

REVESTIMIENTOS SUPERFICIALES, PROTECTORES PARA CELDAS DE FLUJO

Remisión a solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud Provisional U.S. No. 62/504,977, presentada el 11 de mayo de 2017, que se incorpora como referencia en su totalidad.

Campo y Antecedentes de la Invención

- 10 Las matrices biológicas están entre una amplia gama de herramientas utilizadas para detectar y analizar moléculas, que incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En estas aplicaciones, las matrices se modifican para incluir sondas para secuencias de nucleótidos presentes en genes de humanos y otros organismos. En ciertas aplicaciones, por ejemplo, se pueden unir sondas de ADN y ARN individuales en pequeñas
- 15 ubicaciones en una red geométrica (o de forma aleatoria) en un soporte de matriz. Una muestra de prueba, por ejemplo, de un organismo o persona conocida, se puede exponer a la red, de tal forma que fragmentos complementarios se hibridan con las sondas en los sitios individuales en la matriz. La matriz entonces se puede examinar al escanear frecuencias
- 20 específicas de luz sobre los sitios para identificar cuáles fragmentos están presentes en la muestra, por fluorescencia de los sitios en los cuales se hibridan los fragmentos.

- Las matrices biológicas se pueden utilizar para secuenciación genética. En general, la secuenciación genética implica determinar el orden de los
- 25 nucleótidos o ácidos nucleicos en una longitud de material genético, tal como un

fragmento de ADN o ARN. Se analizan secuencias crecientemente más largas de bases y la información de secuencia resultante se puede utilizar en diferentes métodos bioinformáticos para ajustar lógicamente fragmentos de forma conjunta para determinar de forma confiable la secuencia de longitudes extensivas de material genético del cual se obtuvieron los fragmentos. El examen basado en computadora, automatizado de fragmentos característicos se ha empleado, y se ha utilizado en mapeo de genomas, identificación de genes y su función, evaluación de riesgos de ciertas condiciones y estados de enfermedad, etc. Más allá de estas aplicaciones, las matrices biológicas se pueden utilizar para detección y evaluación de una amplia gama de moléculas, familias de moléculas niveles de expresión genética, polimorfismo de nucleótido único, y genotipado.

Breve Descripción de la Invención

En un aspecto una celda de flujo comprende: un sustrato, una tapa unida a una región de unión del sustrato en donde la tapa y el sustrato definen al menos parcialmente un canal de flujo, y producto químico superficial colocado en el sustrato y en el canal de flujo. Un revestimiento protector soluble en agua cubre el producto químico superficial en el sustrato.

En un aspecto una celda de flujo comprende: un sustrato que comprende una superficie expuesta; una capa de revestimiento de polímero funcionalizado unida de forma covalente a la superficie expuesta del sustrato a través de un grupo químico sobre la superficie expuesta; un cebador injertado en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado; y un revestimiento protector soluble en agua sobre el cebador y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En algunos ejemplos, la celda de flujo comprende además una tapa unida a una región unida del sustrato, en donde la tapa y el sustrato definen al menos

parcialmente un canal de flujo.

En algunos aspectos de las celdas de flujo descritas en la presente, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado se une de forma covalente a la superficie expuesta debido a la reacción de un grupo químico en la superficie expuesta con un primer grupo reactivo de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En algunos ejemplos, el cebador se injerta en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado debido a la reacción del cebador con un segundo grupo reactivo de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado.

Un ejemplo de una celda de flujo descrita en la presente incluye un sustrato modelado. El sustrato modelado incluye depresiones separadas por regiones intersticiales, y producto químico superficial colocado en las depresiones. En algunos ejemplos, una tapa se une a una región de unión del sustrato modelado, en donde la tapa define al menos parcialmente un canal de flujo que está en comunicación selectiva con las depresiones. Un revestimiento protector soluble en agua cubre el producto químico superficial en las depresiones. En algunos ejemplos, el grupo químico sobre la superficie expuesta se une al sustrato en las depresiones.

Otro ejemplo de una celda de flujo descrita en la presente incluye un sustrato no modelado. En algunos ejemplos, una tapa se une a una región de unión del sustrato no modelado, en donde la tapa y el sustrato no modelado definen al menos parcialmente un canal de flujo que incluye la superficie expuesta. El producto químico superficial se coloca sobre el sustrato no modelado y en el canal de flujo. Un revestimiento protector soluble en agua cubre el producto químico superficial. En algunos ejemplos, el grupo químico sobre la

superficie expuesta se une al sustrato no modelado.

En otro aspecto, un método de uso de una celda de flujo como se describe en la presente comprende: insertar la celda de flujo en un instrumento de secuenciación; y remover el revestimiento protector soluble en agua al exponer
5 el revestimiento protector soluble en agua a agua (opcionalmente en la forma de una solución amortiguadora acuosa). En algunos aspectos, la remoción se hace al llevar a cabo un proceso de flujo pasante para remover el revestimiento protector soluble en agua. La remoción del revestimiento protector soluble en agua revela el cebador, que entonces se utiliza para hibridarse con un
10 oligonucleótido diana que comprende una secuencia complementaria a al menos una porción del cebador.

En un ejemplo de un método descrito en la presente, el producto químico superficial se añade a una porción de un sustrato de celda de flujo, y se aplica un revestimiento protector soluble en agua sobre al menos el producto químico
15 superficial.

En otro aspecto un método comprende: proporcionar un sustrato con una superficie expuesta que comprende un primer grupo químico, en donde la provisión comprende opcionalmente modificar la superficie expuesta del sustrato para incorporar el primer grupo químico; hacer reaccionar el primer grupo
20 químico con un primer grupo reactivo de una molécula de polímero funcionalizado para formar una capa de revestimiento de polímero funcionalizado unida covalentemente a la superficie expuesta del sustrato; injertar un polímero en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado al hacer reaccionar el cebador con un segundo grupo reactivo de la capa de
25 revestimiento de polímero funcionalizado; y formar un revestimiento protector

soluble en agua sobre el cebador y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado.

Breve Descripción de las Figuras

Las características de los ejemplos de la presente descripción llegarán a ser evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y figuras, en las cuales números de referencia similares corresponden a componentes similares, aunque quizá no idénticos. Por brevedad, los números de referencia de características que tiene una función previamente descrita pueden o no describirse junto con otras figuras en las cuales aparecen.

La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un ejemplo de los métodos descritos en la presente;

La figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra ejemplos más detallados del método mostrado en la figura 1;

La figura 3 es una vista en sección transversal de una celda de flujo de ejemplo formada por los métodos mostrados en la figura 2;

La figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra otro ejemplo de los métodos descritos en la presente;

Las figuras 5A a 5H son vistas en sección transversal que conjuntamente ilustran un ejemplo del método mostrado en la figura 4;

Las figuras 5A a 5D y 5I a 5L son vistas en sección transversal que conjuntamente ilustran otro ejemplo del método mostrado en la figura 4;

Las figuras 6A a 6E son vistas en sección transversal que conjuntamente ilustran otro ejemplo de los métodos descritos en la presente;

La figura 7 es una gráfica de barras que representa la velocidad de retención de Orquilla-TET (HP-TET) para celdas de flujo después de

almacenamiento durante 7 días a 30°C con diferentes ejemplos del revestimiento protector sobre las mismas;

La figura 8 es una gráfica que representa la retención HP-TET para celdas de flujos que habían tenido un ejemplo de revestimiento protector sobre las mismas y para un control sin revestir;

La figura 9 es una gráfica de la intensidad de fluorescencia después de un primer o ciclo inicial de secuenciación para celdas de flujo con pistas de flujo de ejemplo y pistas de flujo comparativas empaquetadas en diferentes condiciones de humedad;

La figura 10 es una gráfica de la intensidad de fluorescencia después del primer ciclo de secuenciación para una celda de flujo con pistas de flujo de ejemplo y pistas de flujo comparativas expuestas a un perfil de elevación de temperatura durante diferentes periodos de tiempo que varían de 2 días a 19 días;

La figura 11A es una gráfica de la intensidad de fluorescencia de lectura 1 (R1) después del primer ciclo de secuenciación inicial (C1) para una celda de flujo de ejemplo y una celda de flujo comparativa reposada a 60°C durante 6 días;

La figura 11B incluye una gráfica del porcentaje de agrupaciones que pasan el filtro (superior) y una gráfica de la intensidad de fluorescencia de lectura 1 (R1) después del primer ciclo de secuenciación (C1) para una celda de flujo de ejemplo y una celda de flujo comparativa reposada a temperatura ambiente durante 7 días;

La figura 12A es una gráfica de la intensidad media para una celda de flujo de ejemplo incubada a diferentes temperaturas durante una hora;

La figura 12B es una gráfica de la intensidad media para una celda de flujo comparativa incubada a diferentes temperaturas durante una hora;

La figura 13 es una gráfica de la intensidad de fluorescencia de lectura 1 (R1) después del primer ciclo de secuenciación para celdas de flujo con pistas de flujo de ejemplo y pistas de flujo comparativas almacenadas a diferentes temperaturas durante diferentes periodos de tiempo;

La figura 14 es una gráfica que representa una distancia a través de un revestimiento protector en una oblea moldeada en mm (eje x) versus una distancia del grosor de revestimiento en μm (eje y) (es decir, grosor de revestimiento (μm) como una función de distancia a través de la superficie de oblea (mm));

La figura 15 es una gráfica de la intensidad de fluorescencia después de una primera prueba de accesibilidad de cebador superficial (ensayo CFR) para una celda de flujo de ejemplo y una celda de flujo comparativa después de almacenamiento a temperatura ambiente durante 28 días, 35 días, y 71 días;

La figura 16 es una gráfica de la intensidad de fluorescencia después del primer ciclo de secuenciación para una celda de flujo de ejemplo después de almacenamiento en seco a 30°C durante 0 semanas, 2 semanas, y 6 semanas, para una celda de flujo comparativa después de almacenamiento en seco a 30°C durante 2 semanas y 6 semanas, y para una celda de flujo de ejemplo después de almacenamiento en húmedo a 4°C durante 6 semanas;

La figura 17 es una gráfica que representa los resultados de un ensayo de retención de Cal Fluor Red (CFR) después de 11 días de almacenamiento a diferentes condiciones de almacenamiento, donde retención CFR significa la señal CFR en el día 0 versus la señal CDR después de almacenamiento;

La figura 18 es una gráfica de barras que representa la retención CFR (% , relación de señal CFR en día X/señal en día 0)) en el tiempo 0 (T0) y en el día 1 y día 2 para una celda de flujo de ejemplo y celda de flujo de ejemplo, comparativa;

- 5 La figura 19 es una gráfica de incremento porcentual de intensidad para porciones de celda de flujo de ejemplo comparadas con un control seco con respecto a un grosor del revestimiento protector de porciones de celda de flujo de ejemplo, respectivas;

- 10 La figura 20 es una gráfica de intensidad de fluorescencia de dos lecturas después del primer ciclo de secuenciación (C1) para una celda de flujo que incluye pistas de ejemplo y pistas de ejemplo comparativas;

La figura 21 es una gráfica del CFR (señal relativa) con respecto a un porcentaje del revestimiento protector que se formó de forma simultánea con injerto de cebador; y

- 15 La figura 22 es una gráfica de intensidad (en unidades de fluorescencia arbitrarias, AFU) versus concentración para un revestimiento protector de ejemplo y diferentes revestimientos protectores de ejemplo, comparativos.

Descripción Detallada de la Invención

- 20 Un primer aspecto de una celda de flujo comprende un sustrato moldeado, que incluye depresiones separadas por regiones intersticiales y producto químico superficial (por ejemplo, una capa de revestimiento de polímero funcionalizado y un cebador injertado en la misma) colocado en las depresiones; una tapa unida a una región de unión del sustrato moldeado, en donde la tapa define al menos parcialmente un canal de flujo que está en comunicación
- 25 selectiva con las depresiones; y un revestimiento protector soluble en agua que

cubre el producto químico superficial en las depresiones y al menos una porción del sustrato moldeado.

En un aspecto una celda de flujo comprende: un sustrato que comprende una superficie expuesta; una capa de revestimiento de polímero funcionalizado
5 unida covalentemente a la superficie expuesta del sustrato; un cebador injertado en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado; y un revestimiento protector soluble en agua en el cebador y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En algunos ejemplos, la celda de flujo comprende además una tapa unida a una región unida del sustrato, en donde la tapa y el sustrato definen
10 al menos parcialmente un canal de flujo.

En algunos ejemplos, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado se une covalentemente a la superficie expuesta debido a reacción de un grupo químico sobre la superficie expuesta con un primer grupo reactivo de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En algunos ejemplos, el cebador se
15 injerta en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado debido a la reacción del cebador con un segundo grupo reactivo de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En algunos ejemplos, el cebador comprende un grupo alquínico para reacción con el segundo grupo reactivo. En algunos ejemplos, el grupo químico unido a la superficie expuesta es un grupo alquénico,
20 cicloalquénico, o norbornénico. En algunos ejemplos, el grupo químico es parte de un ligador, tal como un silano o derivado de silano, que se une a la superficie expuesta del sustrato.

En algunos ejemplos, el sustrato es un sustrato moldeado. El sustrato moldeado incluye depresiones separadas por regiones intersticiales. En algunos
25 ejemplos, se une una tapa a una región de unión del sustrato moldeado, en

donde la tapa define al menos parcialmente un canal de flujo que está en comunicación selectiva con las depresiones. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua cubre la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y el cebador en las depresiones. En algunos ejemplos, el grupo químico sobre la superficie expuesta se une al sustrato en las depresiones, opcionalmente a través de un ligador.

En otros ejemplos, el sustrato de celda de flujo es un sustrato no moldeado. En algunos ejemplos, una tapa se une a una región de unión del sustrato no moldeado, en donde la tapa y el sustrato no moldeado definen al menos parcialmente un canal de flujo que incluye la superficie expuesta. La capa de revestimiento de polímero funcionalizado y cebador están en el sustrato no moldeado y en el canal de flujo. El revestimiento protector soluble en agua cubre la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y el cebador. En algunos ejemplos, el grupo químico sobre la superficie expuesta se une al sustrato, opcionalmente a través de un ligador. Por lo tanto, en algunos aspectos, una celda de flujo comprende un sustrato no moldeado; una tapa unida a una región de unión del sustrato no moldeado, en donde la tapa y el sustrato no moldeado definen al menos parcialmente un canal de flujo; un producto químico superficial (por ejemplo, caspa de revestimiento de polímero funcionalizado y cebador injertado en la misma) colocado sobre el sustrato no moldeado y en el canal de flujo; y un revestimiento protector soluble en agua que cubre el producto químico superficial.

En un primer aspecto, un método comprende añadir producto químico superficial a una porción de un sustrato de celda de flujo, y aplicar un revestimiento protector soluble en agua sobre al menos el producto químico

superficial. En un ejemplo de este primer aspecto del método, la adición del producto químico superficial implica formar una capa de revestimiento de polímero funcionalizado, e injertar un cebador en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado; y el revestimiento protector soluble en agua se aplica
5 después de que injerta el cebador. También en este ejemplo de este primer aspecto, el revestimiento protector soluble en agua se moldea para definir una región de unión del sustrato de celda de flujo después de que se forma el revestimiento protector soluble en agua; y el método comprende además unir una tapa a la región de unión definida del sustrato de celda de flujo para formar
10 un canal de flujo.

En otro ejemplo de este primer aspecto del método, la adición del producto químico superficial implica formar una capa de revestimiento de polímero funcionalizado, y el revestimiento protector soluble en agua se aplica después de que se forma la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. También
15 en este ejemplo de este primer aspecto, el revestimiento protector soluble en agua se selecciona del grupo que consiste de un copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol, sacarosa, poliacrilamida, y polietilenglicol. Aun además en este ejemplo de este primer aspecto, el revestimiento protector soluble en agua se moldea para definir una región de unión del sustrato de celda
20 de flujo después de que se forma el revestimiento protector soluble en agua; y el método comprende además unir una tapa a la región de unión definida del sustrato de celda de flujo para formar un canal de flujo. Después de la unión, el método comprende además remover el revestimiento protector soluble en agua, exponiendo así la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y otra
25 porción del sustrato; injertar un cebador en la capa de revestimiento de polímero

funcionalizado; y formar un segundo revestimiento protector soluble en agua en el cebador, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y la otra porción del sustrato de celda de flujo. En un ejemplo de este aspecto, la remoción del revestimiento protector soluble en agua implica un proceso de disolución.

- 5 También en este aspecto, el segundo revestimiento protector soluble en agua se selecciona del grupo que consiste de un polímero sintético no catiónico; un polisacárido natural o un derivado del mismo; una proteína natural o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua,
- 10 un azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora, un glicol, glicerol, y combinaciones de los mismos.

- En un aspecto es un método en donde una capa de revestimiento de polímero funcionalizado se forma sobre una superficie expuesta de un sustrato. Un cebador se injerta en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado.
- 15 Un revestimiento protector soluble en agua se forma sobre la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En algunos ejemplos, la superficie expuesta comprende un ligador (por ejemplo, un silano o un derivado de silano) unido a la misma. En algunos aspectos, el método comprende unir el ligador (por ejemplo, un silano o derivado de silano) a la superficie expuesta. En algunos
- 20 aspectos, el sustrato no está moldeado. En otros aspectos, el sustrato es moldeado, y la unión proporciona depresiones derivatizadas (por ejemplo, silanizadas) y regiones intersticiales derivatizadas (por ejemplos silanizadas).

- En un aspecto un método comprende: modificar una superficie expuesta de un sustrato para incorporar un primer grupo químico; hacer reaccionar el
- 25 primer grupo químico con un primer grupo reactivo de una molécula de polímero

funcionalizado para formar una capa de revestimiento de polímero funcionalizado unida covalentemente a la superficie expuesta del sustrato; injertar un cebador en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado al hacer reaccionar el cebador con un segundo grupo reactivo de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado; y formar un revestimiento protector soluble en agua sobre el cebador y capa de revestimiento de polímero funcionalizado.

En otro ejemplo de un método descrito en la presente, la modificación de la superficie expuesta comprende unir un ligador (por ejemplo, un silano o un derivado de silano) a la superficie expuesta de un sustrato. En algunos ejemplos, el ligador (por ejemplo, silano o derivado de silano) comprende el primer grupo químico. En algunos ejemplos, el ligador es un silano o un derivado de silano. En algunos ejemplos, la modificación de la superficie expuesta comprende reducción a cenizas por plasma. En algunos ejemplos, la modificación comprende reducción a cenizas por plasma para formar una superficie con ceniza por plasma y unir el ligador (por ejemplo, silano o un derivado de silano) al mismo.

En algunos ejemplos, el sustrato no es moldeado. En algunos ejemplos, la reacción del primer grupo químico con el primer grupo reactivo de la molécula de polímero funcionalizado forma una capa de revestimiento de polímero funcionalizado unida covalentemente a la superficie expuesta del sustrato a través del ligador (por ejemplo, silano o derivado de silano). En algunos ejemplos, después de la modificación de la superficie expuesta, el método comprende además unir una tapa a una región de unión del sustrato no moldeado, en donde la tapa y el sustrato no moldeado definen al menos

parcialmente un canal de flujo que incluye alguna parte de la superficie expuesta.

En otros ejemplos, el sustrato no está moldeado. En algunos ejemplos, la modificación de la superficie expuesta comprende reducción a cenizas por plasma, y después de la modificación de la superficie expuesta, el método
5 comprende además unir una tapa a una región de unión del sustrato no moldeado, en donde la tapa y el sustrato no moldeado definen al menos parcialmente un canal de flujo que incluye alguna parte de la superficie expuesta.

En algunos ejemplos, el sustrato es un sustrato moldeado (que comprende depresiones separadas por regiones intersticiales). En algunos
10 ejemplos, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado se forma en las depresiones para formar depresiones funcionalizadas, y el revestimiento protector soluble en agua se forma sobre las depresiones funcionalizadas. En algunos aspectos, el grupo químico se une al sustrato en las depresiones, y el canal de flujo está en comunicación selectiva con las depresiones. En algunos
15 ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua está en las depresiones y sobre al menos una porción de las regiones intersticiales.

En algunos ejemplos, el sustrato moldeado comprende un ligador (por ejemplo, silano o derivado de silano) unido a la superficie expuesta. En algunos ejemplos, el ligador se une a la superficie expuesta en las depresiones, y en
20 algunos ejemplos, el ligador se une a la superficie expuesta en las depresiones y regiones intersticiales, para formar depresiones derivatizadas (por ejemplo, silanizadas) y regiones intersticiales derivatizadas (por ejemplo, silanizadas). En algunos ejemplos, la modificación de la superficie expuesta implica unir un ligador (por ejemplo, silano, o derivado de silano) que comprende el primer grupo
25 químico a la superficie expuesta para formar depresiones derivatizadas (por

ejemplo, silanizadas) y, opcionalmente, regiones intersticiales derivatizadas (por ejemplo, silanizadas). En algunos ejemplos, la reacción forma la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones derivatizadas (por ejemplo, silanizadas) y regiones intersticiales. En algunos ejemplos, antes del

5 injerto del cebador, el método comprende además remover la capa de revestimiento de polímero funcionalizado de las regiones intersticiales derivatizadas (por ejemplo, silanizadas). En algunos ejemplos, la remoción se hace al pulir la capa de revestimiento de polímero funcionalizado de las regiones intersticiales. Un cebador se injerta en la capa de revestimiento de polímero

10 funcionalizado en las depresiones derivatizadas (por ejemplo, silanizadas) para formar depresiones funcionalizadas. En algunos de estos ejemplos, el injerto une el cebador a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones derivatizadas (por ejemplo, silanizadas), formando así depresiones funcionalizadas. Un revestimiento protector soluble en agua se forma sobre las

15 depresiones funcionalizadas y al menos una porción de las regiones intersticiales. En algunos ejemplos, la formación produce el revestimiento protector soluble en agua sobre las depresiones funcionalizadas y al menos algunas de las regiones intersticiales. En algunos ejemplos, después de la remoción de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado, el método

20 comprende además unir una tapa a una región de unión del sustrato moldeado, en donde la tapa y el sustrato no moldeado definen al menos parcialmente un canal de flujo que incluye las depresiones silanizadas que tienen el revestimiento de polímero funcionalizado sobre las mismas.

Por lo tanto, en algunos ejemplos, el método comprende unir un silano o

25 un derivado de silano a una superficie de un sustrato moldeado que incluye

depresiones separadas por regiones intersticiales, formando así depresiones silanizadas y regiones intersticiales silanizadas; formar una capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones silanizadas y sobre las regiones intersticiales silanizadas; pulir la capa de revestimiento de polímero funcionalizado de las regiones intersticiales silanizadas; injertar un cebador en la
5 capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones silanizadas para formar depresiones funcionalizadas; y formar un revestimiento protector soluble en agua sobre las depresiones funcionalizadas y al menos una porción de las regiones intersticiales.

10 En algunos aspectos del método, el revestimiento protector soluble en agua se forma después de que se injerta el cebador; el revestimiento protector soluble en agua se moldea de tal forma que una región de unión del sustrato moldeado permanece expuesta después de que se forma el revestimiento protector soluble en agua; y el método comprende además unir una tapa a la
15 región de unión del sustrato moldeado para formar un canal de flujo que está en comunicación de fluidos selectiva con al menos algunas de las depresiones funcionalizadas.

En otros aspectos del método, después de que se remueve la capa de revestimiento de polímero funcionalizado (por ejemplo, por pulido) de las regiones intersticiales de un sustrato moldeado y antes de que i) se injerte el
20 cebador y ii) se forme el revestimiento protector soluble en agua, el método comprende además: moldear un revestimiento protector soluble en agua, inicial sobre la capa de revestimiento de polímero funcionalizado de tal forma que una región de unión del sustrato moldeado permanece expuesta; unir una tapa a la
25 región de unión del sustrato moldeado para formar un canal de flujo que está en

comunicación de fluidos selectiva con al menos algunas de las depresiones; y remover el revestimiento protector soluble en agua, inicial.

En algunos ejemplos, la modificación de la superficie expuesta, la reacción del primer grupo químico con el primer grupo reactivo, el injerto del
5 cebador, y/o la formación del revestimiento protector soluble en agua implica procesos de flujo pasante, respectivos. En algunos ejemplos, el injerto del cebador y la formación del revestimiento protector soluble en agua implica procesos de flujo pasante, respectivos. En algunos ejemplos, la aplicación del
10 revestimiento protector soluble en agua implica deposición de fluido pasante, revestimiento por inmersión, revestimiento por centrifugación, revestimiento por rociamiento, revestimiento por rociamiento ultrasónico, revestimiento por cuchilla raspadora, impresión en aerosol, o impresión de inyección de tinta.

En algunos ejemplos, los métodos comprenden además unir una tapa a una región de unión del sustrato de celda de flujo para formar un canal de flujo,
15 y entonces unir el producto químico superficial (por ejemplo, capa de revestimiento de polímero funcionalizado y cebador) y aplicar el revestimiento protector soluble en agua.

En algunos ejemplos, después del injerto del cebador, el método comprende además remover al menos parcialmente el revestimiento protector
20 soluble en agua, y llevar a cabo un ensayo basado en tinte para detectar cualquier degradación (por ejemplo, pérdida o pérdida de función) del cebador.

En algunos ejemplos, después de que se forma la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y antes del injerto del cebador y la formación del revestimiento protector soluble en agua, el método comprende además: moldear
25 un revestimiento protector soluble en agua, inicial sobre la capa de revestimiento

de polímero funcionalizado de tal forma que una región de unión del sustrato permanece expuesta; unir una tapa a la región de unión del sustrato para formar un canal de flujo que está en comunicación de fluidos selectiva con el revestimiento protector soluble en agua, inicial; y remover el revestimiento protector soluble en agua, inicial. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua, inicial se aplica por revestimiento por rociamiento o un proceso de flujo pasante. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua, inicial y el revestimiento protector soluble en agua se forman del mismo material, y forman de diferentes materiales.

En algunos ejemplos, la formación del revestimiento protector soluble en agua implica aplicar una solución acuosa de un material soluble en agua a la superficie expuesta del sustrato. En algunos ejemplos, la solución acuosa del material soluble en agua entonces se seca sobre la superficie expuesta (por ejemplo, por calentamiento, evaporación, exposición al vacío, o similares). En algunos ejemplos, la solución acuosa incluye hasta aproximadamente 15%, o aproximadamente 1 a 15%, o aproximadamente 1 a 10%, o aproximadamente 1 a 5%, o aproximadamente 2 a 5%, o aproximadamente 4 a 8%, o aproximadamente 5 a 7.5%, o aproximadamente 5%, o aproximadamente 7.5% (masa a volumen), de un material soluble en agua. En algunos ejemplos, la solución acuosa comprende aproximadamente 5 a aproximadamente 7.5%, o aproximadamente 5%, o aproximadamente 7.5% (masa a volumen) de un material soluble en agua. En algunos ejemplos, el porcentaje del material soluble en agua en la solución acuosa se ajusta con base en una densidad de cebador del cebador. En algunos ejemplos, la solución acuosa también comprende un co-solvente, tal como etanol. En algunos ejemplos, la solución acuosa es

aproximadamente 5 a aproximadamente 7.5%, o aproximadamente 5%, o aproximadamente 7.5% del material soluble en agua en etanol acuoso al 10%.

En algunos ejemplos de los métodos y celdas de flujo descritos en la presente, el revestimiento protector soluble en agua comprende un polímero
5 sintético no catiónico, soluble en agua; un polisacárido natural soluble en agua o un derivado del mismo; una proteína natural soluble en agua o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; o un compuesto de molécula pequeña, soluble en agua seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, un azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora,
10 un glicol, glicerol, y una ciclodextrina; o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua comprende un polímero sintético no catiónico, soluble en agua. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua comprende:

(a) el polímero sintético no catiónico, opcionalmente que comprende
15 poliacrilamida, ácido poliacrílico o poliacrilato (por ejemplo, poliacrilato de sodio), ácido polimetacrílico, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, polimetacrilamida, una poli(N-alquilacrilamida), una poli(N-dialquilacrilamida), poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida), anhídrido poli(diviniléter-maleico), un poli(fosfato), un poli(2-alquil-2-oxazolina),
20 poli(hidroxietil-metacrilato), poli(2-hidroxietil-acrilato), polietilenglicol, poli(sulfobetaína-metacrilato), un poliéter (por ejemplo, un poliviniléter, polietilenglicol, óxido de polietileno, y similares), ácido poli(viniléter-maleico), un polímero de hidroxilo funcional (por ejemplo PEG o PVA), un polipéptido no natural (por ejemplo, ácido poliglutámico o una sal del
25 mismo), una silicona, o una combinación de los mismos; que incluye, por

ejemplo, copolímeros de bloque e injerto aleatorios y análogos ramificados; o

(b) el polisacárido natural o derivado del mismo, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste de almidón, carboximetilcelulosa, goma de xantano, pectina, dextrano, carragenano, goma guar, celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxietilcelulosa (HEC), metilcelulosa, carboximetilhidroxietilcelulosa (CMHEC), ácido hialurónico, fosfato de almidón, almidón de hidroxipropilo, almidón de hidroxietilo, agarosa, agar, y alginato, y combinaciones de los mismos; o

(c) la proteína natural o derivado de la misma opcionalmente seleccionada de caseína y albúmina; o

(d) la sal soluble en agua opcionalmente seleccionada del grupo que consiste de sal de sodio o potasio de cloruro, bromuro, sulfato, fosfato, carbonato, acetato, y citrato, tal como cloruro de sodio, bromuro de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, carbonato de sodio, acetato de sodio, citrato de sodio, cloruro de potasio, bromuro de potasio, sulfato de potasio, fosfato de potasio, carbonato de potasio, acetato de potasio, citrato de potasio, o citrato de sodio salino, o una combinación de los mismos; o

(e) la solución amortiguadora (por ejemplo, una solución acuosa de un ácido débil y su base conjugada), en donde el ácido débil o base conjugada es opcionalmente citrato de sodio salino, tris(hidroximetil)aminometano (por ejemplo, tris o tris base) opcionalmente con EDTA, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanesulfónico (HEPES), ácido 3-[[1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il]amino]-2-

hidroxipropano-1-sulfónico (TAPSO), N-(2-hidroxi-1,1-bis(hidroximetil)etil)glicina (tricina), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), o ácido 3-(N,N-bis([2-hidroxietil]amino)-2-hidroxipropanosulfónico (DIPSO); o

5 (f) el agente tensoactivo soluble en agua que es opcionalmente un agente tensoactivo aniónico o no iónico, o que es opcionalmente dodecilsulfato de sodio, un etoxilato de alquilo, un aceite etoxilado, una grasa, o un sulfosuccinato, o

10 (g) el azúcar (por ejemplo, sacarosa), el antioxidante, el glicol, el glicerol, o la ciclodextrina; o

(h) el quelante que es opcionalmente sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético, tris(3-hidroxipropil-triazolilmetil)amina, (tris(2-carboxietil)fosfina), o sal disódica de ácido batofenantrolinadisulfónico; o
(i) una combinación de los mismos.

15 Un ejemplo de un polímero sintético no catiónico adecuado es un copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol (un ejemplo del cual incluye KOLLICOAT^{MR} IR, disponible de BASF Corp.). Un ejemplo de un polímero de hidroxilo funcional está comercialmente disponible de BASF Corp., bajo el nombre comercial KOLLICOAT^{MR} IR. Cualquiera de los polímeros
20 sintéticos no catiónicos solubles en agua que incluyen grupos ácidos se pueden utilizar en una forma de sal de metal alcalino.

En algunos de los ejemplos descritos en la presente, cuando se aplican después de injerto de cebador, el revestimiento protector puede ser un copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol (por ejemplo,
25 KOLLICOAT^{MR} IR, ambos disponibles de BASF Corp.), sacarosa, dextrano (por

ejemplo, peso molecular de 200,000 Da), poliacrilamida (por ejemplo, peso molecular de 40,000 Da, 200,000 Da, etc.), polietilenglicol, sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético (es decir, EDTA), ácido tris(hidroximetil)aminometano con ácido etilendiaminotetra-acético, (tris(2-carboxietil)fosfina), tris(3-
5 hidroxipropil-triazolilmetil)amina, sal disódica de ácido batofenantrolina-disulfónico, polímeros de hidroxilo funcionales, glicerol, o citrato de sodio salino. En algunos otros de los ejemplos descritos en la presente, cuando se aplican después o durante la formación de capa de revestimiento de polímero funcionalizado, el revestimiento protector puede ser un copolímero de injerto de
10 alcohol polivinílico/-polietilenglicol, sacarosa, poliacrilamida, o polietilenglicol. Para al menos sacarosa y poliacrilamida, se va a entender que la capa de revestimiento de polímero funcionalizado se debe curar antes de la aplicación del revestimiento protector de estos materiales.

En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua
15 comprende un polímero sintético no catiónico; un polisacárido natural o un derivado del mismo; una proteína natural o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de molécula pequeña seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, una azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora, un glicol, glicerol, o una
20 ciclodextrina; o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua comprende un copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol, sacarosa, dextrano, una poliacrilamida, un glicol, trishidroximetilaminometano o una sal del mismo, ácido etilendiaminotetraacético o una sal del mismo, tris(2-carboxietil)fosfina), tris(3-
25 hidroxipropil-triazolilmetil)amina o una sal de la misma, sal disódica de ácido

batofenantrolinadisulfónico, un polímero de hidroxilo funcional, glicerol, o citrato de sodio salino, o una mezcla de los mismos. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua comprende copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol/sacarosa, o una mezcla de los mismos. En algunos ejemplos, el revestimiento protector soluble en agua comprende un copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol. En algunos ejemplos, el copolímero de injerto comprende aproximadamente 75% de alcohol polivinílico y aproximadamente 25% de polietilenglicol.

En algunos ejemplos de los métodos o celdas de flujo descritos en la presente, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado comprende una poli(N-(5-azidoacetamidilpentil)acrilamida-co-acrilamida (PAZAM).

En algunos ejemplos de los métodos o celdas de flujo descritos en la presente, el revestimiento protector soluble en agua está presente sobre (o se aplica a) la celda de flujo como una mezcla con la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En estos ejemplos, la celda de flujo comprende: un sustrato que comprende una superficie expuesta; una capa de revestimiento de polímero funcionalizado unida covalentemente a la superficie expuesta del sustrato; un cebador injertado en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado; y un revestimiento protector soluble en agua mezclado con la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. Métodos relacionados comprenden: modificar una superficie expuesta de un sustrato para incorporar un primer grupo químico; hacer reaccionar el primer grupo químico con una mezcla de un revestimiento protector soluble en agua y una molécula de polímero funcionalizado que comprende un primer grupo reactivo para formar una capa de revestimiento de polímero funcionalizado unida covalentemente a

la superficie expuesta del sustrato y mezclada con el revestimiento protector soluble en agua; e injertar un cebador en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado al hacer reaccionar el cebador con un segundo grupo reactivo de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En estos ejemplos, entonces la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y la capa protectora soluble en agua se aplican al mismo tiempo. En estos ejemplos, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado se cura después de la aplicación de la mezcla de la molécula de polímero funcionalizado y el revestimiento protector soluble en agua. En algunos ejemplos, la mezcla es de 5% en peso a aproximadamente 95% en peso del revestimiento soluble en agua con respecto a la molécula de polímero funcionalizado o aproximadamente 10% en peso a aproximadamente 80% en peso, o aproximadamente 25% en peso a aproximadamente 75% en peso, o aproximadamente 25% en peso, 50% en peso, o 75% en peso. El revestimiento protector soluble en agua puede proteger la superficie durante el paso de curado. En algunos ejemplos, una mezcla que comprende un precursor de revestimiento soluble en agua y se aplica una molécula de polímero funcional. En algunos ejemplos, la mezcla comprende además un solvente, tal como etanol. En algunos ejemplos, el precursor de revestimiento soluble en agua es KOLLICOAT^{MR} IR y la molécula de polímero funcionalizado es PAZAM. En un ejemplo, la aplicación de una mezcla de 5% p/v de KOLLICOAT^{MR} IR, 0.25% p/v de PAZAM, y etanol al 5% en agua durante el paso de revestimiento de polímero funcionalizado mejoró intensidad CFR e intensidad de lectura 1 y ciclo 1, y mantuvo el % de paso de filtro de cebadores injertados, resultantes que se cargaron a concentraciones de 0.8, 1.1, 1.5 y 5 μ M, con respecto a un control (0.25% p/v de PAZAM y etanol al 5% en agua). En

algunos ejemplos, la mezcla es 5% p/v de precursor de revestimiento soluble en agua (por ejemplo, KOLLICOAT^{MR} IR), 0.25% p/v de molécula de polímero funcional (por ejemplo, PAZAM), y etanol al 5%. En estos ejemplos, el revestimiento soluble en agua puede permanecer en su lugar durante el paso de
 5 injerto de cebador. Para sustratos moldeados, el revestimiento soluble en agua se puede remover durante un paso de pulido posterior (que emplea condiciones acuosas), o durante re-hidratación de la celda de flujo antes del injerto (el revestimiento de polímero funcionalizado se deshidrata durante el curado).

En algunos ejemplos de los métodos o celdas de flujo descritos en la
 10 presente, el grupo químico incorporado sobre la superficie expuesta del sustrato es alquenilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, cicloalquenilo opcionalmente sustituido, norbornenilo opcionalmente sustituido, ciclooctinilo opcionalmente sustituido, bicliclononilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, azido, tetrazinilo opcionalmente sustituido,
 15 hidrazonilo, tetrazolilo opcionalmente sustituido, formilo, o hidroxilo. En algunos ejemplos, el grupo químico es norbornenilo o norbornenilo sustituido. En algunos ejemplos, el grupo químico se liga de forma covalente a la superficie expuesta del sustrato a través de un ligador. El ligador puede comprender, por ejemplo, alquenilo, etilenglicol, propilenglicol, acetilo, carbonilo, acetamido, amido, silano,
 20 silicio, éter de sililo, u otras unidades separadoras, o una combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el ligador comprende un silano o derivado de silano, y se menciona en la presente como un ligador de silano. En algunos ejemplos, el ligador de silano comprende $-\text{Si}(\text{X})_2\text{-C}_{2-6}\text{alquilo}-$, en donde cada X es $-\text{OH}$, $-\text{O-alquilo}$, o derivado de $-\text{O-SiR}_3$ (por ejemplo, siloxano). En algunos
 25 ejemplos, el ligador es $-\text{Si}(\text{OR})_2\text{-CH}_2-$. En algunos ejemplos, el ligador

comprende un éter de sililo y un grupo alquileo.

En algunos ejemplos de las celdas de flujo o métodos descritos en la presente, el primer y segundo grupo reactivo son opcionalmente de forma independiente alqueno sustituido, cicloalqueno opcionalmente sustituido, 5 norborneno opcionalmente sustituido, ciclooctino opcionalmente sustituido, biciclonono opcionalmente sustituido, alquino opcionalmente sustituido, azido, tetrazino opcionalmente sustituido, hidrazono, tetrazolo opcionalmente sustituido, formilo, o hidroxilo. En algunos ejemplos, el primero y segundo grupo reactivo son los mismos. En algunos ejemplos, el primer y segundo grupo 10 reactivo ambos son azido.

En algunos ejemplos de las celdas de flujo o métodos descritos en la presente, el cebador se modifica en un término con una fracción para reacción con el segundo grupo reactivo. Por ejemplo, el cebador comprende un grupo alquino para reacción con el segundo grupo reactivo.

15 En algunos ejemplos de las celdas de flujo o métodos descritos en la presente, el cebador es una pluralidad de cebadores que incluyen dos poblaciones de cebadores funcionales. En algunos ejemplos, el cebador es una población de cebadores funcionales (que puede incluir dos sub-poblaciones de cebadores funcionales, por ejemplo, cebador A y cebador B) y una población de 20 cebadores no funcionales. En algunos aspectos, el cebador comprende una secuencia de cebadores. Donde se utilizan dos sub-poblaciones de cebadores funcionales, incluyen diferentes secuencias de cebadores. Un oligonucleótido diana se hibrida con el cebador (a través de una secuencia complementaria a la secuencia de cebador), y el cebador se extiende en la presencia de una 25 polimerasa para formar una copia complementaria del oligonucleótido diana que

se une al sustrato.

Se va a entender que cualquier característica de las celdas de flujo y de los métodos para fabricar las celdas de flujo descritos en la presente se pueden combinar conjuntamente de cualquier forma deseable y/o configuración.

5 Además, se va a entender que cualquier combinación de características de cualquiera de los métodos y/o de las celdas de flujo se pueden utilizar conjuntamente, y/o que cualquier característica de cualquiera de o de todos estos aspectos se pueden combinar con cualquiera de las características de los ejemplos descritos en la presente.

10 Ejemplos del método descrito en la presente implican aplicación de un revestimiento protector durante flujos de trabajo de fabricación de celda de flujo. El revestimiento protector se puede aplicar de forma directa sobre producto químico superficial químicamente y/o biológicamente activo (por ejemplo, una capa de revestimiento de polímero funcionalizado, un cebador) que se deposita
15 sobre un sustrato. El revestimiento protector puede proteger el producto químico superficial durante técnicas de procesamiento posteriores (por ejemplo, técnicas de montaje, tal como unión de tapa, troceo de oblea, etc.), y/o durante envío de la celda de flujo y/o durante almacenamiento de largo y/o corto plazo de la celda de flujo. En un ejemplo, el periodo de almacenamiento puede ser hasta 120 días,
20 o más largo. En otro ejemplo, el periodo de almacenamiento puede variar de aproximadamente 1 día a aproximadamente 75 días. En otro ejemplo, el periodo de almacenamiento puede variar de aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 años, o puede ser aproximadamente 12 meses, 18 meses, o 24 meses. En tanto que se han proporcionado ejemplos, se va a entender que el periodo de
25 almacenamiento puede variar de cualquier tiempo después de que se ha

aplicado el revestimiento protector hasta que sea deseable utilizar la celda de flujo. Como un ejemplo, el revestimiento protector puede proteger el producto químico superficial de degradación química o física, por ejemplo, de escombros y/o contaminación que puede de otra forma estar en contacto con el producto químico superficial durante unión de etapa u otros procesos de montaje. Como otro ejemplo, el revestimiento protector puede proteger el producto químico superficial de ralladuras u otros defectos relacionados con manejo que pueden resultar durante el envío. Como aun otro ejemplo, el revestimiento protector puede proteger el producto químico superficial de factores ambientales (por ejemplo, temperatura, humedad, etc.), durante la fabricación, envío, y/o almacenamiento de corto y/o largo plazo (por ejemplo, a una temperatura que varía de aproximadamente 4°C a aproximadamente 80°C, o en algunos casos temperaturas menores, hasta aproximadamente -25°C). El revestimiento protector ayuda a mantener la estabilidad inherente del producto químico superficial, y por lo tanto mejora la vida útil, tolerancia de temperatura, durabilidad, y capacidad de almacenamiento ambiente de la celda de flujo, la estabilización del producto químico superficial es un proceso eficiente y el producto químico superficial entonces es estable con el paso del tiempo.

Los métodos descritos en la presente pueden llevarse a cabo de forma completa a nivel de oblea, completamente a nivel de pastilla, en parte a nivel de oblea, y/o en parte a nivel de pastilla. Como un ejemplo de la realización del método parcialmente en los niveles de oblea y pastilla, el método se puede iniciar utilizando una oblea, que entonces se trocea para formar varias pastillas, y el método puede continuar utilizando cada una de las pastillas. La capacidad para llevar a cabo procesamiento de obleas abiertas (por ejemplo, pasos químicos o

físicos llevados a cabo antes de la unión de tapa), al menos en algunos ejemplos, permite que se utilice una variedad de técnicas de metrología/analíticas para control de calidad y caracterización. Antes de unirse para formar una celda de flujo, el sustrato/oblea modificada superficialmente y moldeada se pueden
5 exponer a, por ejemplo, microscopia de fuerza atómica (AFM), microscopia electrónica de barrido (SEM), elipsometría, goniometría, dispersometría y/o técnicas de fluorescencia. De forma alternativa, la celda de flujo unida se puede exponer a estas técnicas. A nivel de pastilla, los métodos se pueden llevar a cabo en una pastilla de caras abiertas, o en una celda de flujo montada (con un canal
10 de flujo encerrado).

Se va a entender que los términos usados en la presente se tomarán en su significado ordinario en la técnica relevante a menos que se especifique de otra forma. Varios términos utilizados en la presente y sus significados se van a exponer más adelante.

15 Las formas singulares “uno”, “una”, y “el” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Los términos que comprende, que incluye, que contiene y diferentes formas de esos términos son sinónimos entre sí y se van a entender que son igualmente amplios.

20 Los términos superior, inferior, parte inferior, parte superior, sobre, etc., se utilizan en la presente para describir la celda de flujo y/o los diferentes componentes de la celda de flujo. Se va a entender que estos términos direccionales no se proponen que impliquen una orientación específica, sino se utilizan para designar orientación relativa entre componentes. El uso de términos
25 direccionales no se debe interpretar que limita los ejemplos descritos en la

presente a cualquier orientación específica.

Como se usa en la presente, “alquilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos recta o ramificada que está completamente saturada (es decir, no contiene ningún enlace doble o triple). El grupo alquilo puede tener de 1 a 20
5 átomos de carbono. Grupos alquilo de ejemplo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, butilo terciario, pentilo, hexilo, y similares. Como un ejemplo, la designación “C1-4alquilo” indica que hay uno a cuatro átomos de carbono en la cadena alquilo, es decir, la cadena alquilo se selecciona del grupo que consiste de metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, y t-
10 butilo.

Como se usa en la presente, “alquenilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos recta o ramificada que contiene uno o más enlaces dobles. El grupo alquenilo puede tener 2 a 20 átomos de carbono. Grupos alquenilo de ejemplo incluye etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo, hexenilo, y similares. El
15 grupo alquenilo se puede designar como, por ejemplo, “C2-4alquenilo”, que indica que hay dos a cuatro átomos de carbono en la cadena alquenilo.

Como se usa en la presente, “alquinilo” se refiere a una cadena de hidrocarburos recta o ramificada que contiene uno o más enlaces triples. El grupo alquinilo puede tener 2 a 20 átomos de carbono. El grupo alquinilo se puede
20 designar, por ejemplo, como “C2-4alquinilo”, que indica que hay dos a cuatro átomos de carbono en la cadena alquinilo.

Un grupo funcional “amino” se refiere a un grupo $-NR_aR_b$, donde R_a y R_b cada uno se selecciona independientemente de hidrógeno, C1-6alquilo, C2-6alquenilo, C2-6alquinilo, C3-7carbociclilo, C6-10arilo, heteroarilo de 5-10
25 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente.

Como se usa en la presente, “arilo” se refiere a un anillo aromático o sistema de anillos (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos de carbono adyacentes) que contiene solo carbono en la estructura principal de anillo. Cuando el arilo es un sistema de anillo, cada anillo en el sistema es aromático. El grupo arilo puede tener 6 a 18 átomos de carbono, que se puede designar como C6-18. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, azuleno, y antraceno.

Como se usa en la presente, el término “unido” se refiere al estado de dos cosas que se unen, sujetan, adhieren, conectan o unen entre sí. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede unir a una capa de revestimiento de polímero funcionalizado por un enlace covalente o no covalente. Un enlace covalente está caracterizado por la compartición de pares de electrones entre átomos. Un enlace no covalente es un enlace físico que no implica la compartición de pares de electrones y pueden incluir, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófilas e interacciones hidrófobas.

Un grupo funcional “azida” o “azido” se refiere a $-N_3$.

Como se usa en la presente, “carbociclilo” significa un anillo cíclico no aromático o sistema de anillos que contiene solo átomos de carbono en la estructura principal de sistema de anillo. Cuando el carbociclilo es un sistema de anillo, dos o más anillos pueden unirse conjuntamente de una forma fusionada, puenteada o espiro-conectada. Carbociclos pueden tener cualquier grado de saturación, siempre que al menos un anillo en un sistema de anillos no sea aromático. Por lo tanto, carbociclilo incluye cicloalquilos, cicloalquenos, y cicloalquinos. El grupo carbociclilo puede tener 3 a 20 átomos de carbono (es

decir, C3-20). Ejemplos de anillos de carbociclilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, 2,3-dihidro-indeno, biciclo[2.2.2]octanilo, adamantilo, y espiro[4.4]nonanilo.

Como se usa en la presente, el término “ácido carboxílico” o “carboxilo”
5 como se usa en la presente se refiere a C(O)OH.

Como se usa en la presente, “cicloalquilo” significa un sistema de anillos o anillo de carbociclilo completamente saturado. Los ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, y ciclohexilo.

Como se usa en la presente, “cicloalquileno” significa un sistema de anillos
10 o anillo de carbociclilo completamente saturado que se une al resto de la molécula a través de dos puntos de unión.

Como se usa en la presente, “cicloalquenilo” o “cicloalcano” significa un sistema de anillos o anillo de carbociclilo que tiene al menos un enlace doble, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. Ejemplos incluyen
15 ciclohexenilo o ciclohexeno o norborneno o norbornenilo. Como se usa también en la presente, “heterocicloalquenilo” o “heterocicloalqueno” significa un sistema de anillos o anillo de carbociclilo con al menos un heteroátomo en la estructura principal de anillo, que tiene al menos un doble enlace, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático.

20 Como se usa en la presente, “cicloalquinilo” o “cicloalquino” significa un sistema de anillos o anillo de carbociclilo que tiene al menos un enlace triple, en donde ningún anillo en el sistema de anillos es aromático. Un ejemplo es ciclooctino. Otro ejemplo es biclclononino. También como se usa en la presente, “heterocicloalquinilo” o “heterocicloalquino” significa un sistema de anillos o anillo
25 de carbociclilo con al menos un heteroátomo en la estructura principal de anillo,

que tiene al menos un enlace triple, con ningún anillo en el sistema de anillos que es aromático.

El término “depositar”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier técnica de aplicación adecuada, que puede ser manual o automatizada, que da
5 por resultado modificación de las propiedades superficiales. En general, la deposición se puede llevar a cabo utilizando técnicas de deposición de vapor, técnicas de revestimiento, técnicas de injerto, o similares. Algunos ejemplos específicos incluyen deposición de vapor químico (CVD), revestimiento por rociamiento (por ejemplo, revestimiento por rociamiento ultrasónico),
10 revestimiento por centrifugación, revestimiento por inmersión o remojo, revestimiento por cuchilla raspadora, dispensación de baño, revestimiento de flujo pasante, impresión en aerosol, impresión de inyección de tinta, o similares. En algunos aspectos, el revestimiento protector soluble en agua se aplica por revestimiento por rociamiento. En otros aspectos, el revestimiento protector
15 soluble en agua se aplica por revestimiento de flujo pasante.

Como se usa en la presente, el término “depresión” se refiere a una característica cóncava discreta en un sustrato moldeado que tiene una abertura superficial que está completamente circundada por regiones intersticiales de la superficie de sustrato moldeado. Las depresiones pueden tener cualquiera de
20 una variedad de formas en su abertura en una superficie que incluyen, como ejemplos, redonda, elíptica, cuadrada, poligonal, hexagonal, en forma de estrella (cualquier número de vértices), etc. La sección transversal de una depresión tomada de forma ortogonal con la superficie puede ser curvada, cuadrada, poligonal, hiperbólica, cónica, angular, etc. Como un ejemplo, la depresión puede
25 ser una cavidad. Como también se usa en la presente, una “depresión

funcionalizada” se refiere a una característica cóncava discreta donde se une la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y los cebadores.

El término “cada uno” cuando se usa con referencia a una recolección de elementos, se propone que identifique un elemento individual en la recolección, pero no necesariamente se refiere a cada elemento en la recolección. Pueden presentarse excepciones si la descripción o contexto explícito dictan claramente lo contrario.

Como se usa en la presente, el término “celda de flujo” se propone que signifique un frasco que tiene una cámara (es decir, canal de flujo) donde se puede llevar a cabo una reacción, una entrada para distribuir reactivos a la cámara, y una salida para remover reactivos de la cámara. En algunos ejemplos, la cámara permite la detección de la reacción que se presenta en la cámara. Por ejemplo, la cámara puede incluir una o más superficies transparentes que permiten la detección óptica de matrices, moléculas ópticamente etiquetadas, o similares, en la cámara.

Como se usa en la presente, un “canal de flujo” puede ser un área definida entre dos componentes unidos, que pueden recibir de forma selectiva una muestra líquida. En algunos ejemplos, el canal de flujo se puede definir entre un sustrato moldeado y una tapa, y por lo tanto puede estar en comunicación de fluidos con una o más depresiones definidas en el sustrato moldeado. En otros ejemplos, el canal de flujo se puede definir entre un sustrato no moldeado y una tapa.

La “capa de revestimiento de polímero funcionalizado” mencionada en la presente se propone que signifique un material semirrígido que es permeable a líquidos y gases. La capa de revestimiento de polímero funcionalizado puede ser

un hidrogel que puede hincharse cuando se absorbe líquido (por ejemplo, agua) y puede contraerse cuando se remueve líquido por secado. De forma convencional, en tanto que un hidrogel puede absorber agua, no es soluble en agua. En un ejemplo, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado es
5 poli(N-(5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida) (PAZAM). La capa de revestimiento de polímero funcionalizado también puede incluir otras moléculas, que incluyen uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste de alquenilo opcionalmente sustituido, azida/azido, amino opcionalmente sustituido, carboxilo, hidrazona opcionalmente sustituida, hidracina
10 opcionalmente sustituida, hidroxilo, tetrazola opcionalmente sustituida, tetrazina opcionalmente sustituida, óxido de nitrilo, nitrona, o tiol. En algunos aspectos, los grupos funcionales son grupos reactivos que se utilizan para unir la capa de revestimiento de polímero funcionalizado con la superficie de sustrato y/o el cebador para formar un enlace covalente entre estos componentes.

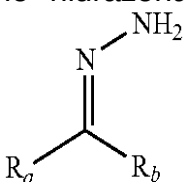
15 Como se usa en la presente, “heteroarilo” se refiere a un sistema de anillos o anillo aromático (es decir, dos o más anillos fusionados que comparten dos átomos adyacentes) que contiene uno o más heteroátomos, es decir, un elemento además de carbono, que incluye, pero no se limita a, nitrógeno, oxígeno y azufre, en la estructura principal de anillo. Cuando el heteroarilo es un
20 sistema de anillo, cada anillo en el sistema es aromático, el grupo heteroarilo puede tener 5-18 miembros de anillo,

Como se usa en la presente, “heterociclilo” significa un anillo cíclico no aromático o sistema de anillos que contiene al menos un heteroátomo en la estructura principal de anillo. Heterociclilos pueden unirse conjuntamente de una
25 forma fusionada, puenteada o espiro-conectada. Heterociclilos pueden tener

cualquier grado de saturación siempre que al menos un anillo en el sistema de anillos sea no aromático. En el sistema de anillos, los heteroátomos pueden estar presentes en cualquier anillo aromático o no aromático. El grupo heterociclilo puede tener 3 a 20 miembros de anillo (es decir, el número de átomos que conforman la estructura principal de anillo, que incluyen átomos de carbono y heteroátomos). El grupo heterociclilo se puede designar como “heterociclilo de 3-6 miembros” o designaciones similares. En algunos ejemplos, los heteroátomos son O, N, o S.

El término “hidrazina” o “hidrazinilo” como se usan en la presente se refiere a un grupo -NHNH_2 .

Como se usa en la presente, el término “hidrazona” o “hidrazonilo” como

se usa en la presente se refiere a un grupo  en el cual R_a y R_b se definen en la presente.

Como se usa en la presente, “hidroxi” o “hidroxilo” se refiere a un grupo -OH .

Como se usa en la presente, el término “región intersticial” se refiere a un área en un sustrato o sobre una superficie que separa depresiones. Por ejemplo, una región intersticial puede separar una característica de una matriz de otra característica de la matriz. Las dos características que se separan entre sí pueden ser discretas, es decir, que carecen de contacto físico entre sí. En otro ejemplo, una región intersticial puede separar una primera porción de una característica de una segunda porción de una característica. En muchos ejemplos, la región intersticial es continua mientras que las características son

discretas, por ejemplo, como es el caso para una pluralidad de concavidades definidas en una superficie de otra forma continua. La separación provista por una región intersticial puede ser separación parcial o completa. Las regiones intersticiales pueden tener un material superficial que difiere del material superficial de las características definidas en la superficie. Por ejemplo, las

5 características de una matriz pueden tener una cantidad o concentración de la capa de revestimiento y cebadores que excede la cantidad o concentración presente en las regiones intersticiales. En algunos ejemplos, la capa de revestimiento y cebadores pueden no estar presentes en las regiones

10 intersticiales.

“Óxido de nitrilo”, como se usa en la presente, significa un grupo “ $R_aC\equiv N^+O^-$ ” en el cual R_a se define en la presente. Ejemplos de preparación de óxido de nitrilo incluyen generación *in situ* de aldoximas por tratamiento con cloramida-T o a través de acción de base en cloruros de imidoilo [$RC(C1)=NOH$].

15 “Nitrona” como se usa en la presente, se refiere a un grupo $R_aR_bC\equiv NR_c^+O^-$ en el cual R_a y R_b se definen en la presente y R_c se selecciona de C1-6alquilo, C2-6alquenilo, C2-6alquinilo, C3-7carbociclilo, C6-10arilo, C10-6arilo, heteroarilo de 5-10 miembros, y heterociclilo de 5-10 miembros, como se define en la presente.

20 Como se usa en la presente, un “nucleótido” incluye una base heterocíclica que contiene nitrógeno, un azúcar, y uno o más grupos fosfato. Nucleótidos son unidades monoméricas de una secuencia de ácido nucleico. En ARN, el azúcar es una ribosa, y en ADN, el azúcar es una desoxirribosa, es decir un azúcar que carece de un grupo hidroxilo que está presente en la segunda

25 posición en ribosa. La base heterocíclica que contiene nitrógeno (es decir,

nucleobase) puede ser una base de purina o una base de pirimidina. Bases de purina incluyen adenina (A) y guanina (G), y derivados modificados o análogos de los mismos. Bases de pirimidina incluyen citosina (C), timina (T), y uracilo (U), y derivados modificados o análogos de los mismos. El C1-átomo de desoxirribosa se une a N-1 de una pirimidina o N-9 de una purina.

El término “procesamiento de obleas abiertas”, como se usa en la presente, se refiere a una serie de procesos secuenciales utilizados para modificar la superficie de una oblea de sustrato con producto químico superficial y revestimiento protector, antes de cualquier proceso de montaje (por ejemplo, unión).

El término “sustrato de celda de flujo”, o “sustrato” se refiere a un soporte sobre el cual se puede añadir el producto químico superficial. El término “sustrato moldeado” se refiere a un soporte sobre el cual o en el cual se definen depresiones. El término “sustrato no moldeado” se refiere a un soporte sustancialmente plano. El sustrato puede ser una oblea, un panel, una hoja rectangular, una pastilla, o cualquier otra configuración adecuada. El sustrato es generalmente rígido y es insoluble en un líquido acuoso. El sustrato puede ser inerte a un producto químico que se utiliza para modificar las depresiones. Por ejemplo, un sustrato puede ser inerte a producto químico utilizado para formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado, para formar el revestimiento protector, para unir los cebadores a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado, etc. Ejemplos de sustratos adecuados incluyen epoxisiloxano, materiales semiconductores complementarios de óxido metálico (CMOS), silsesquioxano (por ejemplo, silsesquioxanos poliédricos o materiales POSS), vidrio (tal como vidrio EAGLE XG^{MR} de Corning) y vidrio modificado o

funcionalizado, plástico (que incluyen acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, politetrafluoroetileno (tal como TEFLON^{MR} de Chemours), olefinas cíclicas/polímeros de cicloolefina (COP) (tal como ZEONOR^{MR} de Zeon),
5 poliimidas, etc.), nilón cerámicas/óxidos cerámicos, sílice, sílice fundida, o materiales a base de sílice, silicato de aluminio, silicio y silicio modificado (por ejemplo, silicio p+ dopado con boro), nitruro de silicio (Si_3N_4), óxido de silicio (SiO_2), pentóxido de tantalio (TaO_5) u otros óxidos de tantalio (TaO_x), óxido de hafnio (HfO_2), carbono, metales, vidrios inorgánicos, o similares. El sustrato
10 también puede ser vidrio o silicio, con una capa de revestimiento de óxido de tantalio u otro óxido cerámico en la superficie. El sustrato puede ser rígido o flexible.

Como se usa en la presente, “reducción a cenizas por plasma” se refiere a un proceso de remoción de materia orgánica de un sustrato por un plasma de
15 oxígeno. Los productos que resultan de la reducción a cenizas por plasma se pueden remover con un sistema/bomba de vacío. La reducción a cenizas por plasma puede activar el sustrato al introducir grupos hidroxilo reactivos. En algunos aspectos, los grupos ligadores entonces se pueden unir a los grupos hidroxilo.

20 Como se usa en la presente, el “cebador” se define como una secuencia individual de ácido nucleico trenzada (por ejemplo, ADN monocatenario o ARN monocatenario) que sirve como un punto de partida para síntesis de ADN o ARN. El 5' término del cebador se puede modificar para permitir reacción de acoplamiento con la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. En
25 algunos aspectos, el 5' término del cebador se modifica con un grupo alquino. La

longitud de cebador puede ser cualquier número de bases de largo y puede incluir una variedad de nucleótidos no naturales. En un ejemplo, el cebador de secuenciación es de hebra corta, que varía por ejemplo, de 20 a 40 bases. En algunos aspectos, el cebador se aplica al sustrato en una solución a una

5 concentración (llamada en la presente como “densidad de cebador”) de aproximadamente 5 a 50 μM , o aproximadamente 10 a 40 μM , o aproximadamente 15 a 30 μM . La “densidad de cebador” como se usa en la presente no es una medición de cebadores injertados sobre superficie, sino es una densidad inferida con base en la concentración de cebador en la mezcla de

10 injerto. En algunos aspectos, la densidad de cebador es de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 μM (cebadores injertados en la superficie utilizando una solución de cebador de 1-20 μM). En algunos aspectos, el cebador es una mezcla de cebador funcional (capaz de servir como un punto de partida para síntesis de oligonucleótidos) y un cebador no funcional. Cebadores no

15 funcionales son oligonucleótidos que no funcionan como cebadores, tal como secuencias de cebadores truncadas o secuencias cortas de oligonucleótidos marcadas con etiquetas detectables, opcionalmente escindibles. Los cebadores no funcionales permiten control independiente (separados) de la densidad de cebador/oligonucleótidos total así como la densidad de cebador funcional en el

20 sustrato injertado. En algunos aspectos, la densidad de cebador es 12 μM y cebador no funcional 6 μM (por ejemplo, un oligonucleótido con un trazador de control de calidad unido al mismo). En algunos aspectos, la densidad de cebador total es aproximadamente 18 μM . En algunos ejemplos, la densidad de cebador total es aproximadamente 22 μM . Cebador injertados pueden estar presentes

25 sobre la superficie de aproximadamente 10,000 a aproximadamente 50,000, o

aproximadamente 25,000 cebadores por micrómetro cuadrado.

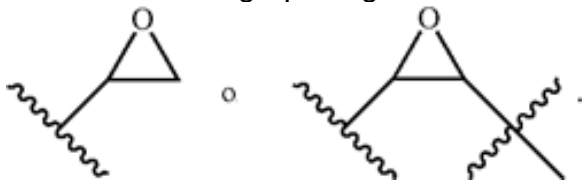
Como se usa en la presente, el término “revestimiento protector” se refiere a un material soluble en agua en la forma de un sólido (por ejemplo, una película delgada), un líquido, o un gel que se aplica sobre el producto químico superficial, por ejemplo en una depresión de un sustrato moldeado o sobre áreas de canal de flujo de un sustrato al menos sustancialmente plano (es decir, un sustrato no moldeado). El revestimiento protector puede ser cualquier material soluble en agua que no afecta de forma perjudicial el producto químico superficial subyacente o sustrato y que sirve para proteger y/o conservar la funcionalidad del producto químico superficial. Un revestimiento protector soluble en agua, por definición, es distinguible de un hidrogel, ya que el revestimiento protector se disuelve cuando se expone a agua, y se puede lavar de esta forma, en tanto que un hidrogel es insoluble en agua. Por ejemplo, el revestimiento protector puede hinchar la capa funcionalizada e impedir al menos sustancialmente que la capa se someta a cambios perjudiciales durante el procesamiento y/o envío y/o almacenamiento. Como otro ejemplo, el revestimiento protector puede conservar la capacidad de acceso del cebador e impide al menos sustancialmente degradación de la capa funcionalizada.

En tanto que se han proporcionado varios ejemplos, se va a entender que se pueden utilizar otros polímeros sintéticos no catiónicos, solubles en agua para formar el revestimiento protector, siempre y cuando el material seleccionado no afecte de forma perjudicial el producto químico superficial o sustrato subyacente. Además. También puede ser deseable seleccionar un material que pueda removerse fácilmente, que no interfiera con procesos posteriormente llevados a cabo (por ejemplo, unión de cebador, lavado, etc.), y/o no interfiera con técnicas

de secuenciación llevadas a cabo posteriormente. En un ejemplo, el revestimiento protector no es un material autofluorescente.

En un ejemplo, el grosor o profundidad del revestimiento protector soluble en agua es al menos aproximadamente 25 nm. En un ejemplo, el grosor o
 5 profundidad del revestimiento protector soluble en agua varía de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm. En otro ejemplo o profundidad del revestimiento protector soluble en agua varía de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 15 μm . en aún otro ejemplo el grosor o profundidad del revestimiento protector soluble en agua varía de
 10 aproximadamente 1.5 μm a aproximadamente 12 μm . El límite superior en el grosor puede depender, al menos en parte, de la arquitectura y dimensiones del canal de flujo y la celda de flujo que se forma. En un ejemplo, el extremo superior del grosor puede variar de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 15 μm .

Como se usa en la presente, los términos “silano” y “derivado de silano”
 15 se refieren a un compuesto orgánico o inorgánico que contiene uno o más átomos de silicio. Un ejemplo de un compuesto de silano inorgánico es SiH_4 , o SiH_4 halogenado donde el hidrogeno se reemplaza por uno o más átomos de halógeno. Un ejemplo de un compuesto de silano orgánico es $\text{X-R}^{\text{B}}\text{-Si(OR}^{\text{C}}\text{)}_3$, en donde X es un grupo orgánico no hidrolizable, tal como amino, vinilo, epoxi (



20), metacrilato, azufre, alquilo, alquenilo, alquinilo; R^{B} es un separador, por ejemplo $-(\text{CH}_2)_n-$, en donde n es 0 a 1000; R^{C} se selecciona de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, carbociclilo

opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido, y heterociclilo de 5-10 miembros opcionalmente sustituido, como se define en la presente. Como se usa en la presente, los términos “silano” y “derivados de silano” pueden incluir mezclas de
5 diferentes compuestos de silano y/o derivados de silano.

En algunos ejemplos, el silano o derivado de silano incluye una fracción insaturada que es capaz de reaccionar con un grupo funcional de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. Como se usa en la presente, el término “fracción insaturada” se refiere a un grupo químico que incluye cicloalquenos,
10 cicloalquinos, heterocicloalquenos, heterocicloalquinos, o variantes opcionalmente sustituidas de los mismos que incluyen al menos un enlace doble o un enlace triple. Las fracciones insaturadas pueden ser monovalentes o divalentes. Cuando la fracción insaturada es monovalente, se utiliza cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalqueno, y heterocicloalquino de forma
15 intercambiable con cicloalquenilos, cicloalquinilos, heterocicloalquenilos, y heterocicloalquinilos, respectivamente. Cuando la fracción insaturada es divalente, se utilizan cicloalqueno, cicloalquino, heterocicloalqueno, y heterocicloalquino de forma intercambiable con cicloalquenileno, cicloalquinileno, heterocicloalquenilileno, heterocicloalquinilileno,
20 respectivamente.

La fracción insaturada se puede unir de forma covalente ya sea directamente a los átomos de silicio del silano o derivado de silano, o indirectamente unido a través de ligadores. Ejemplos de ligadores adecuados incluyen alquilenos opcionalmente sustituidos (es decir, radicales alifáticos,
25 saturados, bivalentes (tal como etileno) considerados como que se obtienen de

un alqueno al abrir el enlace doble o de un alcano por la remoción de dos átomos de hidrógeno de diferentes átomos de carbono), polietilenglicoles sustituidos, o similares.

Una “capa separadora”, como se usa en la presente se refiere a un material que une dos componentes conjuntamente. En algunos ejemplos, la capa separadora puede ser un material absorbente de radiación que ayuda en la unión, o se puede poner en contacto con un material absorbente de radiación que ayuda en la unión.

El término “producto químico superficial”, como se usa en la presente se refiere a componentes químicamente y/o biológicamente activos que se incorporan en la cámara de la celda de flujo. Ejemplos de producto químico superficial descrito en la presente incluyen la capa de revestimiento de polímero funcionalizado unida a al menos una porción de una superficie del sustrato y/o los cebadores unidos a al menos una porción de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado.

Un grupo funcional “tiol” se refiere a $-SH$.

Como se usa en la presente, los términos “tetrazina” y “tratrazinilo” se refieren a un grupo heteroarilo de seis miembros que comprende cuatro átomos de nitrógeno. Tetrazina puede ser opcionalmente sustituida.

“Tetrazola”, como se usa en la presente, se refiere a un grupo heterocíclico de cinco miembros que incluye cuatro átomos de nitrógeno. Tetrazola puede ser opcionalmente sustituido.

Como se usa en la presente, el término “método YES” se refiere a un proceso de deposición de vapor químico desarrollado por Illumina, Inc., que utiliza la herramienta de deposición de vapor químico provista por Yield

Engineering Systems ("YES"). La herramienta incluye tres sistemas de deposición de vapor diferentes. El sistema de vapor de silano YES-VertaCoat automatizado se diseña para producción en volumen con un módulo de manejo de oblea flexible que puede alojar obleas de 200 mm o 300 mm. El sistema de vapor de silano YES-1124P de carga manual se diseña para producción en volumen versátil con sus cámaras de gran capacidad, configurables. Yes-LabKote es una versión de mesa de bajo costo que es ideal para estudios de viabilidad y para R&D.

Los aspectos y ejemplos expuestos en la presente y mencionados en las reivindicaciones se pueden entender en vista de las definiciones anteriores.

Ejemplos de la celda de flujo que incluyen el revestimiento protector y métodos para fabricar y utilizar los mismos ahora se describirán con referencia a las figuras.

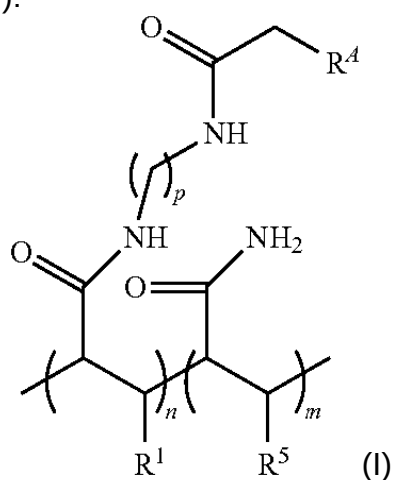
Un ejemplo del método 100 se representa en la figura 1. El método 100 incluye añadir producto químico superficial a una porción de un sustrato (como se muestra en el número de referencia 102), y aplicar un revestimiento protector soluble en agua al menos sobre el producto químico superficial (como se muestra en el número de referencia 104). En un ejemplo, el método 100 incluye añadir producto químico superficial a una porción de un sustrato de celda de flujo, en donde el producto químico superficial es un cebador de secuenciación, o una capa de revestimiento de polímero funcionalizado para unir el cebador de secuenciación, o el cebador de secuenciación y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado; y aplicar un revestimiento protector soluble en agua sobre al menos el producto químico superficial. Dos ejemplos del método 100 se muestran en la figura 2, como métodos 100' y 100''.

Los métodos 100', 100'' pueden implicar el sustrato moldeado, como se muestra en el número de referencia 101 en la figura 2, o un sustrato no moldeado. Otro ejemplo del método 100 que implica el sustrato no moldeado 12' se describe de forma adicional con referencia a las figuras 6A a 6E. El sustrato
5 moldeado puede ser una oblea moldeado o una pastilla moldeada o cualquiera de los otros sustratos moldeados descritos en la presente. Cualquier ejemplo del sustrato descrito en la presente se puede utilizar. El sustrato moldeado (como se muestra en el número de referencia 12 en la figura 3) incluye depresiones definidas sobre o en una superficie o capa expuesta del sustrato, y regiones
10 intersticiales que separan depresiones adyacentes. Las depresiones se pueden fabricar en o sobre el sustrato utilizando una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, fotolitografía, litografía de nanoimpresión, técnicas de estampado, técnicas de grabado, técnicas de moldeo, técnicas de micrograbado, técnicas de impresión, etc. Como se apreciará por aquellos expertos en la técnica, la técnica
15 utilizada dependerá de la composición y forma del sustrato. Muchos diseños diferentes de las depresiones se pueden prever, como se analiza más adelante con referencia a la figura 5A.

En tanto que no se muestra en la figura 2, antes de la adición del producto químico superficial, cada uno de los métodos 100', 100'' puede implicar exponer
20 el sustrato moldeado a un proceso de limpieza y/o a otro proceso que prepara la superficie (por ejemplo, depresiones y, en algunos casos, regiones intersticiales adyacentes) del sustrato moldeado para la deposición posterior del producto químico superficial. Ejemplos del proceso de limpieza y procesos de preparación superficial se analizan más adelante de forma adicional con referencia a las
25 figuras 4 y 5A a 5L.

En el método de ejemplo 100', el producto químico superficial puede ser tanto la capa de revestimiento de polímero funcionalizado como los cebadores, y se puede utilizar un solo revestimiento protector. En este ejemplo, la adición del producto químico superficial implica formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones (número de referencia 102') e injertar el cebador en la capa revestimiento de polímero funcionalizado (número de referencia 102''), y el revestimiento protector soluble en agua se forma después de que se injerta el cebador (número de referencia 104').

En el número de referencia 102' en el método 100', toma lugar la formación de capa de revestimiento de polímero funcionalizado. Un ejemplo de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado incluye una unidad recurrente de la fórmula (I):



en donde:

15 R^1 es H o alquilo opcionalmente sustituido;

R^A se selecciona del grupo que consiste de azido, amino opcionalmente sustituido, alqueno opcionalmente sustituido, hidrazona opcionalmente sustituida, hidrazina opcionalmente sustituida, carboxilo, hidroxilo, tetrazola opcionalmente sustituida, tetrazina opcionalmente sustituida, óxido de nitrilo,

nitrona, tiol;

R^5 se selecciona del grupo que consiste de H y alquilo opcionalmente sustituido; y cada uno del $-(CH_2)_p-$ puede ser opcionalmente sustituido;

p es un entero en el intervalo de 1 a 50;

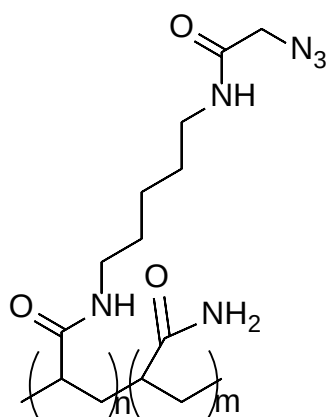
5 n es un entero en el intervalo de 1 a 50,000; y

m es un entero en el intervalo de 1 a 100,000.

En la estructura de la fórmula (I), una persona experta en la técnica entenderá que la subunidades "n" y "m" son subunidades recurrentes que están presentes en un orden aleatorio a lo largo del polímero.

10 Un ejemplo particular de una capa de revestimiento de polímero funcionalizado es poli(N-(5-azidoacetamidilpentil) acrilamida-co-acrilamida), PAZAM (ver, por ejemplo, publicaciones de patentes de los Estados Unidos números 2014/0079923 A1, o 2015/0005447 A1, cada una de las se incorpora en la presente como referencia en su totalidad), que comprende la estructura

15 mostrada más adelante:



en donde n es un entero en el intervalo de 1-20,000, y m es un entero en el intervalo de 1-100,000. Como con la fórmula (I), una persona experta en la técnica reconocerá que las subunidades "n" y "m" son unidades recurrentes que

están presentes en orden aleatorio a lo largo de la estructura de polímero.

El peso molecular de la fórmula (I) o polímero PAZAM puede variar de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 1500 kDa, o puede ser, en un ejemplo específico, aproximadamente 312 kDa.

5 En algunos ejemplos, la fórmula (I) o polímero PAZAM es un polímero lineal. En algunos otros ejemplos, la fórmula (I) o polímero PAZAM es un polímero ligeramente reticulado. En otros ejemplos, la fórmula (I) o polímero PAZAM comprende ramificación.

10 Otros ejemplos de materiales de polímero adecuados incluyen aquellos que tienen una estructura coloidal, tal como agarosa; o una estructura de malla de polímero, tal como gelatina; o una estructura de polímero reticulada, tal como polímeros de poliacrilamida y copolímeros, acrilamida libre de silano (SFA, ver, por ejemplo, publicación de patente de los Estados Unidos No. 2011/0059865, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad), o una versión
15 acidolizada de SFA. Ejemplos de polímeros de poliacrilamida adecuados se pueden formar de acrilamida y un ácido acrílico o un ácido acrílico que contiene un grupo vinilo como se describe, por ejemplo, en WO 2000/031148 (incorporada en la presente como referencia en su totalidad) o de monómeros que forman reacciones de fotocicloaddición [2+2], por ejemplo, como se describe en WO
20 2001/001143 o WO 2003/0014392 (cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Otros polímeros adecuados son copolímeros de SFA y SFA derivatizada con un grupo bromo-acetamida (por ejemplo, BRAPA), o copolímeros de SFA y SFA derivatizada con un grupo acido-acetamida.

25 Se va a entender que se pueden utilizar otras moléculas funcionalizadas

para formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado, siempre y cuando se funcionalicen para interactuar con el sustrato moldeado y los cebadores posteriormente aplicados. Otros ejemplos de moléculas adecuadas para formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado incluyen

5 aquellos que tienen una estructura coloidal, tal como agarosa o una estructura de malla de polímero, tal como gelatina; o una estructura de polímero reticulada, tal como polímeros de poliacrilamida o copolímeros, acrilamida libre de silano (SFA), o una versión azidolizada de SFA. Ejemplos de polímeros de poliacrilamida adecuados se pueden sintetizar de acrilamida y un ácido acrílico

10 o un ácido acrílico que contiene un grupo vinilo, o de monómeros que forman reacciones de foto-cicloadición [2+2].

La molécula de polímero funcionalizado (por ejemplo, PAZAM) se puede depositar sobre la superficie del sustrato moldeado utilizando revestimiento por centrifugación, o revestimiento por inmersión, o flujo de la molécula

15 funcionalizada bajo presión positiva o negativa, u otras técnicas adecuadas. La molécula funcionalizada puede estar presente en una solución. En un ejemplo, la solución incluye PAZAM en una mezcla de etanol y agua. En algunos ejemplos, la molécula de polímero funcionalizada se aplica al sustrato antes de completar la polimerización y la polimerización para formar el revestimiento se

20 realiza sobre la superficie de sustrato.

Después de revestirse, la molécula funcionalizada también se puede exponer a un proceso de curado para formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado a través del sustrato moldeado completo (es decir, sobre depresiones y regiones intersticiales). En un ejemplo, el curado de la molécula

25 funcionalizada puede tomar lugar a una temperatura que varía de temperatura

ambiente (por ejemplo, aproximadamente 25°C) a aproximadamente 60°C durante un tiempo que varía de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 2 horas. En algunos casos, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado se cura antes de la aplicación del revestimiento protector.

5 Para formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones y no en las regiones intersticiales del sustrato moldeado, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado se puede pulir de las regiones intersticiales utilizando i) una suspensión espesa básica, acuosa que tiene un pH que varía de aproximadamente 7.5 a aproximadamente 11 y que incluye una
10 partícula abrasiva o ii) una almohadilla de pulido y una solución libre de la partícula abrasiva.

 En este ejemplo del método 100', el cebador entonces se injerta en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado que permanece en las depresiones, como se muestra como unión de cebador en el número de
15 referencia 102". Ejemplos de cebadores adecuados incluyen cebadores directos de amplificación o cebadores inversos de amplificación. Ejemplos específicos de cebadores adecuados incluyen cebadores P5 o P7, que se utilizan sobre la superficie de celdas de flujo comerciales vendidas por Illumina Inc. para secuenciación en HiSeq^{MR}, HiSeqX^{MR}, MiSeq^{MR}, MiSeqX^{MR}, NextSeq^{MR},
20 NovaSeq^{MR}, Genome Analyzer^{MR}, y otras plataformas de instrumentos.

 El injerto se puede lograr por revestimiento por remojo, revestimiento por rociamiento, dispensación de depósito, o por otro método adecuado que unirá los cebadores a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en al menos algunas de las depresiones. Cada una de estas técnicas de ejemplo puede
25 utilizar una solución o mezcla de cebador, que puede incluir los cebadores, agua,

una solución amortiguadora, y un catalizador.

El revestimiento por remojo puede implicar sumergir el sustrato moldeado (que tiene la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones de la misma) en una serie de baños de temperatura controlada. Los
5 baños también pueden ser de flujo controlado y/o cubrir con una manta de nitrógeno. Los baños pueden incluir la solución o mezcla de cebador. A lo largo de los diferentes baños, los cebadores se unirán a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en al menos algunas de las depresiones. En un ejemplo, el sustrato moldeado revestido y pulido se introducirá en un primer baño que
10 incluye la solución o mezcla de cebador donde toma lugar una reacción para unir los cebadores, y entonces el sustrato moldeado se puede mover a baños adicionales para lavado. El sustrato moldeado se puede mover de baño a baño con un brazo robótico o de forma manual. También se puede utilizar un sistema de secado en revestimiento por remojo.

15 El revestimiento por rociamiento se puede lograr al rociar la solución o mezcla de cebador directamente en el sustrato moldeado revestido y pulido. La oblea revestida por rociamiento se puede incubar durante un tiempo que varía de a aproximadamente 4 minutos a aproximadamente 60 minutos a una temperatura que varía de aproximadamente 0°C a aproximadamente 70°C.
20 Después de la incubación, la solución o mezcla de cebador se puede diluir y remover utilizando, por ejemplo, un revestidor por centrifugación.

La dispensación de depósito se puede llevar a cabo de acuerdo con un método de agrupación y escisión, y por lo tanto se puede lograr con un revestidor de centrifugación. La solución o mezcla de cebador se puede aplicar (de forma
25 manual o a través de un proceso automatizado) al sustrato moldeado revestido

y pulido. La solución o mezcla de cebador aplicada se puede aplicar a o esparcir a través de la superficie completa del sustrato moldeado revestido y pulido. El sustrato moldeado revestido y pulido se puede incubar durante un tiempo que varía de aproximadamente 2 minutos a aproximadamente 60 minutos a una temperatura que varía de aproximadamente 0°C a aproximadamente 80°C. Después de la incubación, la solución o mezcla de cebador se puede diluir y remover utilizando, por ejemplo, el revestidor de centrifugación.

En un ejemplo, después de que se injerta el cebador en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones, este ejemplo del método 100' incluye además aplicar el revestimiento protector soluble en agua sobre el producto químico superficial y sobre al menos una porción del sustrato (como se muestra como formación de revestimiento protector en el número de referencia 104'). En otro ejemplo, la solución o mezcla de cebador puede incluir un material formador de película, soluble en agua que forma el revestimiento protector, y por lo tanto pueden tomar lugar el injerto de cebador y formación de revestimiento protector de forma simultánea.

Cuando son procesos separados el injerto de cebador y formación de revestimiento protector, el revestimiento protector soluble en agua se puede depositar de forma selectiva, o moldear, de tal forma que el producto químico superficial (en este ejemplo la capa de revestimiento funcionalizado y los cebadores sobre la misma) se cubre y de tal forma que una región de unión del sustrato moldeado permanece expuesta. La región de unión del sustrato moldeado está ubicada en general sobre algunas de las regiones intersticiales del sustrato moldeado donde se unirá una tapa al sustrato moldeado. Cuando el sustrato moldeado es una oblea, la región de unión puede definir los límites de

varias celdas de flujo que se forman desde la oblea. Cuando el sustrato moldeado es una pastilla, la región de unión puede definir los límites externos de una celda de flujo que se forma. Se va a entender que otras porciones del sustrato moldeado que no son parte de la región de unión se pueden revestir con el revestimiento protector soluble en agua.

En este ejemplo del método 100', la deposición y moldeado selectivos del revestimiento protector soluble en agua se pueden lograr a través de revestimiento por inmersión, revestimiento por centrifugación, revestimiento por rociamiento, revestimiento por rociamiento ultrasónico, revestimiento por cuchilla raspadora, impresión en aerosol, o impresión de inyección de tinta. Se puede utilizar una máscara para cubrir la región de unión del sustrato moldeado de tal forma que el revestimiento protector soluble en agua no se aplica sobre la región de unión.

Cada una de las técnicas de moldeado o deposición selectivas para el revestimiento protector soluble en agua pueden utilizar una solución acuosa, que puede incluir el agua y hasta aproximadamente 15% (masa a volumen) de un material soluble en agua. En algunos ejemplos, el material soluble en agua conforma 15% o menos de la solución acuosa. En otros ejemplos, la solución acuosa incluye de aproximadamente 2% a aproximadamente 13% del material soluble en agua, o de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 10% del material soluble en agua. Se va a entender que la concentración de la solución acuosa puede variar dependiendo de la arquitectura de celda de flujo (por ejemplo, las dimensiones del canal de flujo, orificios de entrada y salida, etc.). Por ejemplo, cuando se utiliza deposición de flujo pasante, se puede seleccionar la concentración de tal forma que la solución acuosa puede fluir a través de la

celda de flujo sin obstruir los orificios, canal de flujo, etc. Como tal, la concentración también puede ser mayor que aproximadamente 15%. Para obtener un grosor deseable, el límite inferior de la concentración puede ser aproximadamente 2% en peso (masa a volumen). El material soluble en agua (y el revestimiento protector resultante), en este ejemplo del método 100' puede ser cualquiera de los ejemplos descritos en la presente (es decir, un polímero sintético no catiónico, soluble en agua; un polisacárido natural soluble en agua o un derivado del mismo; una proteína natural soluble en agua o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de molécula pequeña soluble en agua seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, un azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora, un glicol; o una ciclodextrina). En un ejemplo, el material soluble en agua puede ser un copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol (un ejemplo de este está comercialmente disponible como KOLLICOAT^{MR} IR, disponible de BASF Corp.), sacarosa, dextrano, poliacrilamida, polietilenglicol, sal disódica de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), tris(hidroximetil)aminometano con ácido etilendiaminotetraacético, (tris(2-carboxietil)fosfina), tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina, sal disódica del ácido batofenantrolinadisulfónico, o un citrato de sodio salino.

La solución acuosa también puede incluir aditivos, tal como co-solventes solubles en agua, antioxidantes, tintes, estabilizadores de luz ultravioleta, adyuvantes de procesamiento, o similares. Estos aditivos pueden estar incluidos en la solución acuosa en cantidades que no afectan de forma perjudicial la fluidez o la solución de la capacidad de formación de película del material formador de película, soluble en agua. Por ejemplo, puede estar presente un co-solvente, tal

como etanol, opcionalmente en una cantidad que varía de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%, o de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 7.5%. En otro ejemplo, la solución acuosa puede incluir aproximadamente 5% del material soluble en agua, a aproximadamente 5% del co-solvente, y un equilibrio (aproximadamente 90%) de agua. En otros ejemplos, la solución acuosa puede incluir aproximadamente 5 a aproximadamente 7.5% del material soluble en agua, y aproximadamente 5 a aproximadamente 10% de co-solvente, con el equilibrio de agua (por ejemplo, 7.5% p/v de KOLLICOAT^{MR} IR en etanol acuoso al 10%).

Después de que se aplica la solución acuosa, se puede secar para formar el revestimiento protector soluble en agua en forma de sólido o gel. El secado se puede lograr a través de exposición de aire, exposición de nitrógeno, vacío, calentamiento (por ejemplo, en un horno), o revestimiento por centrifugación (es decir, girar hasta secar).

Algunos ejemplos del revestimiento protector pueden permanecer en forma líquida, tal como cloruro de sodio-citrato de sodio (SSC). La forma líquida del revestimiento protector constituye almacenamiento en húmedo debido a que la solución puede al menos rellenar sustancialmente un canal de flujo y cubrir el producto químico superficial. La forma líquida del revestimiento protector se puede utilizar, por ejemplo, cuando el canal de flujo se forma antes de la aplicación de revestimiento protector (por ejemplo, en el paso 104''' en la figura 2 o en las figuras 6A-6E), de tal forma que el líquido puede estar contenido en la misma. En un ejemplo, se aplica SSC como NaCl 0.75M, mezcla de citrato de sodio 0.075 M.

Este ejemplo del método 100' entonces incluye montaje, como se muestra

en el número de referencia 106. El revestimiento protector protege el producto químico superficial durante cualquier proceso de montaje. En un ejemplo, el montaje implica unir una tapa a la región de unión del sustrato moldeado para formar un canal de flujo que está en comunicación de fluidos selectiva con las
5 depresiones, cuando el sustrato moldeado es una oblea, diferentes áreas de la tapa pueden definir al menos parcialmente canales de flujo respectivos, que se forman utilizando la oblea. Cuando el sustrato moldeado es una pastilla, la tapa puede definir el uno o más canales de flujo que se forman.

La tapa puede ser cualquier material que es transparente a una luz de
10 excitación que se dirige hacia el producto químico superficial en las depresiones. Como ejemplos, la tapa puede ser vidrio (por ejemplo, borosilicato, sílice fundida, etc.), plástico, o similares. Un ejemplo comercialmente disponible de un vidrio de borosilicato adecuado es D 263^{MR}, disponible de Schott North America, Inc. Ejemplos comercialmente disponibles de materiales plásticos adecuados, es
15 decir polímeros de cicloolefina, son los productos ZEONOR^{MR} disponibles de Zeon Chemicals L.P.

En algunos ejemplos, la tapa se puede formar integralmente con paredes laterales que corresponden con la forma de región de unión, y que se unirán a la región de unión. Por ejemplo, un rebaje se puede grabar en un bloque
20 transparente para formar una porción sustancialmente plana y paredes laterales que se extienden de la porción sustancialmente plana. Cuando el bloque grabado se monta en la región de unión del sustrato moldeado, el rebaje puede volverse el canal de flujo.

En otros ejemplos, las paredes laterales y la tapa pueden ser
25 componentes separados que se acoplan entre sí. Por ejemplo, la tapa puede ser

un bloque sustancialmente rectangular que tiene una superficie exterior al menos sustancialmente plana y superficie interior al menos sustancialmente plana que definen una porción (por ejemplo, una porción superior) del canal de flujo (una vez unidas al sustrato moldeado). El bloque se puede montar en (por ejemplo, 5 unir a) las paredes laterales, que se unen a la región de unión del sustrato moldeado y forman paredes laterales del canal de flujo. En este ejemplo, las paredes laterales pueden incluir cualquiera de los materiales expuestos en la presente para la capa separadora (descrita más adelante).

La tapa se puede unir a la región de unión del sustrato moldeado 10 utilizando cualquier técnica adecuada, tal como unión laser, unión por difusión, unión anódica, unión eutéctica, unión por activación de plasma, unión de fritada de vidrio u otros métodos conocidos en la técnica. En un ejemplo, la capa separadora se puede utilizar para unir la tapa a la región de unión del sustrato moldeado. La capa separada puede ser cualquier material que sellará al menos 15 algunas de las regiones intersticiales (por ejemplo, la región de unión) del sustrato moldeado y la tapa conjuntamente.

En un ejemplo, la capa separadora puede ser un material absorbente de radiación que absorbe radiación en una longitud de onda que se transmite por la tapa y/o el sustrato moldeado. La energía absorbida, a su vez, forma la unión 20 entre la capa separadora y la tapa y entre la capa separadora y el sustrato moldeado. Un ejemplo de este material absorbente de radiación es KAPTON^{MR} negro (poliimida que contiene negro carbón) de DuPont (EEUUA), que absorbe a aproximadamente 1064 nm. Se va a entender que la poliimida se puede utilizar sin la adición de negro carbón, excepto que la longitud de onda tendría que 25 modificarse a una que se absorba significativamente por el material de poliimida

natural (por ejemplo, 480 nm). Como otro ejemplo, se puede unir poliimida CEN JP cuando se irradia con luz a 532 nm. Cuando la capa separadora es el material absorbente de radiación, la capa separadora se puede colocar en una interfaz entre la tapa y el sustrato moldeado de tal forma que la capa separadora está en
5 contacto con la región de unión deseada. Se puede aplicar compresión (por ejemplo, aproximadamente 100 PSI (6.89 Pa) de presión) en tanto que se aplica energía láser a una longitud de onda adecuada a la interfaz (es decir, se irradia el material absorbente de radiación). La energía láser se puede aplicar a la interfaz tanto de la parte superior como de la parte inferior a fin de lograr unión
10 adecuada.

En otro ejemplo, la capa separadora puede incluir un material absorbente de radiación en contacto con la misma. el material absorbente de radiación se puede aplicar en la interfaz entre la capa separadora y la tapa así como en la interfaz entre la capa separadora y el sustrato moldeado. Como un ejemplo, la
15 capa separadora puede ser poliimida y el material absorbente de radiación, separado puede ser negro carbón. En este ejemplo, el material absorbente de radiación, separado absorbe la energía láser que forma las uniones entre la capa separadora y la tapa y entre la capa separadora y el sustrato moldeado. En este ejemplo, se puede aplicar compresión en las interfaces respectivas en tanto que
20 se aplica energía láser a una longitud de onda adecuada a las interfaces (es decir, se irradia el material absorbente de radiación).

Cuando el sustrato moldeado es una oblea, la capa separadora y paredes laterales (de o conectadas a la tapa) pueden separar físicamente un canal de flujo de un canal de flujo adyacente y pueden colocarse en la periferia de las
25 obleas. Cuando el sustrato moldeado es una pastilla y la celda de flujo que se

forma es para incluir un canal o pista de flujo individual, la capa separadora y paredes laterales (de o conectadas a la tapa) se pueden colocar en la periferia de la pastilla para definir el canal de flujo y sellar la celda de flujo. Cuando el sustrato moldeado es una pastilla y la celda de flujo que se forma es para incluir

5 múltiples canales de flujo asilados (por ejemplo, ocho canales de flujo o cuatro pistas de flujo), la capa separadora y paredes laterales (de o conectadas a la tapa) pueden separar físicamente un canal/pista de flujo de un canal/pista de flujo adyacente y se pueden colocar en la periferia de la pastilla. Se va a entender, sin embargo, que la capa separadora y paredes laterales se pueden

10 colocar en cualquier región deseada dependiendo de la implementación.

Cuando el sustrato moldeado es una pastilla, el montaje 106 del método 100' implica la unión de la tapa, que forma la celda de flujo. Cuando el sustrato moldeado es una oblea, el montaje 106 del método 100' puede implicar procesamiento adicional, tal como troceo. En un ejemplo, la tapa se puede unir

15 a la oblea moldeada y el troceo forma celdas de flujo individuales. Como se menciona en la presente, sobre una oblea, las paredes laterales pueden separar físicamente un canal de flujo de un canal de flujo adyacente, y por lo tanto el troceo puede tomar lugar a través de al menos algunas de las paredes laterales, de tal forma que cada celda de flujo individual incluye un número deseado de

20 canales de flujo, cada uno de los cuales tiene una porción de la pared lateral original que circunda su periferia. En otro ejemplo, la oblea moldeada se puede trocear para formar pastillas sin tapa, que puede tener tapas respectivas unidas a las mismas para formar celdas de flujo individuales.

En un ejemplo, después del montaje 106, se forman una o más celdas de

25 flujo.

Con referencia ahora al método de ejemplo 100'' en la figura 2, el producto químico superficial puede ser tanto la capa de revestimiento de polímero funcionalizado como los cebadores, y se pueden utilizar dos revestimientos protectores diferentes. Como el método 100', la adición del producto químico superficial durante el método 100'' implica formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones (número de referencia 102') y el injerto del cebador en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado (número de referencia 102'''). Sin embargo, a diferencia del método 100', durante el método 100'' se forma un revestimiento protector soluble en agua, inicial después de que se forma la capa de revestimiento de polímero funcionalizado (número de referencia 104'') y se forma otro revestimiento protector soluble en agua después de que se injerta el cebador (número de referencia 104''').

En el número de referencia 102' y 104'' en el método 100'', la adición del producto químico superficial implica formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en la depresión (102'), y se forma el revestimiento protector soluble en agua, inicial después de que se forma la capa de revestimiento de polímero funcionalizado (104''). Se va a entender que los materiales y métodos para formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado como se describe en la presente también se pueden utilizar en el método 100''. En un ejemplo, puede ser deseable depositar el revestimiento protector soluble en agua, inicial dentro de aproximadamente 5 horas del pulido de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. Este periodo de tiempo puede disminuir la tasa de decaimiento superficial de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y también puede proporcionar una ventana de procesamiento térmico más grande.

El revestimiento protector soluble en agua, inicial se puede depositar de forma selectiva, o moldear, de tal forma que el producto químico superficial (en este ejemplo, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado) se cubre y de tal forma que una región de unión del sustrato moldeado permanece expuesta.

- 5 La región de unión está ubicada en general sobre algunas de las regiones intersticiales del sustrato moldeado donde se unirá una tapa al sustrato moldeado.

La deposición o moldeado selectivos del revestimiento protector soluble en agua se pueden lograr a través de revestimiento por inmersión, revestimiento por rociamiento, revestimiento por centrifugación, revestimiento por rociamiento, revestimiento por rociamiento ultrasónico, revestimiento por cuchilla raspadora, impresión en aerosol, o impresión de inyección de tinta. Como se menciona anteriormente, se puede utilizar una máscara para cubrir la región de unión del sustrato moldeado de tal forma que no sea aplica el revestimiento protector, soluble en agua, inicial sobre la región de unión.

10

15

Cada una de las técnicas de moldeado o deposición selectivas, de ejemplo para el revestimiento protector soluble en agua, inicial pueden utilizar una solución acuosa, que puede incluir el agua y hasta aproximadamente 15% (masa en volumen) del material soluble en agua. Como se menciona en la presente, la concentración de la solución acuosa puede variar dependiendo de la arquitectura de celda de flujo (por ejemplo, las dimensiones del canal de flujo, orificios de entrada y salida, etc.), y por lo tanto puede ser mayor que 15% o menor que 15%. Para obtener un grosor deseable, el límite inferior de la concentración puede ser aproximadamente 2% en peso (masa a volumen). El material soluble en agua (y el revestimiento protector resultante), en este ejemplo

20

25

del método 100'', puede ser el copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol, sacarosa, poliacrilamida, o polietilenglicol. En este ejemplo, la solución acuosa también puede incluir aditivos, tal como antioxidantes, tintes, estabilizadores de luz ultravioleta, adyuvantes de procesamiento, o similares.

Como se muestra en el número de referencia 106', el método 100'' implica montaje de la celada de flujo después de que se forma el revestimiento protector inicial. En este ejemplo, el revestimiento protector inicial protege la capa de revestimiento de polímero funcionalizado durante cualquier proceso de montaje.

10 Cuando el sustrato moldeado es una oblea, el montaje implica la unión de una tapa a la región de unión para formar canales de flujo respectivos que están en comunicación de fluidos selectiva con conjuntos respectivos de las depresiones, y entonces trocear la tapa unida y sustrato para formar celdas de flujo respectivas. Cuando el sustrato moldeado es una pastilla, el montaje implica unir

15 una tapa a la región de unión para formar una celda de flujo individual con uno o más canales de flujo. Los procesos de unión y/o troceo se pueden llevar a cabo como se describe en la presente.

Después del montaje 106' (es decir, unión, o unión y troceo), se forman una o más celdas de flujo. El método 100' entonces implica remover el

20 revestimiento protector soluble en agua, inicial, exponiendo así la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y la al menos la porción del sustrato moldeado (número de referencia 108, como se muestra en remoción IPC); injertar un cebador a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado (número de referencia 102''', mostrado como unión de cebador); y formar un

25 segundo revestimiento protector soluble en agua sobre el cebador, la capa de

revestimiento de polímero funcionalizado y la al menos la porción del sustrato moldeado (número de referencia 104''', mostrado como formación de revestimiento protector).

Los procesos 108, 102''', y 104''' pueden tomar lugar en cada una de, o
5 cualquiera de una o más de las celdas de flujo formadas como resultado del montaje 106'.

Debido a que el revestimiento protector inicial es soluble en agua, su remoción puede implicar un proceso de disolución. Se puede introducir agua y una solución amortiguadora, o agua, o una solución amortiguadora, acuosa a los
10 canales de flujo de las celdas de flujo a través de orificios de entrada respectivos formados en la tapa o el sustrato moldeado, se pueden mantener en los canales de flujo durante un tiempo suficiente para disolver el revestimiento protector inicial, y entonces se pueden remover de orificios de salida respectivos formados en la tapa o el sustrato moldeado. Como tal, la disolución se puede llevar a cabo
15 como un proceso de flujo pasante. Cuando se disuelve el revestimiento protector, la solución que se forma tendrá una concentración del material soluble en agua que es relativamente baja (en algunos casos, por ejemplo, aproximadamente 15% o menos, masa a volumen), que permite que los canales de flujo y orificios permanezcan destapados. Tras la disolución del revestimiento protector inicial y
20 la remoción de la solución de las celdas de flujo, se expone la capa de revestimiento de polímero funcionalizado y cualquiera del sustrato moldeado que se ha revestido por el revestimiento protector inicial.

En este ejemplo del método 100'', el cebador entonces se injerta en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones, como se
25 representa por el número de referencia 102'''. Cualquiera de los cebadores

descritos en la presente se puede utilizar. En este ejemplo del método 100'', el injerto se puede lograr por un proceso de flujo pasante. En el proceso de flujo pasante, la solución o mezcla de cebador descritos en la presente se pueden introducir en los canales de flujo de las celdas de flujo a través de orificios de entrada respectivos, se pueden mantener en los canales de flujo durante un tiempo suficiente (es decir, un periodo de incubación) para el cebador para que el cebador se una a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en una o más de las depresiones, y entonces se puede remover de orificios de salida respectivos. Después de la unión de cebador, se pueden dirigir los fluidos adicionales a través de los canales de flujo para lavar las depresiones ahora funcionalizadas y los canales de flujo.

En un ejemplo, después de que se injerta el cebador a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones, este ejemplo del método 100'' incluye además formar el (segundo) revestimiento protector soluble en agua sobre el producto químico superficial (en este ejemplo, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado que tiene los cebadores unidos a la misma) y sobre al menos una porción del sustrato moldeado (número de referencia 104'').

En este método de ejemplo 100'', se puede depositar el (segundo) revestimiento protector soluble en agua por un proceso de flujo pasante. En el proceso de flujo pasante, la solución acuosa (que incluye agua y, en algunos casos, hasta aproximadamente 15% (masa a volumen) del material soluble en agua) se puede introducir en los canales de flujo de las celdas de flujo a través de orificios de entrada respectivos y se pueden mantener en los canales de flujo. Se puede introducir suficiente solución acuosa para cubrir el producto químico

superficial y cualquier superficie expuesta del sustrato moldeado dentro del canal de flujo. En tanto que la solución está en los canales de flujo, las celdas de flujo se pueden exponer a un proceso de secado donde se puede descargar aire, nitrógeno, o vacío a través del orificio de entrada durante una cantidad

5 establecida de tiempo para secar el (segundo) revestimiento protector soluble en agua sobre el producto químico superficial y cualquier porción expuesta del sustrato. En otro ejemplo, el proceso de secado puede no llevarse a cabo, y se puede formar un revestimiento protector líquido en el canal de flujo de celda de flujo.

10 En este método de ejemplo 100", el (segundo) revestimiento protector soluble en agua puede ser cualquiera de los ejemplos descritos en la presente (es decir, un polímero sintético no catiónico, soluble en agua; un polisacárido natural soluble en agua o un derivado del mismo; una proteína natural soluble en agua o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de

15 molécula pequeña soluble en agua seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, un azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora, un glicol; o una ciclodextrina) En un ejemplo, el material soluble en agua puede ser el copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol (por ejemplo, KOLLICOAT^{MR} IR, disponible de BASF

20 Corp.), sacarosa, dextrano, poliacrilamida, glicoles, sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético, tris(hidroximetil)aminometano con ácido etilendiaminotetraacético, (tris(2-carboxietil)fosfina), tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina, sal disódica del ácido batofenantrolinadisulfónico, polímeros de hidroxilo funcionales, glicerol, o citrato

25 de sodio salino.

En otro ejemplo, el injerto de cebador y (segundo) revestimiento protector soluble en agua sobre el producto químico superficial 20, 22 pueden presentarse de forma simultánea a través de un proceso de flujo pasante. En este ejemplo, una solución individual incluye el cebador y el material soluble en agua.

5 En un ejemplo, después de la formación de revestimiento protector 104''', se forman una o más celdas de flujo.

Un ejemplo de la celda de flujo 10 formada por el método 100' o 100'' se muestra en la figura 3. La celda de flujo 10 incluye el sustrato moldeado 12, que puede ser una pastilla que se ha expuesto a los procesos del método 100' o
10 100'', o una oblea que sea ha expuesto a los procesos del método 100 o 100'' y se ha troceado como una parte del montaje 106 o 106'.

En general, el sustrato moldeado 12 incluye depresiones 14 separadas por regiones intersticiales 16, y producto químico superficial 20, 22 colocado en las depresiones 14. El producto químico superficial incluye la capa de
15 revestimiento de polímero funcionalizado 20 y los cebadores 22. En tanto que no se muestra, se va a entender que las depresiones 14 también pueden tener producto químico de preparación superficial (por ejemplo, silano o un derivado de silano) colocado entre el sustrato 12 y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado. Este mismo producto químico de preparación superficial también
20 se puede colocar sobre las regiones intersticiales 16.

La celda de flujo 10 también incluye la tapa 26 unida a las regiones de unión 25 del sustrato moldeado 12, en donde la tapa 26 define al menos parcialmente un canal de flujo 30A, 30B, etc., que está en comunicación selectiva con las depresiones 14. En el ejemplo mostrado en la figura 3, la tapa 26 incluye
25 una porción superior 27 que se conecta a varias paredes laterales 29, y estos

componentes 27, 29 definen una porción de cada uno de los seis canales de flujo 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F. Las paredes laterales respectivas 29 aíslan un canal de flujo 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F de canales de flujo adyacentes 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F, cada canal de flujo 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F está en comunicación de fluidos selectiva con un conjunto respectivo de las depresiones 14.

En tanto que no se muestra, la tapa 26 o el sustrato moldeado 12 pueden incluir orificios de entrada y salida que se acoplan de forma fluida a otros orificios (no mostrados) para dirigir fluidos a los canales de flujo respectivos 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F (por ejemplo, de un cartucho de reactivo u otro sistema de almacenamiento de fluido) y fuera del canal de flujo (por ejemplo, a un sistema de remoción de desecho).

El revestimiento protector, soluble en agua 24 cubre el producto químico superficial 20, 22 en las depresiones 14, y al menos una porción del sustrato moldeado 12 (por ejemplo, aquellas regiones intersticiales 16 que tampoco son regiones de unión 25). En la celda de flujo de ejemplo 10, el revestimiento protector 24 se ha formado por el proceso mostrado en el número de referencia 104' en el método 100' o el proceso mostrado en el número de referencia 104''' en el método 100''. Como tal, el revestimiento protector 24 puede ser cualquiera de los ejemplos descritos en la presente (es decir, un polímero sintético no catiónico, soluble en agua; un polisacárido natural soluble en agua o un derivado del mismo; una proteína natural soluble en agua o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de molécula pequeña soluble en agua seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, un azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora, un glicol;

o una ciclodextrina).

La celda de flujo 10 se puede enviar, almacenar, etc., con el revestimiento protector 24 en su lugar. Cuando es deseable utilizar la celda de flujo 10 en una aplicación (por ejemplo, una operación de secuenciación), el revestimiento protector se puede remover al menos parcialmente a través del proceso de disolución descrito con referencia al número de referencia 108. La remoción puede tomar lugar como parte de una operación de secuenciación. De forma alternativa, la remoción puede no tomar lugar a fin de que proceda la secuenciación.

10 La celda de flujo 10 mostrada en la figura 3 se puede formar utilizando un sustrato no moldeado en lugar de un sustrato moldeado. Con un sustrato no moldeado, una superficie continua incluiría el mismo producto químico superficial 20, 22 que se encuentra en las concavidades 14' de la figura 3. Se muestra un ejemplo y se describe de forma adicional con referencia a las figuras 6A a 6E.

15 Otro ejemplo del método 200 se representa en la figura 4. Este ejemplo del método 200 es una variación del método 100, y describe en detalle algunos de los otros procesos que pueden estar implicados, tal como procesos que preparan la superficie (es decir, depresiones 14 y, en algunos casos, regiones intersticiales adyacentes 16) del sustrato moldeado 12 para la deposición posterior del producto químico superficial 20, 22.

20 El método 200 incluye unir un silano o un derivado de silano a una superficie del sustrato moldeado que incluye depresiones separadas por regiones intersticiales, formando así depresiones silanizadas y regiones intersticiales, silanizadas (como se muestra en el número de referencia 202);
25 formar una capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones

silanizadas y sobre las regiones intersticiales, silanizadas (como se muestra en el número de referencia 204); pulir la capa de revestimiento de polímero funcionalizado de las regiones intersticiales silanizadas (como se muestra en el número de referencia 206), injertar un cebador en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado en las depresiones silanizadas para formar depresiones funcionalizadas (como se muestra en el número de referencia 208); y formar un revestimiento protector soluble en agua sobre las depresiones funcionalizadas y al menos una porción del sustrato moldeado (como se muestra en el número de referencia 210).

Se describirán de forma adicional ejemplos del método 200 con referencia a las figuras 5A a 5H (que es similar al método 100'), o figuras 5A a 5D y 5I a 5L (que es similar al método 100''). Cualquiera de los detalles del método 200 también se pueden combinar o incluir en los métodos 100' o 100''.

La figura 5A es una vista en sección transversal del sustrato moldeado 12. El sustrato moldeado 12 puede ser una oblea moldeada o una pastilla moldeada o cualquier otro sustrato moldeado (por ejemplo, panel, hoja rectangular, etc.). Cualquier ejemplo del sustrato 12 descrito en la presente se puede utilizar. La oblea moldeada se puede utilizar para formar varias celdas de flujo, y la pastilla moldeada se puede utilizar para formar una sola celda de flujo. En un ejemplo, el sustrato puede tener un diámetro que varía de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 300 mm, o una lámina o panel rectangular que tiene su dimensión más grande hasta 10 pies (~ 3 metros). En un ejemplo, la oblea de sustrato tiene un diámetro que varía de aproximadamente 200 mm a aproximadamente 300 mm. En otro ejemplo, la pastilla de sustrato tiene un ancho que varía de aproximadamente 0.1 mm a aproximadamente 10 mm. En tanto

que se han proporcionado dimensiones de ejemplo, se va a entender que se pueden utilizar sustratos con cualquier dimensión adecuada.

El sustrato moldeado 12 incluye depresiones 14 definidas sobre o en una capa o superficie expuesta del sustrato 12, y regiones intersticiales 16 que
5 separan depresiones adyacentes 14. En los ejemplos descritos en la presente, las depresiones 14 se funcionalizan con producto químico superficial (por ejemplo, 20, 22), en tanto que las regiones intersticiales 16 se pueden utilizar para unión pero no tendrán cebadores (mostrados en las figuras 5E y 5K) presentes sobre las mismas.

10 Las depresiones 14 se pueden fabricar en o sobre el sustrato 12 utilizando una variedad de técnicas, que incluyen, por ejemplo, fotolitografía, litografía de nanoimpresión, técnicas de estampado, técnicas de grabado, técnicas de moldeo, técnicas de micrograbado, técnicas de impresión, etc. Como se apreciará por aquellos expertos en la técnica, la técnica utilizada dependerá de
15 la composición y forma del sustrato 12.

Muchos diseños diferentes de las depresiones 14 se pueden prever, que incluyen patrones rectangulares, repetitivos, y no regulares. En un ejemplo, las depresiones 14 se colocan en una red hexagonal para empaquetamiento cerrado y densidad mejorada. Otros diseños pueden incluir, por ejemplo, diseños
20 rectilíneos (es decir, rectangulares), diseños triangulares, etc. En algunos ejemplos, el diseño o patrón puede ser un formato x-y de depresiones 14 que están en filas y columnas. En algunos otros ejemplos, el diseño o patrón puede ser un arreglo repetitivo de depresiones 14 y/o regiones intersticiales 16. En aún otros ejemplos, el diseño o patrón puede ser un arreglo aleatorio de depresiones
25 14 y/o regiones intersticiales 16. El patrón puede incluir manchas, almohadillas,

concavidades, postes, rayas, remolinos, líneas, triángulos, rectángulos, círculos, arcos, marcas, cuadros, diagonales, flechas, cuadrados, y/o líneas cruzadas.

El diseño o patrón puede estar caracterizado con respecto a la densidad de las depresiones 14 (es decir, número de depresiones 14) en un área definida.

- 5 Por ejemplo, las depresiones 14 pueden estar presentes en una densidad de aproximadamente 2 millones por mm^2 . La densidad se puede sintonizar a diferentes densidades que incluyen, por ejemplo, una densidad de al menos aproximadamente 100 por mm^2 , aproximadamente 1000 por mm^2 , aproximadamente 0.1 millones por mm^2 , aproximadamente 1 millón por mm^2 ,
10 aproximadamente 2 millones por mm^2 , aproximadamente 5 millones por mm^2 , aproximadamente 10 millones por mm^2 , aproximadamente 50 millones por mm^2 , o más. De forma alternativa o además, la densidad se puede sintonizar para que no sea más que aproximadamente 50 millones por mm^2 , aproximadamente 10 millones por mm^2 , aproximadamente 5 millones por mm^2 , aproximadamente 2
15 millones por mm^2 , aproximadamente 1 millones por mm^2 , aproximadamente 0.1 millones por mm^2 , aproximadamente 1000 por mm^2 , aproximadamente 100 por mm^2 , o menos. Se va a entender además que la densidad de depresiones 14 sobre el sustrato 12 puede estar entre uno de los valores inferiores y uno de los valores superiores seleccionados de los intervalos anteriores. Como ejemplos,
20 puede estar caracterizado un arreglo de alta densidad como que tiene depresiones 14 separadas por menos de aproximadamente 100 nm, un arreglo de densidad media puede estar caracterizado como que tiene depresiones 14 separadas por aproximadamente 400 nm a aproximadamente 1 μm , y un arreglo de baja densidad puede estar caracterizado como que tiene depresiones 14
25 separadas por más de aproximadamente 1 μm . En tanto que se han

proporcionado densidades de ejemplo, se va a entender que se pueden utilizar sustratos con cualquier densidad adecuada.

El diseño o patrón también puede o de forma alternativa estar caracterizado en términos del espaciamiento promedio, es decir, la separación
5 del centro de la depresión 14 al centro de una región intersticial adyacente (separación de centro a centro). El patrón puede ser regular, de tal forma que el coeficiente de variación alrededor del espaciamiento promedio es pequeño, o el patrón puede ser irregular en cuyo caso el coeficiente de variación puede ser relativamente grande. En cualquier caso, el espaciamiento promedio puede ser,
10 por ejemplo, al menos aproximadamente 10 nm, aproximadamente 0.1 μm , aproximadamente 0.5 μm , aproximadamente 1 μm , aproximadamente 5 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 100 μm , o más. De forma alternativa o además, el espaciamiento promedio puede ser, por ejemplo, a lo mucho aproximadamente 100 μm , aproximadamente 10 μm , aproximadamente 5 μm ,
15 aproximadamente 1 μm , aproximadamente 0.5 μm , aproximadamente 0.1 μm , o menos. El espaciamiento promedio para un patrón particular de sitios 16 puede estar entre uno de los valores inferiores y uno de los valores superiores seleccionados de los intervalos anteriores. En un ejemplo, las depresiones 14 tienen un espaciamiento (separación de centro a centro) de aproximadamente
20 1.5 μm . En tanto que se han proporcionado valores de espaciamiento promedio de ejemplo, se va a entender que se pueden utilizar otros valores de espaciamiento promedio.

En los ejemplos mostrados en las figuras 5A a 5L, las depresiones 14 son concavidades 14', y por lo tanto el sustrato moldeado 12 incluye un arreglo de
25 concavidades 14' en una superficie del mismo. las concavidades 14' pueden ser

micro-concavidades o nano-concavidades. Cada concavidad 14' puede estar caracterizada por su volumen, área de abertura de concavidad, profundidad, y/o diámetro.

Cada concavidad 14' puede tener cualquier volumen que sea capaz de
 5 confinar un líquido. El volumen máximo o mínimo se puede seleccionar, por ejemplo, para alojar el rendimiento (por ejemplo, multiplexidad), resolución, composición de analito, o reactividad de analito esperada para usos corriente abajo de la celda de flujo 10 (ver, figuras 5G y 5K). Por ejemplo, el volumen puede ser al menos aproximadamente $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, aproximadamente 1×10^{-2}
 10 μm^3 , aproximadamente $0.1 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $1 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $10 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $100 \mu\text{m}^3$, o más. De forma alternativa o además, el volumen puede ser a lo mucho aproximadamente $1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $100 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $10 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $1 \mu\text{m}^3$, aproximadamente $0.1 \mu\text{m}^3$, o menos. Se va a entender
 15 que la capa de revestimiento de polímero funcionalizado puede rellenar todo o parte del volumen de una concavidad 14'. El volumen de la capa de revestimiento en una concavidad individual 14' puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

El área ocupada por cada abertura de concavidad sobre una superficie se
 20 puede seleccionar con base en criterios similares como aquellos expuestos anteriormente para volumen de concavidad. Por ejemplo, el área de cada abertura de concavidad sobre una superficie puede ser al menos aproximadamente $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$, aproximadamente $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, aproximadamente $0.1 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $10 \mu\text{m}^2$, aproximadamente
 25 $100 \mu\text{m}^2$, o más. De forma alternativa o además, el área puede ser a lo mucho

aproximadamente $1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $100 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $10 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $1 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $0.1 \mu\text{m}^2$, aproximadamente $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, o menos. El área ocupada por cada abertura de concavidad puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

5 La profundidad de cada concavidad 14' puede ser al menos aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$, aproximadamente $1 \mu\text{m}$, aproximadamente $10 \mu\text{m}$, aproximadamente $100 \mu\text{m}$, o más. De forma alternativa o además, la profundidad puede ser a lo mucho aproximadamente $1 \times 10^3 \mu\text{m}$, aproximadamente $100 \mu\text{m}$, aproximadamente $10 \mu\text{m}$, aproximadamente $1 \mu\text{m}$, aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$, o
10 menos. La profundidad de cada concavidad 14' puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

En algunos casos, el diámetro de cada concavidad 14' puede ser al menos aproximadamente 50 nm , aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$, aproximadamente $0.5 \mu\text{m}$, aproximadamente $1 \mu\text{m}$, aproximadamente $10 \mu\text{m}$, aproximadamente $100 \mu\text{m}$, o
15 más. De forma alternativa o además, el diámetro puede ser a lo mucho $1 \times 10^3 \mu\text{m}$, aproximadamente $100 \mu\text{m}$, aproximadamente $10 \mu\text{m}$, aproximadamente $1 \mu\text{m}$, aproximadamente $0.5 \mu\text{m}$, aproximadamente $0.1 \mu\text{m}$, o menos (por ejemplo, aproximadamente 50 nm). El diámetro de cada concavidad 14' puede ser mayor que, menor que o entre los valores especificados anteriormente.

20 El sustrato moldeado 12 se puede exponer a una serie de procesos a fin de añadir el producto químico superficial 20, 22 en las depresiones 14 y para formar el revestimiento protector soluble en agua 24 sobre el producto químico superficial 20, 22 y sobre al menos una porción del sustrato moldeado 12. Las figuras 5B a 5H conjuntamente ilustran un ejemplo en el cual el producto químico
25 superficial 20, 22 se añade antes de que se forme el revestimiento protector 24;

y las figuras 5B a 5D y 5I a 5L conjuntamente ilustran un ejemplo en el cual se forman varios revestimiento protectores 24', 24 a fin de proteger diferentes productos químicos superficiales 20, 22 en diferentes etapas del método 200.

En tanto que no se muestra, se va a entender que el sustrato moldeado 12 se puede exponer a una reducción a cenizas por plasma a fin de limpiar y activar la superficie. Por ejemplo, el proceso de reducción a cenizas por plasma puede remover material orgánico e introducir grupos hidroxilo superficiales. Otros procesos de limpieza adecuados se pueden utilizar para limpiar el sustrato 12, dependiendo, en parte, del tipo de sustrato 12. Por ejemplo, se puede llevar a cabo limpieza química con agentes oxidativos o soluciones causticas.

El sustrato moldeado 12 (mostrado en la figura 5A) entonces se puede exponer a un proceso que preparará la superficie 12 para deposición de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 (figura 5C), que es un ejemplo del producto químico superficial descrito en la presente. En un ejemplo, el sustrato moldeado 12 se puede exponer a silanización, que une un silano o el derivado de silano 18 (figura 5B) a la superficie de oblea moldeada. La silanización introduce el silano o derivado de silano 18 a través de la superficie, que incluye en la depresión 14, 14' (por ejemplo, sobre la superficie inferior y a lo largo de las paredes laterales) y sobre las regiones intersticiales 16.

La silanización se puede lograr utilizando cualquier silano o derivado de silano 18. La selección del silano o derivado de silano 18 puede depender, en parte, de la molécula funcionalizada que se va a utilizar para formar la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 (mostrada en la figura 5C), ya que puede ser deseable formar un enlace covalente entre el silano o derivado de silano 18 y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20. El método

utilizado para unir el silano o derivado de silano 18 al sustrato 12 puede variar dependiendo del silano o derivado de silano 18 que se utiliza. Se exponen en la presente diferentes ejemplos.

En un ejemplo, el silano o derivado de silano 18 es (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) o 3-aminopropil)trimethoxisilano (APTMS) (es decir, $X-R^B-Si(OR^C)_3$, en donde X es amino, R^B es $-(CH_2)_3-$, y R^C es etilo o metilo). En este ejemplo, la superficie de sustrato 12 se puede pre-tratar con el (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) o 3-aminopropil)trimethoxisilano (APTMS) para ligar de forma covalente silicio a uno o más átomos de oxígeno sobre la superficie (sin intentar sujetarse por mecanismo, cada silicio puede unirse a 1, 2 o 3 átomos de oxígeno). Esta superficie tratada de forma química se hornea para formar un grupo amina monocapa. Los grupos amina entonces se hacen reaccionar con Sulfo-HSAB un derivado azido. La activación con luz UV a 21°C con 1 J/cm² a 30 J/cm² de energía genera una especie de nitreno activa, que puede someterse fácilmente a una variedad de reacciones de inserción con PAZAM (por ejemplo, la molécula funcionalizada).

También se pueden utilizar otros métodos de salinización. Ejemplos de métodos de salinización adecuados incluyen deposición de vapor, el método YES, revestimiento por centrifugación, u otros métodos de deposición. Algunos ejemplos de los métodos y materiales que se pueden utilizar para silanizar el sustrato 12 se describen en la presente, aunque se va a entender que se pueden utilizar otros métodos y materiales.

En un ejemplo que utiliza el horno YES CVD, el sustrato moldeado 12 se coloca en el horno CVD. La cámara se puede ventilar y entonces comenzar el ciclo de silanización. Durante la formación de ciclos, el frasco de silano o

derivado de silano se puede mantener a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 120°C para silano de norborneno), las líneas de vapor de silano o derivado de silano se pueden mantener a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 125°C para silano de norborneno), y
 5 las líneas de vacío se pueden mantener a una temperatura adecuada (por ejemplo, aproximadamente 145°C).

En otro ejemplo, el silano o derivado de silano 18 (por ejemplo, silano de norborneno líquido) se puede depositar dentro de un vial de vidrio y colocado dentro de un desecador de vacío de vidrio con un sustrato moldeado 12. El
 10 desecador entonces se puede evacuar a una presión que varía de aproximadamente 15 mTorr (1.99 Pa), y aproximadamente 30 mTorr (3.99 Pa), y colocar dentro de un horno a una temperatura que varía de aproximadamente 60°C a aproximadamente 125°C. Se permite que proceda la silanización, y entonces se remueve el desecador del horno, se enfría y se ventila en aire.

15 La deposición de vapor, el método YES y/o el desecador de vacío se pueden utilizar con una variedad de silanos o derivados de silanos 18, tal como aquellos de silano o derivados de silano 18 que incluyen ejemplos de las fracciones insaturadas descritas en la presente. Como ejemplos, aquellos métodos se pueden utilizar cuando el silano o derivado de silano 18 incluye una
 20 fracción insaturada de cicloalqueno, tal como norborneno, un derivado de norborneno (por ejemplo, un (hetero) norborneno que incluye un oxígeno o nitrógeno en lugar de uno de los átomos de carbono), transcicloocteno, derivados de transcicloocteno, transciclopenteno, transciclohepteno, transciclononeno, biciclo[3.3.1]non-1-eno, biciclo[4.3.1]dec-1 (9)-eno, biciclo [4.2.1]non-1(8)-eno, y
 25 biciclo[4.2.1]non-1-eno. Cualquiera de estos cicloalquenos pueden ser

sustituídos, por ejemplo, con un grupo R, tal como hidrógeno, alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquino, arilo, heteroarilo, heteroalíclico, aralquilo, o (heteroalíclico)alquilo. Un ejemplo de derivado de norborneno incluye [(5-biciclo[2.2.1]hept-2-enil)etil]trimetoxisilano. Como otros
 5 ejemplos, estos métodos se pueden utilizar cuando el silano o derivado de silano 18 incluye una fracción insaturada de cicloalquino, tal como ciclooctino, un derivado de ciclooctino, biclonoínos (por ejemplo, biciclo[6.1.0]non-4-ino o derivados del mismo, biciclo[6.1.0]non-2-ino, o biciclo[6.1.0]non-3-ino). Estos cicloalquinos pueden ser sustituidos con cualquiera de los grupos R descritos en
 10 la presente.

Como se muestra en la figura 5B, la unión del silano o derivado de silano 18 forma un sustrato moldeado, silanizado, que incluye depresiones silanizadas y regiones intersticiales silanizadas.

La oblea moldeada, silanizada entonces se puede exponer a un proceso
 15 que formará la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 sobre las depresiones silanizadas y regiones intersticiales silanizadas.

Como se describe en la presente, ejemplos de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 incluyen PAZAM, o cualquier otra molécula que se funcione para interactuar con la oblea moldeada 12 y los cebadores
 20 posteriormente aplicados 22. La capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 se puede formar sobre la superficie de la oblea moldeada, silanizada (es decir, en las depresiones silanizadas y las regiones intersticiales, silanizadas) utilizando cualquiera de las técnicas descritas con referencia al número de referencia 102'. La capa de revestimiento resultante 20 se muestra
 25 en la figura 5C.

La unión de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 a las depresiones silanizadas y regiones intersticiales, silanizadas (es decir, 18) puede ser a través de enlace covalente. La ligación covalente de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 a las depresiones silanizadas es útil para mantener la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en las depresiones 14, 14' a lo largo de la vida útil de la celda de flujo formada al final durante una variedad de usos. Los siguientes son ejemplos de reacciones que pueden tomar lugar entre el silano o derivado de silano 18 y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20.

10 Cuando el silano o derivado de silano 18 incluye norborneno o un derivado de norborneno como la fracción insaturada, el norborneno o un derivado de norborneno pueden: i) someterse a una reacción de cicloadición 1,3-dipolar con un grupo azida/azido de PAZAM; ii) someterse a una reacción de acoplamiento con un grupo tretazina unido a PAZAM; someterse a una reacción de cicloadición con un grupo hidrazona unido a PAZAM; someterse a una reacción de foto-clíc con un grupo tetrasola unido a PAZAM; o someterse a una cicloadición con un grupo de óxido de nitrilo unido a PAZAM.

20 Cuando el silano o derivado de silano 18 incluye ciclooctino o un derivado de ciclooctino como la fracción insaturada, el ciclooctino o derivado de ciclooctino puede: i) someterse a una reacción de 1,3-cicloadición de azida-alquino promovida por tensión (SPAAC) con una azida/azido de PAZAM, o ii) someterse a una reacción de cicloadición de óxido de nitrilo-alquino promovida por tensión con un grupo de óxido de nitrilo unido a PAZAM.

25 Cuando el silano o derivado de silano 18 incluye un biclclononino como la fracción insaturada, el biclclononino puede someterse a cicloadición de alquino

SPAAC con azidas u óxidos de nitrilo unidos a PAZAM debido a la tensión en el sistema de anillos bicíclicos.

En tanto que no se muestra, se va a entender que en algunos ejemplos del método, el sustrato moldeado 12 puede no exponerse a silanización. En su lugar, el sustrato moldeado 12 se puede exponer a reducción a cenizas por plasma, y entonces la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 se puede revestir por centrifugación directamente (o depositar de otra forma) sobre el sustrato moldeado, reducido a cenizas por plasma 12. En este ejemplo, la reducción a cenizas por plasma puede generar agentes activadores de superficie (por ejemplo, grupos -OH) que pueden adherir la capa de revestimiento de polímero funcionalizado al sustrato moldeado 12. En estos ejemplos, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 se selecciona de tal forma que reacciona con los grupos superficiales generados por la reducción a cenizas por plasma.

En tanto que tampoco se muestra, se va a entender que el sustrato moldeado silanizado y revestido (mostrado en la figura 5C) se pueda exponer a un proceso de limpieza. Este proceso puede utilizar un baño de agua y sonicación. El baño de agua se puede mantener a una temperatura relativamente baja que varía de aproximadamente 22°C a aproximadamente 45°C. En otro ejemplo la temperatura de baño de agua varía de aproximadamente 25°C a aproximadamente 30°C.

El sustrato revestido, moldeado y silanizado entonces se expone a pulido para remover porciones de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 de las regiones intersticiales silanizadas. El sustrato moldeado silanizado, revestido, y pulido se muestra en la figura 5D. Las porciones del silano o derivado

de silano 18 que son adyacentes a las regiones intersticiales 16 pueden o no removerse como resultado del pulido. Como tal, en las figuras 5D a 5L, las porciones del silano o derivado de silano 18 que son adyacentes a las regiones intersticiales 16 se muestran en líneas fantasma, ya que pueden permanecer al menos parcialmente después del pulido o se pueden remover después del pulido. Cuando estas porciones silanizadas se remueven completamente, se va a entender que se expone el sustrato subyacente 12. Como tal, en algunos ejemplos, la capa separado 28 puede estar en contacto directamente con el sustrato 12 en las regiones de unión 25 (por ejemplo, en las figuras 5G y 5J) y los revestimientos protectores 24', 24 pueden estar en contacto directamente con el sustrato 12 en una o más regiones intersticiales 16 (por ejemplo, en las figuras 5F, 5J y 5L). Cuando estas porciones silanizadas permanecen al menos parcialmente después del pulido, la tapa unida posteriormente y los revestimientos protectores formados posteriormente 24, 24' están en contacto directamente con el silano o derivado de silano 18 en las regiones de unión 25 y las regiones intersticiales 16.

El proceso de pulido se puede llevar a cabo con una suspensión espesa, química, suave (que incluye un abrasivo) que puede remover la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20, y en algunos casos, al menos parte del silano o derivado de silano 18, de las regiones intersticiales 16 sin afectar de forma perjudicial el sustrato subyacente 12 en aquellas regiones. De forma alternativa, el pulido se puede llevar a cabo con una solución que no incluye las partículas abrasivas.

La suspensión espesa, química, suave es una suspensión espesa, acuosa, básica que tiene un pH que varía de aproximadamente 7.5 a

aproximadamente 11 y que incluye una partícula abrasiva. Ejemplos de la partícula abrasiva incluyen carbonato de calcio (CaCO_3), agarosa, grafito, metacrilato de polimetilo (PMMA), sílice, óxido de aluminio (por ejemplo, alúmina), ceria, poliestireno, y combinaciones de los mismos. En algunos
5 ejemplos, la partícula abrasiva se selecciona del grupo que consiste de carbonato de calcio (CaCO_3), agarosa y grafito. El tamaño de partícula promedio de las partículas abrasivas puede variar de aproximadamente $15\ \mu\text{m}$ a aproximadamente $5\ \mu\text{m}$, y en un ejemplo es aproximadamente $700\ \text{nm}$.

Además de las partículas abrasivas, la suspensión espesa, acuosa,
10 básica también puede incluir una solución amortiguadora, un agente quelante, un agente tensoactivo, y/o un dispersante. Un ejemplo de la solución amortiguadora incluye tris base (es decir, tris(hidroximetil)aminometano), que puede estar presente en una solución que tiene un pH de aproximadamente 9. Un ejemplo del agente quelante es ácido dimetildiaminotetraacético (EDTA), que
15 puede estar presente en una solución que tiene un pH de aproximadamente 8. Un ejemplo del agente tensoactivo es un agente tensoactivo aniónico, tal como dodecilsulfato de sodio. Dispersantes de poliacrilato que tienen diferentes pesos moleculares se pueden utilizar. Un ejemplo del dispersante es sal de sodio de ácido poliacrílico. El dispersante puede ayudar a mantener el tamaño de, e
20 impedir al menos sustancialmente el asentamiento de las partículas abrasivas.

La suspensión espesa, acuosa, básica se puede utilizar en un sistema de pulido mecánico, químico para pulir la superficie del sustrato moldeado silanizado y revestido mostrado en la figura 5C. Las almohadillas/cabezas de pulido u otras herramientas de pulido son capaces de pulir la capa de
25 revestimiento de polímero funcionalizado 20 de las regiones intersticiales 16 en

tanto que dejan la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en las depresiones 14, 14' y que dejan el sustrato subyacente 12 al menos sustancialmente intacto. Como un ejemplo, la cabeza de pulido puede ser una cabeza de pulido Strasbaugh ViPRR II.

5 Como se menciona anteriormente, el pulido se puede llevar a cabo con una almohadilla de pulido y una solución sin abrasivo. Por ejemplo, la almohadilla de pulido se puede utilizar con una solución libre de partículas abrasivas (es decir, una solución que no incluye partículas abrasivas).

El pulido remueve porciones de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 (y en algunos casos al menos parte del silano o derivado de silano 18) de las regiones intersticiales 16 y deja porciones de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en las depresiones silanizadas, como se muestra en la figura 5D. Como se menciona anteriormente, las regiones intersticiales 16 pueden permanecer silanizadas después de que se completa el pulido. En otras palabras, las regiones intersticiales, silanizadas pueden permanecer intactas después del pulido. De forma alternativa (como se indica por las porciones en líneas fantasma de 18), el silano o derivado de silano 18 se puede remover de las regiones intersticiales 16 como resultado del pulido.

10

15

En tanto que no se muestra, se va a entender que el sustrato silanizado, revestido, y pulido, moldeado (mostrado en la figura 5D) se puede exponer a un proceso de limpieza. Este proceso puede utilizar un baño de agua y sonicación. El baño de agua se puede mantener a una temperatura relativamente baja que varía de aproximadamente 22°C a aproximadamente 30°C. El sustrato moldeado silanizado, revestido, y pulido también se puede secar por centrifugación, o secar a través de otra técnica adecuada.

20

25

El sustrato moldeado silanizado, revestido, y pulido mostrado en la figura 5D entonces se puede exponer a los procesos mostrados en las figuras 5E a 5H o a los procesos mostrados en las figuras 5I a 5L. En las figuras 5E a 5H, se forma un revestimiento protector soluble en agua, individual 24, y en las figuras 5I a 5L, se forman múltiples revestimientos protectores solubles en agua 24', 24.

El ejemplo mostrado en las figuras 5E a 5H se describirá ahora. En la figura 5E, el cebador 22 se injerta en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en las depresiones 14, 14'. Cualquiera de los cebadores descritos en la presente se puede utilizar. En este ejemplo, el injerto se puede lograr por revestimiento por remojo, revestimiento por rociamiento, dispensación de depósito, o por otro método adecuado que unirá a los cebadores a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en al menos algunas de las depresiones 14, 14'. Cada una de estas técnicas de ejemplo puede utilizar la solución o mezcla de cebador descrita en la presente, que puede incluir los cebadores, agua, una solución amortiguadora, y un catalizador.

Como se muestra en la figura 5F, después de que se injerta el cebador 22 a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en las depresiones 14, 14', el revestimiento protector soluble en agua 24 se forma sobre el producto químico superficial 20, 22 y sobre al menos una porción del sustrato moldeado. El revestimiento protector soluble en agua 24 se puede formar sobre la superficie expuesta del sustrato moldeado 12 que no es parte de una región de unión 25. En este ejemplo, el revestimiento protector soluble en agua 24 se deposita o moldea de forma selectiva sobre las regiones intersticiales 16 entre depresiones adyacentes 14, 14', pero no en el borde/periferia del sustrato moldeado 12 donde se ubica la región de unión 25. La deposición/moldeo selectivos del

revestimiento protector soluble en agua 12 se pueden lograr utilizando la solución acuosa, como se describe en la presente. En este ejemplo, el material en la solución acuosa puede ser de cualquiera de los ejemplos descritos en la presente (es decir, un polímero sintético no catiónico soluble en agua; un
5 polisacárido natural soluble en agua o un derivado del mismo; una proteína natural soluble en agua o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de molécula pequeña soluble en agua seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, un azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora, un glicol; o una ciclodextrina). En un
10 ejemplo, el material soluble en agua puede ser. Después de que se deposita la solución acuosa, se puede secar para formar el revestimiento protector soluble en agua 24.

Como se representa en la figura 5G, la tapa 26 entonces se puede unir a la región de unión 25. La tapa 26 puede ser cualquiera de los materiales y en
15 cualquiera de las configuraciones descritas en la presente. La tapa 26 también se puede unir a la región de unión 25 a través de cualquiera de las técnicas descritas en la presente.

En el ejemplo mostrado en la figura 5G, la tapa 26 incluye una porción superior 27 formada integralmente con las paredes laterales 29. Las paredes
20 laterales 29 se unen a la región de unión 25 del sustrato moldeado 12 a través de la capa separadora 28.

Conjuntamente, la tapa 26 y el sustrato moldeado 12 (con el producto químico superficial 20, 22) definen el canal de flujo 30, que está en comunicación de fluidos selectiva con las depresiones 14, 14'. El canal de flujo 30 puede servir
25 para, por ejemplo, introducir de forma selectiva fluido al revestimiento protector

24 a fin de remover el revestimiento 24, y para introducir de forma selectiva componentes de reacción o reactivos al producto químico superficial 20, 22 (después de que se remueve el revestimiento protector 24) a fin de iniciar reacciones designadas en las depresiones 14, 14'.

5 Cuando la tapa 26 se une al sustrato moldeado silanizado, revestido, pulido, e injertado, se forma un ejemplo de la celda de flujo 10', como se muestra en la figura 5G. En este ejemplo, el protector 24 permanece en su lugar sobre el producto químico superficial, 20, 22 y en alguna parte de la superficie de sustrato moldeado. La celda de flujo 10' se puede enviar, almacenar, etc., con el
10 revestimiento protector 24 en su lugar.

 Cuando es deseable utilizar la celda de flujo 10' en una aplicación (por ejemplo, una operación de secuenciación), se puede remover el revestimiento protector 24 a través del proceso de disolución descrito con referencia al número de referencia 108. La solubilidad en agua del revestimiento protector 24 le
15 permite removerse a través de disolución en la solución acuosa, que no perjudica al producto químico superficial subyacente 20, 22 o sustrato moldeado 12. La figura 5H representa la celda de flujo 10' después de que se remueve el revestimiento protector 24.

 Ahora se describirá el ejemplo mostrado en las figuras 5I a 5L. En la figura
20 5I, el revestimiento protector soluble en agua, inicial 24' se puede depositar de forma selectiva, o moldear, de tal forma que la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 se cubre y de tal forma que la región de unión 25 del sustrato moldeado 12 permanece expuesta. En este ejemplo, el revestimiento protector soluble en agua, inicial 24' se deposita o moldea de forma selectiva sobre las
25 regiones intersticiales 16 entre depresiones adyacentes 14, 14', pero no el

borde/periferia del sustrato moldeado 12 donde se ubica la región de unión 25. La deposición/moldeo selectivos del revestimiento protector soluble en agua, inicial 24' se pueden lograr como se describe en la presente utilizando la solución acuosa descrita con referencia al número de referencia 104'' (que incluye agua y, en algunos casos, hasta aproximadamente 15% (masa a volumen) del copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol, sacarosa, o polietilenglicol).

El revestimiento protector inicial 24 protege la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 durante cualquier proceso de montaje que se lleva a cabo de forma posterior. Como se representa en la figura 5J, el proceso de montaje puede incluir unión de la tapa 26 a la región de unión 25. En tanto que no se muestra, cuando se utiliza la oblea de sustrato, el proceso de montaje puede incluir unión y troceo. La tapa 26 puede ser cualquiera de los materiales y puede tener cualquiera de las configuraciones descritas en la presente. La tapa 26 se puede unir a la región de unión 25 a través de cualquiera de las técnicas descritas en la presente.

En el ejemplo mostrado en la figura 5J, la tapa 26 incluye una porción superior 27 formada integralmente con las paredes laterales 29. Las paredes laterales 29 se unen a la región de unión 25 del sustrato moldeado 12 a través de la capa separadora 28. Después de que se une a la tapa 26, se forma el canal de flujo 30 entre la tapa 26 y el sustrato moldeado 12. El canal de flujo 30 puede servir para introducir selectivamente diferentes fluidos a la celda de flujo 10'.

El revestimiento protector soluble en agua, inicial 24' entonces se puede remover, como se muestra en la figura 5K. Debido a que el revestimiento protector inicial es soluble en agua, su remoción puede implicar disolución

acuosa, como se describe con referencia al número de referencia 108. Tras la disolución del revestimiento protector inicial 24' y la remoción de la solución del canal de flujo 30, se expone la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 y cualquiera del sustrato moldeado 12 (por ejemplo, las regiones intersticiales 16 no unidas a la tapa 26) que se ha revestido por el revestimiento protector inicial 24'.

También mostrado en la figura 5K, después de que se remueve el revestimiento protector inicial 24', el cebador 22 se puede injertar en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en las depresiones 14, 14'. Cualquiera de los cebadores 22 descritos en la presente se puede utilizar. En este ejemplo, el injerto se puede lograr utilizando el proceso de flujo pasante (número de referencia 102'''), y la solución o mezcla de cebador descrito en la presente, que puede incluir los cebadores, agua, una solución amortiguadora, y un catalizador. Después de que se injerta el cebador 22, se forma la celda de flujo 10'.

Si la celda de flujo 10' se va a enviar, o almacenar durante algún periodo de tiempo, el (segundo) revestimiento protector soluble en agua 24 se puede aplicar al producto químico superficial 20, 22 y sobre al menos una porción del sustrato moldeado 12 (es decir, regiones intersticiales 16 expuestas dentro del canal 30), como se muestra en la figura 5L. La deposición del (segundo) revestimiento protector soluble en agua 24 se puede lograr utilizando el proceso de flujo pasante y la solución acuosa descritos con referencia al número de referencia 104'''. Para reiterar, el material soluble en agua en la solución acuosa en este ejemplo puede ser cualquiera de los ejemplos descritos en la presente (es decir, un polímero sintético no catiónico, soluble en agua; un polisacárido

natural soluble en agua o un derivado del mismo; una proteína natural soluble en agua o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de molécula pequeña soluble en agua seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, un azúcar, un antioxidante, un quelante, una
 5 solución amortiguadora, un glicol; o una ciclodextrina). En un ejemplo, el material soluble en agua puede ser el copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol, sacarosa, dextrano, poliacrilamida, glicoles, sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético, tris(hidroximetil)aminometano con
 10 ácido etilendiaminotetraacético, (tris(2-carboxietil)fosfina), tris(3-hidroxipropiltriazolilmetil)amina, sal disódica de ácido batofenantrolinadisulfónico, polímeros de hidroxilo funcionales, glicerol, o citrato de sodio salino.

Aun otro ejemplo del método (por ejemplo, método 100 o 200) implica un sustrato no moldeado 12', como se muestra en las figuras 6A a 6E.

15 Cualquiera de los sustratos descritos en la presente, y sustrato no moldeado 12' no incluyen depresiones 14 o regiones intersticiales 16. En este método de ejemplo, la tapa 26 se une al sustrato no moldeado 12' al comienzo para formar los canales de flujo 30. La tapa 26 puede ser cualquiera de los materiales y en cualquiera de las configuraciones descritas en la presente. La
 20 tapa 26 también se puede unir al sustrato no moldeado 12' a través de cualquiera de las técnicas descritas en la presente.

En el ejemplo mostrado en la figura 6B, la tapa 26 incluye una porción superior 27 formada integralmente con paredes laterales 29. Las paredes laterales 29 se unen a una región de unión del sustrato no moldeado 12' a través
 25 de la capa separadora 28. La región de unión puede estar en una periferia del

sustrato no moldeado 12', o en cualquiera de las áreas donde es deseable formar un límite de un canal de flujo 30. En otros ejemplos, la capa separadora 28 puede formar las paredes laterales y se puede unir a una tapa al menos sustancialmente plana 26.

5 Conjuntamente, la tapa 26 (que incluye las paredes laterales 29) y el sustrato no moldeado 12 definen el canal de flujo 30. El canal de flujo 30 puede servir, por ejemplo, para introducir de forma selectiva fluidos a fin de formar el producto químico superficial 20, 22 y el revestimiento protector 24, para remover
10 el revestimiento 24, y para introducir de forma selectiva componentes de reacción o reactivos el producto químico superficial 20, 22 (después de que se remueve el revestimiento protector 24) a fin de iniciar reacciones designadas dentro del canal de flujo 30.

 Antes de la formación de la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 (mostrada en la figura 6C), el método puede implicar exponer
15 el sustrato no moldeado (a través de un proceso de flujo pasante) a un proceso de limpieza y/o a otro proceso (por ejemplo, silanización) que prepara la superficie expuesta del sustrato no moldeado para la deposición posterior de la molécula funcionalizada.

 La silanización del sustrato no moldeado 12' se muestra en la figura 6B.
20 En este ejemplo, la silanización une el silano o derivado de silano 18 a las porciones expuestas de la superficie de oblea no moldeada 12' que están presentes en el canal de flujo 30.

 La silanización se puede lograr utilizando cualquier silano o derivado de silano 18. La selección del silano o derivado de silano 18 puede depender, en
25 parte, de la molécula funcionalizada que se va a utilizar para formar la capa de

revestimiento de polímero funcionalizado 20 (mostrada en la figura 6C), ya que puede ser deseable formar un enlace covalente entre el silano o derivado de silano 18 y la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20. El método utilizado para unir el silano o derivado de silano 18 al sustrato 12' puede ser un
5 proceso de flujo pasante.

Como se muestra en la figura 6C, en este ejemplo, la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 entonces se forma sobre el silano o derivado de silano 18, o sobre otro producto químico que se ha depositado para preparar la superficie expuesta del sustrato no moldeado 12' dentro del canal de
10 flujo 30.

Cualquiera de las moléculas funcionalizadas descritas en la presente se pueden utilizar. En este ejemplo, la formación capa de revestimiento de polímero funcionalizado se puede lograr por un proceso de flujo pasante. En el proceso de flujo pasante, la molécula funcionalizada se puede introducir en los canales
15 de flujo 30 a través de orificios de entrada respectivos y se pueden curar. La capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 se formará sobre la superficie expuesta del sustrato no moldeado 12' y no toma lugar el pulido.

Como se muestra en la figura 6D, el cebador 22 se injerta en la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en el canal de flujo 30. Cualquiera
20 de los cebadores descritos en la presente se pueden utilizar. En este ejemplo, el injerto se puede lograr por un proceso de flujo pasante. En el proceso de flujo pasante, la solución o mezcla de cebador descrita en la presente se puede introducir en los canales de flujo 30 a través de orificios de entrada respectivos, se puede mantener en los canales de flujo durante un tiempo suficiente (es decir,
25 un periodo de incubación) para que el cebador se una a la capa de revestimiento

de polímero funcionalizado 20, y entonces se puede remover de los orificios de salida respectivos. Después de la unión de cebador, los fluidos adicionales se pueden dirigir a través de los canales de flujo para lavar los canales de flujo ahora funcionalizados 30.

5 La celda de flujo resultante 10'' en este ejemplo se muestra en la figura 6D. Esta celda de flujo 10'' se puede utilizar en una operación de secuenciación, o se puede revestir con el revestimiento protector 24 para envío y/o almacenamiento.

10 Como se muestra en la figura 6E, en un ejemplo, después de que se inserta el cebador 22 a la capa de revestimiento de polímero funcionalizado 20 en el canal de flujo 30, se forma el revestimiento protector soluble en agua 24 sobre el producto químico superficial 20, 22. En este ejemplo, la formación de revestimiento de protector soluble en agua 24 se puede lograr por un proceso de flujo pasante. En el proceso de flujo pasante, se puede introducir la solución

15 acuosa (que incluye agua y, en algunos casos, hasta aproximadamente 15% (masa a volumen) de un material formador de película, soluble en agua) en los canales de flujo 30 a través de orificios de entrada respectivos y se puede mantener en los canales de flujo. Se puede introducir suficiente solución acuosa para cubrir el producto químico superficial 20, 22 dentro del canal de flujo 30. En

20 tanto que en los canales de flujo 30, las celdas de flujo pueden estar expuestas a un proceso de secado donde se descarga aire, nitrógeno o vacío a través del orificio de entrada durante una cantidad establecida de tiempo para secar el (segundo) revestimiento protector soluble en agua sobre el producto químico superficial 20, 22.

25 En este ejemplo, el material soluble en agua en la solución acuosa puede

ser cualquiera de los ejemplos descritos en la presente (es decir, un polímero sintético no catiónico, soluble en agua; un polisacárido natural soluble en agua o un derivado del mismo; una proteína natural soluble en agua o un derivado de la misma; una sal soluble en agua; un compuesto de molécula pequeña soluble en agua seleccionado del grupo que consiste de un agente tensoactivo soluble en agua, un azúcar, un antioxidante, un quelante, una solución amortiguadora, un glicol; o una ciclodextrina). En un ejemplo, el material soluble en agua puede ser cualquiera del copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol, sacarosa, dextrano, poliacrilamida, glicoles, sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético, tris(hidroximetil)aminometano con ácido etilendiaminotetraacético, (tris(2-carboxietil)fosfina), tris(3-hidroxipropil triazolilmetil)amina, sal disódica de ácido batofenantrolinadisulfónico, polímeros de hidroxilo funcionales, glicerol, o un citrato de sodio salino.

Se va a entender que el injerto de cebador y formación de revestimiento protector soluble en agua 24 pueden presentarse de forma simultánea en algunos ejemplos.

Cuando es deseable utilizar la celda de flujo 10" (que tiene el revestimiento protector 24 sobre el producto químico superficial 20, 22) en una aplicación (por ejemplo, una operación de secuenciación o una operación de genotipado), el revestimiento protector 24 se puede remover a través del proceso de dilución descrito con referencia al número de referencia 108. La solubilidad en agua del revestimiento protector 24 le permite removerse a través de disolución en la solución acuosa, que no es perjudicial para el producto químico superficial subyacente 20, 22.

Además, los métodos descritos en la presente pueden implicar la realización de un ensayo de control de calidad. En un ejemplo, el ensayo puede ser un ensayo CFR o un ensayo HP-TET u otro ensayo basado en tinte, adecuado. El ensayo se puede llevar a cabo antes de la introducción del
5 revestimiento protector 24 (pero después del injerto de cebador), y entonces de nuevo después de que se remueve el revestimiento protector 24 (y se re-exponen los cebadores). Los datos de ensayo pueden indicar si se ha presentado alguna degradación de cebador. En un ejemplo, el método implica remover el revestimiento protector soluble en agua; y llevar a cabo un ensayo
10 basado en tinte para detectar cualquier degradación del cebador. En un ejemplo, la celda de flujo 10, 10', 10'' descritas en la presente pueden exhibir menos de una caída de 15% en retención de CFR después de 2 días de almacenamiento con el revestimiento protector sobre las mismas, y en otro ejemplo, menos de una caída de 10% en retención CFR después de 2 días de almacenamiento con
15 el revestimiento protector sobre las mismas. En aún otro ejemplo, la celda de flujo 10', 10', 10'' puede no exhibir una caída en retención CFR, sino en su lugar, pueden exhibir una retención CFR incrementada (que varía, por ejemplo, de aproximadamente 1% a aproximadamente 25%, o como otro ejemplo, de aproximadamente 5% a aproximadamente 20%). En otro ejemplo, después del
20 injerto de cebador pero antes de la aplicación del revestimiento soluble en agua, se puede detectar la eficiencia de injerto de cebador por hibridación de los cebadores injertados a oligonucleótidos de control de calidad etiquetados. Los oligonucleótidos de control de calidad hibridados se detectan y entonces se des-hibridan de los cebadores injertados. Entonces se aplica el revestimiento soluble
25 en agua.

Los ejemplos descritos en la presente ilustran que el revestimiento protector 24 no se forma sobre las regiones de unión 25. En otros ejemplos, sin embargo, el revestimiento protector 24 se puede formar sobre la superficie de sustrato completo 12, 12' (es decir, sobre el producto químico superficial 20, 22, en algunos ejemplos sobre las regiones intersticiales 16, y sobre las regiones de unión 25), y la tapa 26 se puede unir al sustrato 12, 12' a través del revestimiento protector 24.

En tanto que no se muestra, se va a entender que algunos ejemplos de la celda de flujo 10, 10', 10'' se puede fijar directamente a, y por lo tanto puede estar en contacto físico con, un dispositivo de detección (no mostrado) a través de uno o más mecanismos de seguridad (por ejemplo, adhesivo, unión, sujetadores, y similares). El dispositivo de detección puede incluir un dispositivo CMOS (que incluye una pluralidad de capas apiladas que incluyen, por ejemplo, capas de silicio, capas dieléctricas, capas de metal-dieléctrico, capas metálicas, etc.), y componentes ópticos. Los componentes ópticos se pueden arreglar de tal forma que un sensor óptico del dispositivo de detección se alinea al menos sustancialmente con, y por lo tanto se asocia operativamente con, una guía de ondas óptica individual del dispositivo de detección y el producto químico superficial 20, 22 dentro de una sola depresión 14, 14' de la celda de flujo 10, 10', 10''.

En tanto que tampoco se muestra, se va a entender que en lugar de unirse a una tapa 26, un sustrato funcionalizado (con el producto químico superficial 20, 22 sobre la misma o en depresiones 14 del mismo) se puede unir a otro sustrato funcionalizado con el producto químico superficial 20, 22 sobre el mismo o en depresiones del mismo. Las dos superficies funcionalizadas pueden orientarse

entre sí y pueden tener un canal de flujo definido entre las mismas. Una capa separadora y método de unión adecuado se pueden utilizar para unir dos de los sustratos funcionalizados conjuntamente.

Las celdas de flujo 10, 10', 10'' descritas en la presente pueden utilizarse en una variedad de enfoques o tecnologías de secuenciación, que incluyen técnicas a menudo llamadas como secuenciación por síntesis (SBS), secuenciación de matriz cíclica, secuenciación por ligación, pirosecuenciación, etc. Con cualquiera de estas técnicas y en los ejemplos que utilizan un sustrato moldeado, ya que la capa de molécula funcional 20 y en los cebadores de secuenciación unidos 22 están presentes en las depresiones funcionalizadas (es decir, 14, 14' con el producto químico superficial 20, 22 sobre los mismos) y no sobre las regiones intersticiales 16, se confinará la amplificación a las depresiones funcionalizadas. En otros ejemplos, puede tomar lugar la amplificación a través de una pista de celda de flujo completa.

Como un ejemplo, una reacción de secuenciación por síntesis (SBS) puede ejecutarse en un sistema tal como los sistemas secuenciadores HiSeq^{MR}, HiSeqX^{MR}, MiSeq^{MR}, NovaSeq^{MR}, o NextSeq^{MR} de Illumina (San Diego, CA). En SBS, la extensión de un cebador de ácido nucleico a lo largo de una plantilla de ácido nucleico se monitoriza para determinar la secuencia de nucleótidos en la plantilla. El proceso químico subyacente puede ser polimerización (por ejemplo, catalizada por una enzima de polimerasa) o ligación (por ejemplo, catalizada por una enzima de ligasa). En un proceso SBS basado en polimerasa, particular, los oligonucleótidos etiquetados de forma fluorescente se añaden al cebador 22 (extendiendo así el cebador 22) de una forma dependiente de plantilla de tal forma que la detección del orden y tipo de nucleótidos añadidos al cebador 22

se puede utilizar para determinar la secuencia de la plantilla. Por ejemplo, para iniciar un primer ciclo SBS, se pueden administrar uno o más nucleótidos etiquetados, polimerasa de ADN, etc., en/a través del canal de flujo 30, 30A, etc., que aloja una matriz de cebadores 22. Las depresiones funcionalizadas (es decir, 14, 14' con producto químico superficial 20, 22 sobre las mismas), donde la extensión de cebador provoca que se incorpore un nucleótido etiquetado, se puede detectar a través de un evento de formación de imágenes. Durante un evento de formación de imágenes, un sistema de iluminación (no mostrado) puede proporcionar una luz de excitación a las depresiones funcionalizadas (es decir 14, 14' con producto químico superficial 20, 22 sobre las mismas).

En algunos ejemplos, los nucleótidos pueden incluir además una propiedad de terminación reversible que termina la extensión de cebador adicional una vez que se ha añadido un nucleótido al cebador 22. Por ejemplo, un análogo de nucleótido que tiene una fracción terminadora reversible se puede añadir al cebador 22 de tal forma que no puede presentarse extensión posterior hasta que se administra un agente de desbloqueo para remover la fracción, por lo tanto, para ejemplos que utilizan terminación reversible, se puede administrar un reactivo de desbloqueo al canal de flujo 30, 30A, etc., (antes o después de que se presenta la detección).

Pueden tomar lugar lavados entre los diferentes pasos de administración de fluido. El ciclo SBS entonces se puede repetir n veces para extender el cebador 22 por n nucleótidos, detectando así una secuencia de longitud n .

En tanto que se ha descrito SBS en detalle, se entenderá que las celdas de flujo 10, 10', 10'' descritas en la presente se pueden utilizar con otro protocolo de secuenciación, para genotipado, o en otras aplicaciones químicas y/o

biológicas.

Para ilustrar de forma adicional en la presente descripción, se dan en la presente ejemplos. Se va a entender que estos ejemplos se proporcionan para propósitos ilustrativos y no se van a considerar como que limitan el alcance de la descripción.

En algunos de estos ejemplos, los revestimientos protectores se secan y algunos de los revestimientos protectores están húmedos. Los revestimientos húmedos son llamados como “almacenamiento en húmedo” o “almacenados en húmedo”. En tanto que los revestimientos que se exponen a un proceso de secado eran visiblemente secos y parecían sólidos, se va a entender que pueden haber estado presentes cantidades traza de humedad. Los revestimientos húmedos estaban en forma líquida.

Ejemplos de trabajo no limitantes

Ejemplo 1

Las celdas de flujo de ejemplo (1A y 1B) incluyeron varios canales/pistas de flujo definidos sobre un sustrato de silicio y/o de óxido de tantalio moldeado, donde cada pista estaba en comunicación de fluidos con una pluralidad de concavidades. Se formó una capa PAZAM en cada concavidad, y se injertaron cebadores de 1 μm sobre la capa PAZAM. Por último se formaron revestimientos protectores sobre el producto químico superficial (como se describe más adelante). Algunos de los revestimientos protectores se secaron y uno de los revestimientos protectores estaba húmedo.

Se probó una celda de flujo comparativa. El producto químico superficial entonces fue el mismo que las celdas de flujo de ejemplo. No se formó ningún revestimiento protector sobre el producto químico superficial de la celda de flujo

comparativa.

Se llevó a cabo un primer ensayo de control de calidad HP-TET en cada una de las pistas de cada celda de flujo de ejemplo y comparativa antes de que se añadieran los revestimientos protectores a las celdas de flujo de ejemplo. HP
5 u horquilla define la parte de estructura secundaria de la molécula de ADN utilizada para sondear los cebadores en la superficie de celda de flujo injertada, y TET (o TET+ADN) es un oligonucleótido etiquetado con tinte que tiene secuencia complementaria a los cebadores utilizados. TET se hibridó con los cebadores, el exceso de TET se lavó, y se midió la fluorescencia del tinte unido
10 por detección de fluorescencia.

Después del primer ensayo HP-TET, se prepararon varias soluciones acuosas de un copolímero de injerto de alcohol polivinílico/polietilenglicol (en este ejemplo KOLLICOAT^{MR} IR). Cada solución tuvo una concentración diferente de copolímero que varía de 0.10% a 10% (masa a volumen). Se utilizó un
15 proceso de flujo pasante para introducir una de las soluciones acuosa en una de las pistas de cada una de las celdas de flujo, y a las capas PAZAM y cebadores dentro de las pistas respectivas. La solución acuosa se secó para formar un revestimiento protector. Cada uno de los revestimientos protectores secos tuvo una concentración diferente del copolímero. Estas celdas de ejemplo y celda
20 comparativa se secaron utilizando gas de nitrógeno.

Las celdas de flujo de ejemplo, secas entonces se almacenaron en seco durante 3 días a 60°C (equivalente a almacenamiento en seco durante 1 mes a 25°C o condiciones ambiente) con el revestimiento protector en su lugar.

La celda de flujo sin revestir, comparativa ("sin revestir") se expuso a las
25 mismas condiciones de almacenamiento en seco.

Se formó otro revestimiento protector al introducir una solución amortiguadora de cloruro de sodio-citrato de sodio (SSC) utilizando un proceso de flujo pasante. Por lo tanto, esta celda de flujo de ejemplo se expuso a condiciones de almacenamiento en húmedo en las cuales la solución
5 amortiguadora de cloruro de sodio-citrato de sodio (SSC) a 4°C se dejó remojar sobre el producto químico superficial de celda de flujo.

Después de almacenamiento, se removió el revestimiento protector de las pistas de las celdas de flujo de ejemplo respectivas a través de disolución acuosa durante el lavado, y la celda de flujo almacenada en húmedo se enjuagó. Se llevó
10 a cabo otro ensayo de control de calidad HPTET en cada una de las pistas de cada una de las celdas de flujo de ejemplo y comparativas.

Los resultados de tasa de retención HP-TET se calcularon utilizando los resultados HP-TET antes de revestimiento y después de almacenamiento. Las tasas de retención se muestran en la figura 7. Como se representa, la retención
15 HP-TET incremento en general con el incremento de las concentraciones de copolímero para ambas celdas de flujo 1A y 1B. A o por debajo de 1%, el revestimiento de copolímero no fue tan efectivo como el ejemplo comparativo o el almacenamiento en húmedo. Este ejemplo ilustra que a concentraciones de copolímero que varían de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 10%, el
20 polímero protector mejora la estabilidad de almacenamiento en seco del producto químico superficial en comparación con el producto químico superficial sin revestir almacenado a las mismas condiciones secas y se aproxima a la estabilidad de las condiciones de almacenamiento en húmedo.

Ejemplos 2

25 Las celdas de flujo de ejemplo (dos de cada una de 2A a 2H) incluyeron

una pista definida en un sustrato de silicio revestido con óxido de tantalio. Se formó una capa PAZAM en la pista, y se injertaron cebadores de 1 μm sobre la capa PAZAM. Por último se formaron revestimientos protectores sobre el producto químico superficial. Como se describe más adelante, se probaron dos
5 celdas de flujo para cada tipo de revestimiento protector, y los resultados en la figura 8 son el promedio para las dos celdas de flujo que tienen el mismo tipo de revestimiento protector. Algunos de los revestimientos protectores se secaron (2A a 2H) y se humedeció uno de los revestimientos protectores.

Se probó una celda de flujo comparativa. El producto químico superficial
10 fue el mismo que las celdas de flujo de ejemplo. No se formó ningún revestimiento protector sobre el producto químico superficial de la celda de flujo comparativa.

Se llevó a cabo un primer ensayo de control de calidad HP-TET en cada una de las pistas de las celdas de ejemplo y comparativas antes de que se
15 añadieran los revestimientos protectores a las celdas de flujo de ejemplo.

Después del primer ensayo HP-TET, se prepararon diferentes soluciones acuosas de diferentes materiales de revestimiento protectores, potenciales. Las soluciones se prepararon con sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0.1 % en peso), glicerol 1% en peso, hidroquinona (0.1 % en peso),
20 KOLLICOAT^{MR} IR (1%), polietilenglicol 3000 (1%), (tris(2-carboxietil)fosfina) (TCEP) (0.1 % en peso), Tris Base (pH 7-8) (100 mM), y TWEEN^{MR} 20 (un agente emulsionante no iónico) (1%).

Se utilizó un proceso de flujo pasante para introducir una de las soluciones en dos de las celdas de flujo de ejemplo (es decir, la solución EDTA estuvo en
25 las dos celdas de flujo (colectivamente llamadas como 2A), la solución de glicerol

estuvo en otras dos celdas de flujo (colectivamente llamadas como 2B), la solución de hidroquinona estuvo en dos más celdas de flujo (colectivamente llamadas como 2C), la solución de KOLLICOAT^{MR} IR estuvo en otras dos celdas de flujo (colectivamente llamadas como 2D), la solución de polietilenglicol 3000
5 estuvo en dos celdas de flujo adicionales (colectivamente llamadas como 2E), la solución TCEP estuvo en dos más celdas de flujo (colectivamente llamadas como 2F), la solución de Tris Base estuvo en aún dos más celdas de flujo (colectivamente llamadas como 2G), y la solución de TWEEN^{MR} 20 estuvo en otras dos celdas de flujo (colectivamente llamadas como 2H)), y en las capas
10 PAZAM y cebadores dentro de las celdas de flujo respectivas. Las soluciones acuosas se secaron para formar revestimientos protectores. El secado de las celdas de ejemplo y comparativas se llevó a cabo utilizando gas de nitrógeno.

Las celdas de flujo de ejemplo entonces se almacenaron en seco durante 3 días a 60°C (equivalente a almacenamiento en seco durante 1 mes a 25°C o
15 condiciones ambiente) con el revestimiento protector en su lugar.

Se expuso la celda de flujo sin revestir, comparativa (C1) a las mismas condiciones de almacenamiento en seco.

Se formó otro revestimiento protector al introducir una solución amortiguadora de cloruro de sodio-citrato de sodio (SSC) utilizando un proceso
20 de flujo pasante. Por lo tanto, esta celda de flujo de ejemplo (WC) se expuso a condiciones de almacenamiento en húmedo en las cuales la solución de cloruro de sodio-citrato de sodio (SSC) a 4°C se dejó remojar sobre el producto químico superficial de celda de flujo.

Después de almacenamiento, se removió el revestimiento protector de las
25 pistas de la celda de flujo de ejemplo a través de disolución acuosa durante el

lavado, y se enjuagó la celda de flujo almacenada en húmedo (WC). Se llevó a cabo otro ensayo de control de calidad HP-TET en cada una de las pistas de cada una de las celdas de flujo de ejemplo y comparativas.

Los resultados de retención HP-TET se calcularon utilizando los
5 resultados HP-TET antes de revestimiento y después de almacenamiento. Los datos de retención se muestran en la figura 8. Como se representa, la retención HP-TET para las celdas de flujo con revestimientos de glicerol (2B), el copolímero (2D), el polietilenglicol (2E), y el TCEP (2F) fueron comparables con o mejores que el ejemplo comparativo almacenado en seco (C1) almacenado en
10 condiciones similares. Los resultados para revestimientos 2A, 2C, 2G, y 2H indican que estos revestimientos, a estas concentraciones y/o aplicados por un proceso de flujo pasante, pueden obstaculizar la capacidad de acceso de los cebadores y/o pueden no impedir degradación del producto químico superficial así como los revestimientos 2B y 2D-2F. Se cree que los revestimientos 2A, 2C,
15 2G, y 2H pueden desempeñarse mejor a concentraciones diferentes y/o cuando se aplican por un proceso de revestimiento diferente.

Ejemplo 3

Las celdas de flujo utilizadas en este ejemplo cada una incluyó un sustrato de vidrio no moldeado con 4 pistas definidas sobre el mismo. En una de las
20 celdas de flujo, dos de las pistas (colectivamente llamadas como 3A) se utilizaron como pistas de ejemplo, y dos de las pistas (colectivamente llamadas como C2A) se utilizaron como pistas de ejemplo comparativas. En otras de las celdas de flujo, dos de las pistas (colectivamente llamadas como 3B) se utilizaron como pistas de ejemplo, y dos de las pistas (colectivamente llamadas como C2B) se
25 utilizaron como pistas de ejemplo comparativas. En una tercera de las celdas de

flujo, dos de las pistas (colectivamente llamadas como 3C) se utilizaron como pistas de ejemplo, y dos de las pistas (colectivamente llamadas como C2C) se utilizaron como pistas de ejemplo comparativas.

Se formó una capa PAZAM en cada pista, y se injertaron cebadores sobre la capa PAZAM. En las pistas de ejemplo (3A, 3B, 3C), KOLLICOAT^{MR} IR se formaron revestimientos protectores sobre el producto químico superficial utilizando un proceso de flujo pasante. En las pistas de ejemplo comparativas (C2A, C2B, C2C), no se formó ningún revestimiento protector. El secado de las pistas de ejemplo y las pistas de ejemplo comparativas se llevó a cabo al hacer fluir gas de nitrógeno a través de cada pista durante 30 segundos.

La celda de flujo con pistas de flujo de ejemplo 3A y pistas de flujo comparativas C2A se almacenaron con 84% de humedad relativa en el empaquetamiento durante 7 días y 14 días. La celda de flujo con pistas de flujo de ejemplo 3B y pistas de flujo comparativas C2B se almacenaron con 5% de humedad relativa en el empaquetamiento durante 7 días y 14 días.

Estas celdas de flujo se removieron de almacenamiento y se utilizaron para secuenciación. Las pistas de ejemplo 3A, 3B y las pistas de ejemplo comparativas C2A, C2B se expusieron a pasos de lavado durante secuenciación. Se cree que el lavado remueve al menos parcialmente el revestimiento protector de las pistas de ejemplo 3A, 3B. Sin embargo, también se puede llevar a cabo secuenciación sin remover el revestimiento protector.

La figura 9 muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia para las pistas (3A, 3B, C2A, c2b) después del primer ciclo de secuenciación. Los datos muestran que las intensidades de ciclo 1 se impactaron de forma mínima por las condiciones de almacenamiento de humedad cuando estuvo en su lugar el

revestimiento protector, en comparación cuando no se utilizó el revestimiento protector (es decir, comparar 3A con C2A, y comparar 3B con C2B). Las intensidades de ciclo 1 para las pistas sin revestir C2A, C2B indican que el producto químico superficial decayó como resultado de la exposición a humedad.

- 5 El efecto en la intensidad de 5% de humedad (pistas de flujo 3B) también fue mucho menor que el efecto observado a 84% de humedad (pistas de flujo 3A).

La celda de flujo con pistas de flujo de ejemplo 3CA y pistas de flujo comparativas C2C se almacenaron bajo fluctuaciones de temperatura externas durante entre 2 días y 19 días. La rampa de perfil de temperatura varió de
10 aproximadamente -23°C a aproximadamente 60°C durante cada periodo de 24 horas a lo largo del periodo de tiempo respectivo. De la hora cero a aproximadamente hora 8, se mantuvo la temperatura entre aproximadamente -23°C a -25°C. entonces se elevó la temperatura a aproximadamente 60°C y se mantuvo durante aproximadamente 8 horas. Entonces se disminuyó la
15 temperatura a entre aproximadamente -23°C a -25°C, y de aproximadamente la hora 18 a la hora 24, la temperatura se mantuvo entre aproximadamente -23°C a -25°C.

Esta celda de flujo se removi6 de almacenamiento y se utiliz6 para secuenciación. Las pistas de ejemplo 3C y las pistas de ejemplo comparativas
20 C2C se expusieron a pasos de lavado durante secuenciación, y se cree que estos pasos remueven al menos parcialmente el revestimiento protector de las pistas de ejemplo 3C (aunque se puede llevar a cabo secuenciación antes sin remoción de revestimiento protector).

La figura 10 muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia para
25 las pistas (3C, C2C) después del primer ciclo de secuenciación. Los datos

muestran que la intensidad de ciclo 1 se impactó de forma mínima por fluctuaciones de temperatura externas cuando estaba en su lugar el revestimiento protector, en comparación cuando no se utilizó el revestimiento protector (es decir, comparar 3C con C2C). La intensidad de ciclo 1 para las
5 pistas sin revestir C2C indica que el producto químico superficial decayó como resultado de las fluctuaciones de temperatura externas.

Ejemplo 4

Dos celdas de flujo abiertas (es decir, no se unió ninguna tapa) se utilizaron en este ejemplo. Cada celda de flujo abierta incluyó una pista individual
10 (4A, 4B) definida sobre un sustrato de silicio moldeado, donde cada pista estuvo en comunicación de fluidos con una pluralidad de concavidades. Se formó una capa PAZAM en cada concavidad, y se injertaron cebadores de 1 μm sobre la capa PAZAM.

Antes de la formación de cualquier revestimiento protector, las dos celdas
15 de flujo abiertas expusieron a secuenciación.

Entonces se formaron revestimientos protectores de KOLLICOAT^{MR} IR en la mitad del producto químico superficial de cada celda de flujo abierta utilizando un proceso de revestimiento por inmersión. Las celdas de flujo abiertas se secaron en gas de nitrógeno. Como tal, en este ejemplo, las mitades revestidas
20 son llamadas como ejemplos 4A y 4B y las mitades sin revestir son llamadas como ejemplos comparativos C3 y C4.

Después de que se formaron los revestimientos protectores, la celda de flujo de muestra que incluye lado revestido 4A y lado sin revestir comparativo C3 se expusieron a 6 días de almacenamiento abierto a 60°C. En almacenamiento
25 abierto, el revestimiento protector y el producto químico superficial expuesto del

lado sin revestir se expusieron directamente a la temperatura de 60°C. La celda de flujo de muestra que incluye lado revestido 4B y lado sin revestir comparativo C4 se expusieron a 7 días de almacenamiento abierto a temperatura ambiente.

Las celdas de flujo completas (es decir, mitades previamente revestidas 4A y 4B) y mitades sin revestir (C3 y C4) se removieron de almacenamiento utilizadas para secuenciación. Se cree que los revestimientos protectores se removieron al menos parcialmente de las mitades revestidas 4A y 4B a través de disolución acuosa durante los pasos de lavado.

La figura 11A muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia después del primer ciclo de secuenciación para la celda de flujo que incluye 4A y C3 en el tiempo T0 (es decir, pre-revestimiento en 4A) y después de almacenamiento en tiempo T1. Los datos muestran que la intensidad de ciclo 1 se impactó de forma mínima por almacenamiento abierto a 60°C cuando estuvo en su lugar el revestimiento protector, en comparación con cuando no se utilizó el revestimiento protector (es decir, comparar 4A con C3). La intensidad de ciclo 1 para la mitad sin revestir C3 indica que el producto químico superficial decayó como resultado del almacenamiento abierto.

La figura 11B muestra dos gráficas-la superior ilustra el porcentaje de agrupaciones que pasan a través de un filtro (% de paso de filtro (PF)) y la inferior ilustra la intensidad de fluorescencia después del primer ciclo de secuenciación para la celda de flujo que incluye 4B y C4 en tiempo T0 (es decir, pre-revestimiento en 4B) y dos corridas tomadas después de almacenamiento en tiempo T1. El % de paso de filtro (PF) es la métrica utilizada para describir agrupaciones que pasan un umbral de pureza y se utilizan para procesamiento y análisis adicionales de datos de secuenciación. El % de paso de filtro más alto

da por resultado rendimiento incrementado de agrupaciones únicas utilizadas para datos de secuenciación. Los datos en la figura 11B muestran que el % de paso de filtro se mejoró cuando se utilizó el revestimiento protector (comparar 4B con C4 en tiempos T0 y ambos puntos de datos T1). Los datos en la figura 11B también muestran que la intensidad de ciclo 1 se impactó de forma mínima por el almacenamiento abierto a temperatura ambiente cuando estuvo en su lugar el revestimiento protector, en comparación con cuando no se utilizó el revestimiento protector (es decir, comparar 4B con C4 en tiempos T0 y ambos puntos de datos T1). La intensidad de ciclo 1 para la mitad sin revestir C4 indica que el producto químico superficial decayó como resultado del almacenamiento abierto, incluso a temperatura ambiente.

Ejemplo 5

Una oblea de vidrio, moldeada, abierta tuvo una capa PAZAM formada en cada una de sus concavidades. Después del pulido, se troceó la oblea, y se revistió por rociamiento un revestimiento protector de KOLLICOAT^{MR} IR en una de las celdas troceadas. Una celda troceada comparativa se formó de una forma similar (con un revestimiento PAZAM), excepto que no se formó el revestimiento protector de KOLLICOAT^{MR} IR.

Las celdas troceadas de ejemplo y comparativas se almacenaron durante 1 hora a 20°C, 60°C, y 80°C. Después de almacenamiento, el revestimiento protector se removió de la celda troceada de ejemplo a través de disolución acuosa durante el lavado. Entonces se injertaron cebadores de 1 µm sobre las capas PAZAM de las celdas troceadas de ejemplo y comparativas para formar, respectivamente una celda de flujo de ejemplo y una celda de flujo comparativa.

Se llevó a cabo un ensayo CFR para determinar si se impactó el injerto

de los cebadores por las diferentes condiciones de almacenamiento. Durante un ensayo CFR, se expusieron superficies injertadas con cebador a oligonucleótidos complementarios etiquetados de forma fluorescente (Cal Fluor Red) en una solución amortiguadora. Estos oligonucleótidos se unen a
5 cebadores de unión superficial y se lava el exceso de CFR. La superficie entonces se escanea en un detector fluorescente para medir intensidad CFR sobre la superficie para proporcionar una medición cuantitativa de concentración de los cebadores y salud sobre la superficie. Después de la medición, los oligonucleótidos se remueven de una solución base, suave y se re-escanean las
10 superficies para confirmar que se removió todo el CFR.

Los resultados de intensidad media para la celda de flujo de ejemplo se muestran en la figura 12A y los resultados de intensidad media para la celda de flujo comparativa se muestran en la figura 12B. Claramente, la capacidad de la capa PAZAM sin revestir de la celda de flujo comparativa para injertar los
15 cebadores se afectó de forma perjudicial a exposición a 60°C o temperaturas mayores (figura 12B). La capa PAZAM revestida de la celda de flujo de ejemplo fue capaz de injertar los cebadores mejor a todas las temperaturas probadas que la capa PAZAM sin revestir de la celda troceada, comparativa (comparar figuras 12A y 12B). En tanto que la intensidad media disminuyó tanto para las celdas de
20 flujo de ejemplo como comparativas a 80°C, la celda de flujo de ejemplo pareció degradarse más lento en comparación con la celda de flujo comparativa.

Ejemplo 6

Las celdas de flujo utilizadas en este ejemplo cada una incluyó un sustrato de vidrio no moldeado con cuatro pistas definidas sobre el mismo. En cada una
25 de las celdas de flujo, dos de las pistas fueron pistas de ejemplo que tienen el

revestimiento protector formado sobre las mismas, y dos de las pistas fueron pistas comparativas que no tuvieron el revestimiento protector formado sobre las mismas.

En cada pista de cada celda, se formó una capa PAZAM, y se injertaron
5 cebadores sobre la capa PAZAM utilizando un proceso de flujo pasante. En cada una de las dos pistas de ejemplo de cada celda de flujo, se formó un revestimiento protector de KOLLICOAT^{MR} IR sobre el producto químico superficial utilizando un proceso de flujo pasante. En cada una de las dos pistas de ejemplo comparativas de cada celda de flujo, no se formó el revestimiento
10 protector. El secado de las pistas de ejemplo y las pistas comparativas se llevó a cabo al hacer fluir gas de nitrógeno a través de cada pista durante 30 segundos,

Cada celda de flujo (que incluyen dos pistas de ejemplo y dos pistas de ejemplo, comparativas) se almacenó a una temperatura particular, es decir 25°C, 40°C, 60°C, o 80°C. El número de días durante los cuales se almacenaron las
15 celdas varió de 1 día hasta 120 días.

Las celdas de flujo se removieron de almacenamiento y se utilizaron para secuenciación. Las pistas de ejemplo y las pistas de ejemplo comparativas se expusieron a pasos de lavado durante secuenciación, y se cree que estos pasos remueven al menos parcialmente los revestimientos protectores de las pistas de
20 ejemplo (aunque se puede llevar a cabo secuenciación sin esta remoción).

La figura 13 muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia promedio para los conjuntos de pistas (ejemplo (es decir, 6) o comparativas (es decir, C5)) después del primer ciclo de secuenciación. Los datos de intensidad se muestran para pistas de ejemplo y pistas de ejemplo comparativas, y los datos
25 se grafican por temperatura a la cual se almacenó la celda y el número de días

durante los cuales se almacenó la celda. Los datos muestran claramente que las intensidades de ciclo 1 se impactaron principalmente por las condiciones de almacenamiento a temperatura elevada cuando estaba en su lugar el revestimiento protector, independientemente del número de días de almacenamiento, en comparación cuando no se utilizó el revestimiento protector (es decir, comparar datos etiquetados “6” con datos comparativos etiquetados “C5”). Las intensidades de ciclo 1 para las pistas de ejemplo comparativas, sin revestir indican que el producto químico superficial decayó como resultado de la exposición de temperatura.

10 Ejemplo 7

KOLLICOAT^{MR} IR se revistió por rociamiento en una oblea CMOS moldeada que tiene una superficie de TaO_x. El número de pasos de rociamiento varió a través de la oblea CMOS moldeada para determinar el efecto sobre el grosor del revestimiento resultante. Los resultados se muestran en la figura 14 como la distancia a través del revestimiento protector sobre la oblea en mm (eje x) versus la distancia del grosor de revestimiento protector en μm (eje y). El grosor del revestimiento de polímero incrementó ligeramente conforme se incrementó el número de pasos a través de la oblea, y entonces disminuyó ligeramente conforme se disminuyó el número de pasos. Los datos indican que el revestimiento por rociamiento se puede utilizar para obtener un revestimiento protector con un grosor controlado.

Ejemplo 8

Una oblea CMOS moldeada, abierta tuvo una capa PAZAM en formada en cada una de sus concavidades. Después del pulido, la oblea se troceo a celdas de 700 nm, y se revistió por rociamiento un revestimiento protector de

KOLLICOAT^{MR} IR sobre tres de las celdas troceadas. Las celdas troceadas, comparativas se formaron de una forma similar (con un revestimiento PAZAM) excepto que no se formó el revestimiento protector de KOLLICOAT^{MR} IR.

Una celda troceada de ejemplo y una celda troceada comparativa se
5 almacenaron durante 28 días, o 35 días, o 71 días a temperatura ambiente (es decir, ~25°C). Después de almacenamiento, los revestimientos protectores se removieron de la celda troceada de ejemplo a través de disolución acuosa durante el lavado. Entonces se injertaron cebadores de 1 µm sobre las capas PAZAM de las celdas troceadas de ejemplo y comparativas para formar,
10 respectivamente celdas de flujo de ejemplo (9A (almacenamiento de 28 días), 9B (almacenamiento de 35 días), 9C (almacenamiento de 71 días)) y celdas de flujo comparativas (C7A (almacenamiento de 28 días), C7B (almacenamiento de 35 días), C7C (almacenamiento de 71 días)).

Entonces se llevó a cabo secuenciación en cada una de las celdas. Los
15 pasos de lavado removieron el revestimiento protector de las celdas de flujo de ejemplo.

La figura 15 muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia después del primer ciclo de secuenciación. En cada uno de los periodos de almacenamiento, las celdas de flujo comparativas C7A, C7B, C7C (almacenadas
20 sin el revestimiento protector) exhibieron intensidad reducida cuando se compararon con las celdas de flujo de ejemplo 9A, 9B, 9C (almacenadas con el revestimiento protector). Las intensidades de ciclo 1 para las celdas de flujo sin revestir C7A, C7B, C7C indican que el producto químico superficial decayó como resultado de la exposición, incluso a temperatura ambiente.

25 Ejemplo 9

Una oblea de silicio moldeada, abierta tubo una capa PAZAM formada en cada de sus concavidades. Después del pulido, la oblea se troceo para formar celdas, y se revistió por rociamiento de forma selectiva a un revestimiento protector de KOLLICOAT^{MR} IR sobre dos de las celdas troceadas, de tal forma que una región de unión permaneció expuesta. Se formaron celdas troceadas, comparativas de una forma similar (con un revestimiento PAZAM), excepto que no se formó el revestimiento protector de KOLLICOAT^{MR} IR. Se unieron tapas a las regiones de unión respectivas de las celdas troceadas de ejemplo y comparativas para formar celdas de flujo. Los revestimientos protectores de KOLLICOAT^{MR} IR iniciales entonces se removieron de las capas PAZAM dentro de las celdas de flujo de ejemplo a través de disolución acuosa utilizando un proceso de flujo pasante.

Entonces se injertaron cebadores en cada una de las capa PAZAM dentro de cada una de las celdas de flujo de ejemplo y comparativas utilizando un proceso de flujo pasante.

Después del injerto de cebador, se formó otro revestimiento protector de KOLLICOAT^{MR} IR sobre los cebadores y capas PAZAM dentro de las celdas de flujo de ejemplo a través de un proceso de flujo pasante y secado.

Las celdas de flujo de ejemplo (10A y 10B) entonces se almacenaron en seco durante 2 semanas a 6 semanas a 30°C con el revestimiento protector en su lugar. Dos celdas de flujo sin revestir, comparativas (C8A, C8B) se expusieron a las misma condiciones de almacenamiento en seco (almacenamiento de 2 semanas o almacenamiento de 6 semanas a 30°C), y la otra celda de flujo de ejemplo (WC2) se expuso a condiciones de almacenamiento en húmedo durante 6 semanas, durante las cuales se dejó la solución amortiguadora de cloruro de

sodio-citrato de sodio (SSC) remojar a 4°C sobre el producto químico superficial de celda de flujo.

Después de almacenamiento, entonces se llevó a cabo secuenciación en cada una de las celdas. Durante los pasos de lavado, se cree que el
5 revestimiento protector se removió al menos parcialmente de las celdas de flujo de ejemplo 10A, 10B, y se enjuagó la solución amortiguadora SSC de la celda de flujo almacenada en húmedo WC2.

La figura 16 muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia después del primer ciclo de secuenciación. En cada uno de los periodos de
10 almacenamiento, las celdas de flujo comparativas C8A, C8B (almacenadas en condiciones secas sin el revestimiento protector) exhibieron intensidad reducida cuando se comparan con las celdas de flujo de ejemplo 10A, 10B (almacenadas con el revestimiento protector). A las 6 semanas, el revestimiento protector seco proporcionó buena protección para el producto químico superficial como el
15 revestimiento protector de almacenamiento en húmedo (comparar 10B con WC2).

Ejemplo 10

Sustratos revestidos con óxido de tantalio, moldeados, de caras abiertas tuvieron una capa PAZAM formada en cada una de las concavidades, y se
20 injertaron cebadores sobre las capas PAZAM utilizando un proceso de flujo pasante. También se probaron celdas de flujo comparativas. El producto químico superficial fue el mismo que las celdas de flujo de ejemplo. No se formó ningún revestimiento protector sobre el producto químico superficial de las celdas de flujo comparativas,

25 Se llevó a cabo un primer ensayo CFR antes de que se formara algún

revestimiento protector sobre las celdas de flujo de ejemplo.

Después del primer ensayo CFR, se prepararon diferentes soluciones acuosas de diferentes materiales de revestimiento protector, potenciales. Las soluciones se prepararon con sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), polietilenglicol, (tris(2-carboxietil)fosfina) (TCEP), tris(3-hidroxipropil triazolilmetil)amina (TPTA), tris(hidroximetil)aminometano con EDTA (solución amortiguadora TE), y sal disódica de ácido batofenantrolinadisulfónico (Baño). Cada solución tuvo una concentración como se muestra en la tabla 1. Las soluciones acuosas se aplicaron al acumular las soluciones sobre las superficies de las celdas de flujo de ejemplo y se permitió que las soluciones se evaporaron para formar los revestimientos. Las celdas de flujo ejemplo entonces se almacenaron en seco durante 11 días a 4°C o a temperatura ambiente. Otra celda de flujo de ejemplo fue una celda de almacenamiento en húmedo. La siguiente tabla 1 identifica las diferentes celdas probadas y las condiciones a las cuales se probaron.

Tabla 1

Identificador	Revestimiento protector	Condición de almacenamiento	
		4°C	Temperatura ambiente (TA)
WC3	almacenamiento en húmedo	si	no

		Condición de almacenamiento	
C11 (ejemplo comparativo)	ninguno	si	no
11A	EDTA 0.5M	si	no
11B	PEG 4.4 % en peso	si	no
11C	TCEP 0.8 % en peso	si	no
11D	THPTA 1.0 % en peso	si	no
11E	1x solución amortiguadora TE	si	no
C12 (ejemplo comparativo)	ninguno	no	si
11F	1x solución amortiguadora TE	no	si
11G	1.6 % en peso Baño	no	si
11H	EDTA 0.5M	no	si
11I	PEG 4.4 % en peso	no	si
11J	TCEP 0.8 % en peso	no	si
11K	THPTA 1.0 % en peso	no	si

La celda de flujo sin revestir comparativa C11 y C12 expuestas a las mismas condiciones de almacenamiento en seco, respectivamente, como las celdas de ejemplo almacenadas en seco a 4°C y a temperatura ambiente en seco. La otra celda de flujo WC3 se expuso a condiciones de almacenamiento en húmedo en las cuales la solución amortiguadora de cloruro de sodio-citrato de sodio SSC se dejó remojar a 4°C sobre el producto químico superficial de celda de flujo.

Después de almacenamiento a las condiciones respectivas, se removió el revestimiento protector de cada una de las celdas de flujo de ejemplo (11A a 11K) a través de disolución acuosa durante lavado, y se enjuagó la celda de flujo almacenada en húmedo WC3. Se llevó a cabo otro ensayo de control de calidad CFR en cada una de las celdas de flujo de ejemplo y comparativa.

Los resultados mostrados en la figura 17 son los resultados CFR de día 11 divididos por los resultados T0 CFR para cada uno de los ejemplos y ejemplos comparativos. Como se representa, la retención CFR para las celdas de flujo con cada uno de los revestimientos protectores, secos fueron mejores que los ejemplos comparativos almacenados en seco almacenados en condiciones similares, y estuvieron a la par con las condiciones de almacenamiento en húmedo.

Ejemplo 11

Sustratos de silicio moldeados, de caras abiertas tuvieron una capa PAZAM formada en cada una de sus concavidades. Después del pulido, entonces se injertaron cebadores de 1 μm sobre las capas PAZAM. Se formó un ejemplo comparativo de una forma similar.

Se llevó a cabo un primer ensayo CFR antes de que se formara cualquier revestimiento protector sobre las celdas de flujo de caras abiertas, de ejemplo. Estos datos se muestran en la figura 18 como T0.

Después del primer ensayo CFR, se preparó una solución acuosa de
5 KOLLICOAT^{MR} IR y se utilizó para formar revestimientos protector revestidos por rociamiento sobre las celdas de caras abiertas, de ejemplo.

Las celdas de flujo de caras abiertas de ejemplo entonces se almacenaron en seco durante 1 día o 2 días a 60°C.

Entonces se llevó a cabo secuenciación en cada una de las celdas de
10 caras abiertas después de sus periodos de almacenamiento respectivos, y se removieron los revestimientos protectores durante los pasos de lavado.

La figura 18 muestra una gráfica de barras de la retención CFR (%
relación de la señal CFR en día X (X = 1 o 2) dividida por la señal en día 0)
después se llevó a cabo el primer ciclo de secuenciación después de 1 día de
15 almacenamiento y dos días de almacenamiento. En cada uno de los periodos de almacenamiento, las celdas de flujo comparativas C13 (almacenadas sin el revestimiento protector) exhibieron retención CFR significativamente reducida cuando se compararon con las celdas de flujo de ejemplo 12 (almacenadas con el revestimiento protector). Después de 1 día de almacenamiento, el CFR de la
20 celda de flujo comparativa cayó 40%.

Ejemplo 12

Una oblea CMOS moldeada tuvo una capa PAZAM formada en cada una de sus concavidades. Después del pulido, se revistieron por rociamiento revestimientos de KOLLICOAT^{MR} IR de diferentes grosores sobre la oblea CMOS
25 moldeada en concavidades respectivas (y las capas PAZAM en las mismas) de

la oblea CMOS moldeada. La solución utilizada para rociar selectivamente los revestimientos de KOLLICOAT^{MR} IR incluyó aproximadamente 5% de KOLLICOAT^{MR} IR, aproximadamente 5% de etanol, y aproximadamente 90% de agua. Los grosores de los diferentes revestimientos variaron de 1.708 μm a 11.73 μm . otra porción de la oblea permaneció sin revestir, y se utilizó como un ejemplo comparativo.

La oblea (que incluye porciones de ejemplo y porción de ejemplo comparativa) entonces se almacenó en seco a 40°C durante 2 días.

Los revestimientos respectivos se removieron de la oblea a través de disolución acuosa, y entonces se remojaron cebadores injertados en las capas PAZAM en las concavidades. Entonces se llevó a cabo un ensayo CFR.

El porcentaje de incremento de intensidad, con respecto a la porción de ejemplo comparativa, se muestra para cada una de las porciones de ejemplo de la oblea que se había revestido con un revestimiento de KOLLICOAT^{MR} IR. Los resultados se muestran en la figura 19 y se etiquetan por el grosor del revestimiento de KOLLICOAT^{MR} IR que se ha utilizado. Los resultados indican que el grosor del revestimiento protector no parece que afecte la funcionalidad para conservar el desempeño de la capa PAZAM para injertar cebadores después de que se remueve el revestimiento protector.

Ejemplo 13

La celda de flujo de ejemplo incluyó ocho pistas definidas sobre un sustrato de silicio moldeado, donde cada pista estuvo en comunicación de fluidos con una pluralidad de concavidades. Se formó una capa PAZAM en cada concavidad, y se injertaron cebadores de 1 μm sobre la capa PAZAM.

Por último se formaron revestimientos protectores sobre el producto

químico superficial en cuatro de las ocho pistas. De forma más particular, cuatro de las ocho pistas se revistieron con una solución que incluye aproximadamente 5% de KOLLICOAT^{MR} IR, aproximadamente 5% de etanol, y aproximadamente 90% de agua. La celda se secó utilizando vacío seguido por 30 segundos de
5 exposición a gas de nitrógeno. La celda de flujo se almacenó durante 2 días a 60°C.

Las otras cuatro pistas fueron pistas de flujo comparativas. El producto químico superficial en las pistas de flujo comparativas fue el mismo que las pistas de flujo de ejemplo, excepto que se formaron revestimientos protectores sobre
10 el producto químico superficial de las pistas de flujo comparativas.

Después de almacenamiento, se llevó a cabo secuenciación en cada una de las pistas de flujo de ejemplo (colectivamente llamadas como 13) y las pistas de flujo de ejemplo comparativas (colectivamente llamadas como C14). Se removi6 el revestimiento protector utilizando un lavado acuoso como parte de la
15 secuenciación.

La figura 20 muestra una gráfica de la intensidad de fluorescencia promedio para las pistas de ejemplo (13) y las pistas de ejemplo comparativas (C14) para dos lecturas después del primer ciclo de secuenciación. Como se representa, el revestimiento protector protegió las pistas de ejemplo de la celda
20 de flujo contra una disminución significativa en intensidad C1.

Ejemplo 14

La celda de flujo de ejemplo incluyó 8 pistas definidas sobre un sustrato de silicio moldeado, donde cada pista estuvo en comunicación de fluidos con una pluralidad de concavidades. Se formó una capa PAZAM en cada concavidad, y
25 se injertaron cebadores de 1 µm sobre la capa PAZAM.

Se preparó una mezcla de injerto de cebador con diferentes cantidades de KOLLICOAT^{MR} IR que varían de 5% a 0.1%, y se aleatorizó entre las 8 pistas sobre la celda de flujo. Se permitió que esta mezcla de injerto se incubara y entonces se secó la celda utilizando vacío seguido por 30 segundos de
5 exposición a gas de nitrógeno en cada agujero/orificio.

Los revestimientos protectores se removieron a través de disolución acuosa, y se llevó a cabo un ensayo CFR.

La figura 21 muestra una gráfica del CFR relativo versus el porcentaje de KOLLICOAT^{MR} IR. Los datos CFR relativamente consistentes indican que los
10 cebadores se pueden injertar al mismo tiempo que se deposita el revestimiento protector. Este ejemplo proporciona evidencia que el revestimiento no afecta de forma perjudicial el producto químico de deposición de cebador utilizado en este ejemplo.

Ejemplo 15

15 Las tres celdas de flujo en este ejemplo incluyeron ocho pistas definidas sobre un sustrato de silicio moldeado, donde cada pista estuvo en comunicación de fluidos con una pluralidad de concavidades. Se formó una capa PAZAM en cada concavidad, y se injertaron cebadores de 1 μm sobre la capa PAZAM.

Se formaron revestimientos protectores de poliacrilamida sobre el
20 producto químico superficial en una de las ocho pistas. Se formaron revestimientos comparativos (diferentes polímeros catiónicos solubles en agua) sobre el producto químico superficial en cinco de las ocho pistas, y una de las ocho pistas se dejó sin revestir. Los revestimientos comparativos fueron diferentes polímeros catiónicos. La siguiente tabla 2 identifica las diferentes
25 celdas probadas y la concentración a la cual se probaron.

Tabla 2

Identificador	Revestimiento protector	Concentración (%)		
		FC1	FC2	FC3
Sin revestimiento (ejemplo comparativo)	Ninguno	NA	NA	NA
14	Poliacrilamida	0.01	0.1	1
C15A (ejemplo comparativo)	Luviquat ^{MR} HOLD	0.01	0.1	1
C15B (ejemplo comparativo)	Luviquat ^{MR} FC 370	0.01	0.1	1
C15C (ejemplo comparativo)	Luviquat ^{MR} FC 550	0.01	0.1	1
C15D (ejemplo comparativo)	Poliquaternio-10	0.01	0.1	1
C15E (ejemplo comparativo)	Poli(etilenimina) (PEI)	0.01	0.1	1

Se formaron los revestimientos a través de un proceso de flujo pasante, y se secaron utilizando 30 segundos de exposición a gas de nitrógeno. Se lavaron las celdas.

Se llevó a cabo agrupación en una de las pistas de flujo. Se cargó una biblioteca de secuenciación en cada pista de flujo, y se capturaron fragmentos por los cebadores complementarios. Cada fragmento se amplificó en agrupaciones clonales distintas. Se midió la intensidad, y la figura 22 ilustra los

resultados como unidades de fluorescencia arbitrarias, que cuantifican la cantidad de ADN bicatenario presente sobre las superficies de pista de celda de flujo. Como se representa, el revestimiento protector protegió la pista de ejemplo, en tanto que los polímeros catiónicos obstaculizaron la agrupación (comparar 14
5 con cada uno de C15A a C15E). Los polímeros catiónicos se unieron probablemente a PAZAM y/o el producto químico superficial de cebador.

Notas adicionales

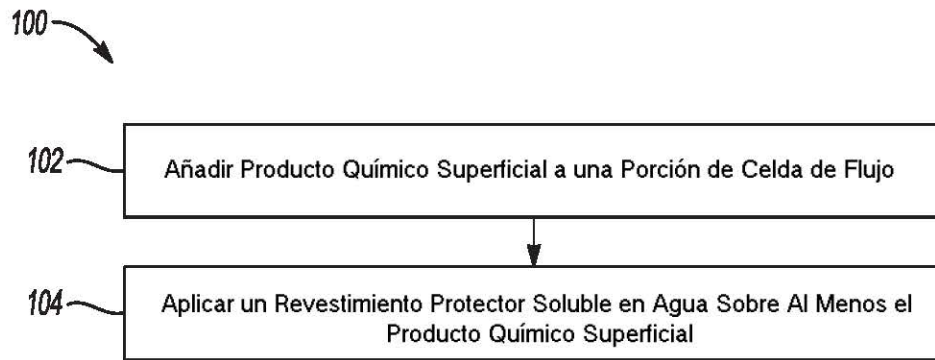
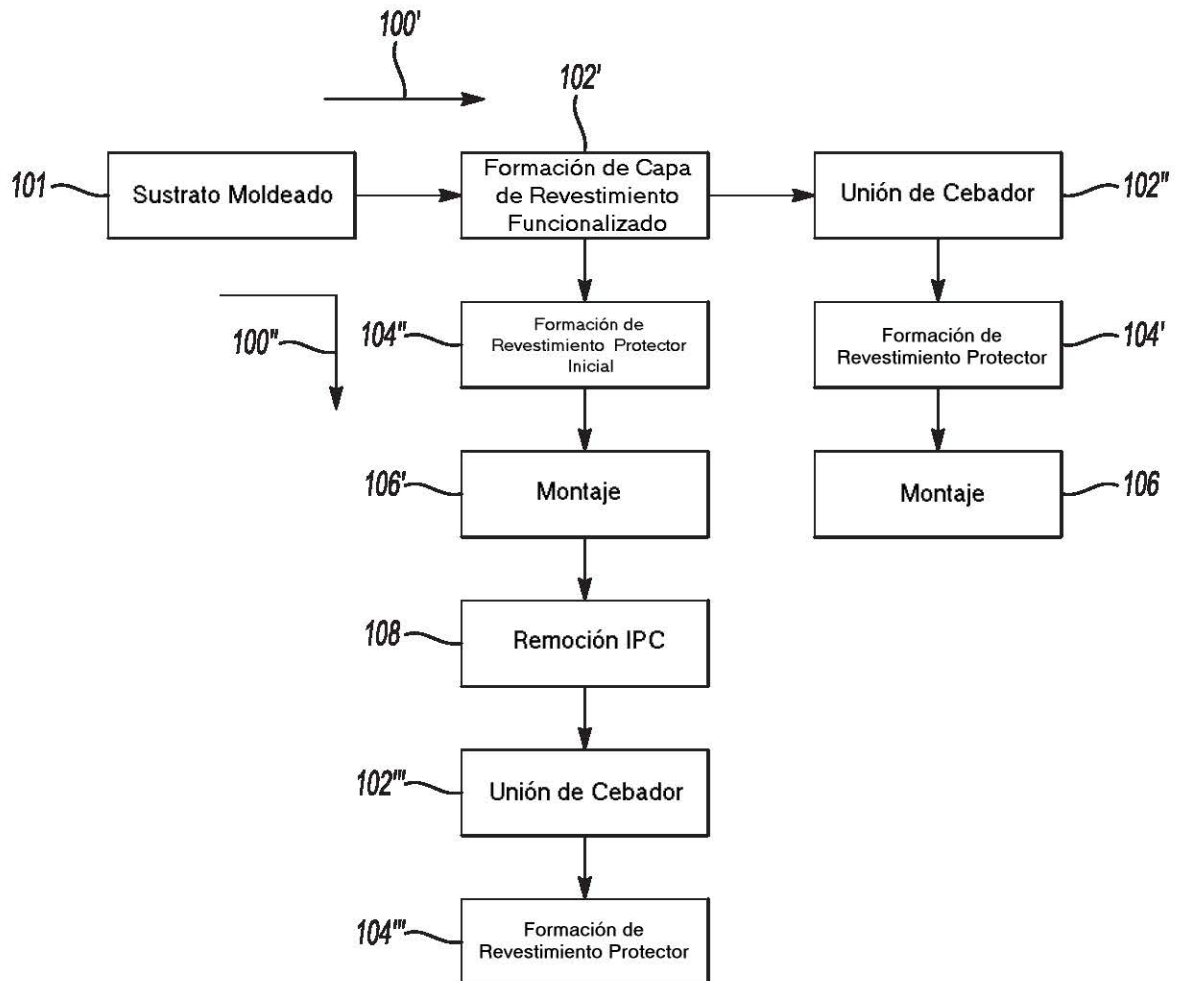
Se debe señalar que todas las combinaciones de los conceptos anteriores y conceptos adicionales analizados en más detalle más adelante (dado que estos
10 componentes no son mutuamente inconsistentes) se contempla como que son parte de la materia inventiva descrita en la presente. En particular, todas las combinaciones de la materia reivindicada que aparece al final de esta descripción se contemplan como que son parte de la materia inventiva descrita en la presente. También se debe apreciar que la terminología empleada
15 explícitamente en la presente que también puede aparecer en cualquier descripción incorporada como referencia se le debe conceder un significado más consistente con los conceptos particulares descritos en la presente.

La referencia a lo largo de la especificación a “un ejemplo”, “otro ejemplo”, “un ejemplo”, etc., significa que un elemento particular (por ejemplo,
20 característica, estructura y/o rasgo) descrito junto con el ejemplo está incluido en al menos un ejemplo descrito en la presente, y puede o no estar presente en otros ejemplos. Además, se va a entender que los elementos descritos para cualquier ejemplo se pueden combinar de cualquier forma adecuada en los diferentes ejemplos al menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

25 Se va a entender que los intervalos provistos en la presente incluyen el

intervalo indicado y cualquier valor o sub-intervalo dentro del intervalo indicado, como si los valores o sub-intervalos dentro del intervalo indicado se mencionaron explícitamente. Por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 200 mm a aproximadamente 300 mm, se debe interpretar que incluye no solo los límites explícitamente mencionados de aproximadamente 200 mm a aproximadamente 300 mm, sino también incluyen valores individuales, tal como aproximadamente 208 mm, aproximadamente 245 mm, aproximadamente 275. 5 mm, etc., y sub-intervalos, tal como de aproximadamente 225 mm a aproximadamente 290 mm, de aproximadamente 235 mm a aproximadamente 280 mm, etc. Además, cuando se utiliza “aproximadamente” y/o “sustancialmente” para describir un valor, se entiende que abarca variaciones menores (hasta +/- 10%) del valor indicado.

En tanto que se han descrito diferentes ejemplos en detalle, se va a entender que se pueden modificar los ejemplos descritos. Por lo tanto, la descripción anterior se va a considerar no limitante.

**Fig-1****Fig-2**

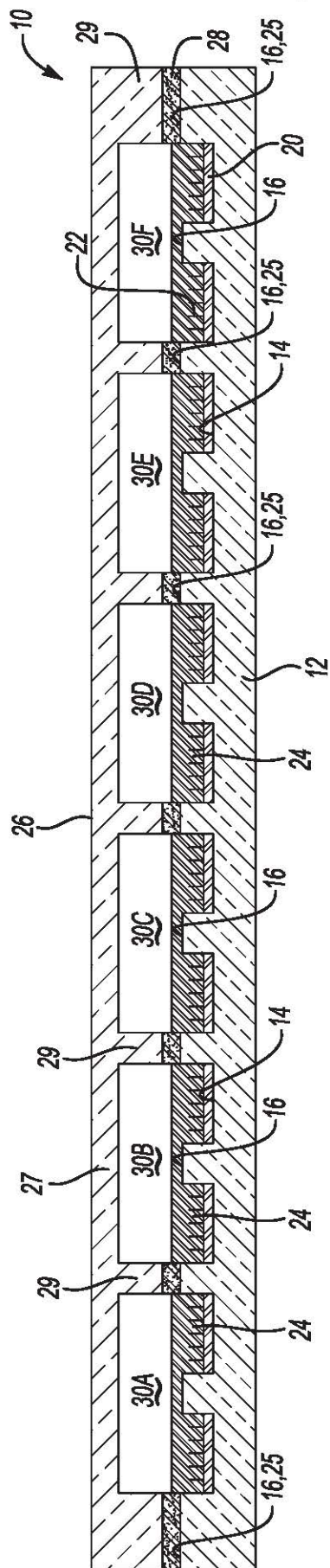


Fig-3

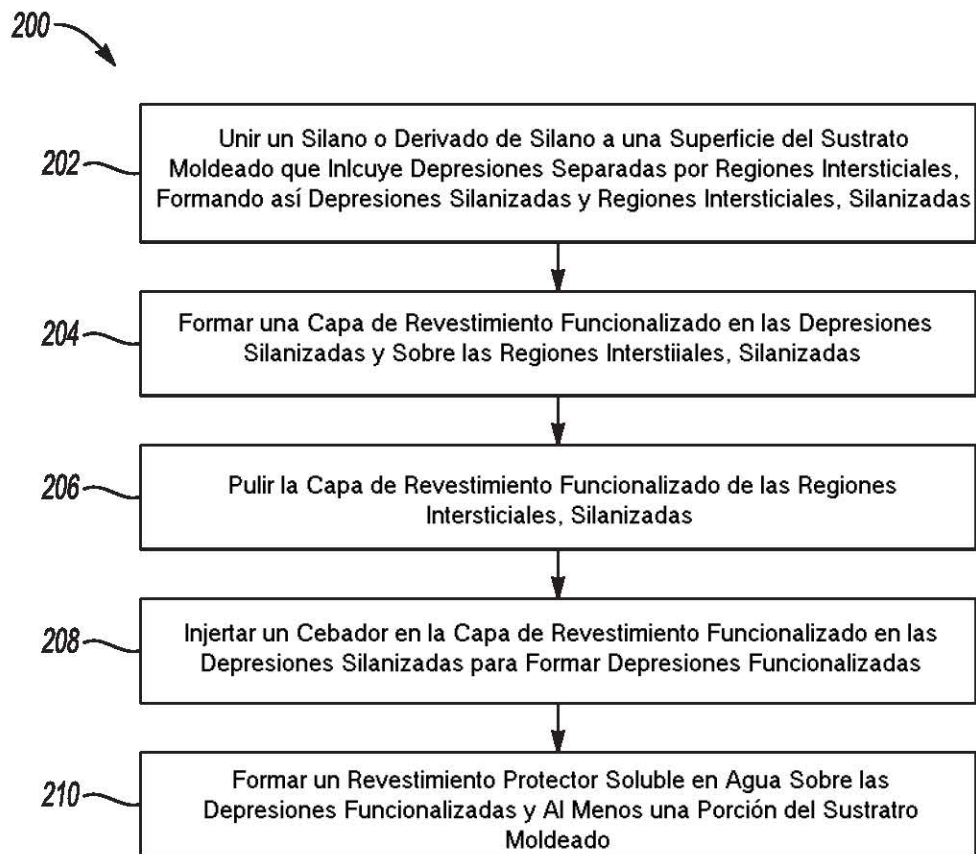


Fig-4

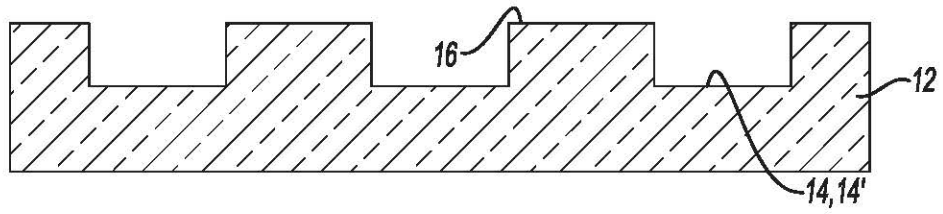


Fig-5A

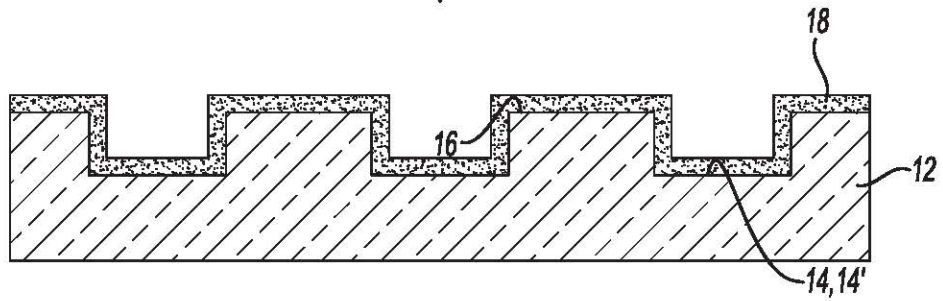


Fig-5B

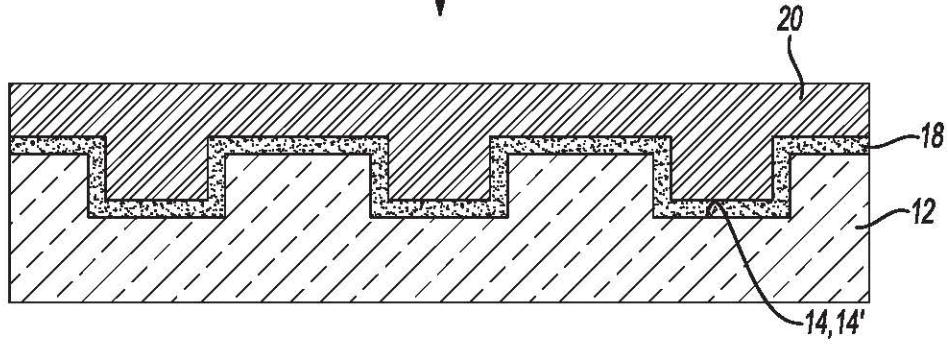


Fig-5C

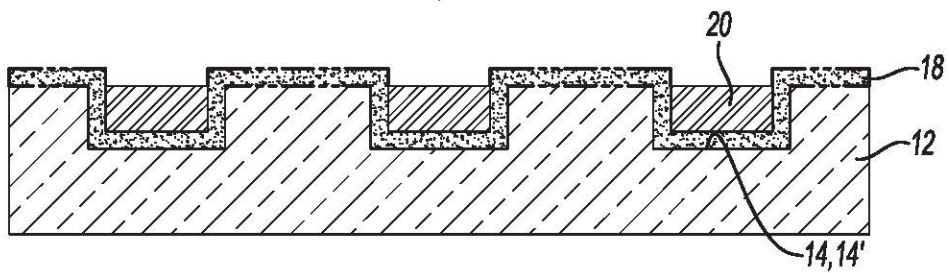


Fig-5D

To Fig 5E

To Fig 5I

De Fig. 5D

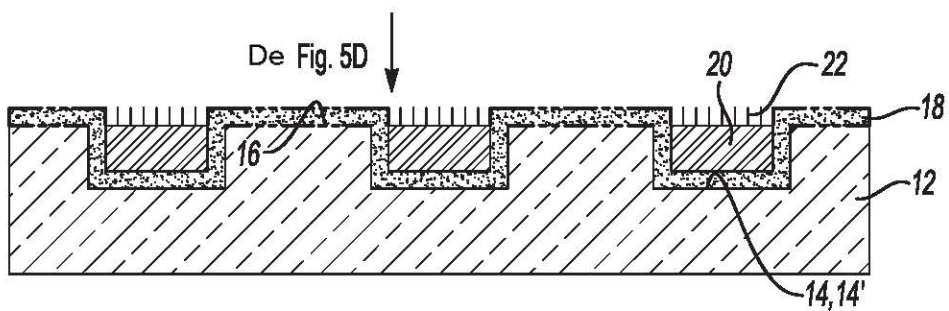


Fig-5E

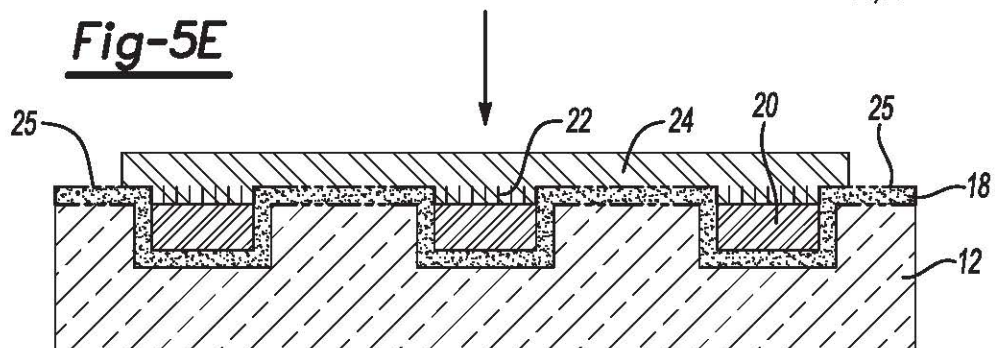


Fig-5F

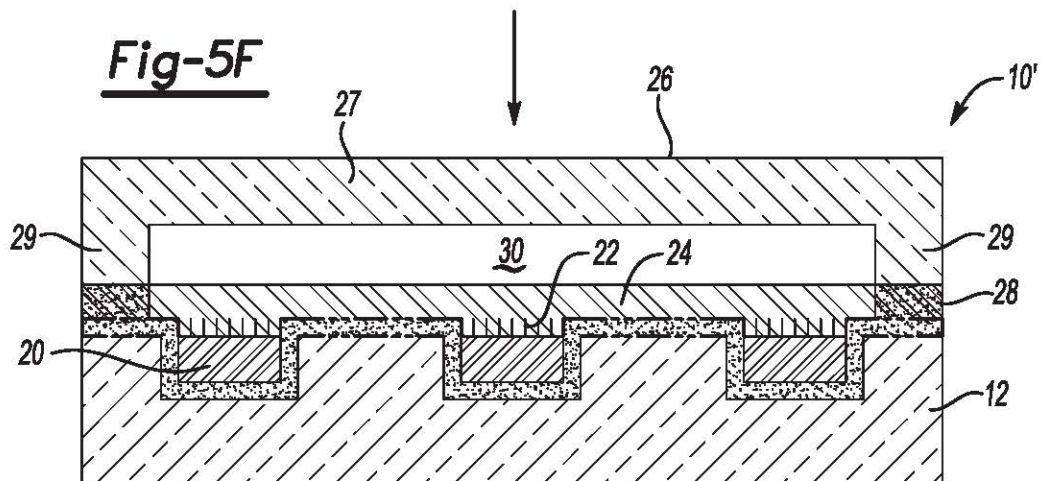


Fig-5G

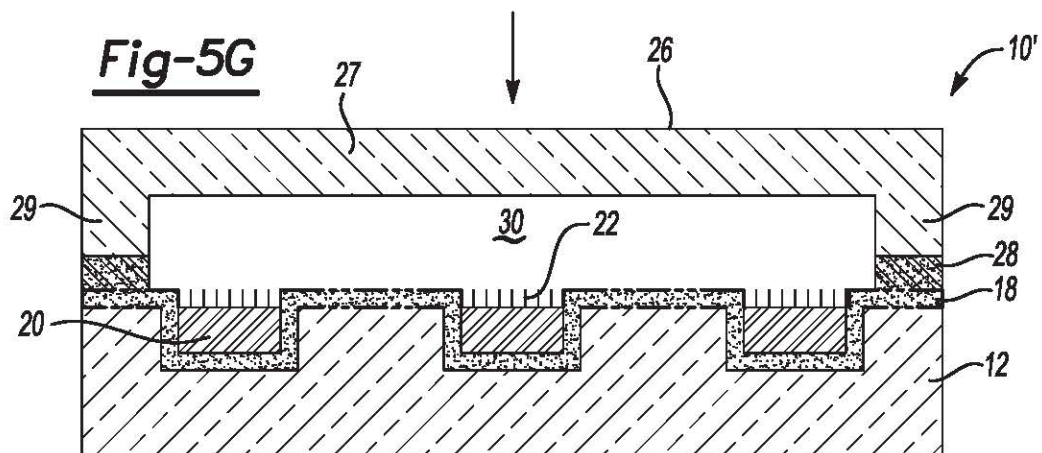


Fig-5H

6/16

De Fig. 5D

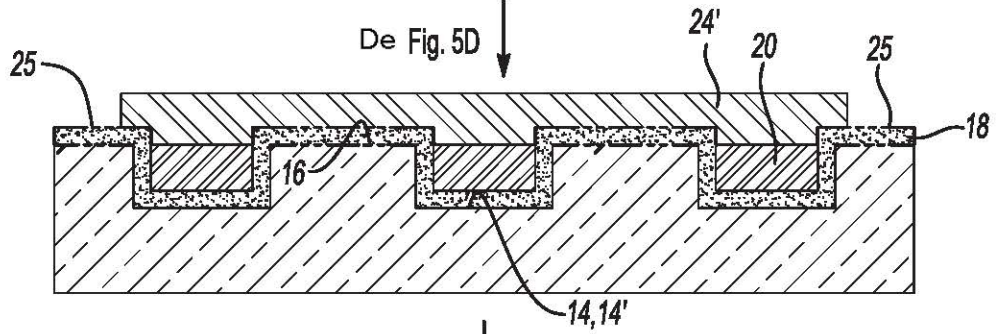


Fig-5I

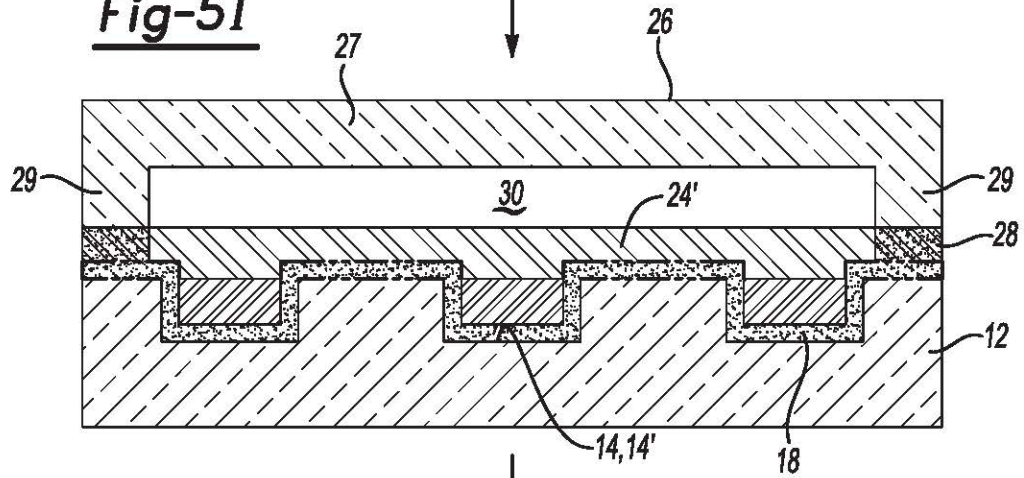


Fig-5J

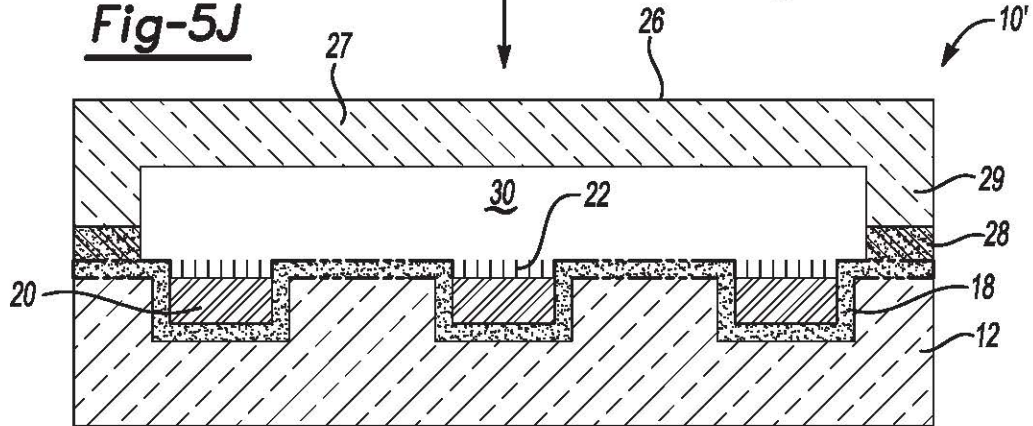


Fig-5K

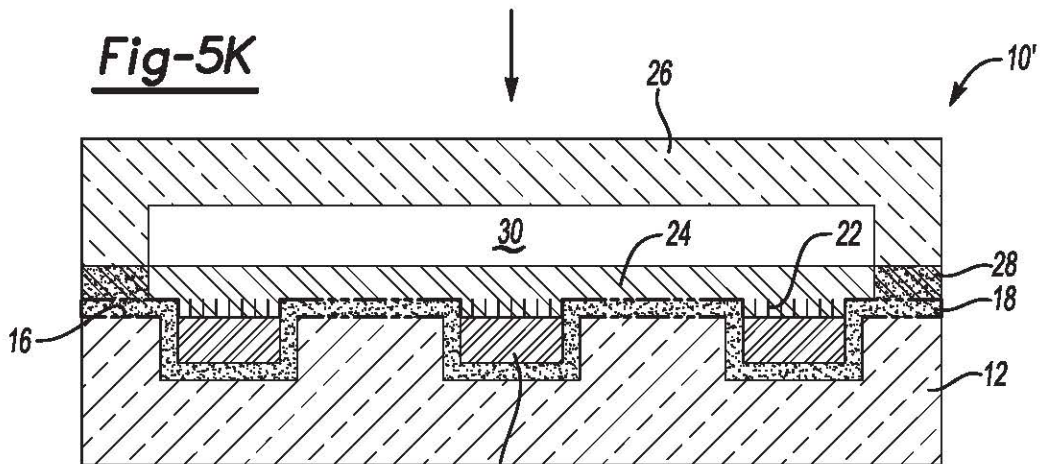


Fig-5L

20

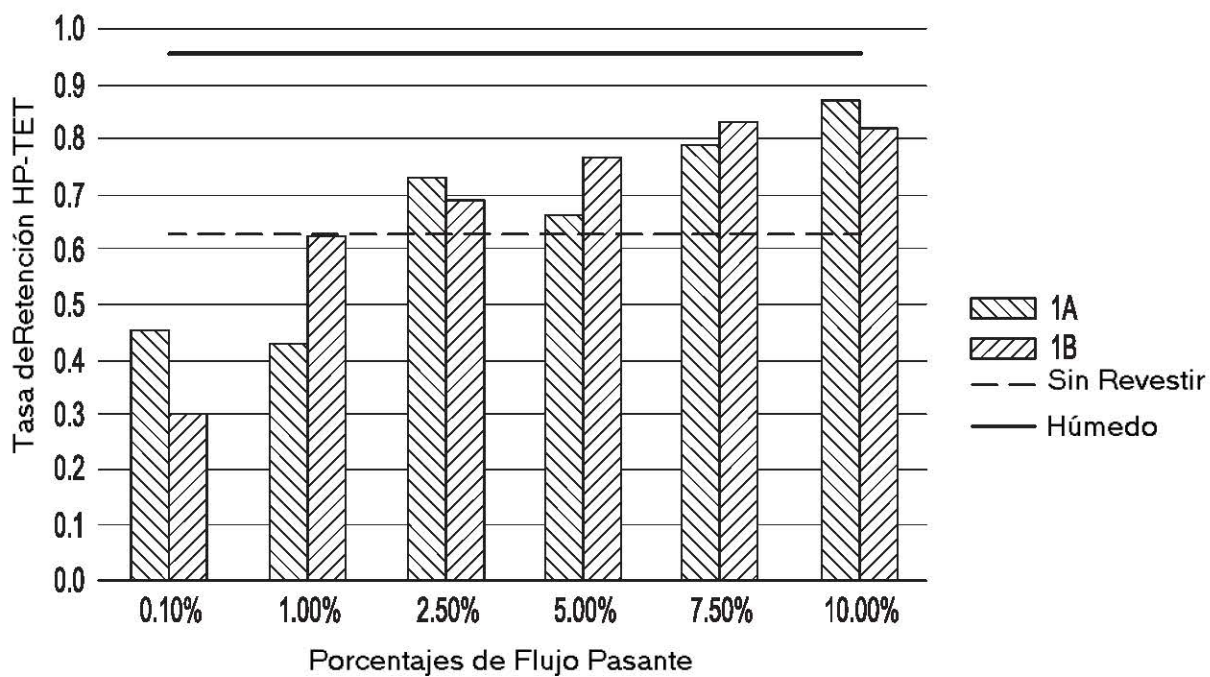
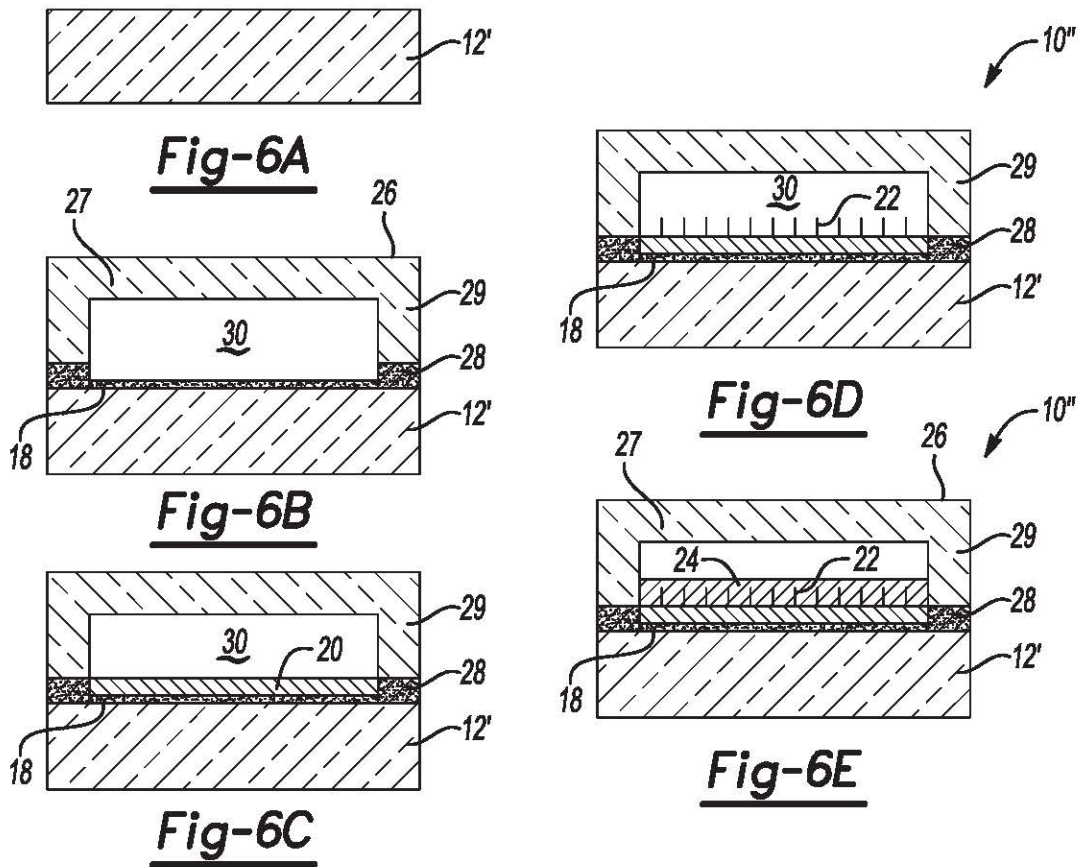
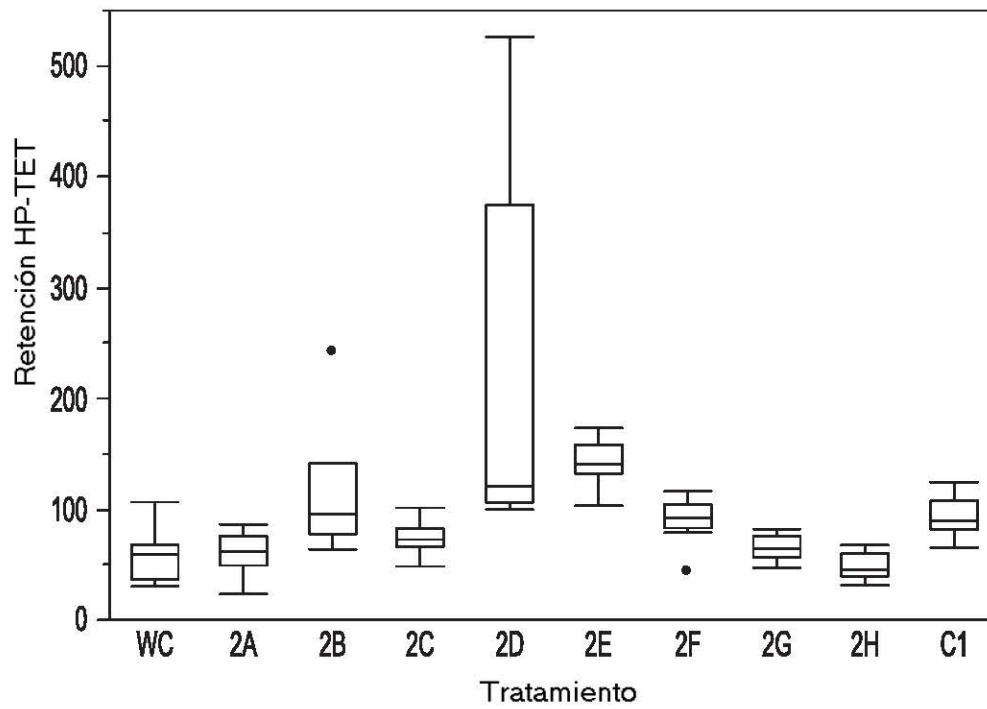
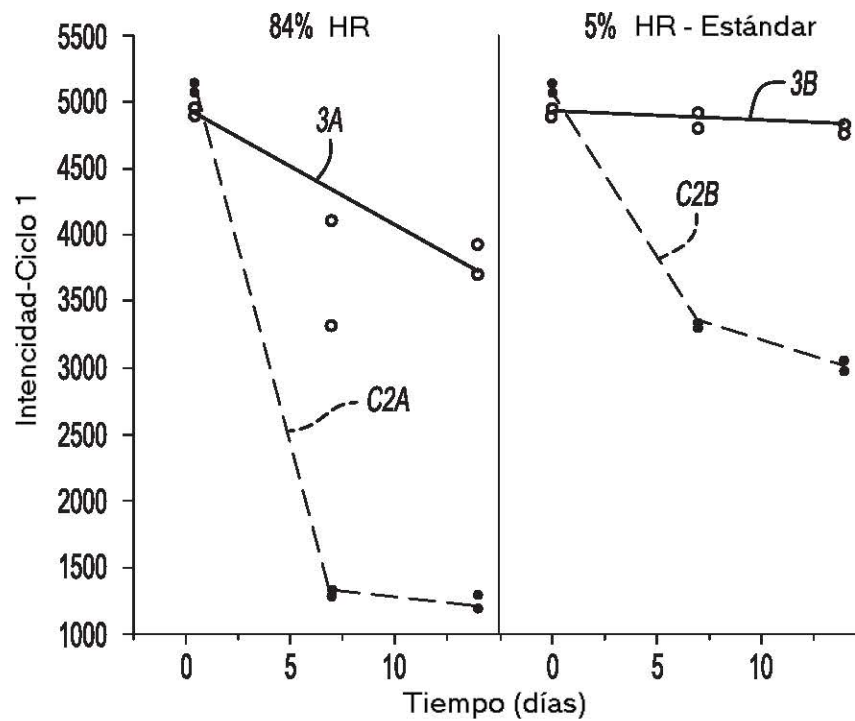


Fig-7

**Fig-8****Fig-9**

9/16

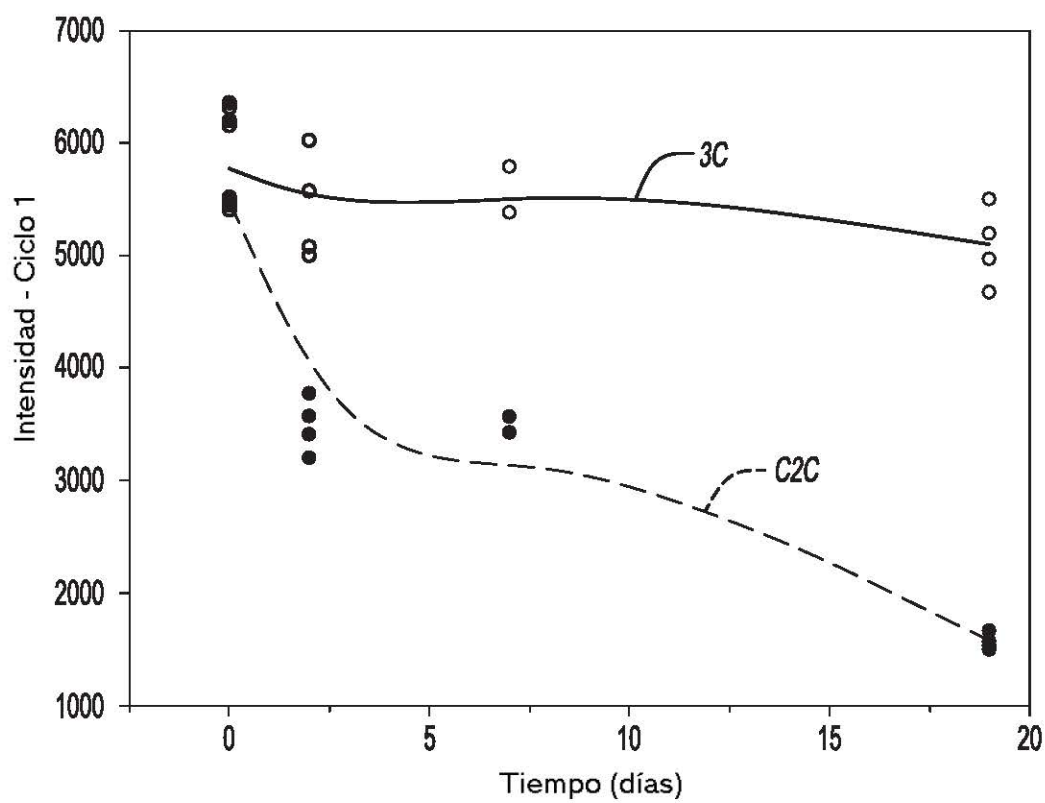


Fig-10

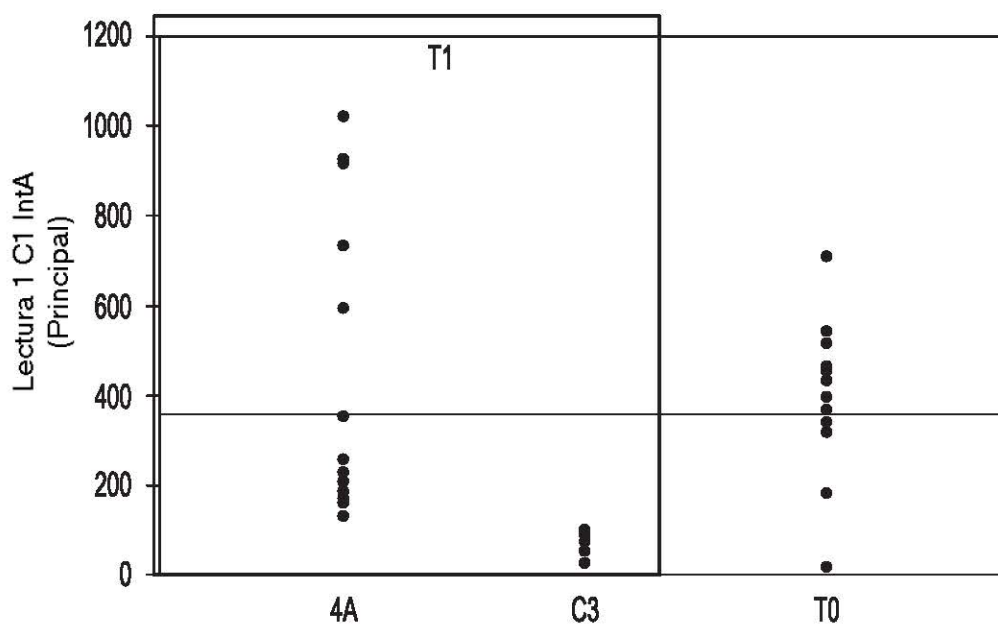
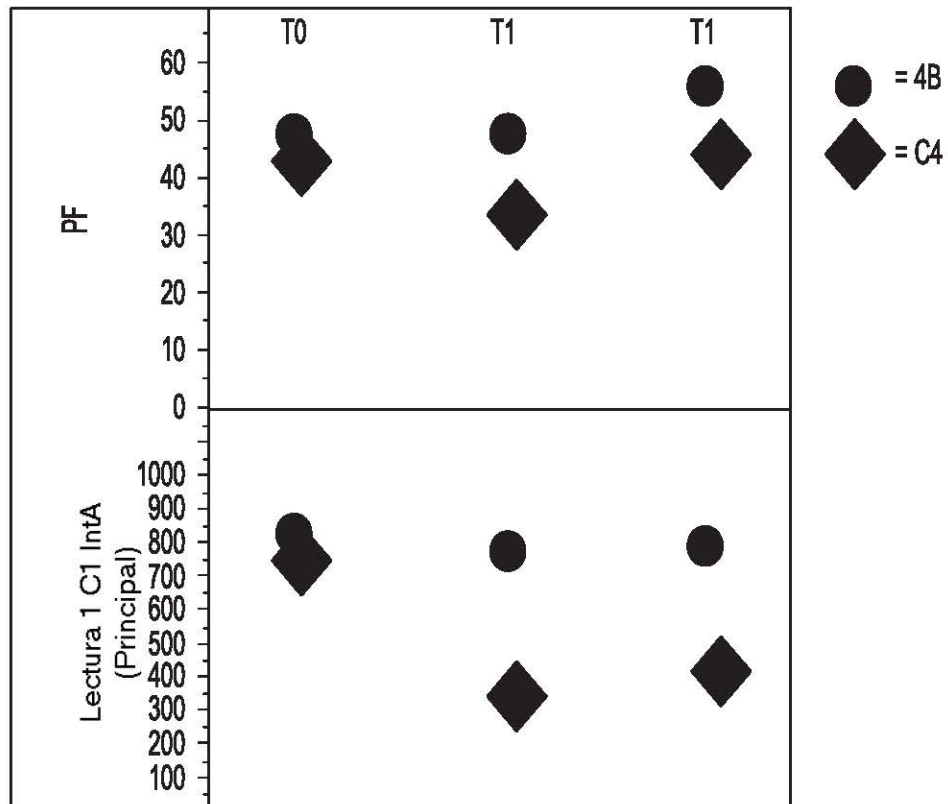
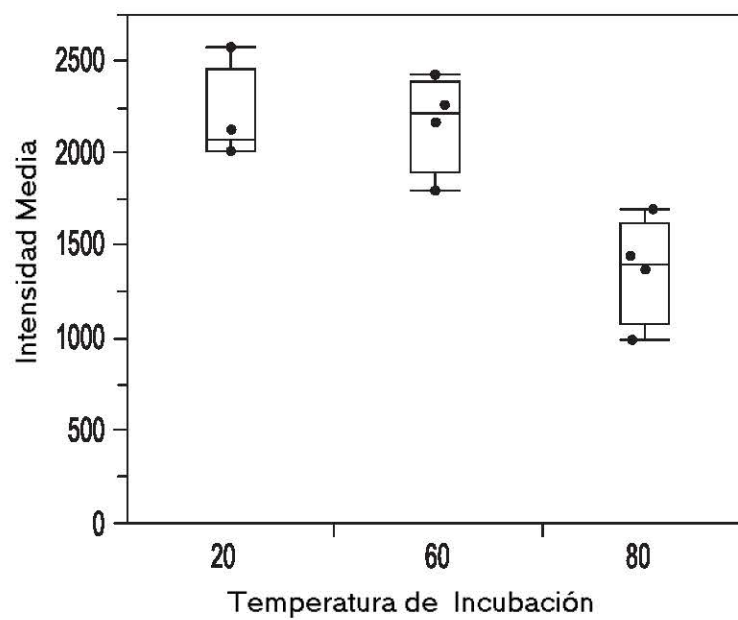
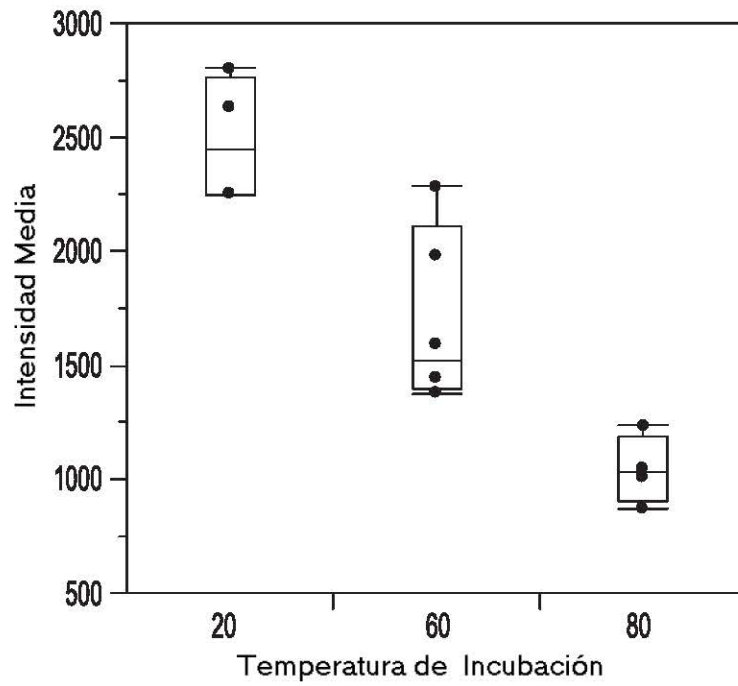
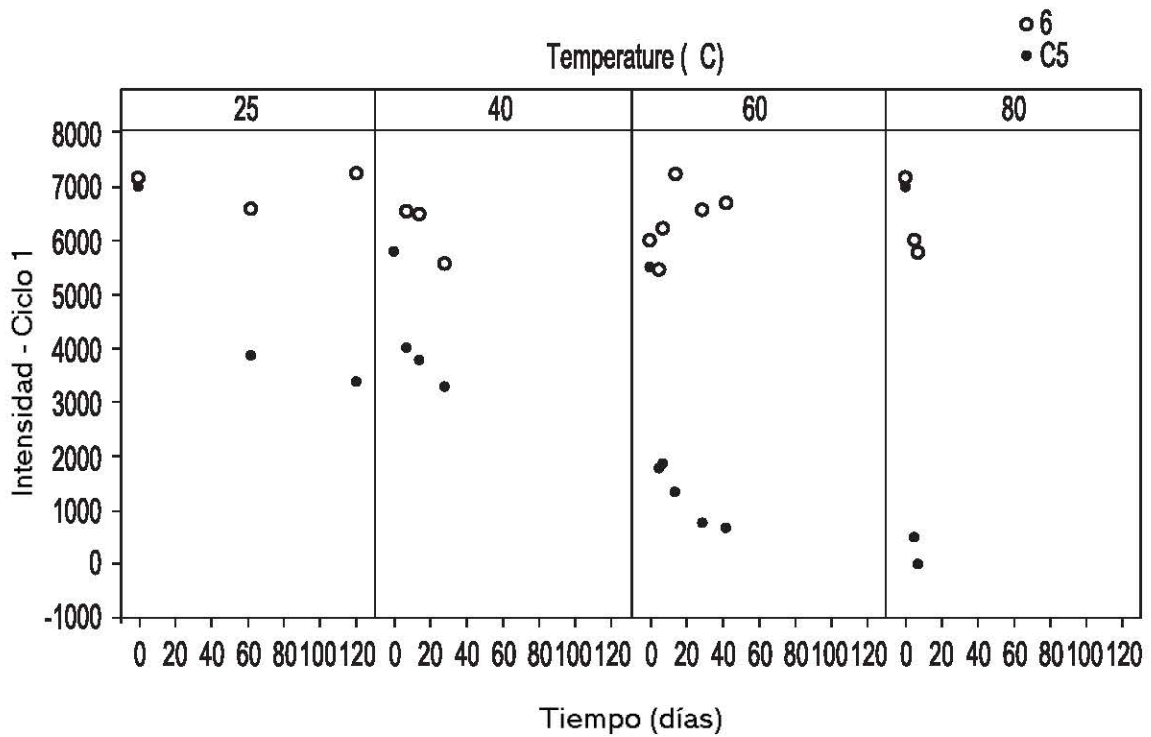
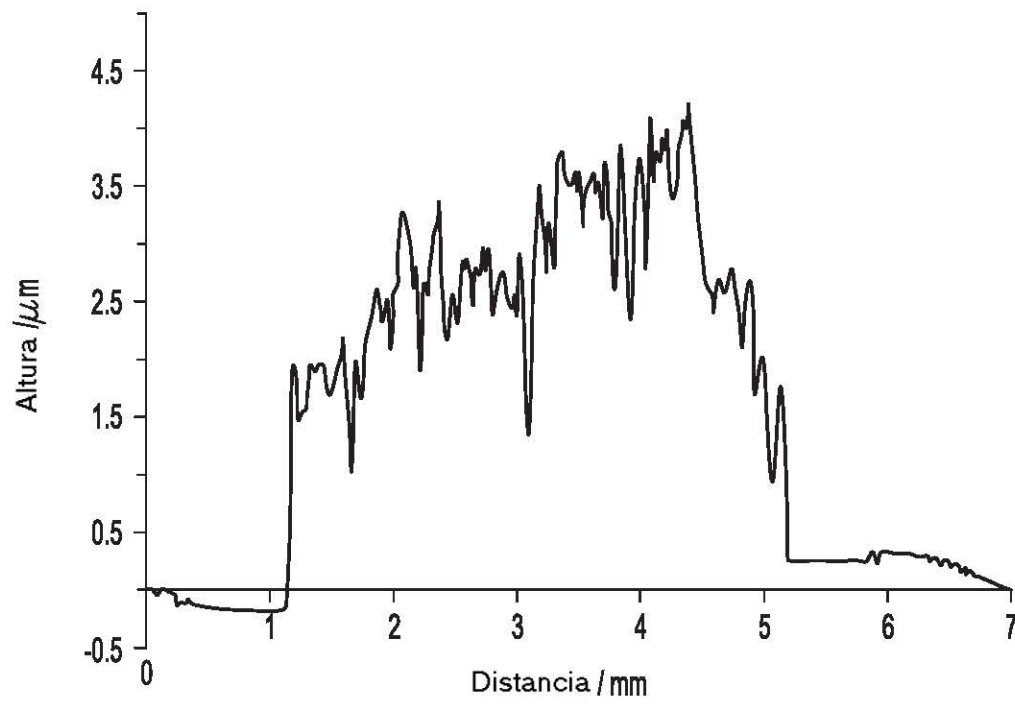
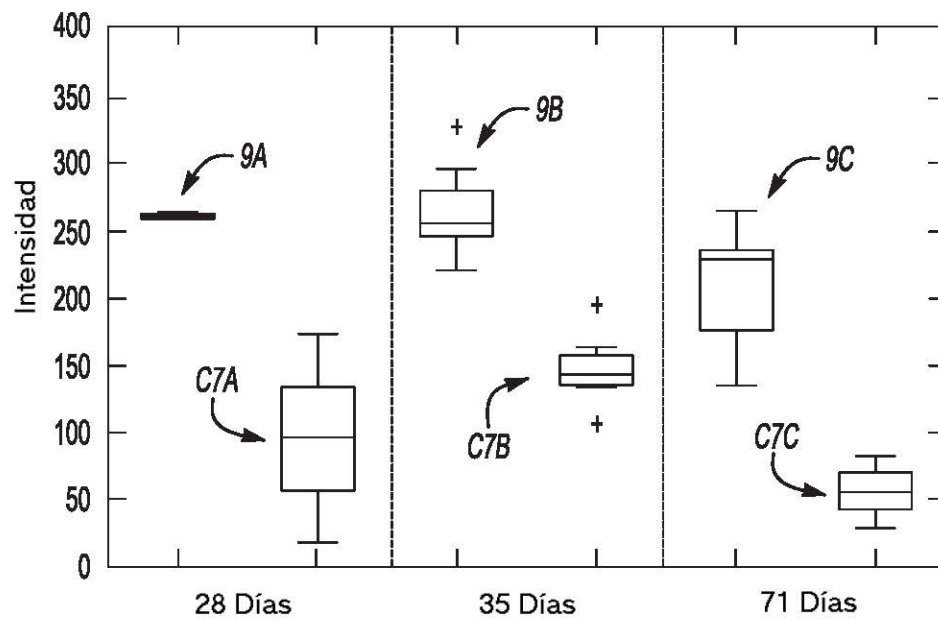
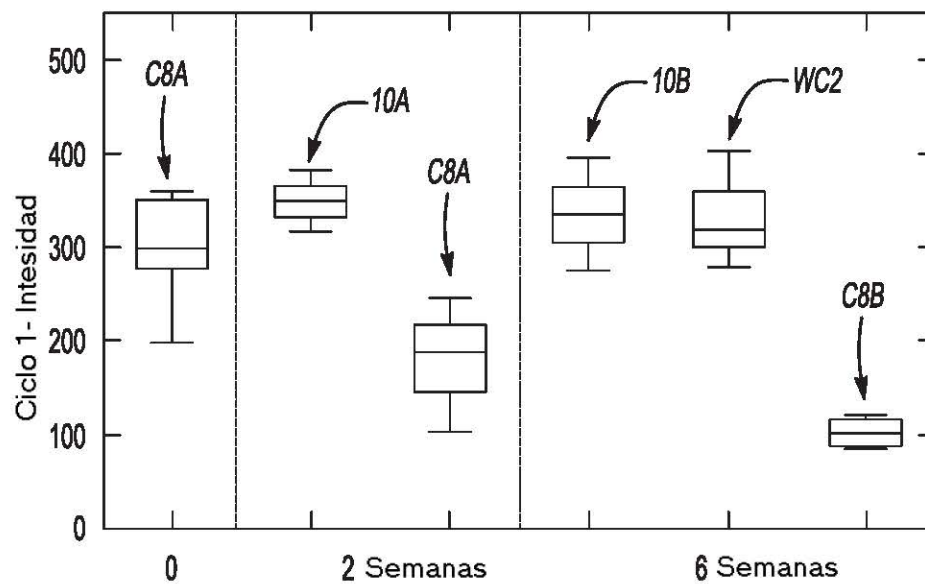
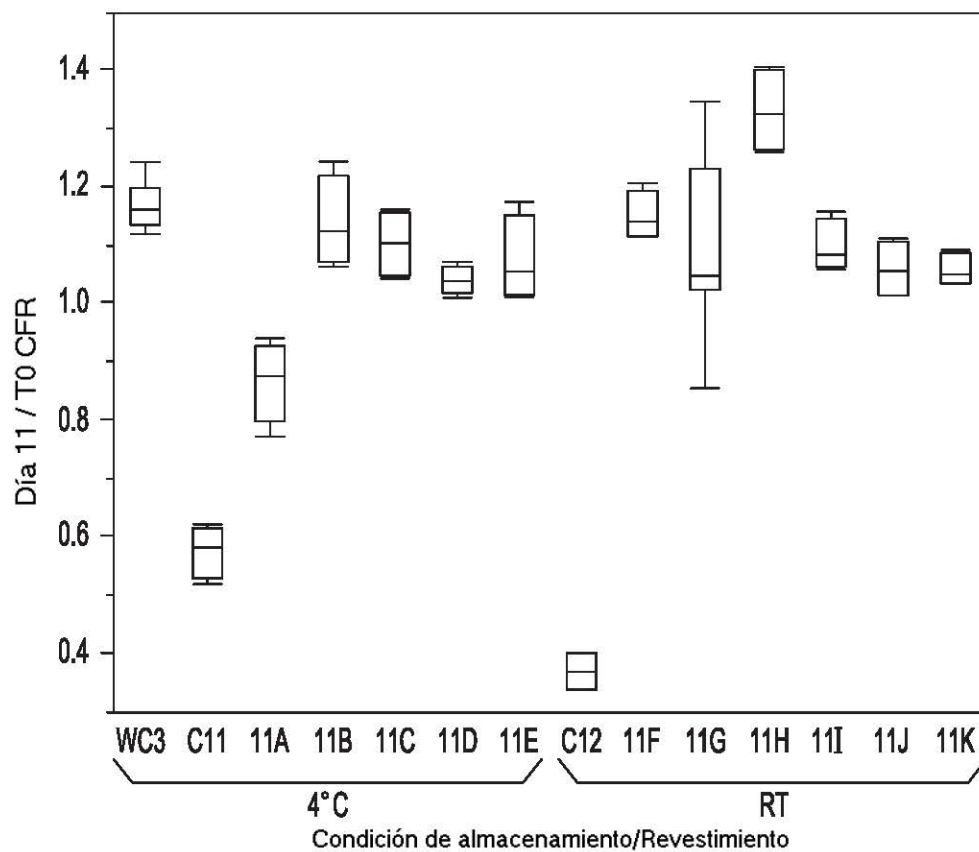


Fig-11A

**Fig-11B****Fig-12A**

**Fig-12B****Fig-13**

**Fig-14****Fig-15**

**Fig-16****Fig-17**

14/16

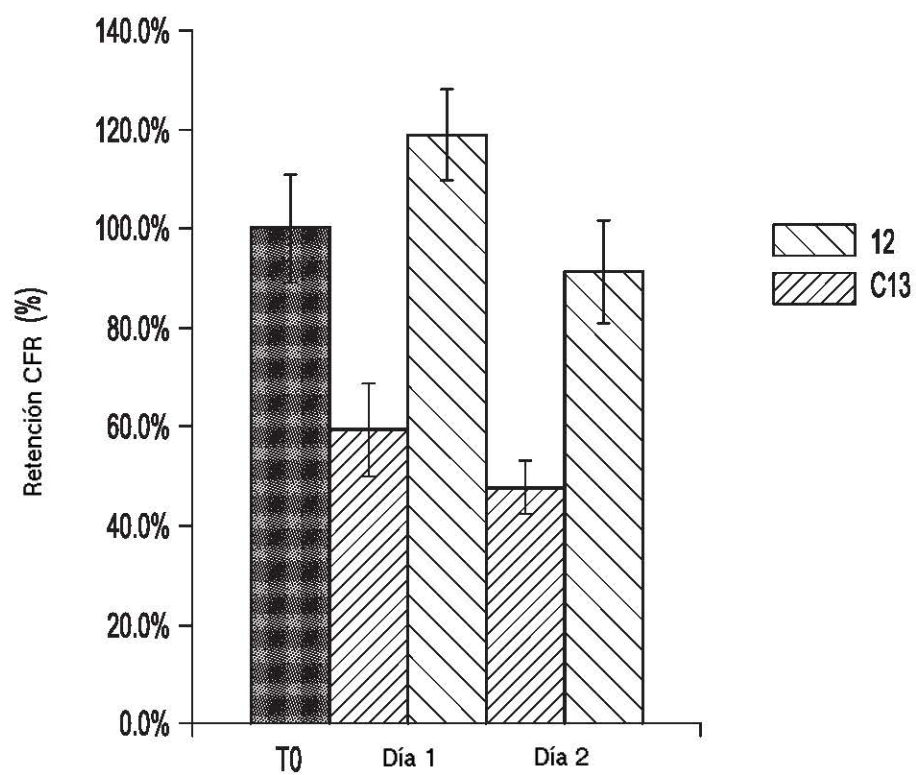


Fig-18

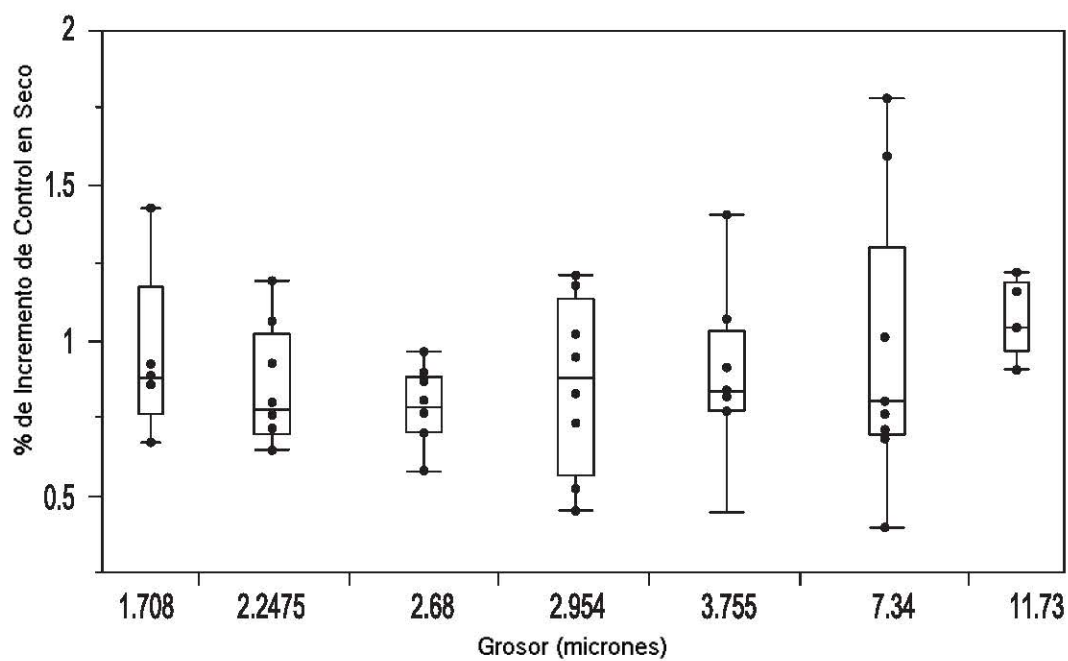
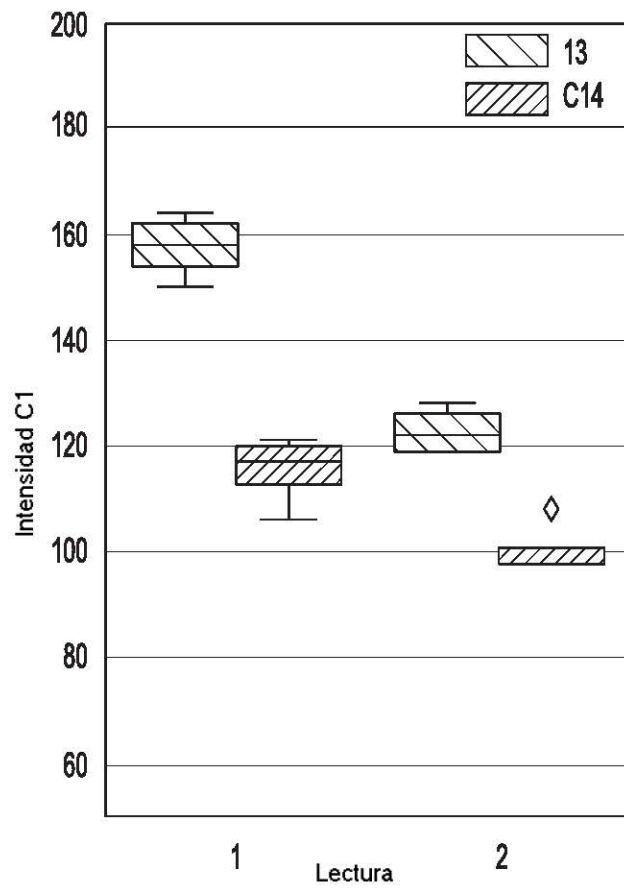
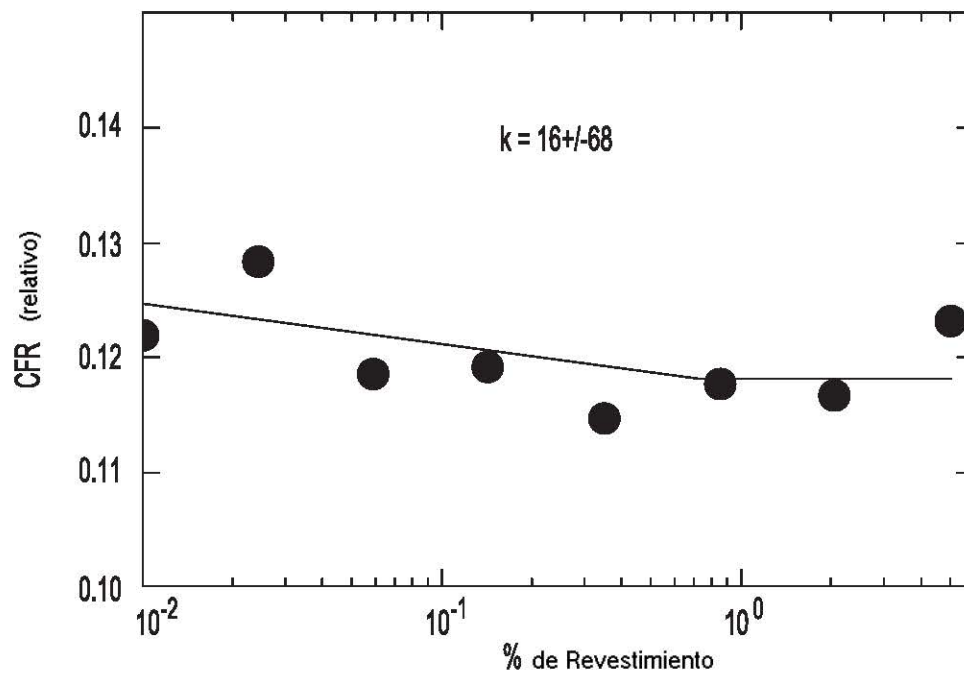
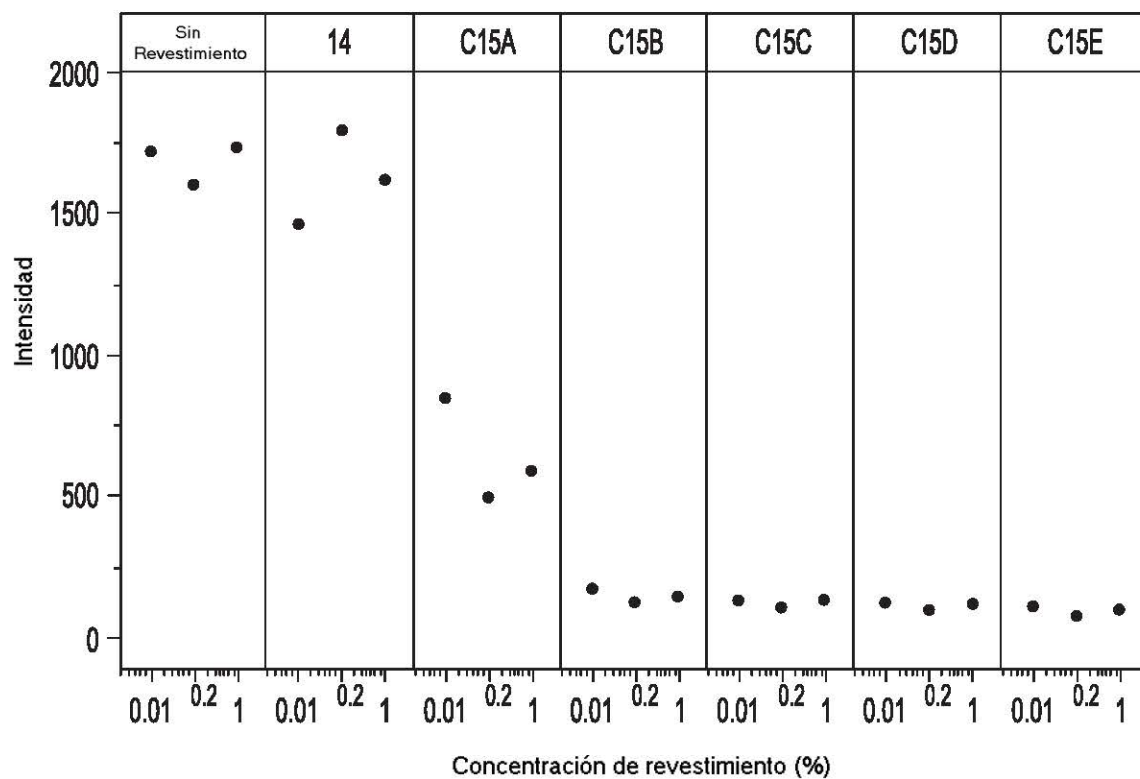


Fig-19

**Fig-20****Fig-21**

**Fig-22**