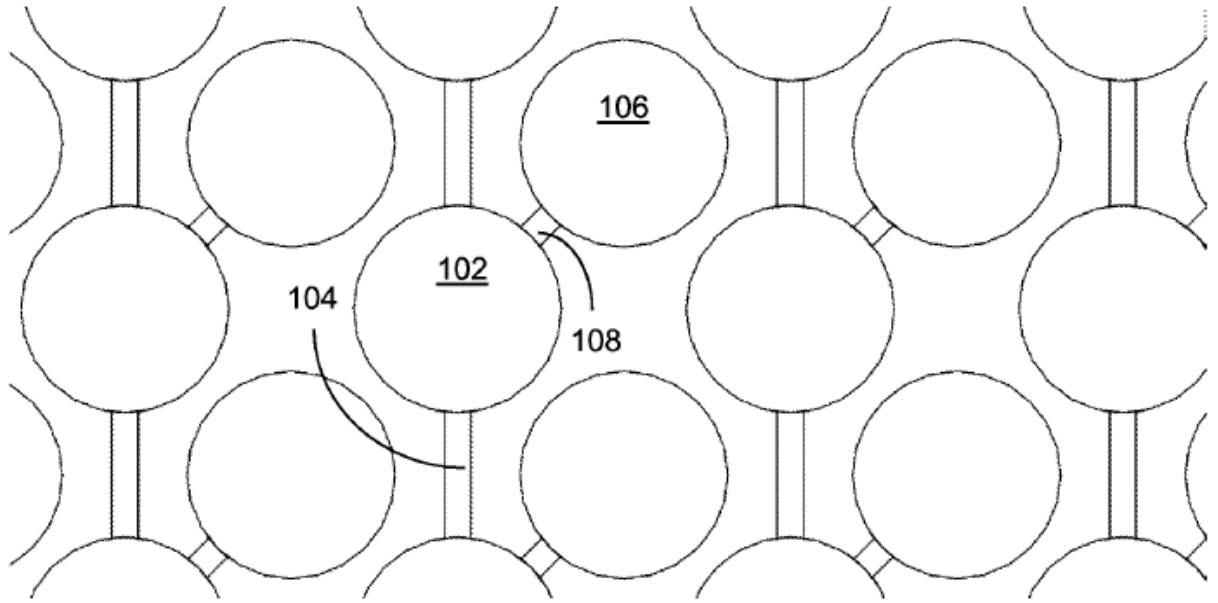


Fig. 12B





**Fig. 13A**

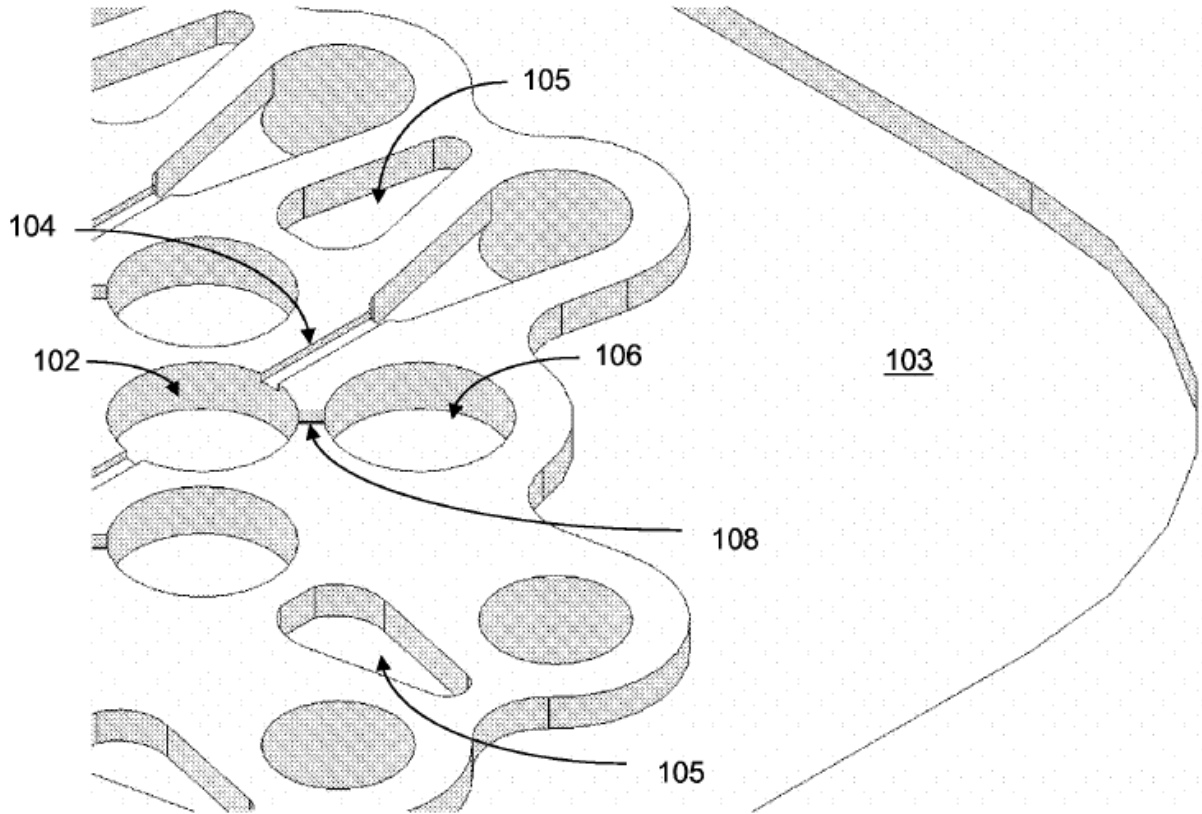


Fig. 13B

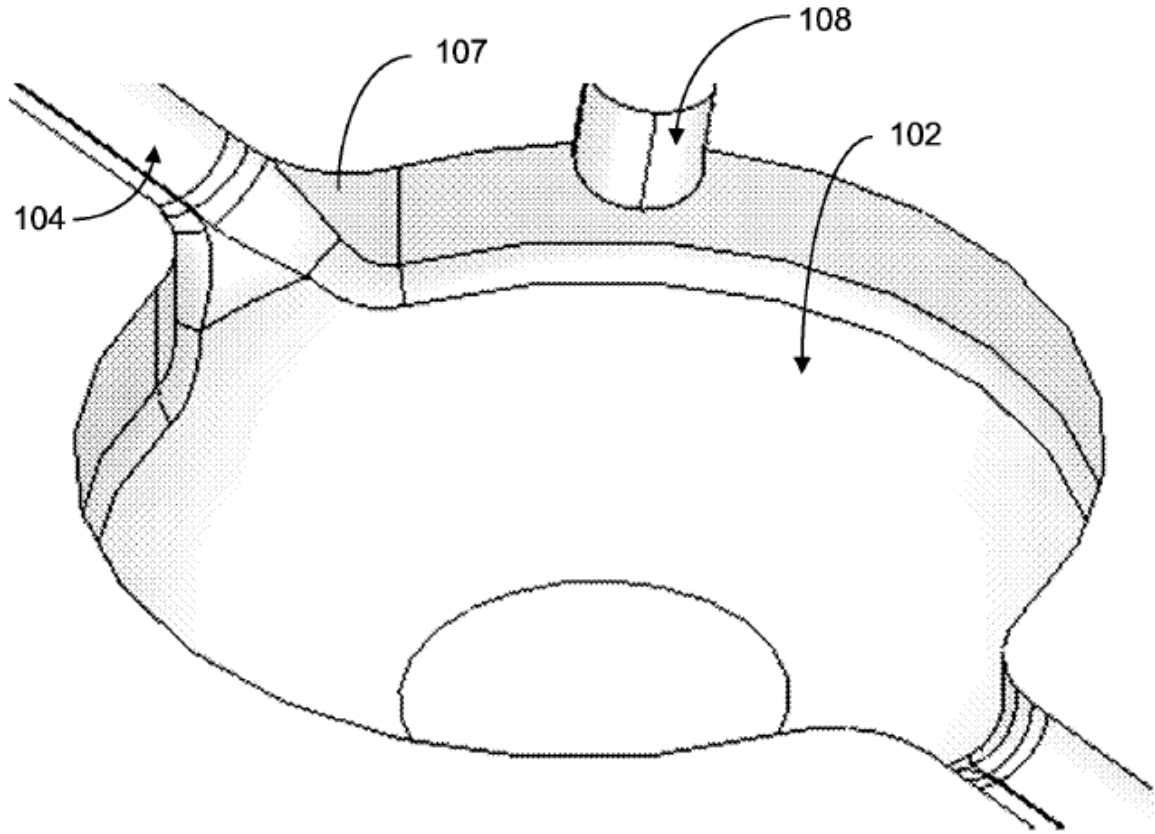


Fig. 14

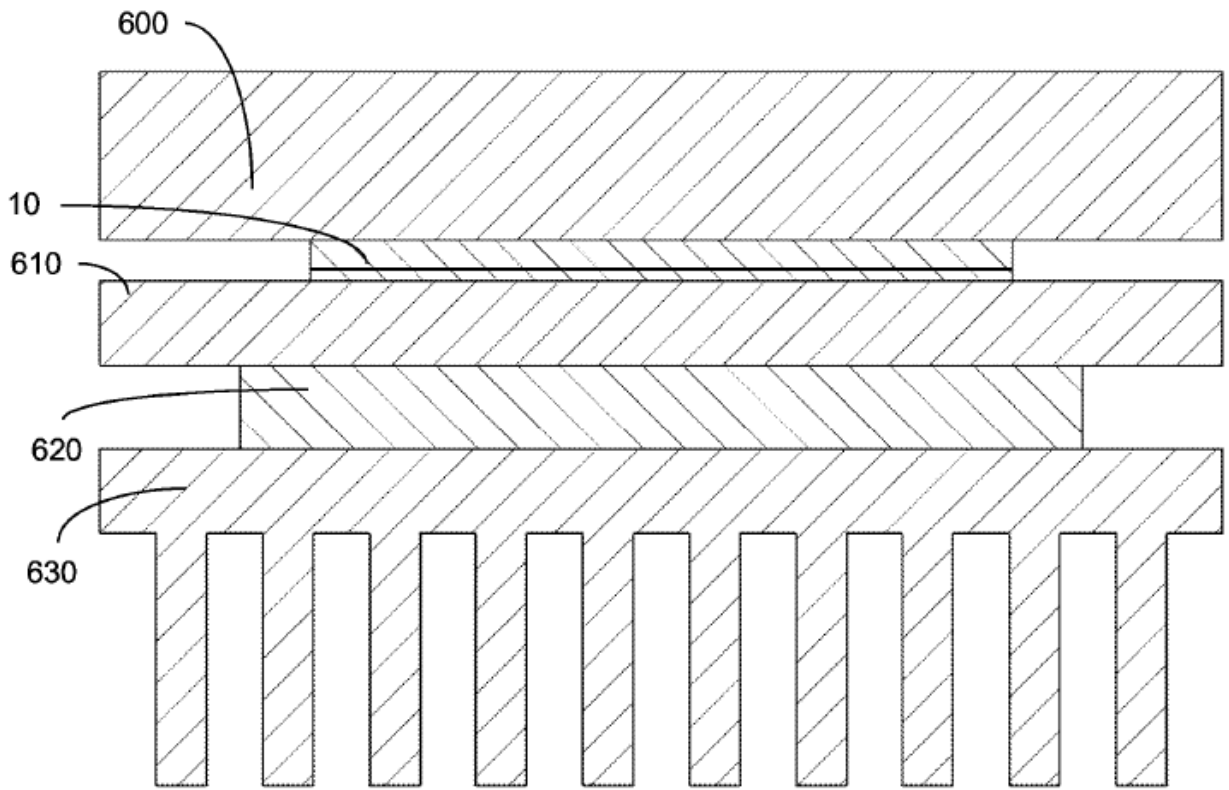


Fig. 15

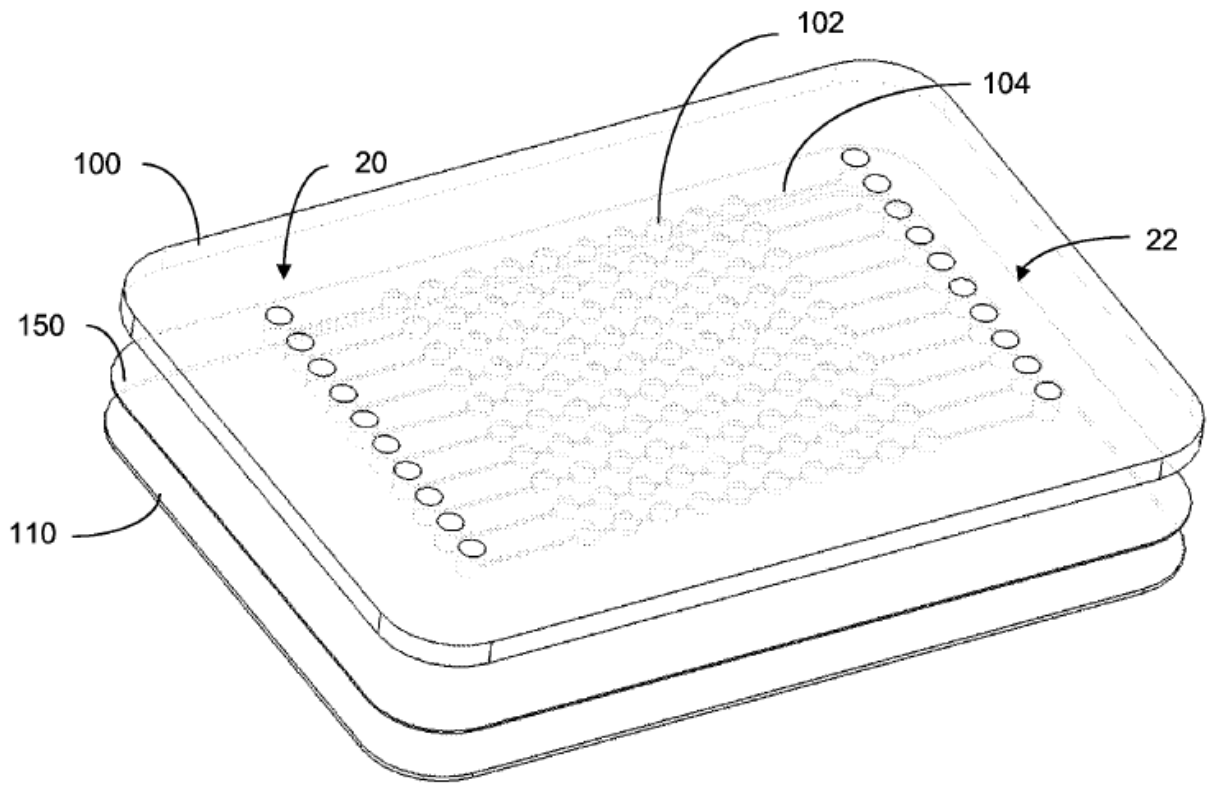


Fig. 16A

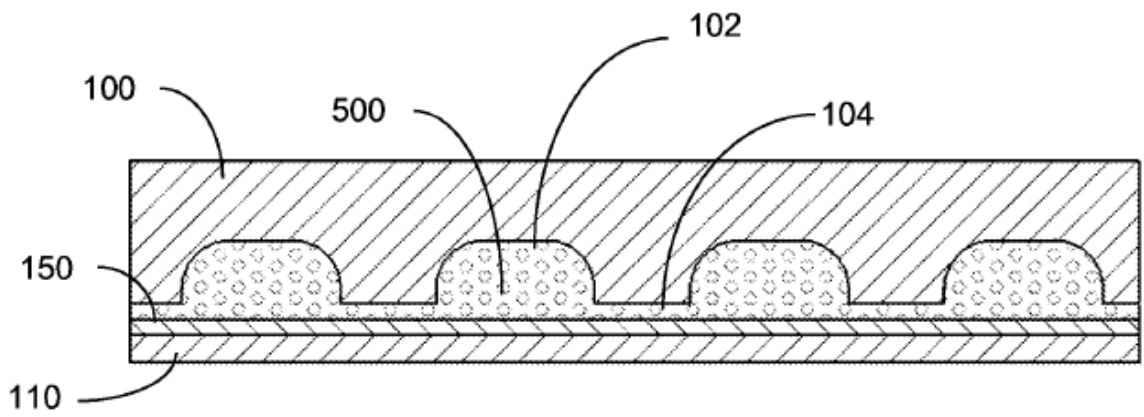
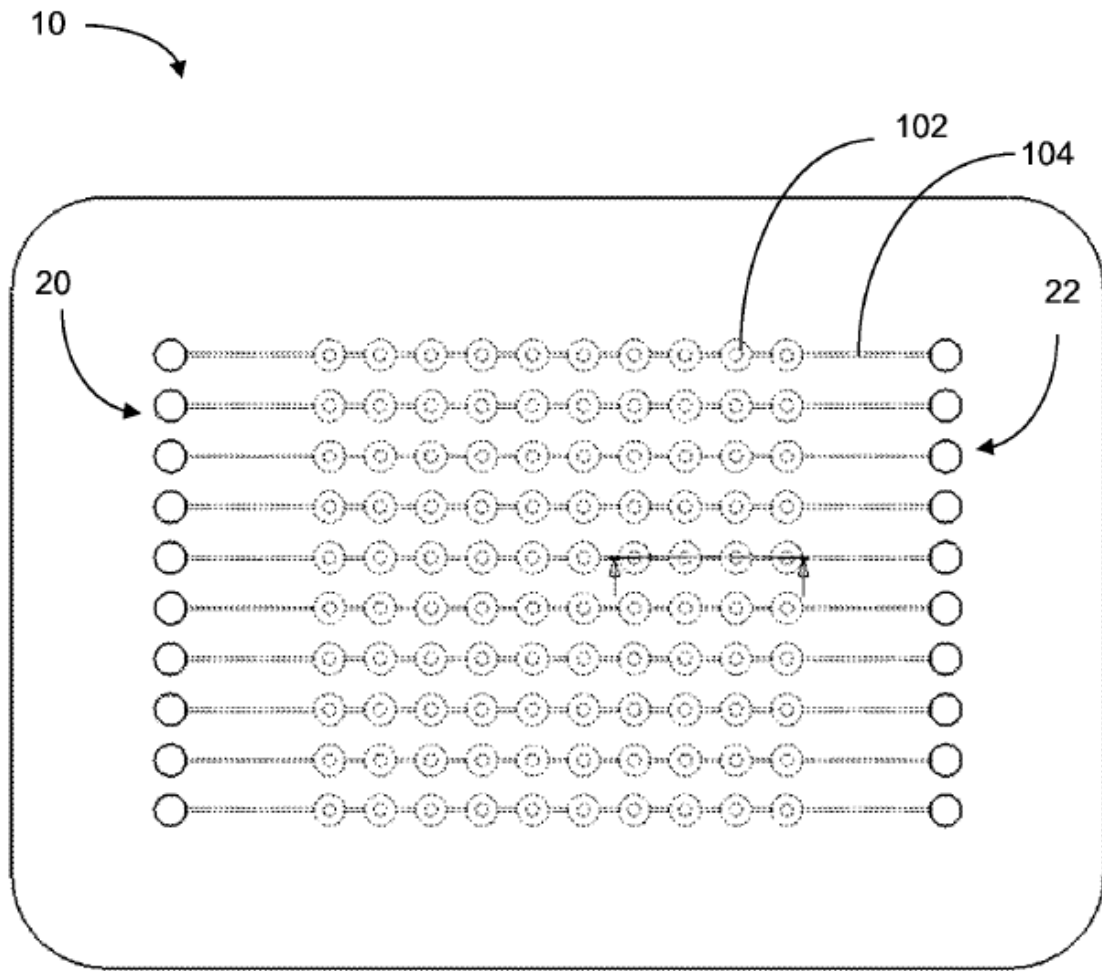


Fig. 16B

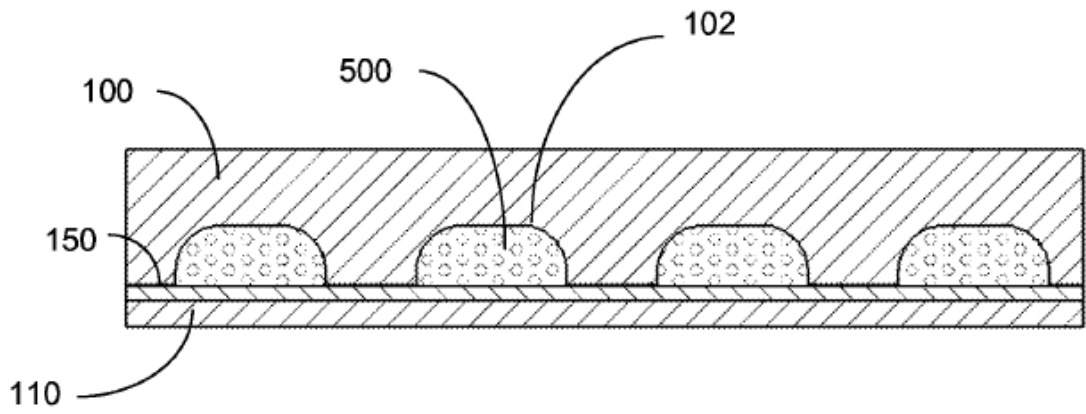
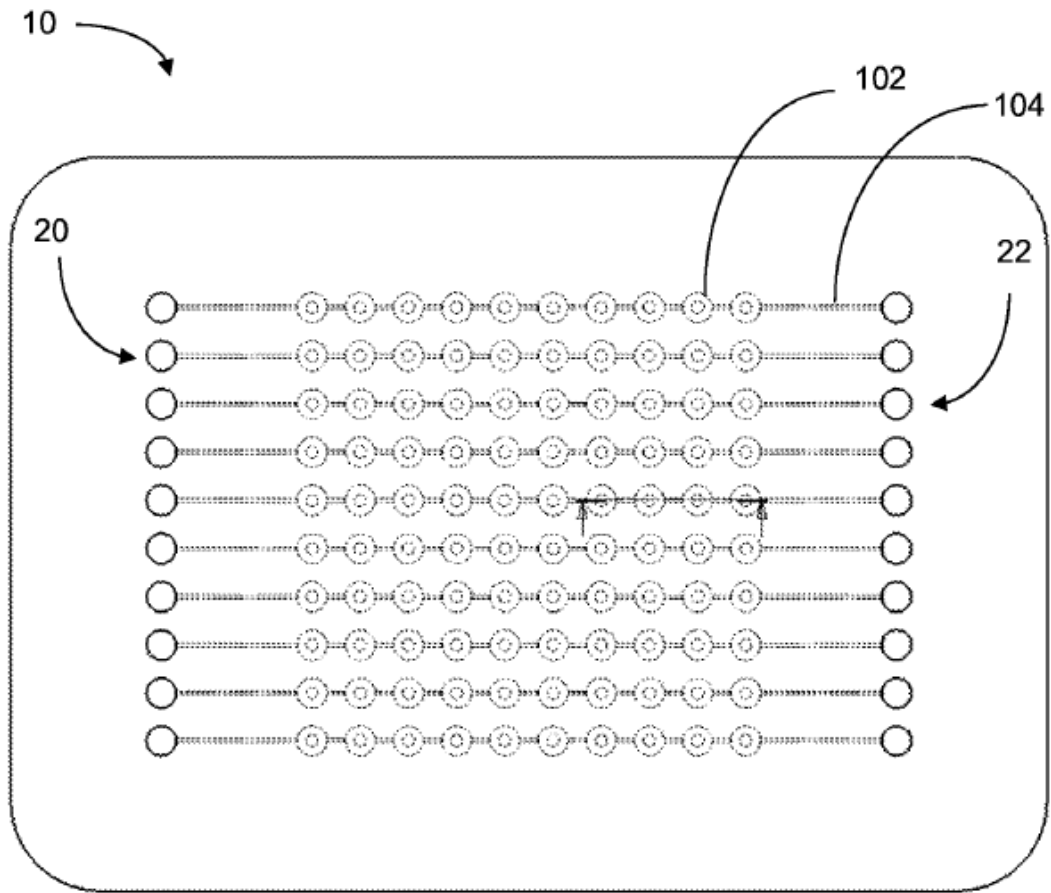


Fig. 16C

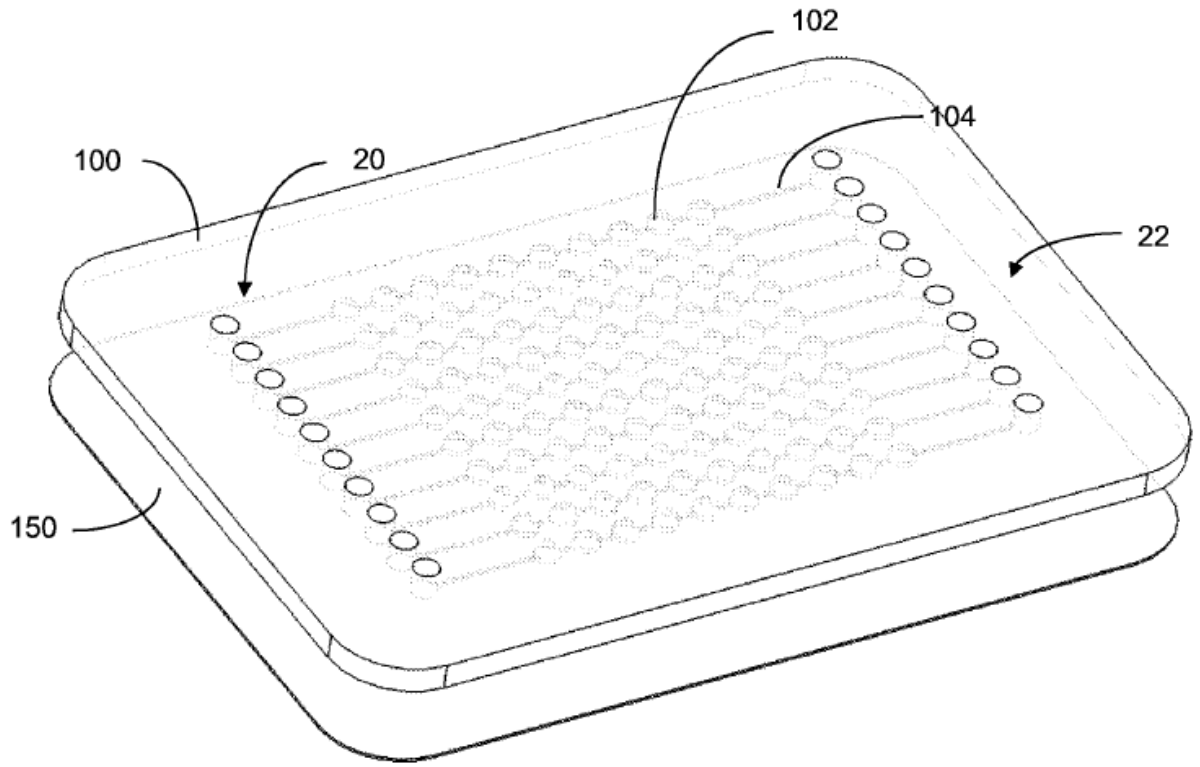


Fig. 17A



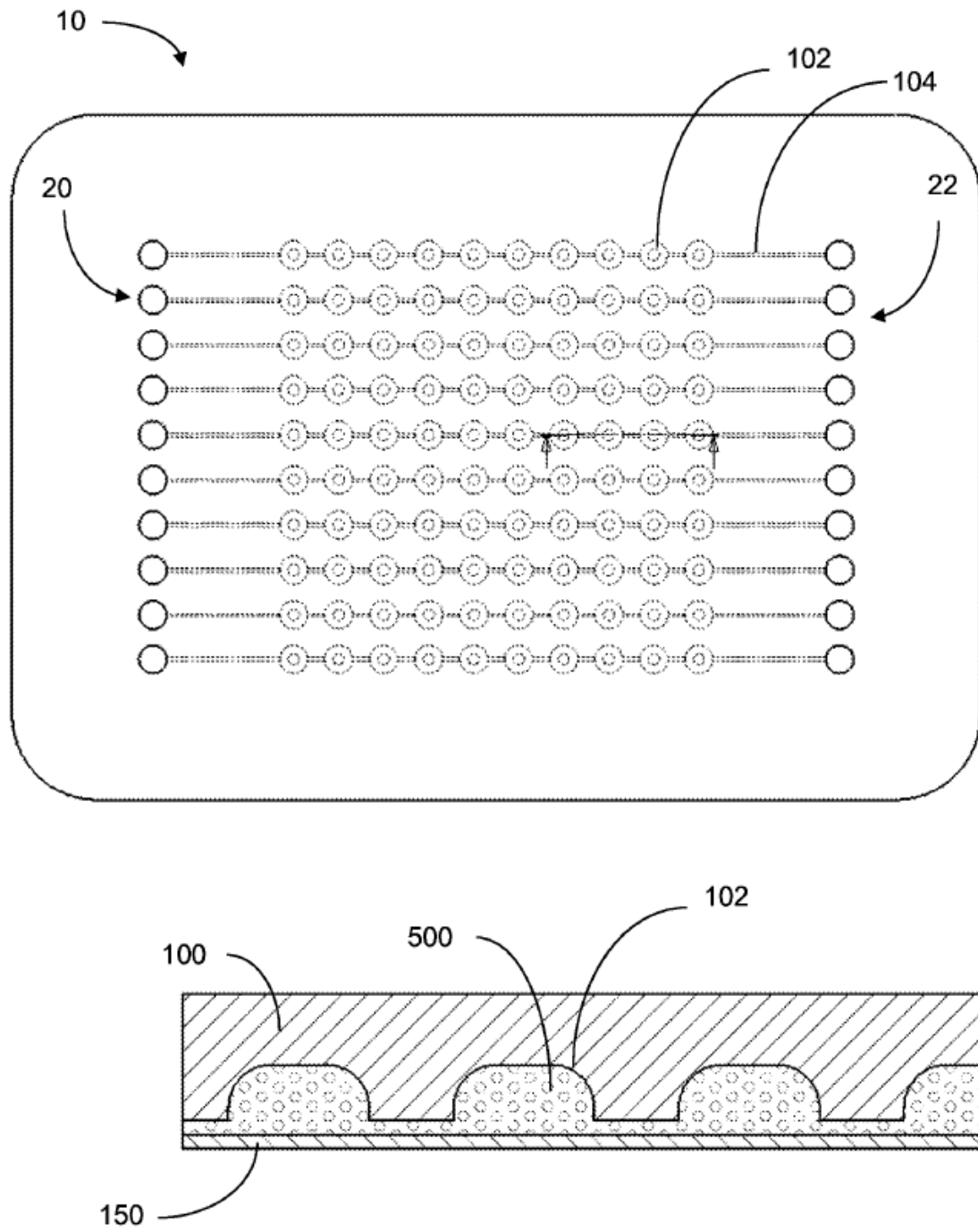


Fig. 17B

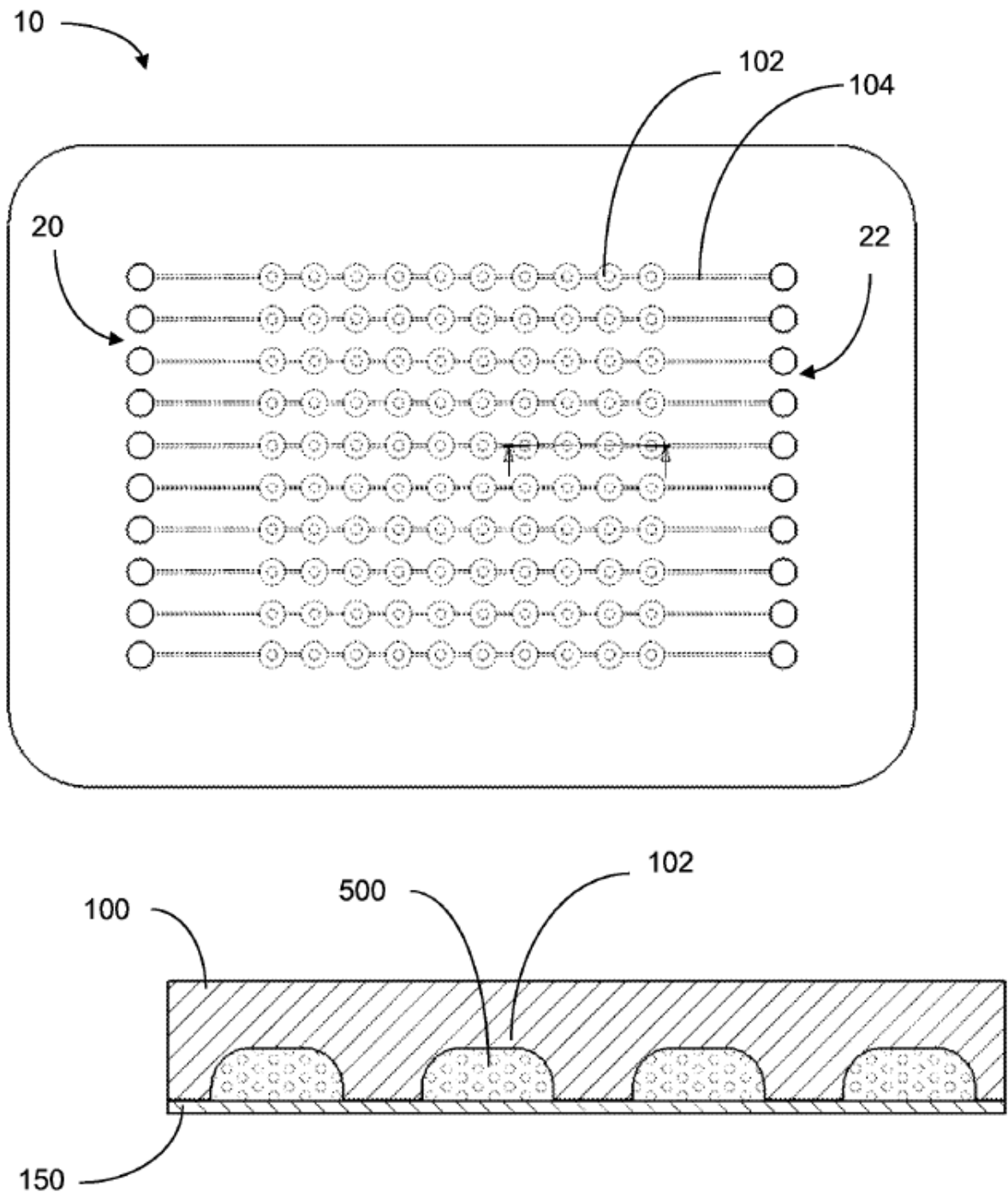


Fig. 17C

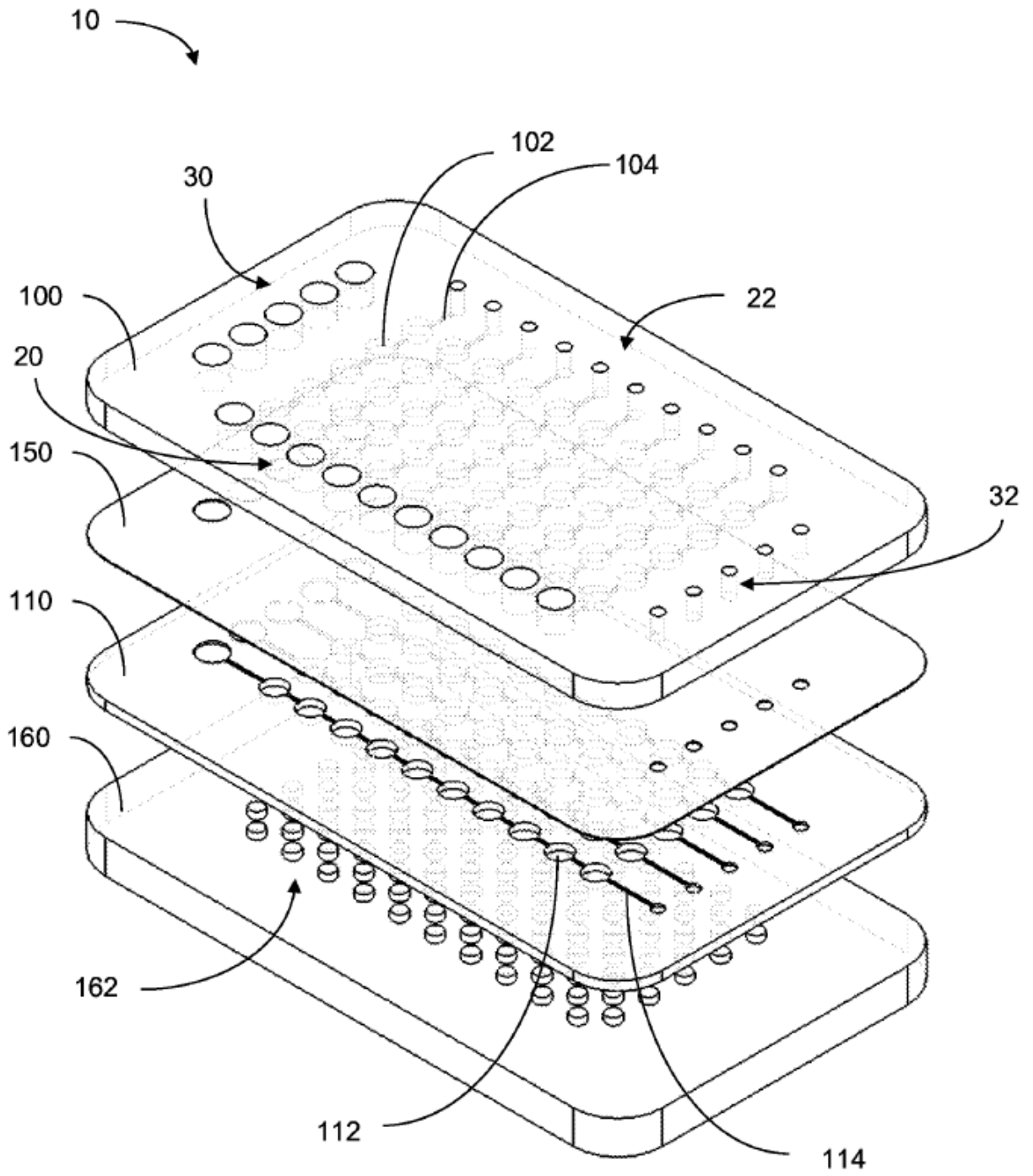


Fig. 18A

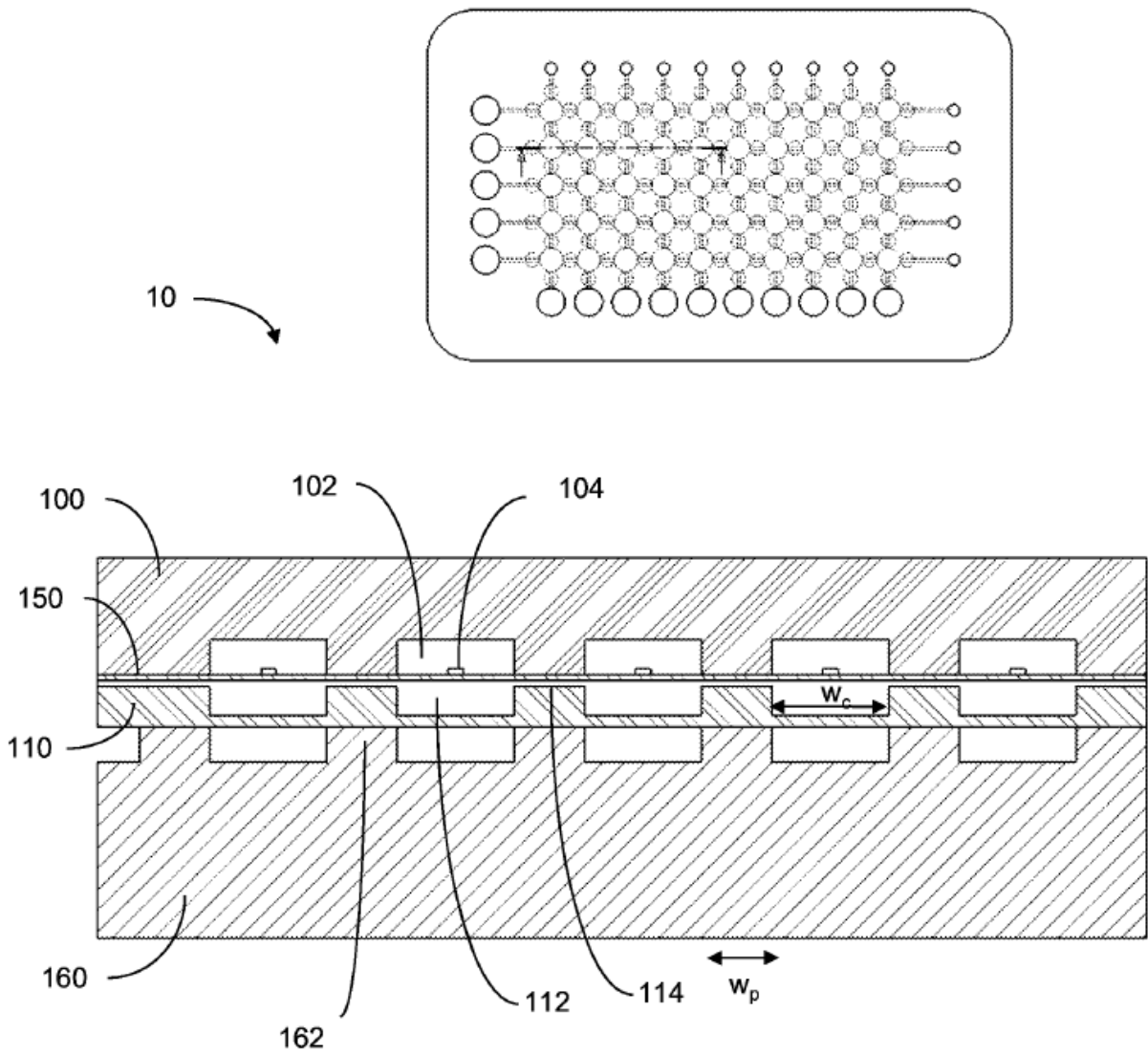


Fig. 18B

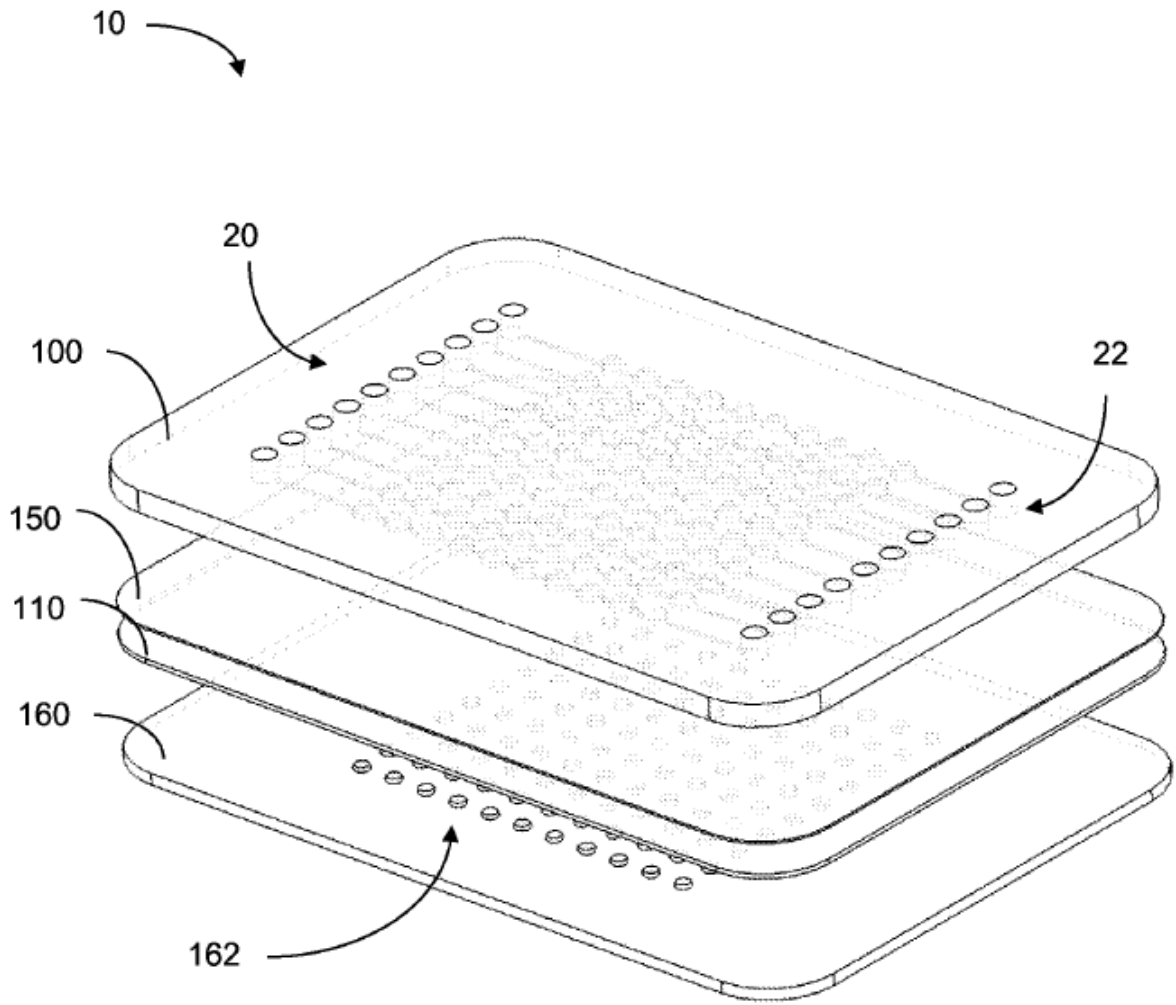
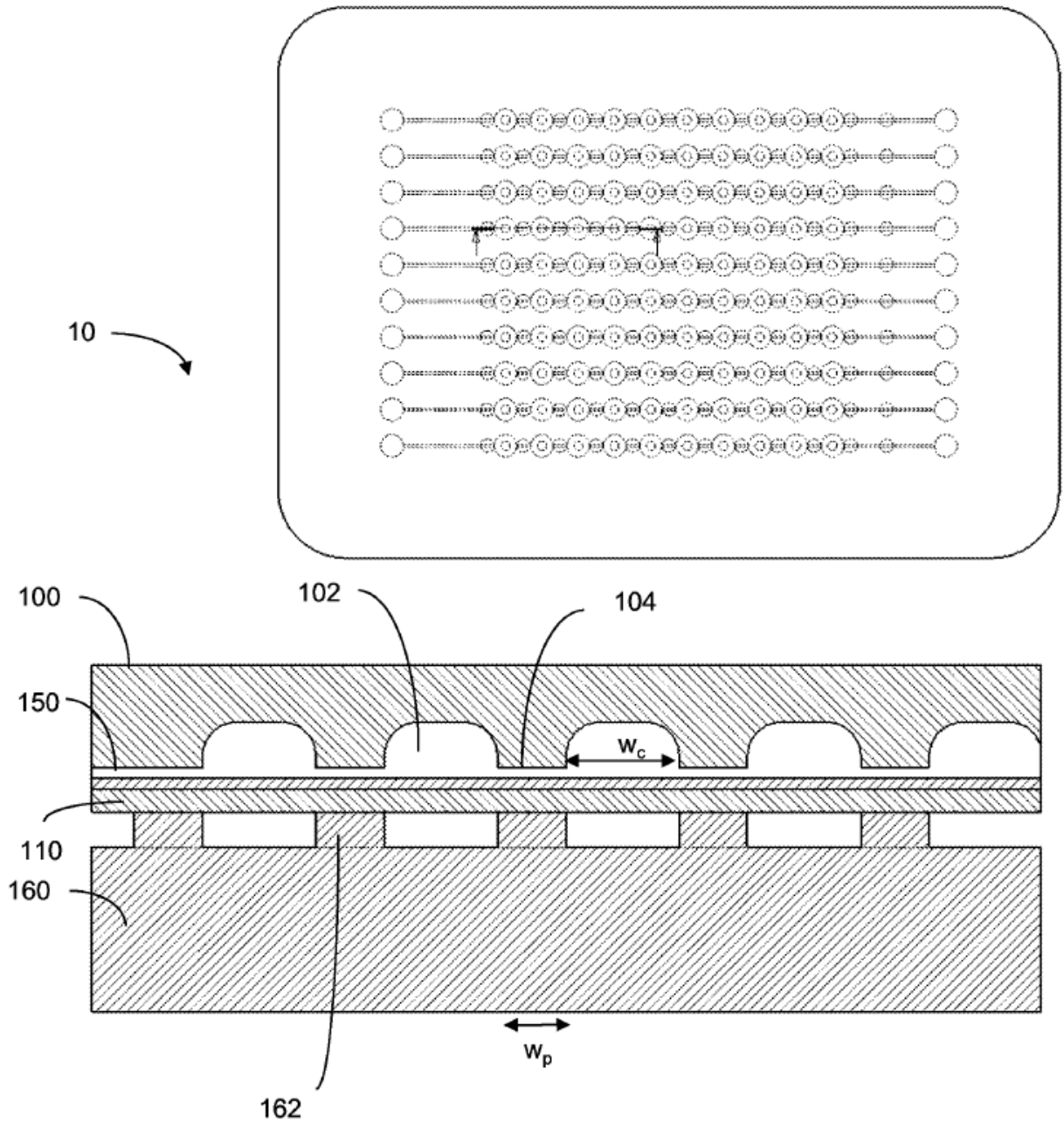


Fig. 19A



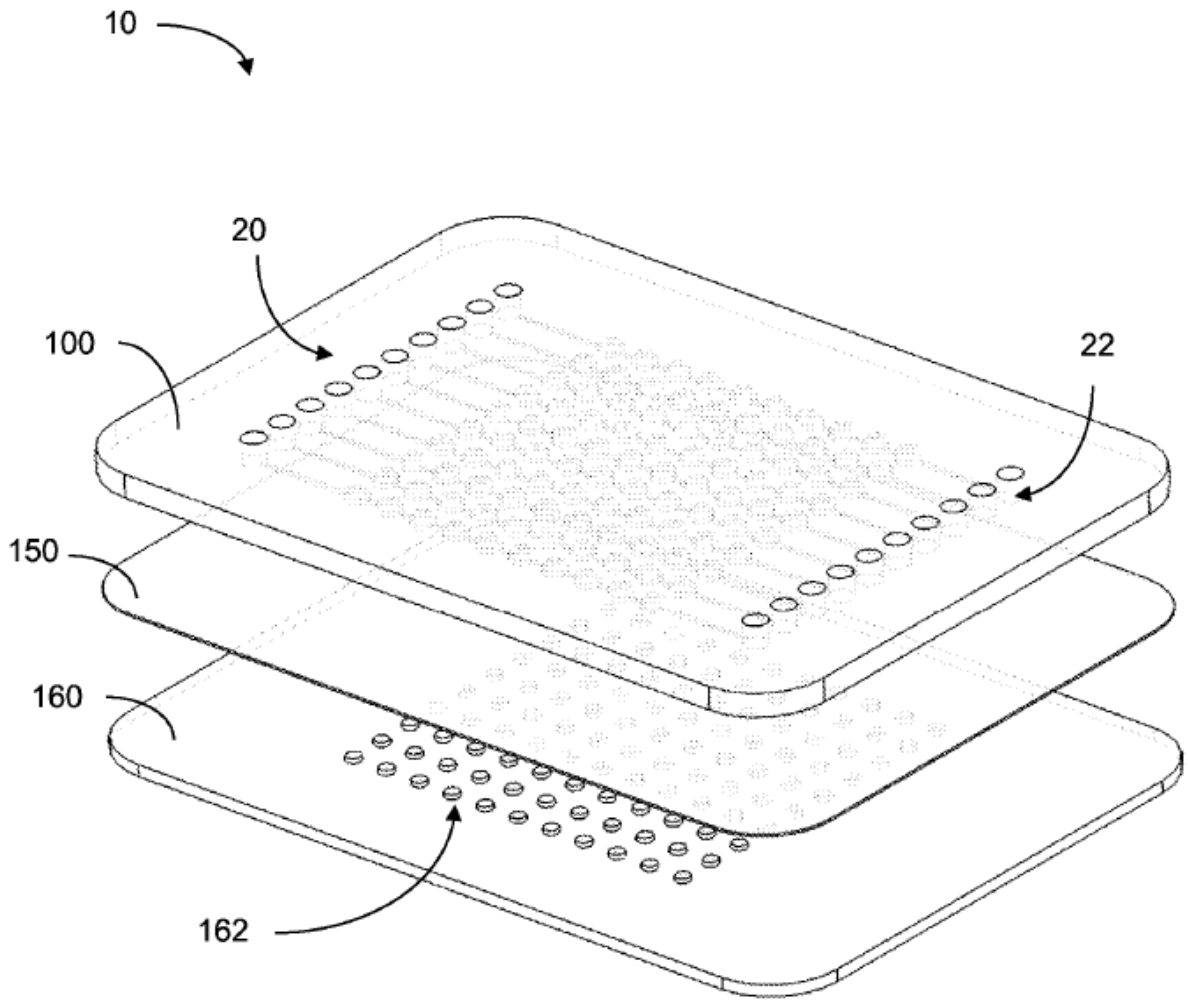


Fig. 20A

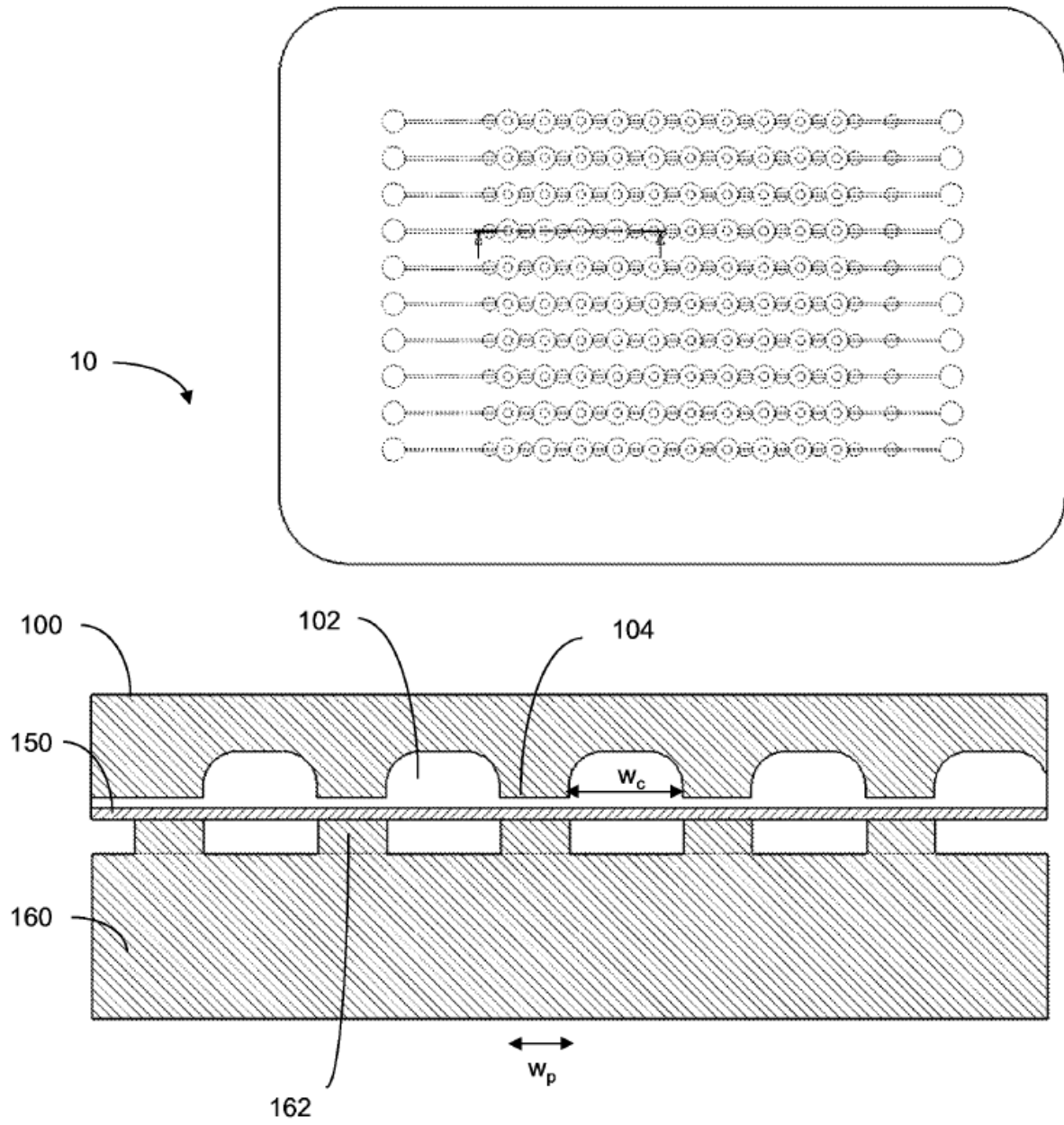


Fig. 20B



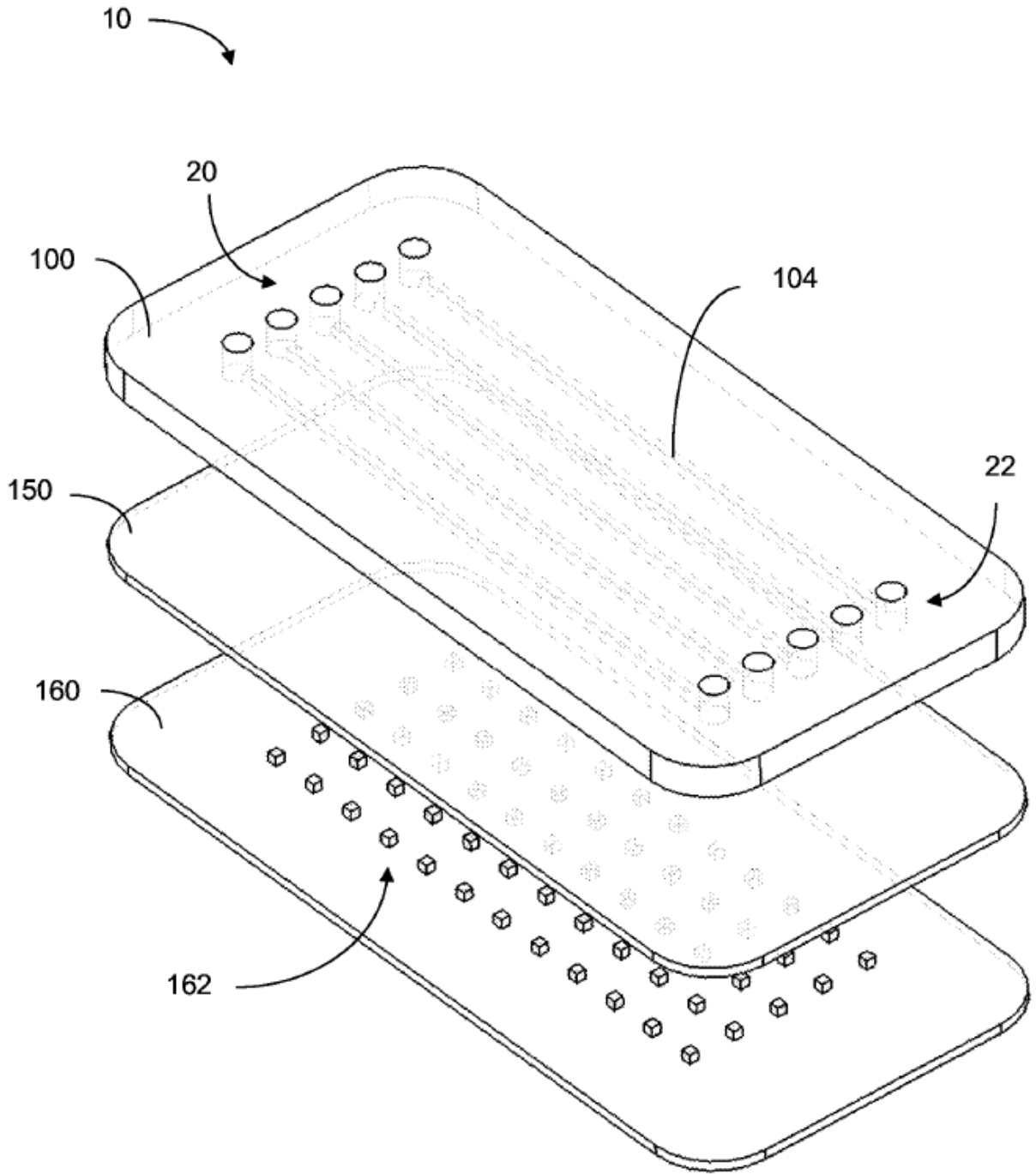


Fig. 21

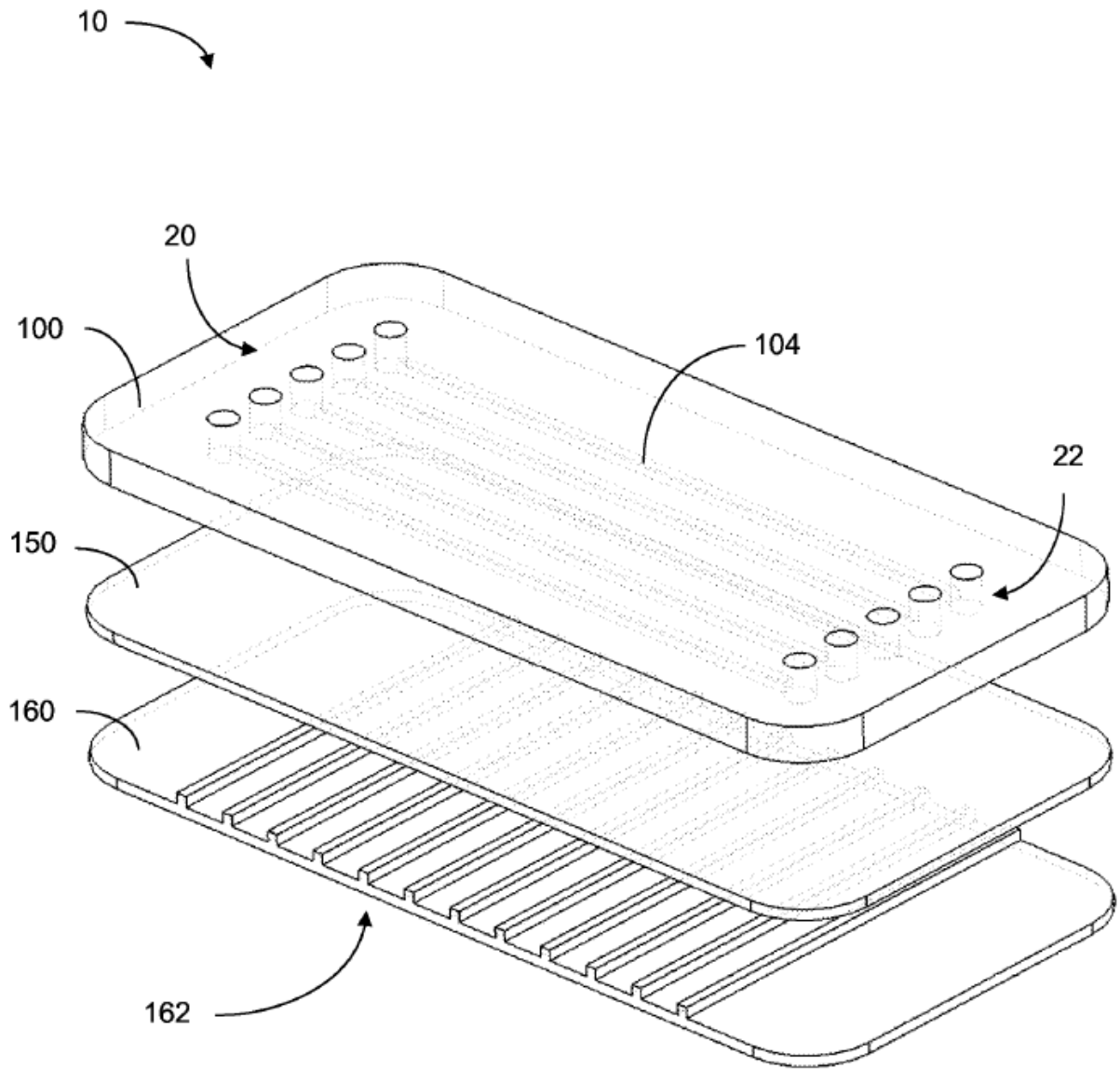


Fig. 22A

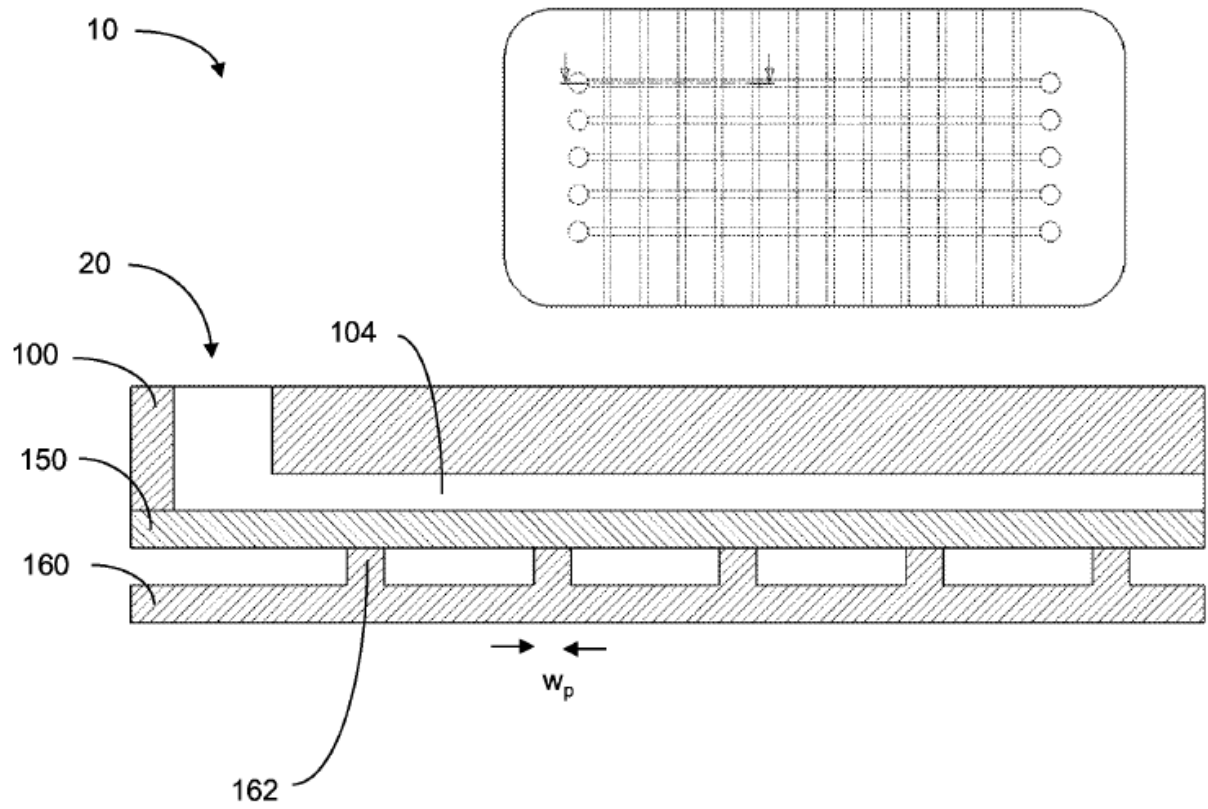


Fig. 22B

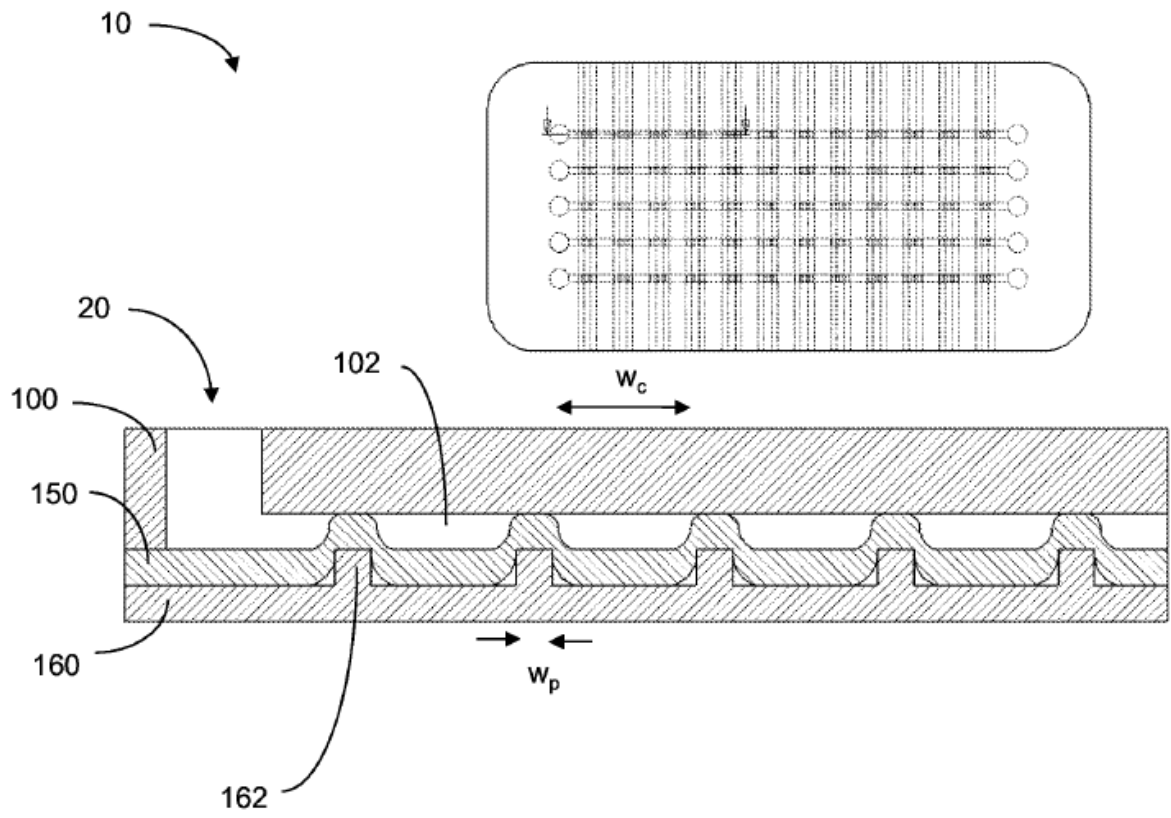


Fig. 22C

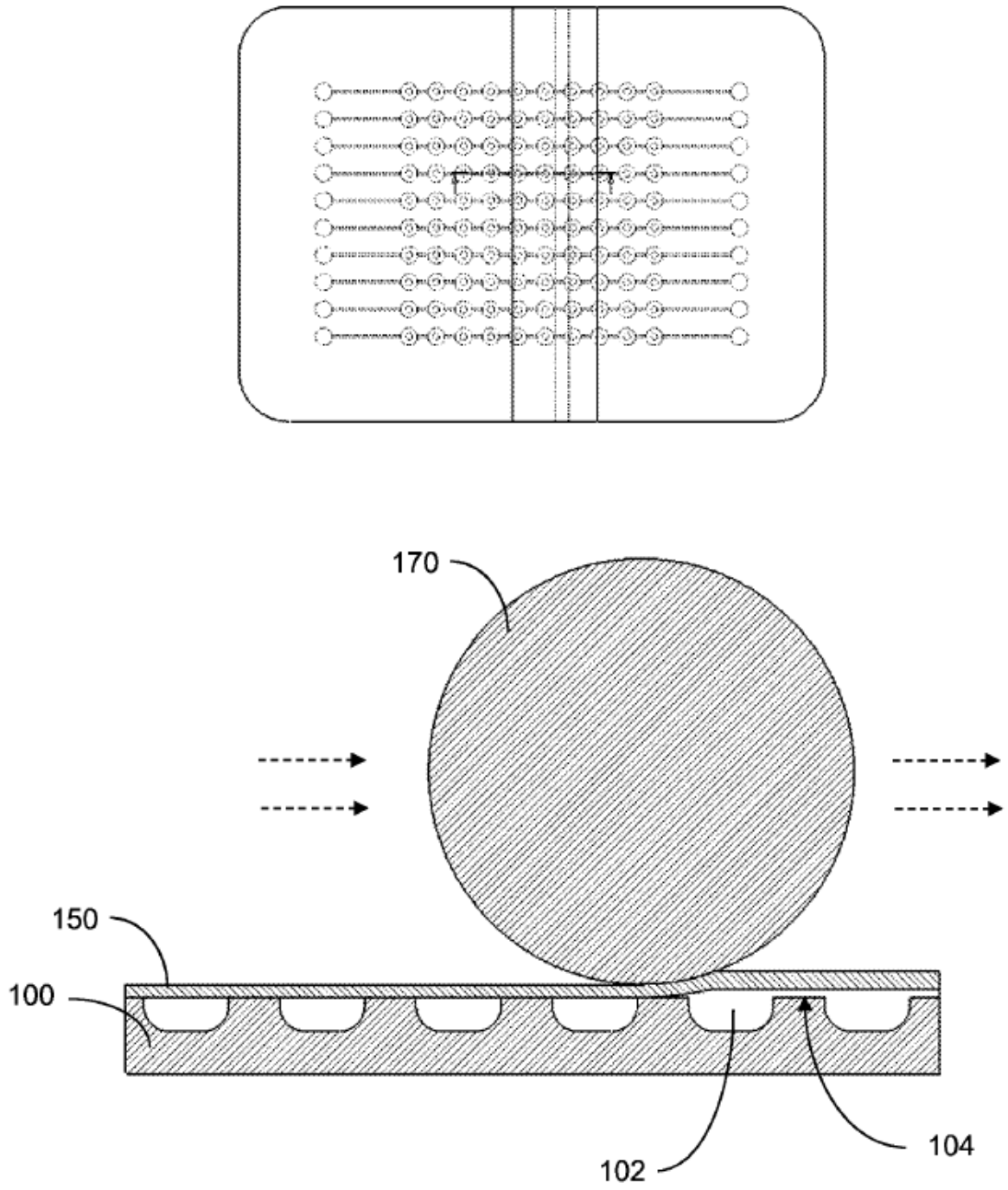


Fig. 23

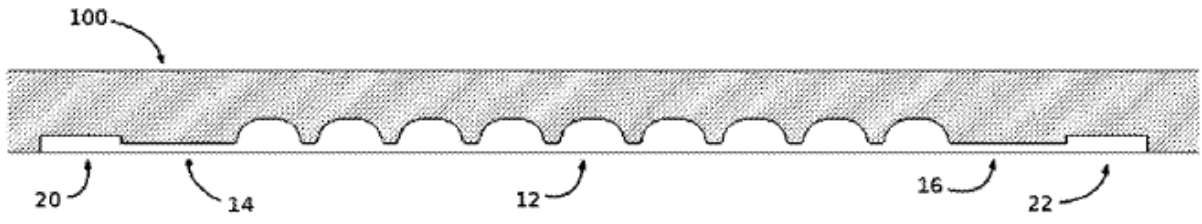


Fig. 24

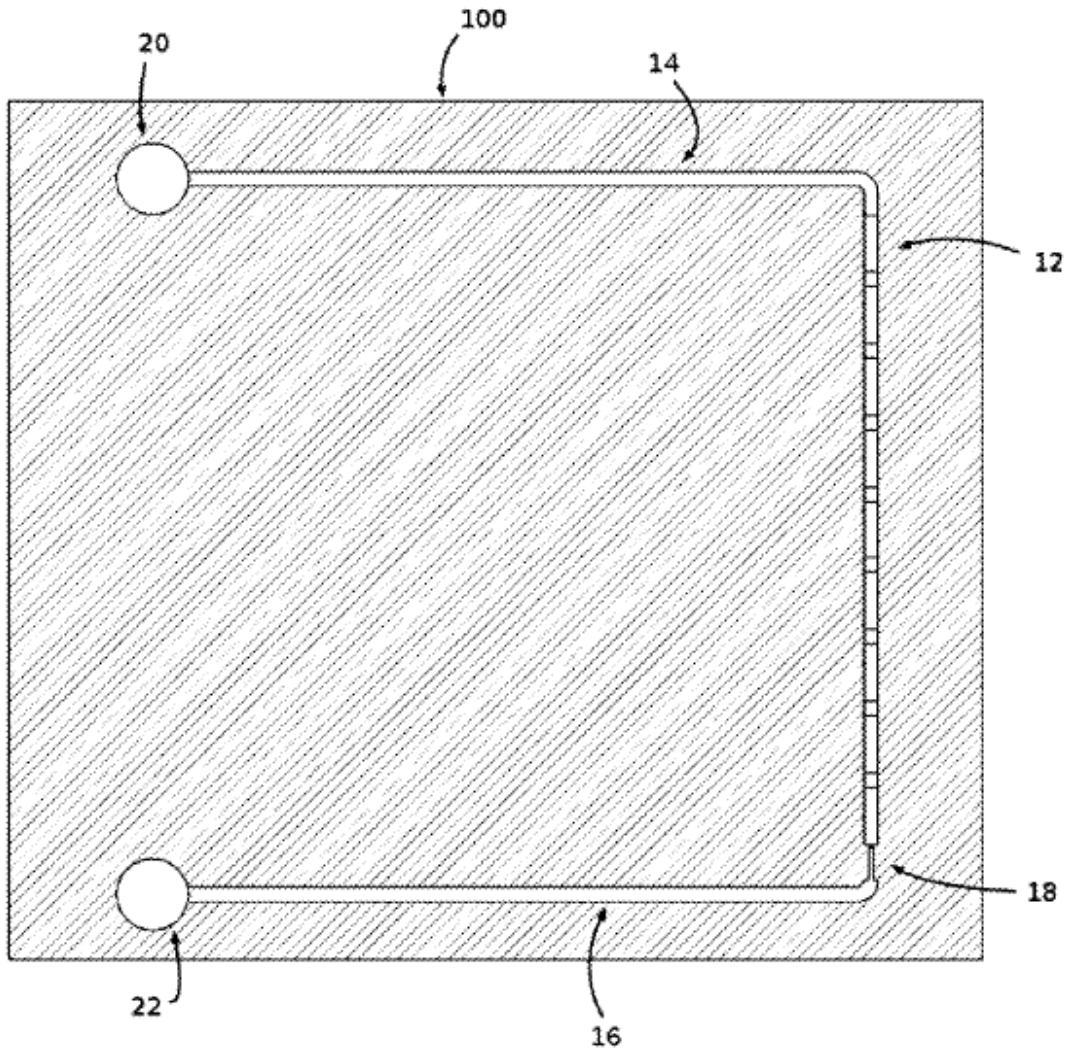


Fig. 25

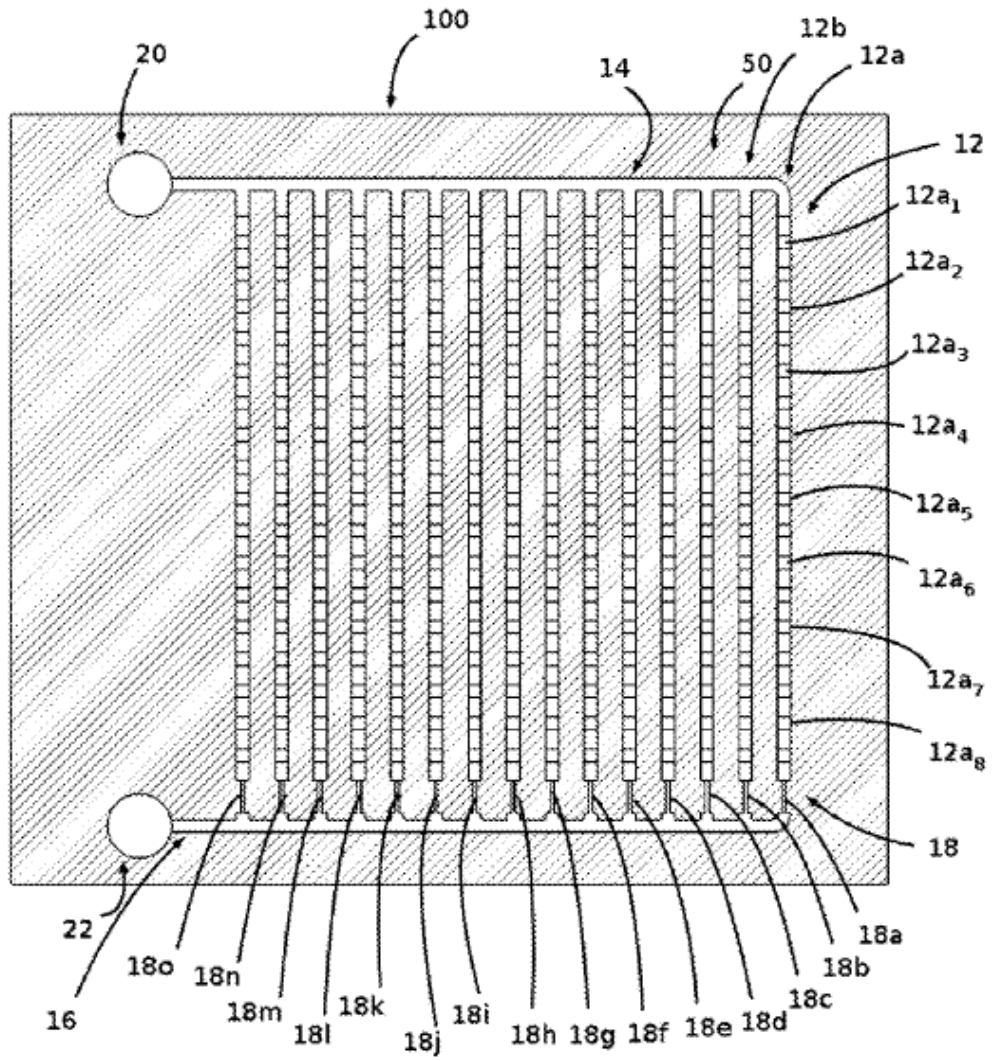


Fig. 26



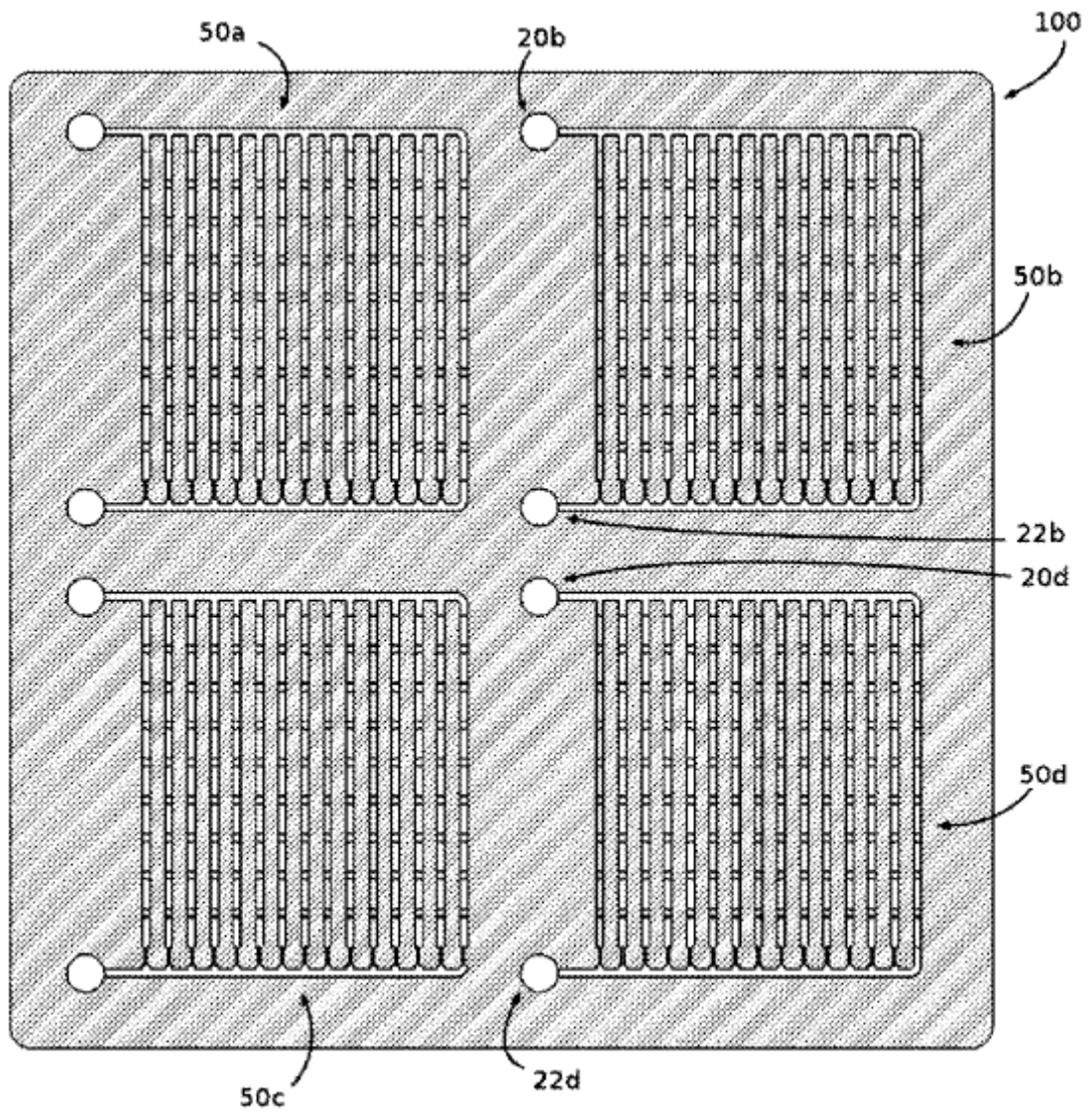


Fig. 27

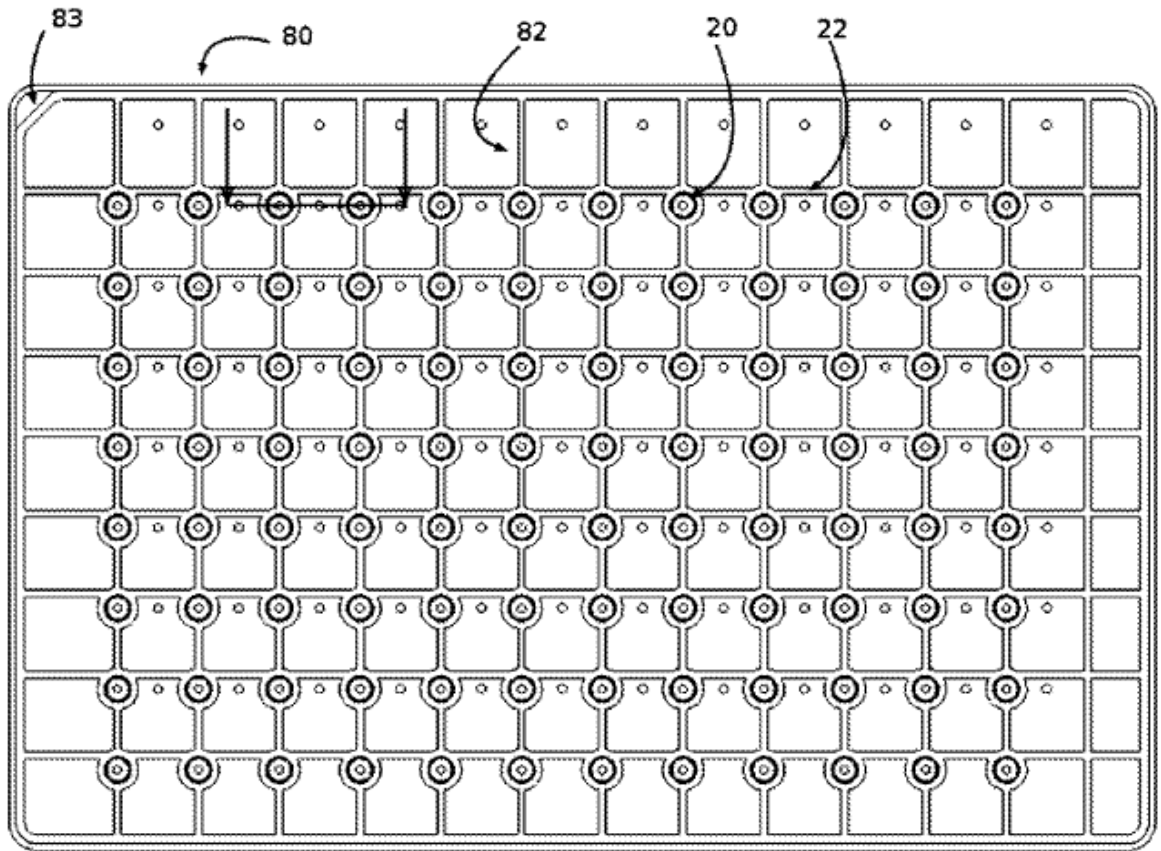


Fig. 28A

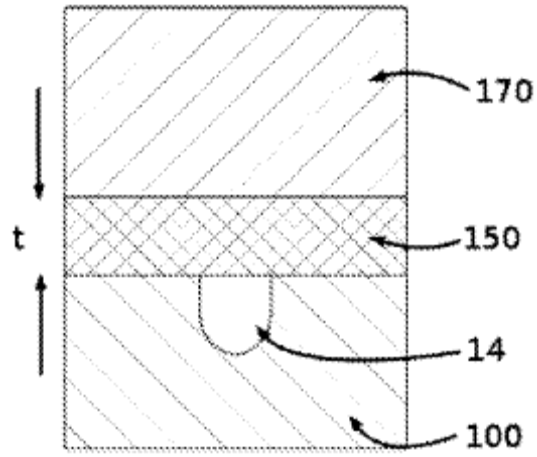


Fig. 28B

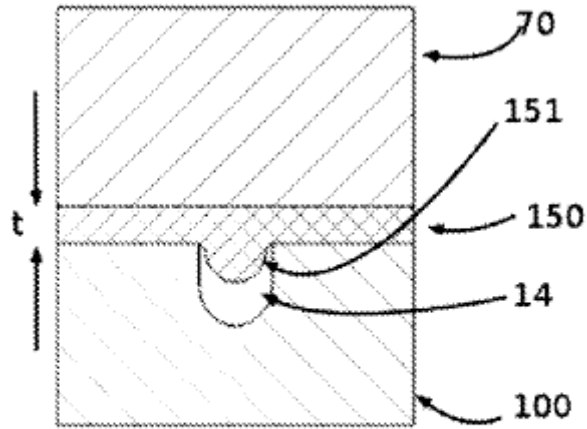


Fig. 28C

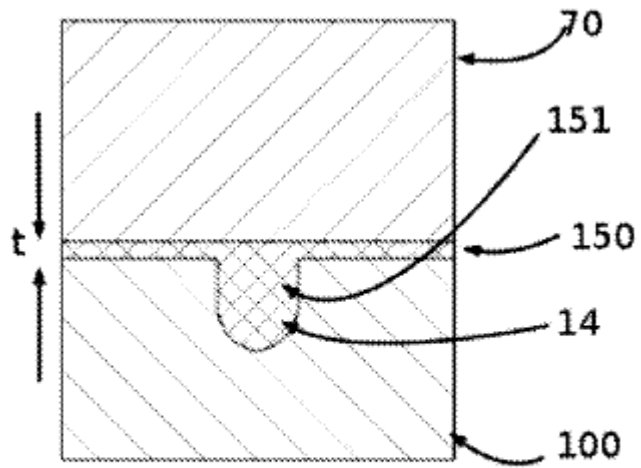


Fig. 28D

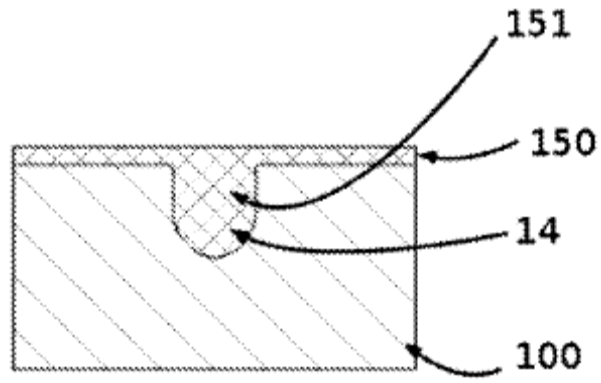


Fig. 28E

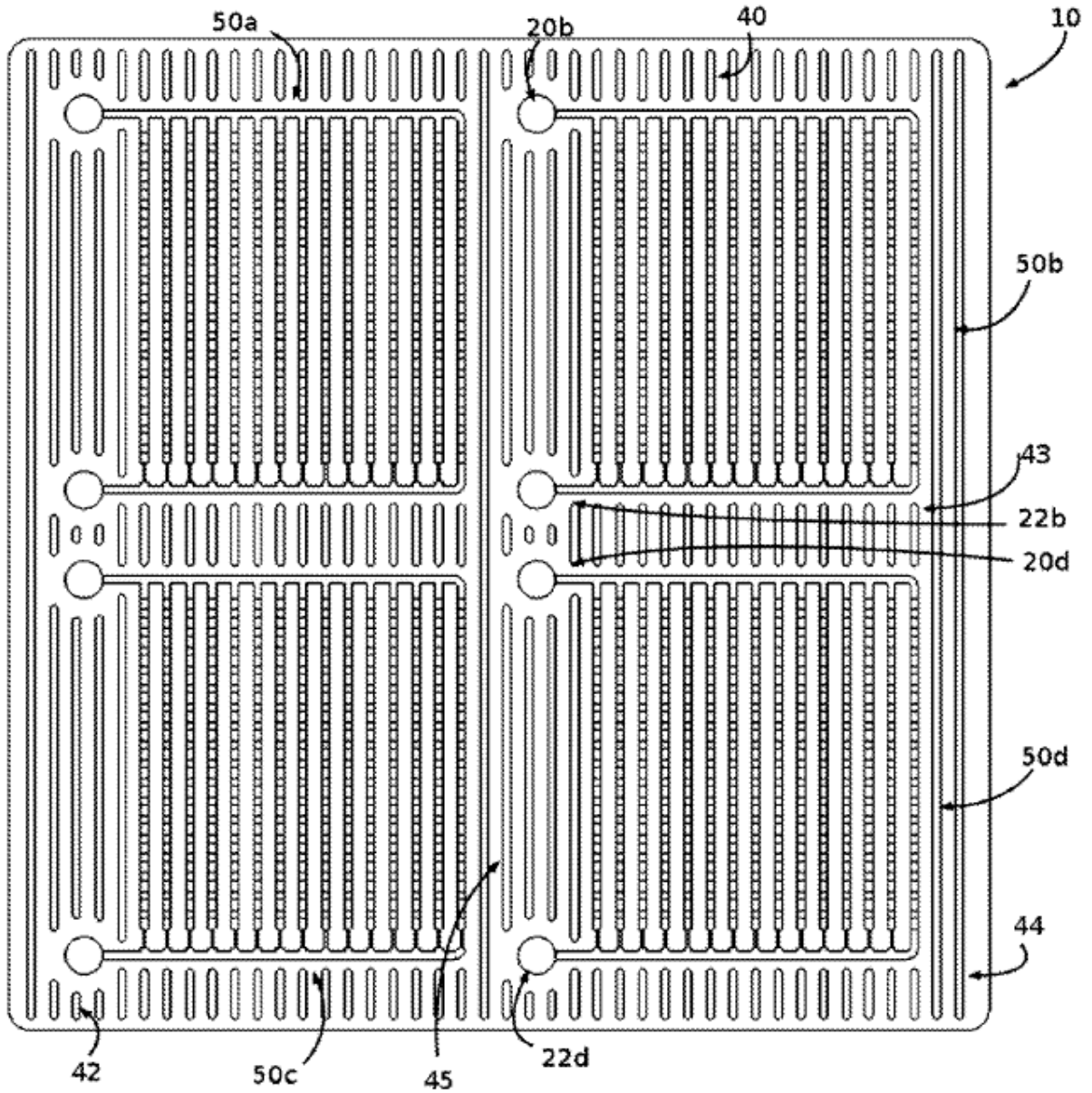


Fig. 29

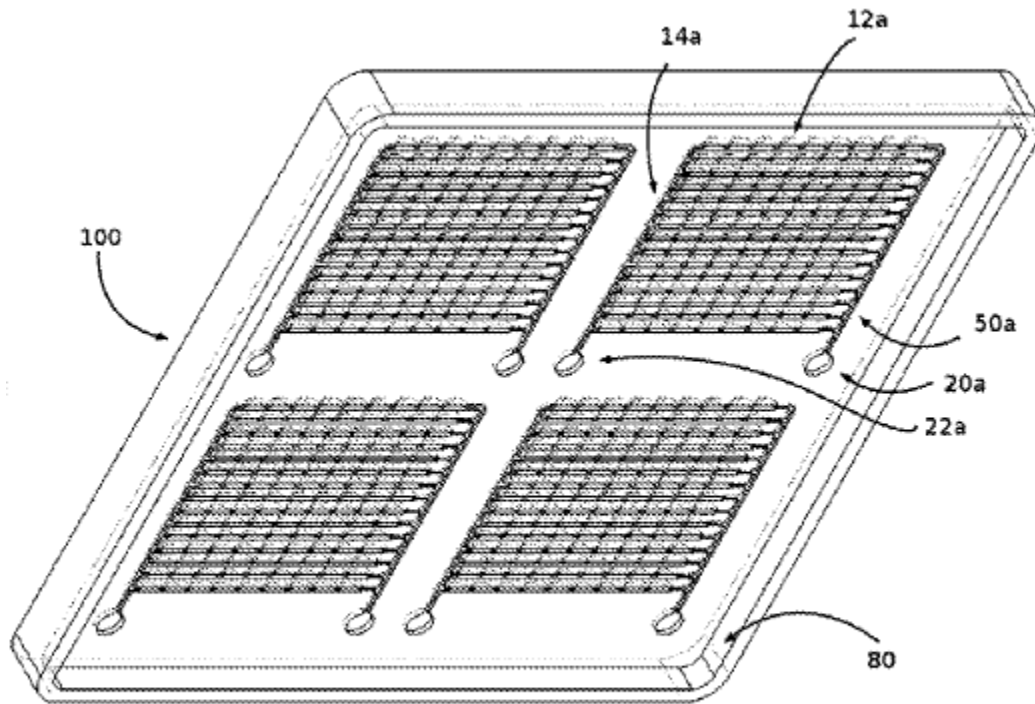


Fig. 30



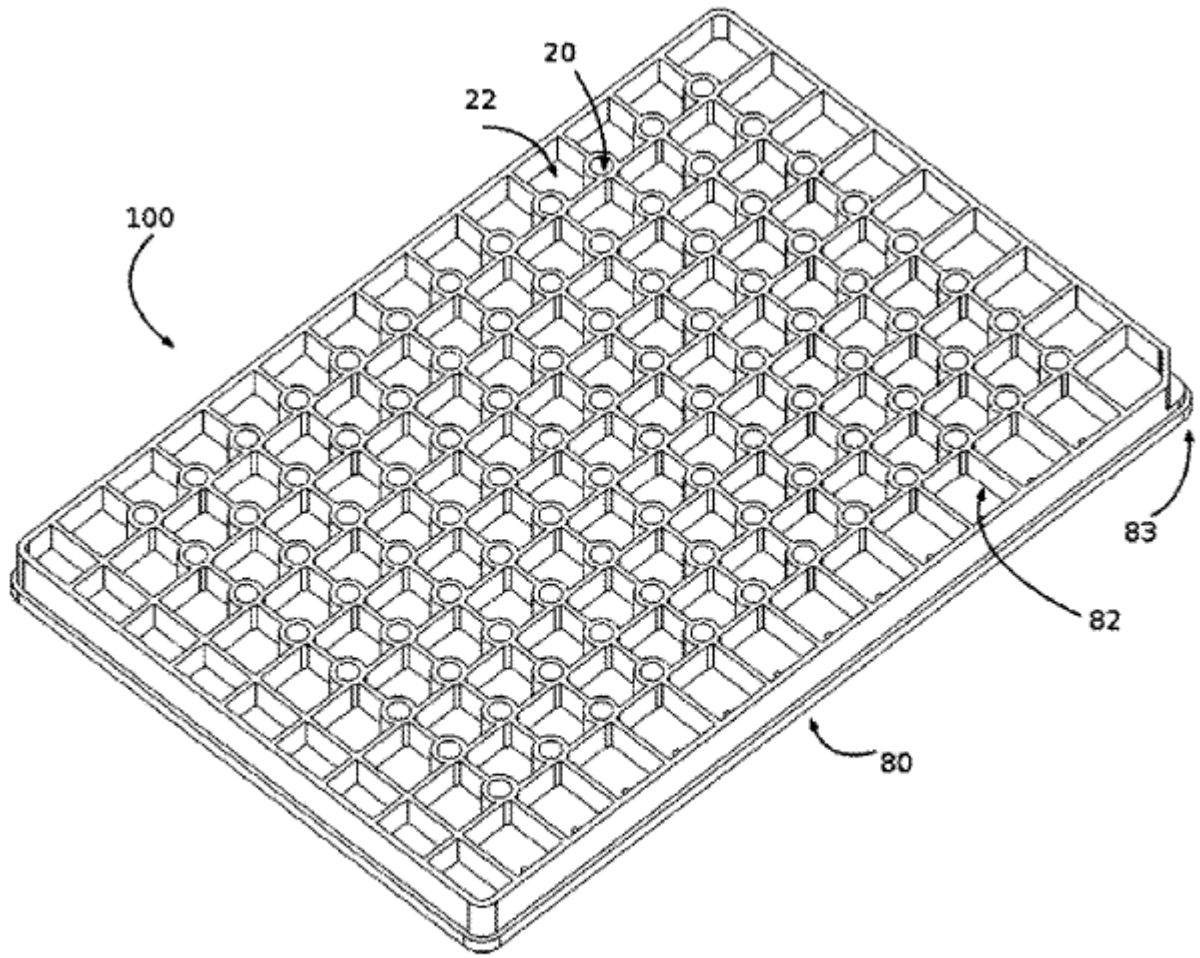


Fig. 31A

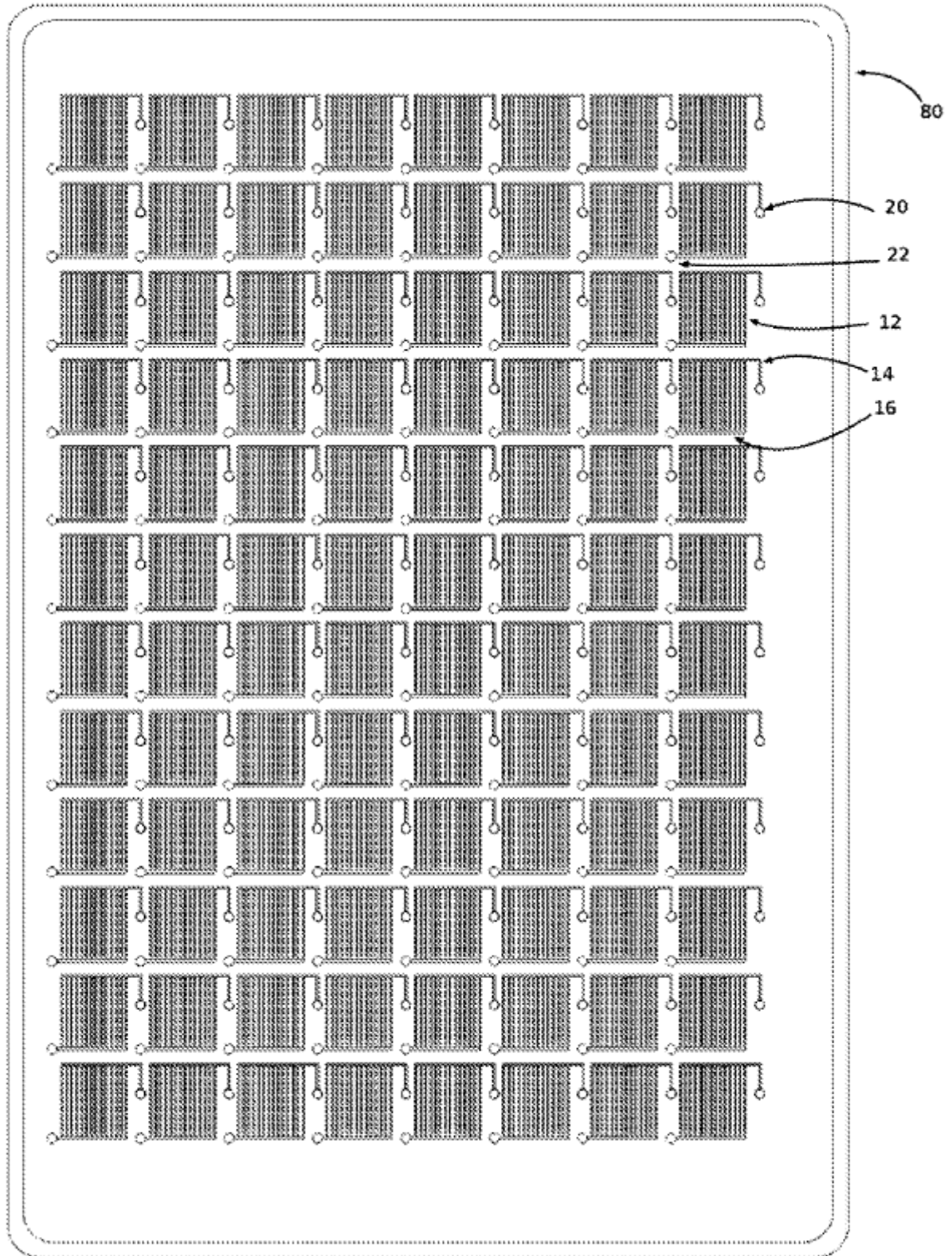


Fig. 31B

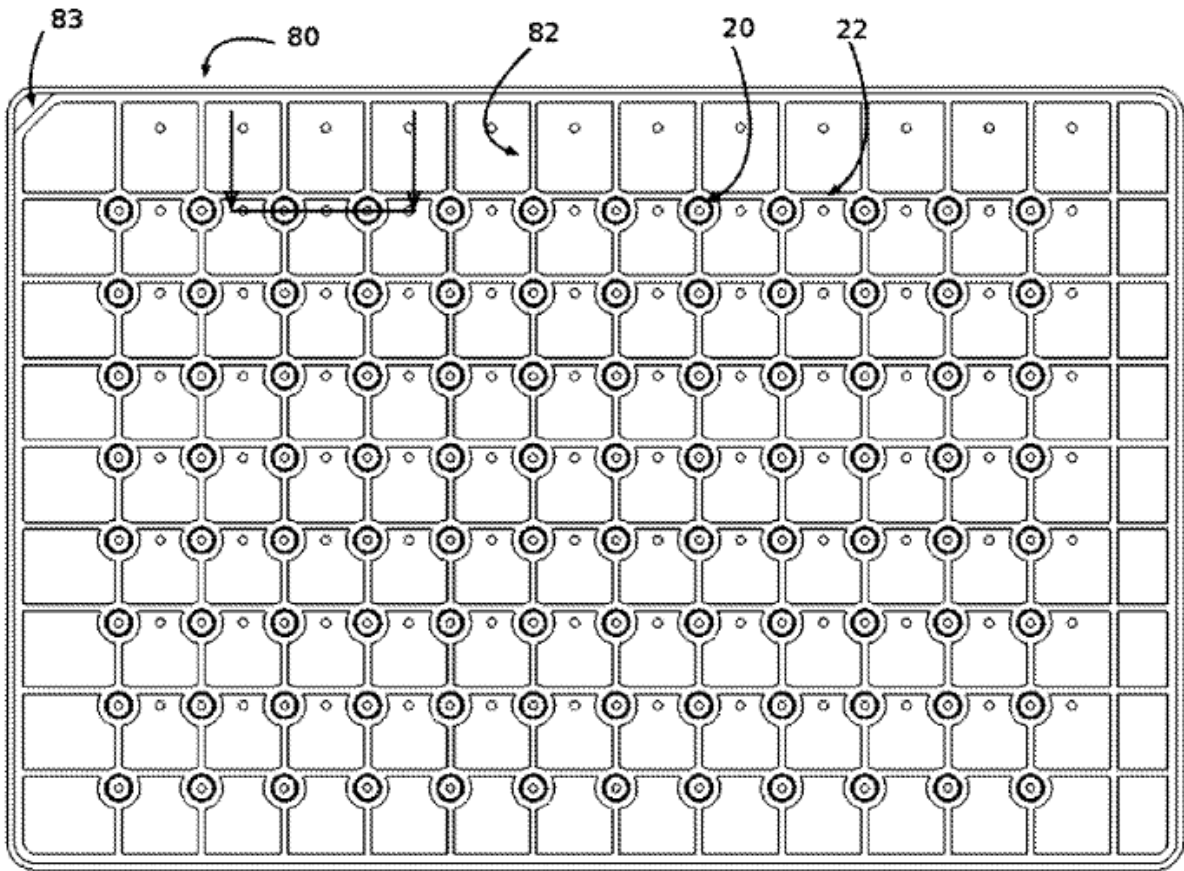


Fig. 32A

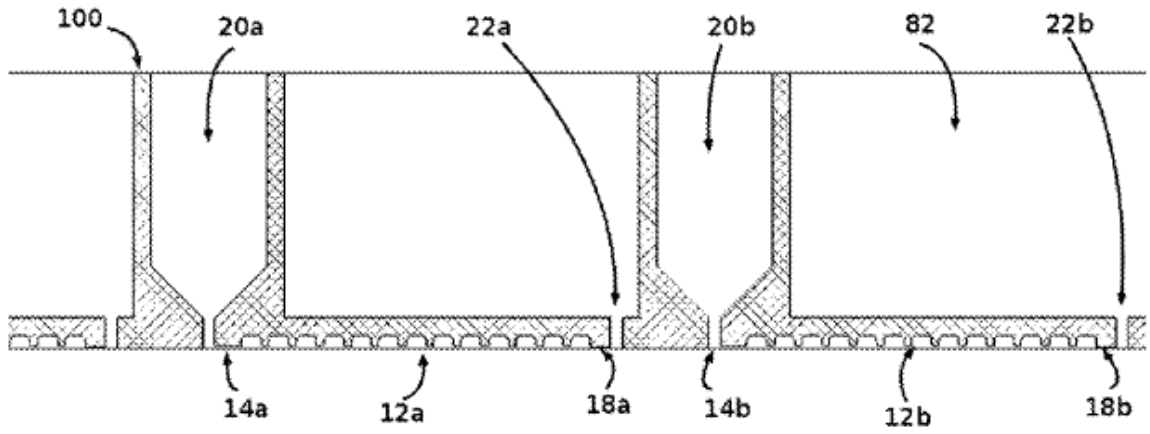


Fig. 32B

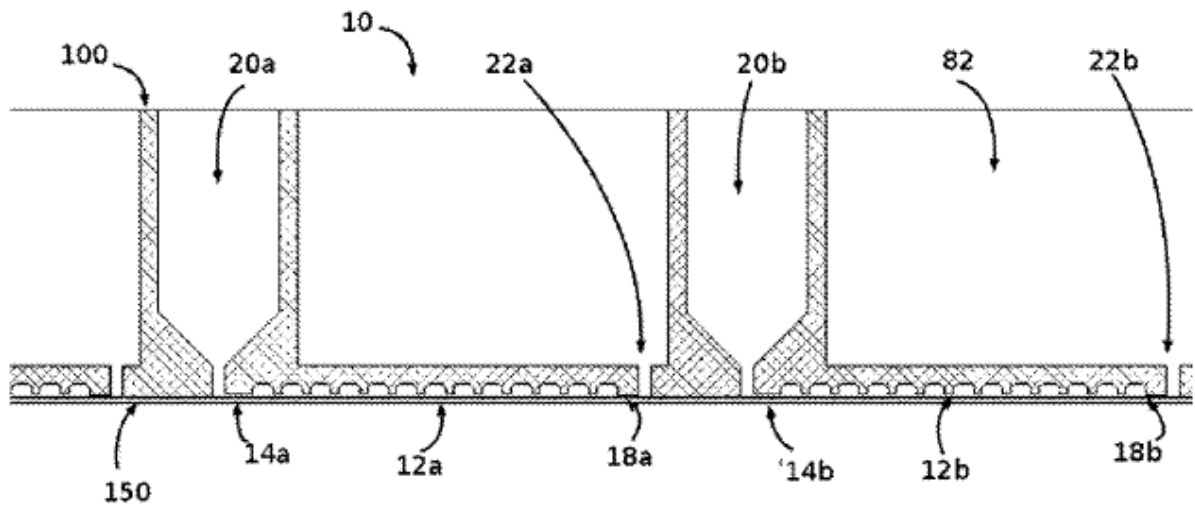


Fig. 32C

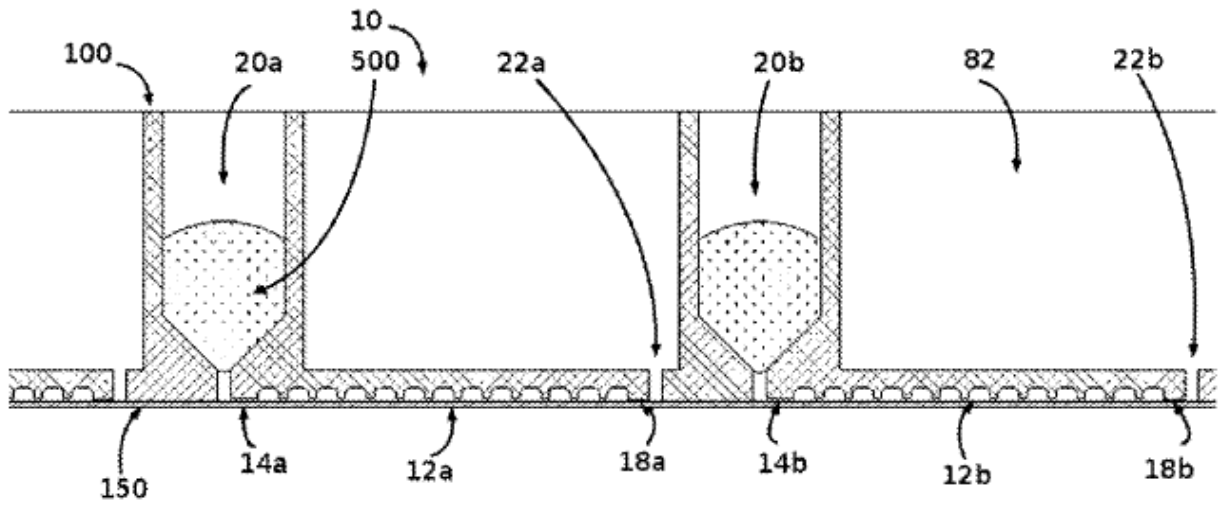


Fig. 32D

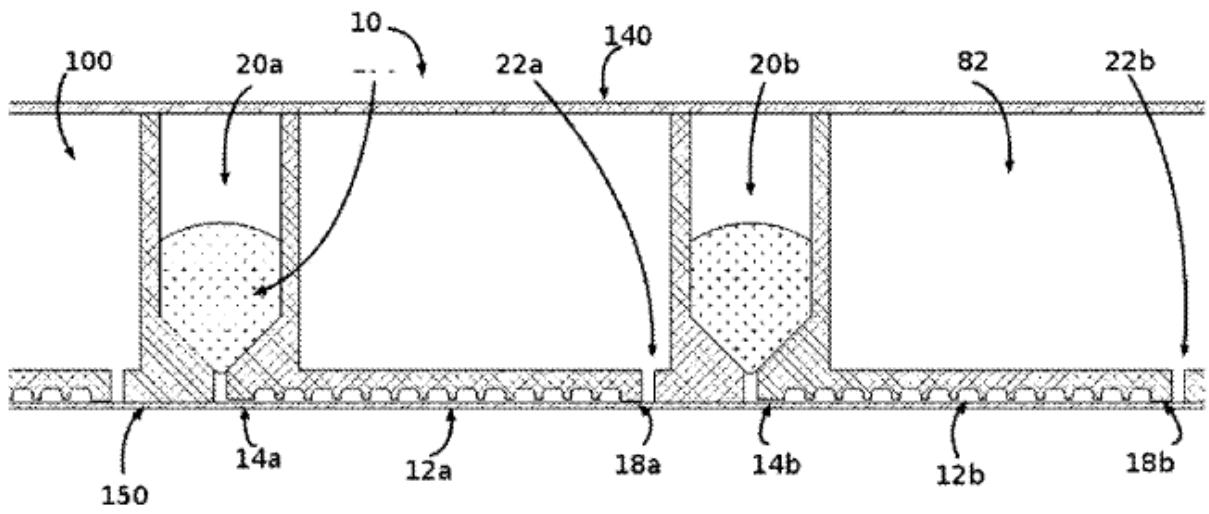


Fig. 32E

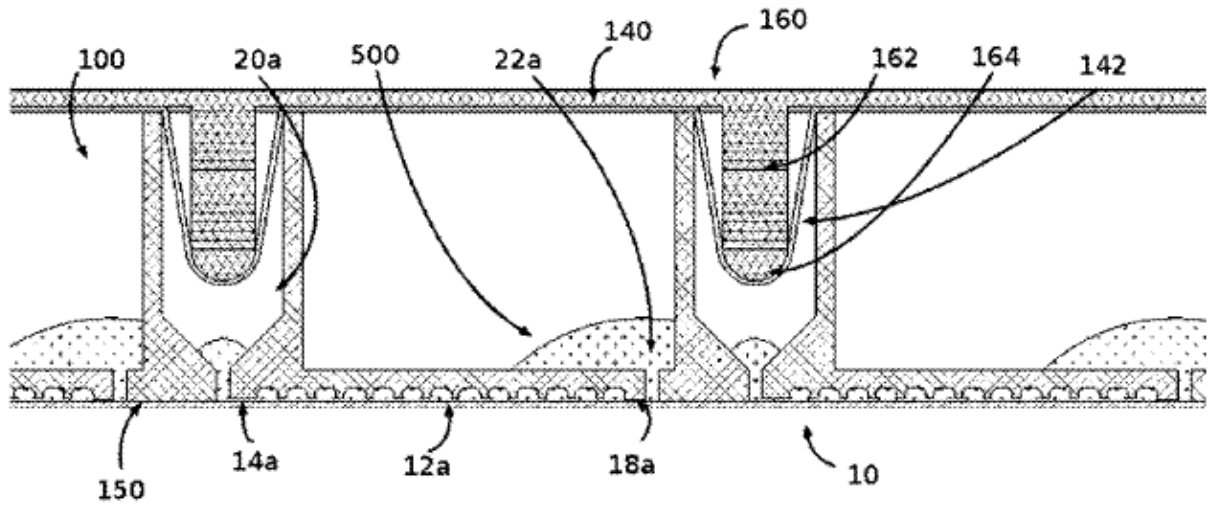


Fig. 32F



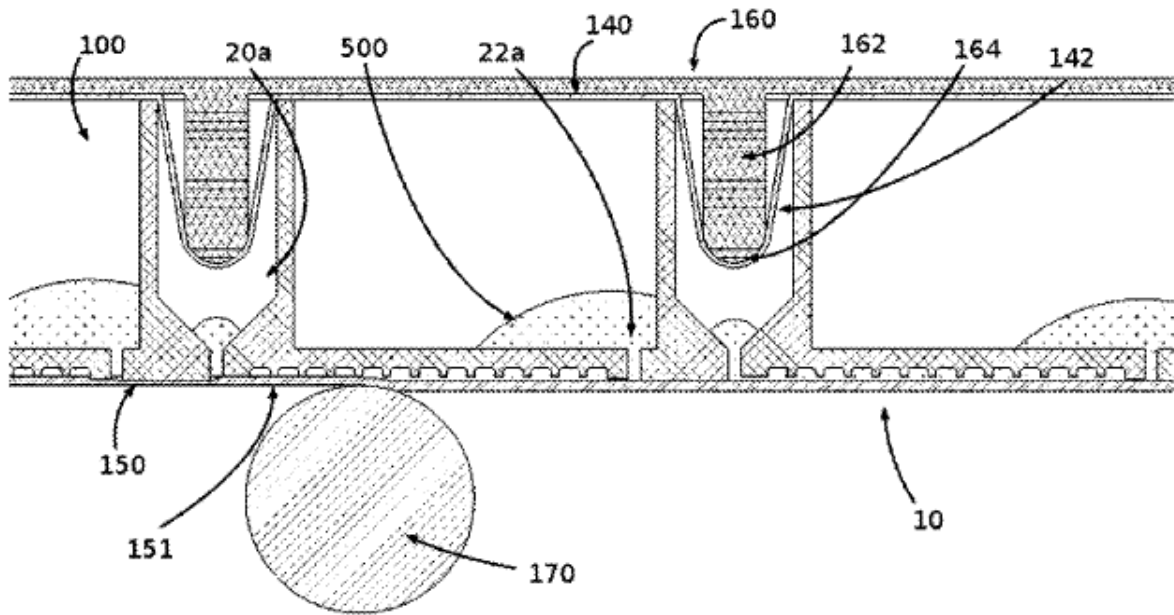


Fig. 33A

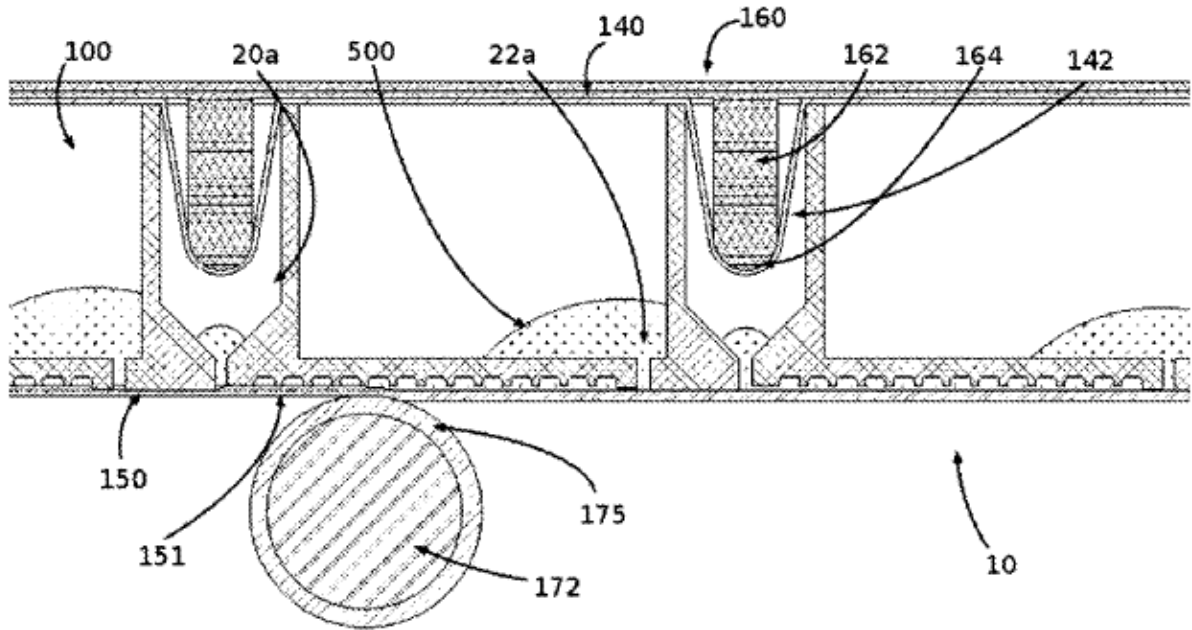


Fig. 33B

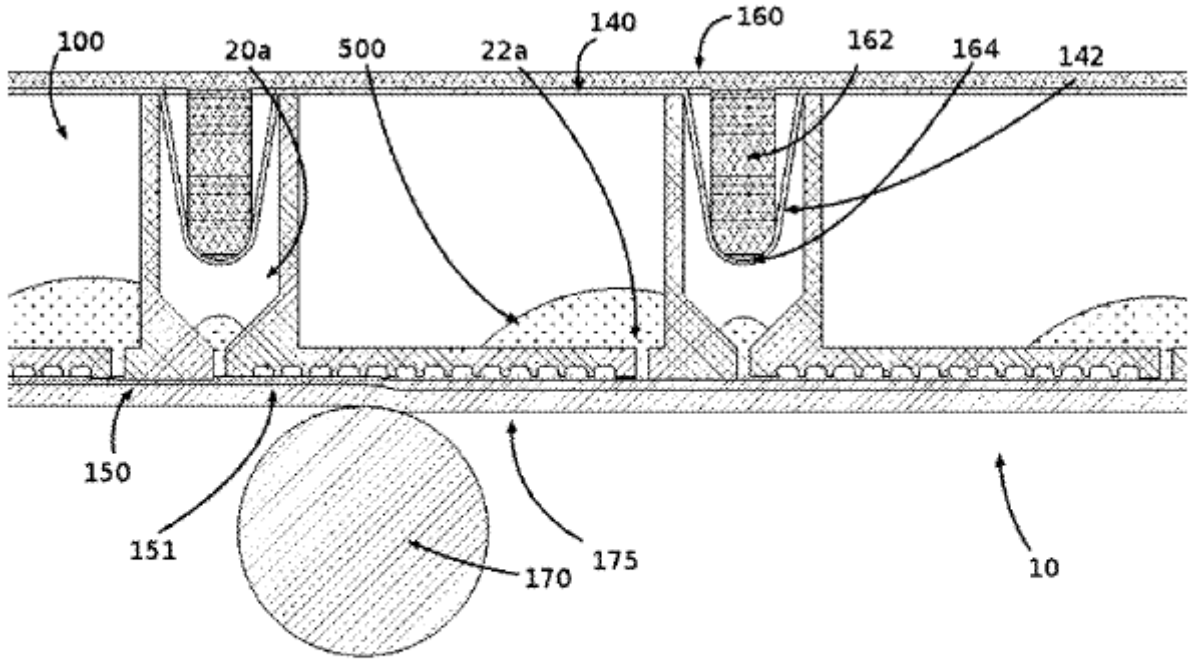


Fig. 33C

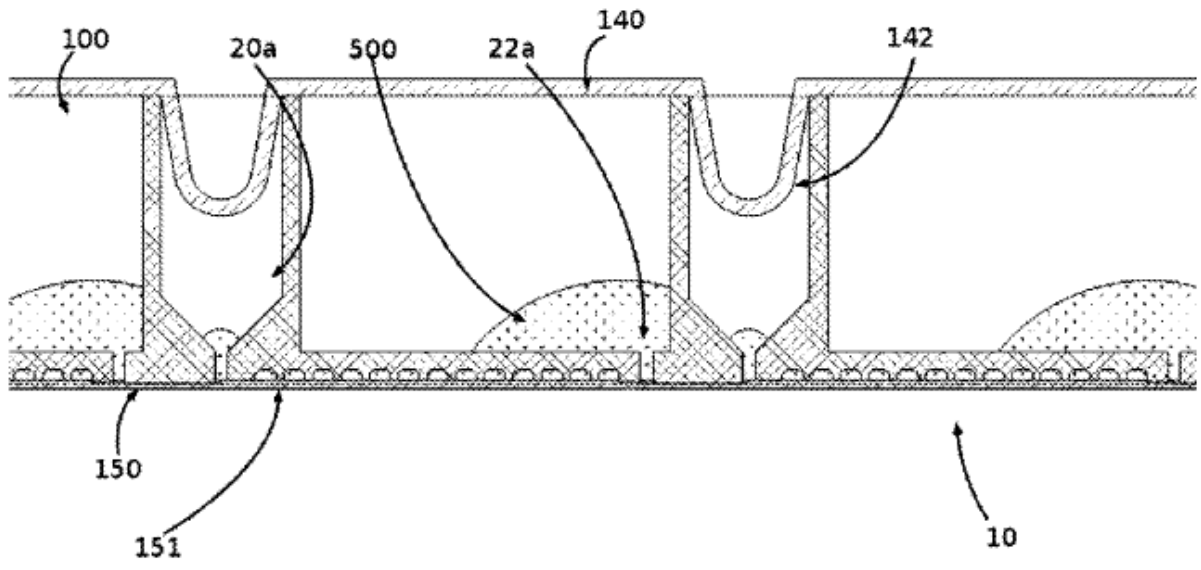


Fig. 34