



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036067

(51)⁷ B01J 19/00; C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2019-03818

(22) 20/12/2017

(86) PCT/US2017/067566 20/12/2017

(87) WO/2018/119057 28/06/2018

(30) 62/438,294 22/12/2016 US

(45) 26/06/2023 423

(43) 25/03/2020 384ASC

(73) ILLUMINA, INC. (US)

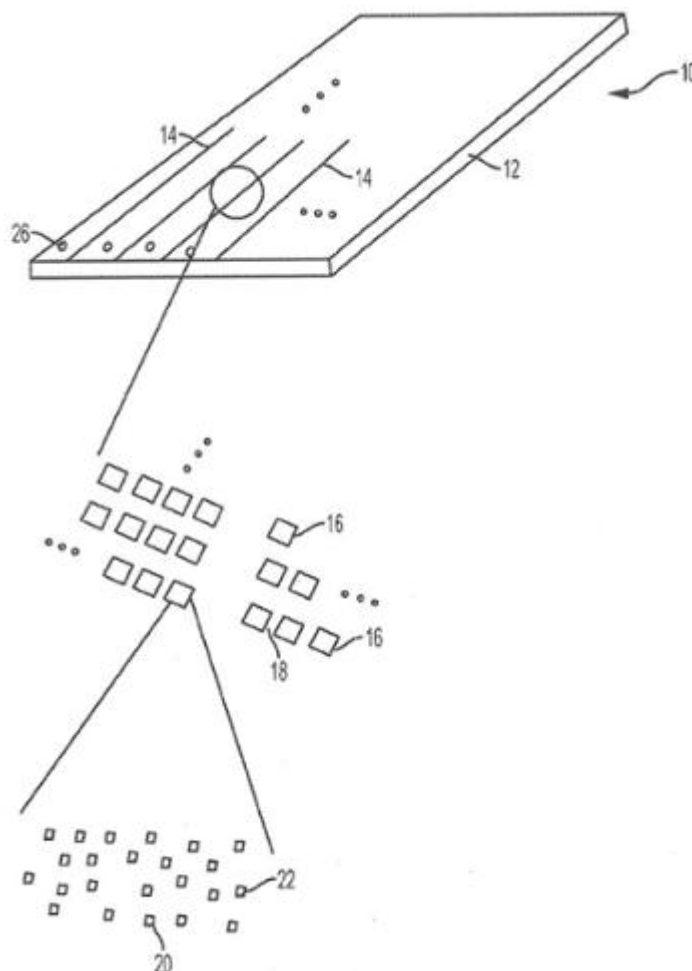
5200 Illumina Way San Diego, CA 92122 (US)

(72) TSAY, James (US); HUANG, Yuxiang (CN).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHIP CHỨA ĐOẠN MỖI GIẢI TRÌNH TỰ VÀ THỰC THỂ KHÔNG GIẢI TRÌNH TỰ, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHIP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chip bao gồm vật đỡ có nhiều giếng riêng biệt, vật liệu gel được đặt trong mỗi giếng trong số các giếng riêng biệt, đoạn mỗi giải trình tự được ghép với vật liệu gel, và thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel. Mỗi trong số đoạn mỗi giải trình tự và thực thể không giải trình tự đều ở dạng ghép.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chip chứa đoạn mỗi giải trình tự và thực thể không giải trình tự.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chip sinh học nằm trong số các công cụ có phạm vi rộng được sử dụng để phát hiện và phân tích các phân tử, bao gồm axit deoxyribonucleic (ADN) và axit ribonucleic (ARN). Trong các ứng dụng này, các chip được thiết kế để bao gồm các mẫu dò cho các trình tự nucleotit có trong các gen ở người và các sinh vật khác. Trong một số ứng dụng, ví dụ, các mẫu dò ADN và ARN riêng lẻ có thể được gắn ở các vị trí nhỏ ở dạng hình lưới (hoặc ngẫu nhiên) trên vật đỡ của chip. Ví dụ, mẫu thử nghiệm, từ người hoặc sinh vật đã biết, có thể được tiếp xúc với lưới, sao cho các đoạn bổ sung lai với các mẫu dò ở các vị trí riêng lẻ trong chip. Chip có thể sau đó được kiểm tra bằng cách quét các tần số ánh sáng cụ thể qua các vị trí để xác định các đoạn nào có trong mẫu, bằng huỳnh quang của các vị trí mà các đoạn được lai ở đó.

Các chip sinh học có thể được sử dụng để giải trình tự gen. Nói chung, giải trình tự gen liên quan đến sự xác định thứ tự của các nucleotit hoặc các axit nucleic trong một độ dài của vật liệu di truyền, như đoạn ADN hoặc ARN. Các trình tự ngày càng dài của các cặp cơ sở đang được phân tích, và thông tin trình tự kết quả có thể được sử dụng trong các phương pháp tin sinh học khác nhau để khớp các đoạn với nhau một cách hợp lý để xác định một cách đáng tin cậy trình tự của các độ dài bao quát của vật liệu di truyền mà các đoạn được dẫn xuất từ đó. Việc thử nghiệm dựa trên máy tính và tự động của các đoạn đặc trưng đã được phát triển, và đã được sử dụng trong lập bản đồ gen, xác định các gen và chức năng của chúng, đánh giá các rủi ro của các điều kiện nhất định và các tình trạng bệnh, và v.v. Ngoài các ứng dụng này, các chip sinh học có thể được sử dụng để phát hiện và đánh giá phạm vi rộng các phân tử, các họ phân tử, các mức độ thể hiện di truyền, các sự đa dạng nucleotit đơn, và xác định kiểu gen.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Ví dụ về chip bao gồm vật đỡ có nhiều giếng riêng biệt, vật liệu gel được đặt trong mỗi giếng trong các giếng riêng biệt, đoạn mỗi giải trình tự được ghép với vật liệu gel, và thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel. Mỗi đoạn mỗi giải trình tự và thực thể không giải trình tự đều ở dạng ghép.

Ví dụ khác về chip bao gồm vật đỡ có nhiều giếng riêng biệt, vật liệu gel được đặt trong mỗi giếng riêng biệt, đoạn mỗi giải trình tự được ghép với vật liệu gel, và đoạn đệm được ghép với vật liệu gel. Đoạn đệm được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyethyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(N-isopropylacrylamit), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(troxol este), và các dạng kết hợp của chúng.

Theo ví dụ của phương pháp, gel được đặt trong mỗi giếng trong nhiều giếng riêng biệt của vật đỡ, đoạn mỗi giải trình tự được ghép với vật liệu gel; và thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đặc tính và các ưu điểm của các ví dụ của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng bằng cách tham chiếu đến mô tả chi tiết và các hình vẽ sau, trong đó các số tham chiếu tương ứng với các thành phần tương tự, mặc dù có thể không giống nhau. Để ngắn gọn, các số tham chiếu hoặc các đặc tính có chức năng được mô tả trước đó có thể hoặc không thể được mô tả liên quan đến các hình vẽ khác mà chúng xuất hiện trong đó.

Fig.1 là hình vẽ dạng biểu đồ của chip mẫu theo sáng chế, minh họa sự bố trí tổng thể của chip và trình bày chi tiết sự sắp xếp các vị trí riêng lẻ;

Các hình từ Fig.2A đến Fig.2D là các hình vẽ mặt cắt ngang mà cùng minh họa ví dụ về phương pháp được bộc lộ ở đây;

Fig.3 là hình vẽ phối cảnh được cắt bỏ một phần và được phóng đại của một trong các vị trí riêng lẻ được thể hiện trên các hình Fig.1 và Fig.2D;

Fig.4 là biểu đồ mô tả, theo ví dụ, các kết quả kiểm soát chất lượng (quality control - QC) tetrachloro fluorescein (TET), về cường độ, cho các đường bao gồm các tỷ lệ mol khác nhau của đoạn môi không giải trình tự so với đoạn môi giải trình tự;

Fig.5 là biểu đồ mô tả, theo ví dụ, Cường độ Read2 C1A đối với các tỷ lệ mol khác nhau của đoạn môi không giải trình tự so với đoạn môi giải trình tự;

Các hình Fig.6A và Fig.6B là các biểu đồ mô tả, theo ví dụ, phần trăm các chùm xuyên qua bộ lọc đối với các tỷ lệ mol khác nhau của thực thể không giải trình tự sợi polyme so với đoạn môi giải trình tự; và

Các hình Fig.7A và Fig.7B là các biểu đồ mô tả, theo ví dụ, phần trăm phản nhảy cách đối với các tỷ lệ mol khác nhau của thực thể không giải trình tự sợi polyme so với đoạn môi giải trình tự.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất của chip được bộc lộ ở đây, chip bao gồm vật đỡ có nhiều giếng riêng biệt, vật liệu gel được đặt trong mỗi giếng riêng biệt, đoạn môi giải trình tự được ghép với vật liệu gel, và thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel, mỗi trong số đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự ở dạng ghép.

Theo khía cạnh thứ nhất của chip, tỷ lệ mol của thực thể không giải trình tự so với đoạn môi giải trình tự có phạm vi từ khoảng 0,25:1 đến khoảng 5:1.

Theo ví dụ về khía cạnh thứ nhất của chip, thực thể không giải trình tự được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(N-isopropylacrylamit), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(trolox este), peptit, và đoạn môi không có chức năng. Thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel qua nhóm chức đầu cuối. Theo một số ví dụ, nhóm chức được chọn từ nhóm bao gồm alkyn, norbornyl, gốc kích hoạt không chứa đồng, và thiol. Theo ví dụ theo khía cạnh thứ nhất này, thực thể không giải trình tự là đoạn môi không có chức năng, và đoạn môi không có chức năng là polyT hoặc polyA. theo ví dụ khác theo khía cạnh thứ nhất này, thực thể

không giải trình tự là poly(etylen glycol) có trọng lượng phân tử có phạm vi từ khoảng 0,5 KDa đến nhỏ hơn khoảng 10 KDa.

Theo ví dụ khác về khía cạnh thứ nhất của chip, thực thể không giải trình tự bao gồm chất liên kết và chất dập tắt trạng thái bộ ba hoặc chất chống oxy hóa được liên kết với chất liên kết. Theo một số ví dụ, chất liên kết được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(N-isopropylacrylamit), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, và poly(trolox este). Theo một số ví dụ theo khía cạnh này, chất dập tắt trạng thái bộ ba được chọn từ nhóm bao gồm xyclo-octyltetraen (COT), Trolox, và rượu nitrobenzyl (NBA); và theo một số ví dụ, chất chống oxy hóa được chọn từ nhóm bao gồm ascobat, glutathion, axit galic, catechin, Trolox, và vitamin E.

Theo ví dụ khác nữa về khía cạnh thứ nhất của chip, thực thể không giải trình tự bao gồm chất liên kết và chất cho truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (fluorescence resonance energy transfer - FRET) được liên kết với chất liên kết. Theo một số ví dụ, chất liên kết được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, và poly(trolox este). Theo một số ví dụ theo khía cạnh này, chất cho FRET được chọn từ nhóm bao gồm chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu xanh lá và chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu đỏ.

Cần phải hiểu rằng các đặc tính bất kỳ của khía cạnh thứ nhất của chip có thể được kết hợp cùng nhau theo cách và/hoặc kết cấu mong muốn bất kỳ.

Theo khía cạnh thứ hai của chip được bộc lộ ở đây, chip bao gồm vật đỡ có nhiều giếng riêng biệt, vật liệu gel được đặt trong mỗi giếng riêng biệt, đoạn môi giải trình tự được ghép với vật liệu gel, và đoạn đệm được ghép với vật liệu gel. Theo một số ví dụ, đoạn đệm được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl

metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(trox este), và các dạng kết hợp của chúng.

Theo khía cạnh thứ hai của chip 10, tỷ lệ mol của đoạn đệm so với đoạn môi giải trình tự có phạm vi từ khoảng 0,25:1 đến khoảng 5:1.

Ví dụ về khía cạnh thứ hai của chip còn bao gồm chất dập tắt trạng thái bộ ba, chất chống oxy hóa, hoặc chất cho truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET) được liên kết với đoạn đệm. Theo một số ví dụ theo khía cạnh này, chất dập tắt trạng thái bộ ba được chọn từ nhóm bao gồm xyclo-octyltetraen (COT), Trolox, và rượu nitrobenzyl (NBA). Theo một số ví dụ theo khía cạnh này, chất chống oxy hóa được chọn từ nhóm bao gồm ascorbat, glutathion, axit galic, catechin, Trolox, và vitamin E. Theo một số ví dụ theo khía cạnh này, chất cho FRET được chọn từ nhóm bao gồm chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu xanh lá và chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu đỏ.

Theo ví dụ về khía cạnh thứ hai của chip, đoạn đệm được ghép với vật liệu gel qua nhóm chức đầu cuối. Theo một số ví dụ, nhóm chức được chọn từ nhóm bao gồm alkyn, norbornyl, gốc kích hoạt không chứa đồng, và thiol.

Cần phải hiểu rằng các đặc tính bất kỳ của khía cạnh thứ hai của chip có thể được kết hợp cùng nhau theo cách mong muốn bất kỳ. Hơn nữa, được hiểu rằng sự kết hợp bất kỳ các đặc tính của khía cạnh thứ nhất và/hoặc khía cạnh thứ hai có thể được sử dụng cùng nhau, và/hoặc các đặc tính bất kỳ từ mỗi hoặc cả hai khía cạnh này có thể được kết hợp với ví dụ bất kỳ theo các ví dụ được bộc lộ ở đây.

Khía cạnh của phương pháp bao gồm bước đặt vật liệu gel trong mỗi giếng trong số nhiều giếng riêng biệt của vật đỡ, bước ghép đoạn môi giải trình tự với vật liệu gel, và bước ghép thực thể không giải trình tự với vật liệu gel.

Theo ví dụ theo khía cạnh này của phương pháp, đoạn môi giải trình tự được ghép với vật liệu gel trước khi hoặc sau khi thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel.

Theo ví dụ khác theo khía cạnh này của phương pháp, đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự được đồng ghép với vật liệu gel. Việc đồng ghép được thực hiện

bằng cách lắng đọng hỗn hợp của đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự lên trên vật đỡ có vật liệu gel trên đó; và ử vật đỡ ở nhiệt độ được xác định trước.

Theo khía cạnh này của phương pháp, thực thể không giải trình tự được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(trox este), peptit, và đoạn môi không có chức năng; và thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel qua nhóm chức đầu cuối. Theo một số ví dụ, nhóm chức đầu cuối được chọn từ nhóm bao gồm alkyn, norbornyl, gốc kích hoạt không chứa đồng, và thiol.

Theo một số khía cạnh của phương pháp, thực thể không giải trình tự còn bao gồm chất dập tắt trạng thái bộ ba, chất chống oxy hóa, hoặc chất cho truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET) được liên kết vào đó.

Cần phải hiểu rằng các đặc tính bất kỳ theo khía cạnh này của phương pháp có thể được kết hợp cùng nhau theo cách mong muốn bất kỳ. Hơn nữa, được hiểu rằng sự kết hợp bất kỳ các đặc tính theo khía cạnh này của phương pháp có thể được kết hợp với khía cạnh bất kỳ trong các khía cạnh của chip và/hoặc ví dụ bất kỳ theo các ví dụ được bộc lộ ở đây.

Các ví dụ về các chip được bộc lộ ở đây bao gồm vài vị trí, mà mỗi vị trí có đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự được gắn với vật liệu gel. Đoạn môi giải trình tự có thể được sử dụng trong liên kết và khuếch đại các axit deoxyribonucleic (ADN) hoặc các axit ribonucleic (ARN), trong khi thực thể không giải trình tự không tham gia vào liên kết hoặc khuếch đại. Thay vào đó, thực thể không giải trình tự đóng vai trò là đoạn đệm giữa các đoạn môi giải trình tự. Việc tạo khoảng cách giữa các đoạn môi giải trình tự có thể tăng cường sự khuếch đại bằng cách hạn chế sự trở ngại về không gian đối với các protein liên quan đến quá trình khuếch đại.

Ngoài đóng vai trò là đoạn đệm, thực thể không giải trình tự có thể cũng đưa các chức năng khác cho chip. Đối với các ví dụ, thực thể không giải trình tự có thể i) hạn chế liên kết không đặc hiệu của các enzym, các protein, và/hoặc các phân tử nhỏ khác với vật liệu gel trong quá trình khuếch đại và giải trình tự; ii) tăng tính ưa nước của vật liệu gel, mà có

thể giúp ngăn việc sụp ở các điều kiện khô; iii) tăng cường các đặc tính huỳnh quang của các chất màu được liên kết với vật liệu gel; và/hoặc iv) các kết hợp của i, ii, và/hoặc iii. Hơn khác nữa, thực thể không giải trình tự có thể hỗ trợ việc làm lộ các đoạn mỗi bề mặt chức năng khỏi bề mặt.

Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ được sử dụng ở đây sẽ mang ý nghĩa thông thường của chúng trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan trừ khi được quy định cụ thể. Một vài thuật ngữ được sử dụng ở đây và ý nghĩa của chúng sẽ được nêu ra ở đây.

Các mao từ ở dạng số ít bao gồm các dạng số nhiều trừ khi được quy định cụ thể.

Như được sử dụng ở đây, “alkyl” đề cập đến chuỗi hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh mà nó hoàn toàn (ví dụ, không chứa các liên kết đôi hoặc ba). Nhóm alkyl có thể có từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Ví dụ các nhóm alkyl bao gồm metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, tertiary butyl, pentyl, hexyl, và các chất tương tự. Ví dụ, ký hiệu “C1-4 alkyl” biểu thị alkyl có từ một đến bốn các nguyên tử cacbon trong chuỗi alkyl, ví dụ, chuỗi alkyl được chọn từ nhóm bao gồm metyl, etyl, propyl, iso-propyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl, và t-butyl.

Như được sử dụng ở đây, “alkenyl” đề cập đến chuỗi hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa một hoặc nhiều liên kết đôi. Nhóm alkenyl có thể có từ 2 đến 20 nguyên tử cacbon. Ví dụ các nhóm alkenyl bao gồm ethenyl, propenyl, butenyl, pentenyl, hexenyl, và các chất tương tự. Nhóm alkenyl có thể được chỉ định là, ví dụ, “C2-4 alkenyl,” mà biểu thị alkenyl có từ hai đến bốn nguyên tử cacbon trong chuỗi alkenyl.

Như được sử dụng ở đây, “alkynyl” đề cập đến chuỗi hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh chứa một hoặc nhiều liên kết ba. Nhóm alkynyl có thể có từ 2 đến 20 nguyên tử cacbon. Ví dụ, nhóm alkynyl có thể được chỉ định là “C2-4 alkynyl”, mà biểu thị alkynyl có từ hai đến bốn nguyên tử cacbon trong chuỗi alkynyl.

Nhóm chức “amino” đề cập đến nhóm $-NR_aR_b$, mà ở đó mỗi R_a và R_b được chọn độc lập từ hydro, C1-6 alkyl, C2-6 alkenyl, C2-6 alkynyl, C3-7 carboxycyl, C6-10 aryl, aryl dị vòng có 5-10 phần tử, và xycyl dị vòng có 5-10 phần tử, như được định ra ở đây.

Như được sử dụng ở đây, “aryl” đề cập đến hệ vòng hoặc vòng thơm (ví dụ, hai hoặc nhiều vòng ngưng tụ mà có chung hai nguyên tử cacbon liền kề) chứa chỉ cacbon trong

khung chính của vòng. Khi aryl là hệ vòng, mọi vòng trong hệ vòng là vòng thơm. Nhóm aryl có thể có từ 6 đến 18 nguyên tử cacbon, mà có thể được chỉ định là C6-18. Các ví dụ về các nhóm aryl bao gồm phenyl, naphthyl, azulenyl, và anthracenyl.

Cụm từ “dạng ghép” đề cập đến trạng thái của đoạn môi và/hoặc thực thể không giải trình tự khi nó được gắn với vật liệu gel là kết quả của việc ghép, và mà không có sự thay đổi nào. Theo các ví dụ được bộc lộ ở đây, thực thể không giải trình tự ở dạng ghép không có khả năng trải qua giải trình tự ADN hoặc ARN. Nói cách khác, từ điểm mà thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel ở đó, nó không có khả năng để được giải trình tự. Như vậy, các bước xử lý bổ sung không phải được thực hiện để làm cho thực thể không giải trình tự không phản ứng trong quá trình giải trình tự. Thay vào đó, khi thực thể không giải trình tự được ghép, nó không có khả năng để được giải trình tự.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “được gắn” đề cập đến trạng thái của hai vật được nối, gắn chặt, gắn kết, kết nối, hoặc được liên kết với nhau. Ví dụ, axit nucleic có thể được gắn với vật liệu, như vật liệu gel, bằng liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị. Liên kết cộng hóa trị được định rõ đặc điểm bởi việc chia sẻ các cặp electron giữa các nguyên tử. Liên kết không cộng hóa trị là liên kết hóa học mà không liên quan đến việc chia sẻ các cặp electron và có thể bao gồm, ví dụ, các liên kết hydro, các liên kết ion, lực van der Waals, các tương tác ưa nước và các tương tác kỵ nước.

“Azit” hoặc “azido” đề cập đến $-N_3$.

Như được sử dụng ở đây, “carboxyclyl” có nghĩa là hệ vòng hoặc vòng không thơm chứa chỉ các nguyên tử cacbon trong trục chính của hệ vòng. Khi carboxyclyl là hệ vòng, hai hoặc nhiều vòng có thể được nối với nhau ở dạng xoắn, cầu hoặc ngưng tụ. Các carboxyclyl có thể có mức độ no bất kỳ, miễn là ít nhất một vòng trong hệ vòng không phải là vòng thơm. Do đó, các carboxyclyl bao gồm các xycloalkyl, xycloalkenyls, và xycloalkynyls. Nhóm carboxyclyl có thể có từ 3 đến 20 nguyên tử cacbon (ví dụ, C3-20). Các ví dụ về các vòng carboxyclyl bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, 2,3-dihydro-inden, bixyclo[2.2.2]octanyl, adamantyl, và spiro[4.4]nonanyl.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “axit carboxylic” hoặc “carboxyl” như được sử dụng ở đây đề cập đến -C(O)OH .

Như được sử dụng ở đây, “xycloalkyl” nghĩa là hệ vòng hoặc vòng carboxycyl no hoàn toàn. Các ví dụ bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, và xyclohexyl.

Như được sử dụng ở đây, “xycloalkylen” có nghĩa là hệ vòng hoặc vòng carboxycyl no hoàn toàn mà được gắn với phần còn lại của phân tử thông qua hai điểm gắn.

Như được sử dụng ở đây, “xycloalkenyl” hoặc “xycloalkan” có nghĩa là hệ vòng hoặc vòng carboxycyl có ít nhất một liên kết đôi, trong đó không có vòng nào trong hệ vòng là vòng thơm. Các ví dụ bao gồm xyclohexenyl hoặc xyclohexen và norbornen hoặc norbornenyl. Cũng như được sử dụng ở đây, “xycloalkenyl dị vòng” hoặc “xycloalkan dị vòng” có nghĩa là hệ vòng hoặc vòng carboxycyl với ít nhất một nguyên tử khác loại trong trục chính của vòng, có ít nhất một liên kết đôi, trong đó không có vòng nào trong hệ vòng là vòng thơm.

Như được sử dụng ở đây, “xycloalkynyl” hoặc “xycloalkyn” có nghĩa là hệ vòng hoặc vòng carboxycyl có ít nhất một liên kết ba, trong đó không có vòng nào trong hệ vòng là vòng thơm. Ví dụ là xyclooctyn. Ví dụ khác là bixyclononyn. Cũng như được sử dụng ở đây, “xycloalkynyl dị vòng” hoặc “xycloalkyn dị vòng” có nghĩa là hệ vòng hoặc vòng carboxycyl với ít nhất một nguyên tử khác loại trong trục chính của vòng, có ít nhất một liên kết ba, trong đó không có vòng nào trong hệ vòng là vòng thơm.

Thuật ngữ “lắng đọng”, như được sử dụng ở đây, đề cập đến kỹ thuật ứng dụng thích hợp bất kỳ, mà có thể là bằng tay hoặc tự động hóa. Thường, việc lắng đọng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật lắng đọng pha hơi, các kỹ thuật phủ, các kỹ thuật ghép, hoặc các kỹ thuật tương tự. Một số ví dụ cụ thể bao gồm lắng đọng pha hơi hóa học (chemical vapor deposition -CVD), kỹ thuật phủ bằng phun, kỹ thuật quay phủ, kỹ thuật phủ nhúng, kỹ thuật định lượng khuấy luyện, hoặc các kỹ thuật tương tự.

Thuật ngữ “mỗi”, khi được sử dụng với tham chiếu đến tập hợp các mục, định để xác định mục riêng lẻ trong tập hợp nhưng không nhất thiết đề cập đến mọi mục trong tập hợp. Ngoại lệ có thể xảy ra nếu được quy định cụ thể khác.

“Chất tăng cường huỳnh quang” là phân tử bất kỳ mà có thể nâng cao đặc tính của huỳnh quang hoặc có thể làm giảm thiệt hại do ánh sáng gây ra. Ví dụ, chất tăng cường huỳnh quang có thể là chất chống oxy hóa mà nâng cao tính bền quang của chất màu huỳnh quang (hoặc nucleotit đầy đủ chức năng (FFN) được kết hợp trong quá trình giải trình tự bằng tổng hợp (SBS)). Đối với ví dụ khác, chất tăng cường huỳnh quang có thể là chất cho truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET), mà hấp thụ năng lượng trong một vùng của phổ hấp thụ và cho năng lượng để kích thích các chất màu (ví dụ, chất có thể được gắn với (các) nucleotit) trong vùng khác. Chất cho FRET có thể là chất cho nhuộm FRET với chất màu được kết hợp và phát hiện trong quy trình giải trình tự bằng tổng hợp (SBS). Đối với ví dụ khác nữa, chất tăng cường huỳnh quang có thể là chất dập tắt trạng thái bộ ba mà có thể làm giảm nhẹ thiệt hại do ánh sáng gây ra (ví dụ, với các axit nucleic) mà có thể được gây ra bởi các huỳnh quang ở trạng thái bộ ba hoạt tính cao. Chất dập tắt trạng thái bộ ba có thể làm ngắn tuổi thọ của hợp chất bị kích thích ở trạng thái bộ ba, theo đó giảm lượng thời gian hợp chất ở trạng thái bộ ba có thể gây ra thiệt hại do ánh sáng gây ra với hợp chất khác được gắn với vật liệu gel.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “vật liệu gel” định có nghĩa là vật liệu dạng bán rắn mà có thể thấm qua các chất lỏng và các khí. Thông thường, vật liệu gel là hydrogel mà có thể nở ra khi chất lỏng được đưa lên và có thể co lại khi chất lỏng được loại bỏ bằng cách làm khô.

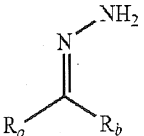
Như được sử dụng ở đây, “aryl dị vòng” đề cập đến hệ vòng hoặc vòng thơm (ví dụ, hai hoặc nhiều các vòng ngưng tụ mà chia sẻ hai nguyên tử liền kề) mà chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, nghĩa là, nguyên tố khác cacbon, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở, nitơ, oxy và lưu huỳnh, trong khung chính của vòng. Khi aryl dị vòng là hệ vòng, mọi vòng trong hệ vòng là vòng thơm. Nhóm aryl dị vòng có thể có 5-18 thành phần vòng.

Như được sử dụng ở đây, “xyclyl dị vòng” có nghĩa là hệ vòng hoặc vòng không thơm chứa ít nhất một nguyên tử khác loại trong khung chính của vòng. Các xyclyl dị vòng có thể được nối với nhau ở dạng xoắn, cầu hoặc ngưng tụ. Các xyclyl dị vòng có thể có mức độ no bất kỳ miễn là ít nhất một vòng trong hệ vòng không phải là vòng thơm. Trong hệ vòng, (các) nguyên tử khác loại có thể có trong vòng thơm hoặc vòng không thơm.

Nhóm xyclyl dị vòng có thể có từ 3 đến 20 thành phần vòng (ví dụ, số nguyên tử tạo nên khung chính của vòng, bao gồm các nguyên tử cacbon và các nguyên tử khác loại). Nhóm xyclyl dị vòng có thể được chỉ định là "xyclyl dị vòng có 3-6 phần tử" hoặc các ký hiệu tương tự. Theo một số ví dụ, (các) nguyên tử khác loại là O, N, hoặc S.

Thuật ngữ "hydrazin" hoặc "hydrazinyl" như được sử dụng ở đây đề cập đến nhóm -NHNH₂.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "hydrazon" hoặc "hydrazonyl" như được sử dụng

ở đây đề cập đến nhóm  trong đó R_a và R_b được định ra trước đó ở đây.

Như được sử dụng ở đây, "hydroxyl" là nhóm -OH.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "vùng kẽ" đề cập đến vùng trong nền/vật đỡ hoặc trên bề mặt mà tách biệt với các vùng khác của nền hoặc bề mặt. Ví dụ, vùng kẽ có thể tách một đặc tính của chip khỏi đặc tính khác của chip. Hai đặc tính mà được tách khỏi nhau có thể là riêng biệt, ví dụ, không tiếp xúc với nhau. Theo ví dụ khác, vùng kẽ có thể tách phần thứ nhất của đặc tính khỏi phần thứ hai của đặc tính. Trong nhiều ví dụ, vùng kẽ là liên tục trong khi các đặc tính là riêng biệt, ví dụ, như trường hợp đối với nhiều giếng được định ra trong bề mặt liên tục khác. Sự tách ra được tạo ra bởi vùng kẽ có thể là tách ra một phần hoặc toàn phần. Các vùng kẽ có thể có bề mặt vật liệu mà khác với bề mặt vật liệu của các đặc tính được định ra trong bề mặt. Ví dụ, các đặc tính của chip có thể có lượng hoặc nồng độ vật liệu gel, (các) đoạn môi giải trình tự, và các đối tượng không tham gia giải trình tự mà vượt quá lượng hoặc nồng độ có ở các vùng kẽ. Theo một số ví dụ, vật liệu gel, (các) đoạn môi giải trình tự, và các đối tượng không tham gia giải trình tự không thể có ở các vùng kẽ.

"Nitril oxit," như được sử dụng ở đây, có nghĩa là nhóm " $R_aC\equiv N^+O^-$ " trong đó R_a được định ra trước đó ở đây. Các ví dụ về điều chế nitril oxit bao gồm việc tạo ra tại chỗ từ các aldoxim bằng việc điều chế với cloramit-T hoặc qua hoạt động của bazơ trên các imidoyl clorua [RC(Cl)=NOH].

“Nitron,” như được sử dụng ở đây, nghĩa là nhóm $\text{R}_a\text{R}_b\text{C}=\text{NR}_c^+\text{O}^-$ trong đó R_a và R_b được định ra trước đó ở đây và R_c được chọn từ C1-6 alkyl, C2-6 alkenyl, C2-6 alkynyl, C3-7 carboxycyl, C6-10 aryl, aryl dị vòng có 5-10 phần tử, và xycyl dị vòng có 5-10 phần tử, như được định ra ở đây.

Như được sử dụng ở đây, “nucleotit” bao gồm nitơ chứa bazơ dị vòng, đường, và một hoặc nhiều các nhóm photphat. Các nucleotit là các đơn vị có tính monome của trình tự axit nucleic. Trong ARN, đường là riboza, và trong ADN, deoxyriboza, ví dụ, đường không có nhóm hydroxyl mà có ở vị trí 2' trong riboza. Nitơ chứa bazơ dị vòng có thể là bazơ purin hoặc bazơ pyrimidin. Các bazơ purin bao gồm adenin (A) và guanin (G), và các dẫn xuất hoặc các tương tự được biến đổi của chúng. Các bazơ pyrimidin bao gồm xytosin (C), thymine (T), và uraxil (U), và các dẫn xuất hoặc các tương tự được biến đổi của chúng. Nguyên tử C-1 của deoxyriboza được liên kết với N-1 của pyrimidin hoặc N-9 của purin.

“Thực thể không giải trình tự” được đề cập ở đây có thể là phân tử khán giả bất kỳ mà không chủ động tham gia vào quá trình tổng hợp ADN hoặc ARN. Thực thể không giải trình tự có thể được sử dụng để tạo ra khoảng cách giữa các đoạn mỗi giải trình tự được ghép. Thực thể không giải trình tự có thể cũng có (các) chức năng khác, như làm hạn chế liên kết không đặc hiệu, để làm tăng tính ưa nước của vật liệu gel, để tăng cường các đặc tính huỳnh quang, hoặc các dạng kết hợp của chúng. Như vậy, thực thể không giải trình tự có thể là đơn chức, hai chức, hoặc đa chức. Các ví dụ của thực thể không giải trình tự bao gồm đoạn mỗi không có chức năng, sợi polyme, peptit, và/hoặc chất tăng cường huỳnh quang.

“Đoạn mỗi không có chức năng” là trình tự axit nucleic ở dạng sợi đơn bất kỳ mà sẽ không tham gia vào quá trình tổng hợp ADN hoặc ARN. Các ví dụ về các đoạn mỗi không có chức năng bao gồm trình tự poly T hoặc trình tự poly A. Độ dài của đoạn mỗi không có chức năng có thể được chọn sao cho sự lai giống không đặc hiệu không xảy ra. Ví dụ, đoạn mỗi không có chức năng độ dài có thể có phạm vi từ 3 đến 10. Theo một số ví dụ, độ dài của đoạn mỗi không có chức năng là ít hơn 10 bazơ.

“Sợi polyme” là phân tử gồm có một ít đơn vị monome được lặp lại (ví dụ, oligome) hoặc nhiều đơn vị monome được lặp lại (ví dụ, polyme). Sợi polyme có thể mạch thẳng,

mạch nhánh hoặc hình cây. Các ví dụ về các polyme mạch nhánh bao gồm các polyme hình sao, các polyme hình lược, các polyme hình bàn chải, các polyme được dendron hóa, hình thang, và các dendrime. Theo các ví dụ được bộc lộ ở đây, sợi polyme bao gồm nhóm chức đầu cuối ở một đầu mà có thể phản ứng với vật liệu gel. Theo một số ví dụ, đầu còn lại của sợi polyme có thể bao gồm nhóm chức đầu cuối mà gắn chất dập tắt trạng thái bộ ba, chất chống oxy hóa, hoặc chất màu. Theo các ví dụ này, sợi polyme có thể có chức năng là chất liên kết, mà liên kết (gắn) chất dập tắt trạng thái bộ ba, chất chống oxy hóa, hoặc chất màu với vật liệu gel.

“Peptit” là chuỗi ngắn các monome axit amin được liên kết bởi các liên kết peptit (amit).

Như được sử dụng ở đây, “đoạn môi giải trình tự” được định ra là trình tự axit nucleic ở dạng sợi đơn (ví dụ, ADN sợi đơn hoặc ARN sợi đơn) mà đóng vai trò là điểm bắt đầu cho quá trình tổng hợp ADN hoặc ARN. Phần cuối 5' của đoạn môi giải trình tự có thể được biến đổi để cho phép phản ứng ghép đôi với vật liệu gel. Độ dài của đoạn môi giải trình tự có thể là số bazơ dài bất kỳ và có thể bao gồm nhiều loại các nucleotit không tự nhiên. Theo ví dụ, đoạn môi giải trình tự là sợi ngắn, bao gồm từ 20 bazơ đến 40 bazơ.

Như được sử dụng ở đây, “vị trí” đề cập đến vị trí được định ra trên hoặc trong vật đỡ mà vật liệu gel, đoạn môi giải trình tự, và thực thể không giải trình tự có thể được gắn ở đó.

Các thuật ngữ “nền” và “vật đỡ” được sử dụng có thể thay thế cho nhau ở đây, và đề cập đến bề mặt mà vị trí ở trong đó hoặc trên đó. Vật đỡ thường cứng và không hòa tan được trong chất lỏng chứa nước. Vật đỡ có thể là trơ với hóa học mà được sử dụng để sửa đổi vật liệu gel. Ví dụ, vật đỡ rắn có thể là trơ với hóa học được sử dụng để gắn các đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự, với vật liệu gel theo phương pháp được nêu ở đây. Các ví dụ về các vật đỡ thích hợp bao gồm thủy tinh và thủy tinh được biến đổi hoặc được chức năng hóa, các chất dẻo (bao gồm các acrylic, polystyren và các copolyme của styren và các vật liệu khác, polypropylen, polyetylen, polybutylen, các polyuretan, polytetrafluoroetylen (PTFE) (như TEFLON® từ Chemours), các olefin vòng/các polyme xyclo-olefin (COP) (như ZEONOR® từ Zeon), các polyimit, v.v.), ni lông, gốm, silic oxit

hoặc các vật liệu có gốc silic oxit, silic và silic được biến đổi, cacbon, các kim loại, các thủy tinh vô cơ, và các chùm sợi quang.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "tetrazin" và "tetrazinyl" đề cập đến nhóm aryl dị vòng có sáu phần tử bao gồm bốn nguyên tử nitơ. Tetrazin có thể được thể tùy ý.

Như được sử dụng ở đây, "tetrazol," đề cập đến nhóm dị vòng có năm phần tử bao gồm bốn nguyên tử nitơ. Tetrazol có thể được thể tùy ý.

Thuật ngữ "nhóm chức đầu cuối" đề cập đến nhóm chức mà gắn trên thực thể không giải trình tự và do đó có thể đạt được để phản ứng với vật liệu gel.

"Thiol" nhóm chức đề cập đến -SH.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "giếng" đề cập đến đặc tính lõm rời rạc trong vật đỡ có khoảng hở bề mặt mà được bao quanh hoàn toàn bởi (các) vùng kề của vật đỡ bề mặt. Các giếng có thể có hình dạng bất kỳ trong nhiều hình dạng ở khoảng hở của chúng trên bề mặt bao gồm, ví dụ, hình tròn, elip, hình vuông, đa giác, ngôi sao (với số đỉnh bất kỳ), v.v. Mặt cắt ngang của giếng được thực hiện vuông góc với bề mặt có thể cong, hình vuông, đa giác, hypebon, hình nón, hình góc cạnh, v.v.

Các khía cạnh và ví dụ được nêu ở đây và được nêu trong các yêu cầu bảo hộ có thể được hiểu theo quan điểm của các định nghĩa ở trên.

Bây giờ tham chiếu đến Fig.1, ví dụ về chip 10 được mô tả. Nói chung, chip 10 bao gồm nền hoặc vật đỡ 12 và các đường hoặc các rãnh dẫn dòng 14 ngang vật đỡ 12. Mỗi rãnh dẫn dòng 14 bao gồm nhiều vị trí 16 mà được tách ra khỏi nhau bởi các vùng kề 18. Ở mỗi vị trí 16, (các) đoạn môi giải trình tự 20 và các đối tượng/thực thể không giải trình tự 22 được lắng đọng và gắn với vật liệu gel (24, 24', ví dụ, trên Fig.2D).

Chip 10 được minh họa trên Fig.1 và được thảo luận trong sáng chế có thể được bố trí trong hoặc được tạo ra là một phần của mao quản dẫn dòng, mà là khoang bao gồm bề mặt rắn mà các chất mang dạng lỏng, các thuốc thử khác nhau, và v.v có thể được chảy qua đó. Theo ví dụ, mao quản dẫn dòng có thể bao gồm chip 10 được liên kết với nền phía trên qua vật liệu làm kín (ví dụ, polyimide đen hoặc vật liệu liên kết thích hợp khác). Việc liên kết diễn ra trong các vùng liên kết của vật đỡ 12, vật liệu làm kín, và nền phía trên. Các vùng liên kết có thể được đặt giữa các rãnh dẫn dòng sao cho vật liệu làm kín tách vật

lý một kênh dẫn dòng 14 khỏi kênh dẫn dòng liền kề 14 (để ngăn sự lây nhiễm chéo) và có thể được đặt ở ngoại vi của mao quản dẫn dòng (để làm kín mao quản dẫn dòng khỏi sự lây nhiễm từ bên ngoài). Tuy nhiên, điều này nên được hiểu rằng các vùng liên kết và vật liệu làm kín có thể được đặt trong vùng mong muốn bất kỳ tùy thuộc vào việc thực hiện. Việc liên kết có thể được thực hiện thông qua liên kết laze, liên kết khuếch tán, liên kết anot, liên kết eutecti, liên kết bằng sự hoạt hóa plasma, liên kết bằng sự nấu chảy thủy tinh, hoặc các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực.

Các ví dụ khác về các mao quản dẫn dòng và các hệ chất lưu liên quan và các nền tảng phát hiện mà có thể được tích hợp với chip 10 và/hoặc sẵn sàng được sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế được mô tả, ví dụ, trong Bentley và các cộng sự, *Nature* 456:53-59 (2008), WO 04/018497; US 7057026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7329492; US 7211414; US 7315019; US 7405281, và US 2008/0108082, mỗi phương pháp được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ.

Trong một số ứng dụng, mao quản dẫn dòng được sử dụng để thực hiện các phản ứng sinh hóa hoặc hóa học được kiểm soát trong thiết bị tự động hóa phản ứng, như trong bộ sắp xếp dãy nucleotit. Các cổng 26 có thể được khoan qua vật đỡ 12. Bằng cách kết nối với các cổng 26, thiết bị tự động hóa phản ứng có thể kiểm soát dòng của (các) thuốc thử và (các) sản phẩm trong các rãnh dẫn dòng được làm kín 14. Trong một số ứng dụng, thiết bị tự động hóa phản ứng có thể điều chỉnh áp suất, nhiệt độ, thành phần khí và các điều kiện môi trường khác của mao quản dẫn dòng. Hơn nữa, trong một số ứng dụng, các cổng 26 có thể được khoan trong nền phía trên hoặc trong cả vật đỡ 12 và nền phía trên. Trong một số ứng dụng, các phản ứng diễn ra trong các rãnh dẫn dòng được làm kín 14 có thể được theo dõi qua nền phía trên và/hoặc vật đỡ 12 bằng cách chụp ảnh hoặc đo nhiệt, phát xạ ánh sáng và/hoặc huỳnh quang.

Cần phải hiểu rằng sự định hướng cụ thể của các rãnh dẫn dòng 14, các vị trí 16, v.v. có thể khác với các rãnh dẫn dòng và các vị trí được minh họa trên Fig.1. Theo một số ví dụ, các vị trí 16 tiếp giáp nhau và do đó không cần được phân tách bằng các vùng kẽ 18.

Chip 10 theo Fig.1, và các ví dụ về cách có thể tạo ra chip 10, bây giờ sẽ được mô tả chi tiết hơn với tham chiếu đến các hình từ Fig.2A đến Fig.2D.

Fig.2A mô tả vật đỡ 12 có các vị trí 16 được định ra trong đó và được phân tách bằng các vùng kẽ 18. Vật đỡ 12 này có bề mặt được tạo mẫu. “Bề mặt được tạo mẫu” đề cập đến sự bố trí các vùng khác nhau (ví dụ, các vị trí 16) trong hoặc trên lớp lộ ra của vật đỡ rắn 12. Ví dụ, một hoặc nhiều vị trí 16 có thể là các đặc tính mà một hoặc nhiều đoạn môi giải trình tự (sự khuếch đại) 20 và các đối tượng không tham gia giải trình tự 22 có mặt ở đó. Các đặc tính có thể được phân tách bằng các vùng kẽ 18, mà các đoạn môi giải trình tự 20 và các đối tượng không tham gia giải trình tự 22 không có mặt ở đó. Nhiều bố trí khác nhau của các vị trí 16 có thể được dự kiến, bao gồm các mẫu đều đặn, lặp lại và không đều đặn. Theo ví dụ, các vị trí 16 được bố trí theo lưới dạng lục giác đều lèn chặt và mật độ được nâng cao. Các cách bố trí khác có thể bao gồm, ví dụ, các bố trí phẳng (ví dụ, hình chữ nhật), các bố trí theo hình tam giác, và v.v. Đối với các ví dụ, cách bố trí hoặc mẫu có thể là định dạng x-y của các vị trí 16 mà theo các hàng và các cột. Theo một số ví dụ khác, cách bố trí hoặc mẫu có thể là cách bố trí lặp lại của các vị trí 16 và/hoặc các vùng kẽ 18. Vẫn theo các ví dụ khác, cách bố trí hoặc mẫu có thể là cách bố trí ngẫu nhiên của các vị trí 16 và/hoặc các vùng kẽ 18. Mẫu có thể bao gồm các chấm tròn nhỏ, các miếng, các giếng, các cột, các đường sọc, các đường xoắn, các đường thẳng, các hình tam giác, các hình chữ nhật, các hình tròn, các hình cung, carô, sọc ô vuông, các đường chéo, các mũi tên, các ô vuông, và/hoặc các đường chéo song song. Vẫn các ví dụ khác về các bề mặt được tạo mẫu mà có thể được sử dụng theo các ví dụ được nêu ở đây được mô tả trong các Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 8778849; 9079148; 8778848; và Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2014/0243224, mỗi Bằng hoặc Công bố đơn được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ.

Cách bố trí hoặc mẫu có thể được định rõ đặc điểm đối với mật độ của các vị trí 16 (ví dụ, số vị trí 16) trong diện tích được định ra. Ví dụ, các vị trí 16 có thể có mặt với mật độ khoảng 2 triệu trên mm^2 . Mật độ có thể được điều chỉnh đến các mật độ khác nhau bao gồm, ví dụ, mật độ ít nhất khoảng 100 trên mm^2 , khoảng 1000 trên mm^2 , khoảng 0,1 triệu trên mm^2 , khoảng 1 triệu trên mm^2 , khoảng 2 triệu trên mm^2 , khoảng 5 triệu trên mm^2 , khoảng 10 triệu trên mm^2 , khoảng 50 triệu trên mm^2 , hoặc lớn hơn. Theo cách thay thế hoặc bổ sung, mật độ có thể được điều chỉnh để không lớn hơn khoảng 50 triệu trên mm^2 ,

khoảng 10 triệu trên mm^2 , khoảng 5 triệu trên mm^2 , khoảng 2 triệu trên mm^2 , khoảng 1 triệu trên mm^2 , khoảng 0,1 triệu trên mm^2 , khoảng 1000 trên mm^2 , khoảng 100 trên mm^2 , hoặc nhỏ hơn. Cần được hiểu thêm rằng mật độ của các vị trí 16 trên vật đỡ 12 có thể là giữa một trong các trị số thấp hơn và một trong các trị số cao hơn được chọn từ các phạm vi ở trên. Đối với các ví dụ, mật độ chip cao có thể được định rõ đặc điểm là có các vị trí 16 được phân tách ít hơn khoảng $15\ \mu\text{m}$, mật độ chip trung bình có thể được định rõ đặc điểm là có các vị trí 16 được phân tách từ khoảng $15\ \mu\text{m}$ đến khoảng $30\ \mu\text{m}$, và mật độ chip thấp có thể được định rõ đặc điểm là có các vị trí 16 được phân tách lớn hơn khoảng $30\ \mu\text{m}$.

Cách bố trí hoặc mẫu có thể cũng hoặc theo cách thay thế được định rõ đặc điểm theo bước trung bình, ví dụ, khoảng cách từ tâm của vị trí 16 đến tâm của vùng kế liền kề 18 (khoảng cách từ tâm đến tâm). Mẫu có thể là đều đặn sao cho hệ số biến thiên quanh bước trung bình là nhỏ, hoặc mẫu có thể là không đều đặn trong trường hợp mà hệ số biến thiên có thể là tương đối lớn. Trong trường hợp khác, bước trung bình có thể là, ví dụ, ít nhất khoảng $10\ \text{nm}$, khoảng $0,1\ \mu\text{m}$, khoảng $0,5\ \mu\text{m}$, khoảng $1\ \mu\text{m}$, khoảng $5\ \mu\text{m}$, khoảng $10\ \mu\text{m}$, khoảng $100\ \mu\text{m}$, hoặc lớn hơn. Theo cách thay thế hoặc bổ sung, bước trung bình có thể là, ví dụ, nhiều nhất khoảng $100\ \mu\text{m}$, khoảng $10\ \mu\text{m}$, khoảng $5\ \mu\text{m}$, khoảng $1\ \mu\text{m}$, khoảng $0,5\ \mu\text{m}$ khoảng $0,1\ \mu\text{m}$, hoặc nhỏ hơn. Bước trung bình cho mẫu cụ thể của các vị trí 16 có thể là giữa một trong các trị số thấp hơn và một trong các trị số cao hơn được chọn từ các phạm vi ở trên. Theo ví dụ, các vị trí 16 có bước (khoảng cách từ tâm đến tâm) là khoảng $1,5\ \mu\text{m}$.

Theo một số ví dụ, các vị trí 16 là các giếng 16', và do đó vật đỡ 12 bao gồm chip của các giếng 16' trong bề mặt của nó. Các giếng 16' (hoặc các vị trí 16 khác với các kết cấu khác nhau, như hình dạng, mặt cắt ngang, v.v.) có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm, ví dụ, kỹ thuật in ảnh litô, in litô nano, các kỹ thuật đóng dấu, các kỹ thuật dập, các kỹ thuật đúc, các kỹ thuật vi khắc, các kỹ thuật in, v.v. Như sẽ được đánh giá cao bởi những người có hiểu biết trong lĩnh vực, kỹ thuật được sử dụng sẽ tùy thuộc vào chế phẩm và hình dạng của vật đỡ 12.

Các giếng 16' có thể là các vi giếng (có ít nhất một kích thước trên thang đo micro, ví dụ, khoảng 1 μm đến khoảng 1000 μm) hoặc các giếng nano (có ít nhất một kích thước trên thang đo nano, ví dụ, khoảng 1 nm đến khoảng 1000 nm). Mỗi giếng 16' có thể được định rõ đặc điểm bằng thể tích, diện tích khoảng hở giếng, độ sâu, và/hoặc đường kính của nó.

Mỗi giếng 16' có thể có thể tích bất kỳ mà có khả năng giới hạn chất lỏng. Thể tích tối thiểu hoặc tối đa có thể được chọn, ví dụ, để chứa lưu lượng (ví dụ, tính chất đa thành phần), độ hòa tan, chế phẩm chất gắn, hoặc độ phản ứng chất gắn được dự kiến cho việc sử dụng ở đầu ra của chip 10. Ví dụ, thể tích có thể ít nhất khoảng $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, khoảng $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$, khoảng 0,1 μm^3 , khoảng 1 μm^3 , khoảng 10 μm^3 , khoảng 100 μm^3 , hoặc lớn hơn. Theo cách thay thế hoặc bổ sung, thể tích có thể nhiều nhất khoảng $1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$, khoảng $1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, khoảng 100 μm^3 , khoảng 10 μm^3 , khoảng 1 μm^3 , khoảng 0,1 μm^3 , hoặc nhỏ hơn. Cần phải hiểu rằng vật liệu gel 24 có thể làm đầy tất cả hoặc một phần thể tích của giếng 16'. Thể tích của vật liệu gel 24 trong giếng riêng lẻ 16' có thể là lớn hơn, nhỏ hơn hoặc giữa các trị số được định rõ ở trên.

Diện tích của mỗi khoảng hở giếng trên bề mặt có thể được chọn dựa trên các tiêu chí tương tự như được nêu ra ở trên đối với thể tích giếng. Ví dụ, diện tích đối với mỗi khoảng hở giếng trên bề mặt có thể là ít nhất khoảng $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$, khoảng $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, khoảng 0,1 μm^2 , khoảng 1 μm^2 , khoảng 10 μm^2 , khoảng 100 μm^2 , hoặc lớn hơn. Theo cách thay thế hoặc bổ sung, diện tích có thể là nhiều nhất khoảng $1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, khoảng 100 μm^2 , khoảng 10 μm^2 , khoảng 1 μm^2 , khoảng 0,1 μm^2 , khoảng $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, hoặc nhỏ hơn.

Độ sâu của mỗi giếng 16' có thể là ít nhất khoảng 0,1 μm , khoảng 1 μm , khoảng 10 μm , khoảng 100 μm , hoặc lớn hơn. Theo cách thay thế hoặc bổ sung, độ sâu có thể là nhiều nhất khoảng $1 \times 10^3 \mu\text{m}$, khoảng 100 μm , khoảng 10 μm , khoảng 1 μm , khoảng 0,1 μm , hoặc nhỏ hơn.

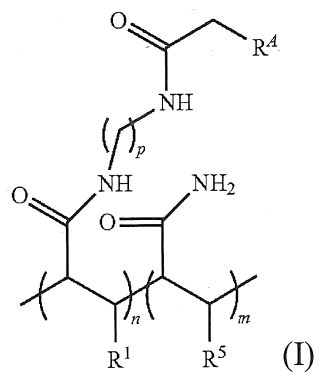
Theo một số ví dụ, đường kính của mỗi giếng 16' có thể là ít nhất khoảng 50 nm, khoảng 0,1 μm , khoảng 0,5 μm , khoảng 1 μm , khoảng 10 μm , khoảng 100 μm , hoặc lớn hơn. Theo cách thay thế hoặc bổ sung, đường kính có thể là nhiều nhất khoảng $1 \times 10^3 \mu\text{m}$,

khoảng 100 μm , khoảng 10 μm , khoảng 1 μm , khoảng 0,5 μm , khoảng 0,1 μm , khoảng 50 nm, hoặc nhỏ hơn.

Trong chip 10 mà được tạo ra, vật liệu gel 24 được đặt trong mỗi giếng riêng biệt 16'. Việc đặt vật liệu gel 24 trong mỗi giếng 16' có thể được thực hiện bằng cách đầu tiên phủ bề mặt được tạo mẫu của vật đỡ 12 với vật liệu gel 24, như được thể hiện trên Fig.2B, và sau đó loại bỏ vật liệu gel 24, ví dụ thông qua việc làm bóng hóa học hoặc cơ khí, từ ít nhất các vùng kẽ 18 trên bề mặt của vật đỡ được tạo kết cấu 12 giữa các giếng 16'. Theo một số ví dụ, vật liệu gel có thể được loại bỏ từ các vùng kẽ bằng các bước rửa mà không yêu cầu làm bóng hóa học hoặc cơ khí. Các quá trình này duy trì ít nhất một ít vật liệu gel 24 trong các giếng 16' nhưng loại bỏ hoặc làm bất hoạt ít nhất hầu như tất cả của vật liệu gel 24 từ các vùng kẽ 18 trên bề mặt của vật đỡ được tạo kết cấu 12 giữa các giếng 16'. Như vậy, các quá trình này tạo ra các miếng gel 24' (Fig.2D) được sử dụng để giải trình tự mà có thể ổn định qua các lần chạy giải trình tự với số lượng lớn các chu kỳ. theo các ví dụ khác, vật liệu gel 24 được đặt trong mỗi giếng 16' bằng các kỹ thuật lắng đọng chọn lọc mà cũng không yêu cầu các bước làm bóng hóa học hoặc cơ khí để loại bỏ vật liệu gel từ các vùng kẽ.

Các vật liệu gel đặc biệt hữu dụng 24 sẽ thay đổi phù hợp với hình dạng của vị trí 16 mà nó ở trong đó. Một số vật liệu gel hữu dụng 24 có thể cả (a) thay đổi phù hợp với hình dạng của vị trí 16 (ví dụ, giếng 16' hoặc đặc tính lõm khác) mà nó ở trong đó và (b) có thể tích mà không ít nhất vượt quá thể tích của vị trí 16 mà nó ở trong đó một cách đáng kể.

Một ví dụ về vật liệu gel thích hợp 24 bao gồm polyme với đơn vị tuần hoàn có công thức (I):



trong đó:

R^1 là H hoặc alkyl được thể tùy ý;

R^4 được chọn từ nhóm bao gồm azido, amino được thể tùy ý, alkenyl được thể tùy ý, hydrazon được thể tùy ý, hydrazin được thể tùy ý, carboxyl, hydroxy, tetrazol được thể tùy ý, tetrazin được thể tùy ý, nitril oxit, nitron, và thiol; R^5 được chọn từ nhóm bao gồm H và alkyl được thể tùy ý;

mỗi nhóm $-(CH_2)_p-$ có thể được thể tùy ý;

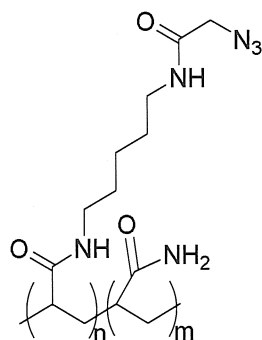
p là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 50;

n là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 50000; và

m là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 100000.

Các polyme thích hợp có Công thức (I) được mô tả, ví dụ, trong các Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2014/0079923 A1, hoặc 2015/0005447 A1, mỗi Công bố đơn được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ). Trong kết cấu của Công thức (I), người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các tiểu đơn vị “n” và “m” là các tiểu đơn vị tuần hoàn mà có thứ tự ngẫu nhiên trong suốt polyme.

Các ví dụ cụ thể về lớp phủ polyme như Công thức (I) is poly(N-(5-azidoaxetamidylpentyl)acrylamit-co-acrylamit (PAZAM), được mô tả, ví dụ, trong các Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2014/0079923 A1, hoặc 2015/0005447 A1, mà bao gồm kết cấu được thể hiện dưới đây:



trong đó n là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 20000, và m là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 100000. Đối với công thức (I), người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ

nhận ra rằng các tiểu đơn vị “n” và “m” là các đơn vị tuần hoàn mà có theo thứ tự ngẫu nhiên trong suốt kết cấu polyme.

Trọng lượng phân tử của polyme của Công thức (I) hoặc polyme PAZAM có thể có phạm vi từ khoảng 10 kDa đến khoảng 1500 kD, hoặc theo ví dụ cụ thể, có thể là khoảng 312 kDa.

Theo một số ví dụ, polyme của Công thức (I) hoặc polyme PAZAM là polyme mạch thẳng. Theo một số phương án khác, polyme của Công thức (I) hoặc polyme PAZAM là polyme liên kết ngang thưa. Theo các ví dụ khác, polyme của Công thức (I) hoặc polyme PAZAM bao gồm mạch nhánh. Các polyme thích hợp khác là các co-polyme của SFA và SFA được tạo dẫn xuất với nhóm bromo-axetamit (ví dụ, BRAPA), hoặc các co-polyme của SFA và SFA được tạo dẫn xuất với nhóm azido-axetamit.

Các ví dụ khác về các vật liệu gel thích hợp 24 bao gồm các vật liệu có kết cấu keo, như gel agarose; hoặc kết cấu lưới polyme, như gelatin; hoặc kết cấu polyme liên kết ngang, như các copolyme và các polyme polyacrylamit, acrylamit không có silan (SFA, xem, ví dụ, Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2011/0059865, mà được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ), hoặc phiên bản SFA được azido hóa. Các ví dụ về các polyme polyacrylamit thích hợp có thể được tạo ra từ acrylamit và axit acrylic hoặc axit acrylic chứa nhóm vinyl như được mô tả, ví dụ, trong WO 2000/031148 (được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ) hoặc từ các monome mà tạo ra các phản ứng cộng hợp vòng hóa được xúc tiến bằng ánh sáng [2+2], ví dụ, như được mô tả trong WO 2001/001143 hoặc WO 2003/0014392 (mỗi tài liệu được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ).

Vật liệu gel 24 có thể là vật liệu gel được tạo ra trước. Các vật liệu gel được tạo ra trước có thể được phủ bằng cách sử dụng kỹ thuật quay phủ, hoặc nhúng, hoặc dòng chảy của gel dưới áp suất âm hoặc dương, hoặc các kỹ thuật được nêu trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 9012022, mà được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ. Nhúng hoặc phủ nhúng có thể là kỹ thuật lắng đọng chọn lọc, tùy thuộc vào vật đỡ 12 và vật liệu gel 24 mà được sử dụng. Ví dụ, vật đỡ được tạo mẫu 12 được nhúng vào trong vật liệu gel được tạo ra trước 24, và vật liệu gel 24 có thể làm đầy các vị trí 16 một cách chọn lọc (ví dụ, vật liệu

gel 24 không lắng đọng trên các vùng kẽ 18), và việc làm bóng (hoặc quá trình loại bỏ khác) có thể không cần thiết.

Polyme hoặc PAZAM được tạo hình sẵn có thể được phủ trên vật đỡ được tạo mẫu 12 bằng cách sử dụng kỹ thuật quay phủ, hoặc nhúng, hoặc dòng chảy của gel dưới áp suất âm hoặc dương, hoặc các kỹ thuật được nêu trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 9012022. Việc gắn polyme hoặc PAZAM có thể cũng diễn ra thông qua quá trình trùng hợp gốc chuyển đổi phân tử bắt đầu từ bề mặt (SI-ATRP) đến bề mặt được silan hóa. Theo ví dụ này, vật đỡ 12 bề mặt có thể được xử lý sơ bộ với APTS (metoxy hoặc ethoxy silan) để liên kết cộng hóa trị silic với một hoặc nhiều các nguyên tử oxy trên bề mặt (mà không định giữ bằng cơ chế, mỗi silic có thể gắn với một, hai hoặc ba nguyên tử oxy). Bề mặt này được xử lý hóa học được sấy để tạo ra lớp đơn nhóm amin. Sau đó, các nhóm amin được phản ứng với Sulfo-HSAB để tạo ra dẫn xuất azido. Sự kích hoạt tia UV ở 21°C với năng lượng từ 1 J/cm² đến 30 J/cm² tạo ra loại nitren hoạt tính, mà có thể sẵn sàng trải qua nhiều phản ứng chèn với PAZAM.

Các ví dụ khác về việc phủ PAZAM trên vật đỡ 12 được mô tả trong Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2014/0200158, mà được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ), và bao gồm liên kết trung gian tia cực tím (UV) của các monome PAZAM với bề mặt được chức năng hóa với amin, hoặc phản ứng liên kết nhiệt liên quan đến nhóm hoạt tính (acryloyl clorua hoặc phân tử chứa alken hoặc alkyn khác) với sự lắng đọng PAZAM sau đó và ứng dụng nhiệt. Theo một số ví dụ, bề mặt 30 được biến đổi với các nhóm alkenyl hoặc xycloalkenyl, mà sau đó có thể phản ứng với các polyme được chức năng hóa với azido như PAZAM hoặc các polyme bao gồm SFA được tạo dẫn xuất với azido, trong các điều kiện như hóa học click, để tạo ra các liên kết cộng hóa trị giữa bề mặt được biến đổi và polyme.

Vẫn theo các ví dụ khác, PAZAM có thể được lắng đọng trên vật đỡ 12, mà bao gồm, ở bề mặt của nó, silan hoặc dẫn xuất silan mà có thể gắn với nhóm chức của PAZAM. Ví dụ, silan hoặc dẫn xuất silan có thể chứa nhóm chức không no (ví dụ, các xycloalken, các xycloalkyn, các xycloalken dị vòng, các xycloalkyn dị vòng, các biến thể được thể của chúng, và các dạng kết hợp của chúng) mà có thể liên kết cộng hóa trị với nhóm chức của

PAZAM. Các ví dụ về các nhóm chức không no xycloalken bao gồm norbornen, dẫn xuất norbornen (ví dụ, (hetero)norbornen bao gồm oxy hoặc nitơ ở vị trí của một trong các nguyên tử cacbon), transxycloocten, các dẫn xuất transxycloocten, transxyclopenten, transxyclohepten, trans-xyclononen, bixyclo[3.3.1]non-1-en, bixyclo[4.3.1]dec-1 (9)-en, bixyclo[4.2.1]non-1(8)-en, và bixyclo[4.2.1]non-1-en. Bất kỳ trong các xycloalken này có thể được thể như được mô tả trong Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2015/0005447, mà được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo toàn bộ. Ví dụ về dẫn xuất norbornen bao gồm [(5-bixyclo[2.2.1]hept-2-enyl)etyl]trimetoxysilan. Các ví dụ về các nhóm chức không no xycloalkyn bao gồm xyclooctyn, dẫn xuất xyclooctyn, hoặc các bixyclononyn (ví dụ, bixyclo[6.1.0]non-4-yn hoặc các dẫn xuất của nó, bixyclo[6.1.0]non-2-yn, hoặc bixyclo[6.1.0]non-3-yn). Các xycloalkyn này có thể cũng được thể như được mô tả trong Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2015/0005447.

Theo các ví dụ này, PAZAM có thể được lắng đọng trên bề mặt của vật đỡ được silan hóa 12 bằng cách sử dụng kỹ thuật quay phủ, hoặc nhúng hoặc phủ nhúng, hoặc dòng của phân tử được chức năng hóa ở áp suất dương hoặc âm, hoặc các kỹ thuật được nêu trong Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 9012022. Để lắng đọng, PAZAM có thể có trong dung dịch (ví dụ, hỗn hợp etanol và nước). Sau khi được lắng đọng, dung dịch PAZAM có thể cũng được tiếp xúc với quá trình lưu hóa để tạo ra vật liệu gel 24.

Vật liệu gel 24 có thể là chất lỏng mà sau đó tạo ra vật liệu gel 24. Ví dụ về việc áp dụng chất lỏng mà sau đó tạo ra vật liệu gel 24 là lớp phủ của chip của các vị trí 16 với acrylamit không có silan và N-[5-(2-bromoacetyl) aminopentyl]acrylamit (BRAPA) ở dạng lỏng và cho phép các chất thử để tạo ra gel bằng cách polyme hóa trên bề mặt. Ví dụ khác liên quan đến việc phủ chip của các vị trí 16 với các monome PAZAM ở dạng lỏng và cho phép các chất thử để tạo ra gel bằng cách polyme hóa trên bề mặt. Việc phủ chip theo cách này có thể sử dụng các thuốc thử hóa học và các quy trình như được nêu trong Công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ số 2011/0059865.

Vật liệu gel 24 có thể được liên kết cộng hóa trị với vật đỡ 12 (ở các vị trí 16) hoặc không thể được liên kết cộng hóa trị với vật đỡ 12. Việc liên kết cộng hóa trị của vật liệu gel 12 với các vị trí 16 là hữu ích để duy trì gel trong các vị trí được tạo kết cấu 16 trong

suốt vòng đời của chip 10 trong nhiều lần sử dụng. Sau đây là một số ví dụ về các phản ứng mà có thể diễn ra giữa PAZAM và silan hoặc dẫn xuất silan trên một số ví dụ của vật đỡ 12, mà dẫn đến các liên kết cộng hóa trị.

Khi silan hoặc dẫn xuất silan trên vật đỡ 12 bao gồm norbornen hoặc dẫn xuất norbornen là nhóm chức không no, norbornen hoặc dẫn xuất norbornen có thể: i) trải qua phản ứng cộng hợp vòng hóa lưỡng cực 1,3 với nhóm azit/azido của PAZAM; ii) trải qua phản ứng ghép đôi với nhóm tetrazin được gắn với PAZAM; trải qua phản ứng cộng hợp vòng hóa với nhóm hydrazon được gắn với PAZAM; trải qua phản ứng thúc đẩy được xúc tiến bằng ánh sáng với nhóm tetrazol được gắn với PAZAM; hoặc trải qua phản ứng cộng hợp vòng hóa với nhóm nitril oxit được gắn với PAZAM.

Khi silan hoặc dẫn xuất silan trên vật đỡ 12 bao gồm xyclooctyn hoặc dẫn xuất xyclooctyn là nhóm chức không no, xyclooctyn hoặc dẫn xuất xyclooctyn có thể: i) trải qua phản ứng cộng hợp vòng hóa 1,3 azit-alkyn được xúc tiến bằng sức căng vòng (strain-promoted azide-alkyne 1,3-cycloaddition - SPAAC) với azit/azido của PAZAM, hoặc ii) trải qua phản ứng cộng hợp vòng hóa alkyn-nitril oxit được xúc tiến bằng sức căng vòng với nhóm nitril oxit được gắn với PAZAM.

Khi silan hoặc dẫn xuất silan trên vật đỡ 12 bao gồm bixyclononyn là nhóm chức không no, bixyclononyn có thể trải qua phản ứng cộng hợp vòng hóa alkyn SPAAC tương tự với các azit hoặc các nitril oxit được gắn với PAZAM do sức căng trong hệ vòng được tạo từ hai vòng.

Trong khi vài ví dụ về các liên kết cộng hóa trị giữa vật đỡ 12 và vật liệu gel 24 được đưa ra, như được lưu ý ở trên và trong nhiều ví dụ, vật liệu gel 24 không cần được liên kết cộng hóa trị với các vị trí 16. Ví dụ, acrylamit không có silan, SFA, không được liên kết cộng hóa trị với phần bất kỳ của vật đỡ 12.

Như được đề cập ở trên, Fig.2C minh họa việc loại bỏ vật liệu gel 24 khỏi các vùng kẽ 18. Việc loại bỏ có thể được thực hiện thông qua việc làm bóng. Việc làm bóng có thể là quá trình xử lý cơ học và/hoặc hóa học.

Việc làm bóng cơ học có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các lực mài với bề mặt của vật đỡ rắn 12 (có vật liệu gel 24 trên đó). Ví dụ các phương pháp bao gồm việc

mài mòn bằng bùn chứa các hạt, lau bằng tấm hoặc vải, cạo, hoặc các phương pháp tương tự. Nó sẽ được hiểu là các hạt được sử dụng để làm bóng có thể hoặc có thể không phải là hình cầu, và có thể có các hình dạng không đều, các hình dạng đa giác, các hình dạng hình trứng, các hình dạng kéo dài, các hình dạng hình trụ, v.v. Bề mặt của các hạt có thể nhẵn hoặc nhám. Bất kỳ loại hạt nào có thể là hữu dụng làm các hạt để làm bóng. Một ví dụ về việc làm bóng bao gồm sử dụng khăn không thớ (loại phòng sạch) được phủ với bùn hạt 3 μm silic oxit (10% trọng lượng/thể tích trong nước) để loại bỏ vật liệu gel 24 khỏi các vùng kẽ 18. Thiết bị mài/bánh mài làm bóng có thể cũng được sử dụng với loại bùn này hoặc loại bùn khác.

Vẫn ví dụ khác về việc làm bóng cơ học có thể cũng đạt được bằng cách sử dụng tia chất lỏng hoặc tia khí (ví dụ, không khí hoặc khí trơ như argon hoặc nitơ) để loại bỏ gel từ các vùng kẽ 18.

Các kỹ thuật làm bóng hóa học, như sự thủy phân hoặc sự giảm triệt gốc acrylamit (ví dụ, thông qua tiếp xúc với benzoyl peroxit hoặc hydro peroxit loãng) có thể cũng được sử dụng. Trong dạng làm bóng này, các hóa chất có thể được bố trí ở trạng thái rắn, lỏng, khí hoặc plasma. Theo đó, việc làm bóng plasma có thể là hữu dụng theo một số ví dụ.

Việc làm bóng có thể cũng liên quan đến sự kết hợp của các phương pháp làm bóng hóa học và cơ học mà bùn hóa học chứa thể huyền phù keo của các hạt được sử dụng để bóc cơ học và sau đó hòa tan hóa học các phần dịch chuyển của vật liệu gel 24 từ các vùng kẽ 18. Theo ví dụ, hệ thống làm bóng cơ hóa học, ví dụ, thiết bị làm bóng đĩa bao gồm Strasbaugh ViPRR II, hoặc đầu làm bóng thích hợp khác, có thể được sử dụng để loại bỏ vật liệu gel 24 từ các vùng kẽ 18 mà không ảnh hưởng có hại đến vật đỡ nằm dưới 12 ở các vùng 18 đó. Loại hệ thống làm bóng này có thể được sử dụng với bùn hạt silic oxit được mô tả ở trước, hoặc với bùn hóa học nhẹ hơn. Theo ví dụ, bùn hóa học nhẹ là bùn chứa nước, cơ bản bao gồm hạt mài được chọn từ nhóm bao gồm canxi cacbonat (CaCO_3) và poly(metyl metacrylat) (PMMA). Kích thước hạt trung bình của CaCO_3 có thể có phạm vi từ khoảng 15 nm đến khoảng 5 μm , và theo ví dụ là khoảng 700 nm. Ngoài CaCO_3 , bùn chứa nước, cơ bản có thể cũng bao gồm chất đệm, chất tạo phức, chất hoạt tính bề mặt, và/hoặc chất phân tán. Ví dụ về chất đệm bao gồm gốc tris (ví dụ,

tris(hydroxymetyl)aminometan), mà có thể có trong dung dịch có độ pH khoảng 9. Ví dụ về chất tạo phức là axit etylendiaminetetraaxetic (EDTA), mà có thể có trong dung dịch có độ pH khoảng 8. Ví dụ về chất hoạt tính bề mặt là natri dodecyl sulfat. Các chất phân tán Polyacrylat có các trọng lượng phân tử khác nhau có thể được sử dụng. Ví dụ về chất phân tán là poly(muối axit acrylic natri).

Các phương pháp khác để làm bóng hoặc làm sạch các vùng kẽ 18 bao gồm các kỹ thuật có gốc từ chất kết dính, ví dụ, các kỹ thuật trong đó màng kết dính phẳng, cứng có ái lực với vật liệu gel 24 được áp dụng, theo đó tạo ra sự tiếp xúc mật thiết (ví dụ, thông qua liên kết hóa học) với vật liệu gel 24 trong các vùng kẽ 18. Việc bóc/loại bỏ cơ học màng kết dính này sẽ dẫn đến việc loại bỏ cơ học vật liệu gel 24 khỏi các vùng kẽ 18, trong khi để lại vật liệu gel 24 trong các vị trí 16.

Theo ví dụ, SFA được ghép với thiophotphat có thể được loại bỏ khỏi các vùng kẽ 18 trên vật đỡ 12 bề mặt như sau: khăn lau Whatman được làm ẩm bằng nước có thể được chấm nhẹ vào trong nhôm oxit (~100 mg, 0,3 μ m) hoặc các hạt thép, và sau đó bùn được tạo ra có thể được chà xát trên bề mặt của vật đỡ (có SFA được ghép với thiophotphat trên đó), trong các hình tròn đồng tâm nhỏ, sử dụng áp lực đều đều, và sau đó khăn lau Whatman được làm ướt bằng nước sạch có thể được sử dụng để loại bỏ bùn và SFA được ghép với thiophotphat khỏi bề mặt.

Các phương pháp làm bóng cơ học và hóa học được minh họa ở đây để loại bỏ vật liệu gel 24 khỏi các vùng kẽ 18 có thể cũng được sử dụng để làm bất hoạt vật liệu gel ở các vùng kẽ 18, dù cho vật liệu gel 24 được loại bỏ hay không. Ví dụ, vật liệu gel 24 có thể được làm bất hoạt đối với khả năng gắn đoạn môi giải trình tự 20 và thực thể không giải trình tự 22.

Sau khi vật liệu gel 24 được đặt trong mỗi giếng 16', (các) đoạn môi giải trình tự 20 và đối tượng/các thực thể không giải trình tự 22 được ghép với vật liệu gel 24. Theo một số ví dụ, (các) đoạn môi 20 có thể được ghép trước khi hoặc sau khi đối tượng/các thực thể không giải trình tự 22 được ghép với vật liệu gel 24. Theo các ví dụ khác, (các) đoạn môi 20 và đối tượng/các thực thể không giải trình tự 22 được đồng ghép với vật liệu gel 24.

Việc ghép nối tiếp có thể được thực hiện bằng cách tiếp xúc vật đỡ 12 (có vật liệu gel 24 trong các vị trí 16) với dung dịch hoặc hỗn hợp chứa (các) đoạn môi giải trình tự 20 và ủ, và sau đó với dung dịch hoặc hỗn hợp chứa thực thể không giải trình tự 22 và ủ. Ngoài ra, việc ghép nối tiếp có thể được thực hiện bằng cách tiếp xúc vật đỡ 12 (có vật liệu gel 24 trong các vị trí 16) với dung dịch hoặc hỗn hợp chứa thực thể không giải trình tự 22 và ủ, và sau đó với dung dịch hoặc hỗn hợp chứa (các) đoạn môi giải trình tự 20 và ủ.

Việc đồng ghép có thể được thực hiện bằng cách tiếp xúc vật đỡ 12 (có vật liệu gel 24 trong các vị trí 16) với dung dịch hoặc hỗn hợp chứa (các) đoạn môi giải trình tự 20 và thực thể không giải trình tự 22, và sau đó ủ. Việc tiếp xúc vật đỡ 12 với dung dịch hoặc hỗn hợp này có thể được thực hiện bằng cách lắng đọng hỗn hợp của (các) đoạn môi giải trình tự 20 và thực thể không giải trình tự 22 lên trên vật đỡ 12. Theo ví dụ, dung dịch hoặc hỗn hợp có thể được kéo ngang vật liệu gel 24 được phủ vật đỡ 12 (được thể hiện trên Fig.2C).

Theo ví dụ bất kỳ theo các ví dụ về việc ghép, incubation diễn ra ở nhiệt độ được xác định trước mà một phần phụ thuộc vào (các) đoạn môi giải trình tự 20 và thực thể không giải trình tự 22 được sử dụng. Đối với các ví dụ, việc ủ có thể được thực hiện ở nhiệt độ có phạm vi từ nhiệt độ phòng (ví dụ, khoảng 25°C) đến khoảng 60°C.

Cũng theo ví dụ bất kỳ theo các ví dụ về việc ghép, dung dịch có thể bao gồm (các) đoạn môi giải trình tự 20 và/hoặc thực thể không giải trình tự 22, nước, chất đệm, và chất xúc tác. Tỷ lệ mol của thực thể không giải trình tự 22 so với đoạn môi giải trình tự 20, dù cho có trong cùng dung dịch/hỗn hợp hoặc các dung dịch/các hỗn hợp riêng lẻ, có phạm vi từ khoảng 0,25:1 đến khoảng 5:1.

Các ví dụ về thích hợp các đoạn môi giải trình tự 20 bao gồm các đoạn môi khuếch đại thuận hoặc các đoạn môi khuếch đại nghịch. Các ví dụ về các đoạn môi giải trình tự thích hợp 20 bao gồm các đoạn môi P5 hoặc P7. Các đoạn môi P5 và P7 được sử dụng trên bề mặt của các mao quản dẫn dòng có sẵn trên thị trường được bán bởi Illumina Inc. để giải trình tự trên các nền tảng thiết bị HiSeq®, HiSeqX®, MiSeq®, NextSeq® và Genome Analyzer®. Các trình tự đoạn môi P5 và P7 bao gồm như sau:

P5: 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGA(dU)CTACAC (SEQ. ID số 1)

P7: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAG*AT (SEQ. ID số 2)

trong đó G* là 8-oxoguanin.

Một cách tùy chọn, một trong số hoặc cả hai đoạn môi P5 và P7 có thể bao gồm đuôi poly T. Đuôi poly T thường được đặt ở đầu 5' của trình tự, nhưng trong một số trường hợp có thể được đặt ở đầu 3'. Trình tự poly T có thể bao gồm số nucleotit T bất kỳ, ví dụ, từ 2 đến 20.

Các đoạn môi P5 và P7, cũng như các đoạn môi giải trình tự 20 khác, có thể được biến đổi ở đầu 5' với nhóm mà có khả năng phản ứng với nhóm chức của vật liệu gel 24. Ví dụ về nhóm chức thích hợp là bixyclo[6.1.0] non-4-yn (BCN), mà có thể phản ứng với azit của vật liệu gel 24. Các đoạn môi kết thúc mẫu khác bao gồm đoạn môi kết thúc bằng tetrazin, đoạn môi kết thúc bằng norbornen, đoạn môi kết thúc bằng alkyn, đoạn môi kết thúc bằng amino, đoạn môi kết thúc bằng epoxy hoặc glycidyl, đoạn môi kết thúc bằng thiophotphat, và đoạn môi kết thúc bằng triazolinedion. Theo một số phương án, các đoạn môi kết thúc bao gồm đoạn môi kết thúc bằng alkyn. Theo các phương án khác, các đoạn môi kết thúc bao gồm đoạn môi kết thúc bằng thiophotphat. Người có hiểu biết trong lĩnh vực sẽ hiểu cách thiết kế và sử dụng các đoạn môi giải trình tự 20 mà thích hợp để thu nạp và khuếch đại các axit nucleic như được biểu diễn ở đây.

Các ví dụ về thích hợp các đối tượng không tham gia giải trình tự 22 bao gồm đoạn môi không có chức năng, sợi polyme, peptit, và/hoặc chất tăng cường huỳnh quang.

Như được đề cập ở trên, đoạn môi không có chức năng là trình tự axit nucleic bất kỳ ở dạng sợi đơn mà, ở dạng ghép, sẽ không tham gia vào quá trình tổng hợp ADN hoặc ARN. Các ví dụ bao gồm trình tự poly T hoặc trình tự poly A.

Các ví dụ của sợi polyme bao gồm dendrime (ví dụ, poly(amido amin hoặc PAMAM), polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin (PCA), poly(etylen glycol) (PEG, ví dụ, poly(etylen oxit) hoặc PEO), poly(etylen imin) (PEI), poly-L-lyzin (PLL), propargyl metacrylat (PMA), poly(metyl metacrylat) (PMMA), poly(N-isopropylacrylamit) (PNIPAM), poly(etylen glycol) acrylat (POEGA), poly(propylen imin) (PPI, mà là lõi dendrime), poly(rượu vinyl) (PVA), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic (PAA), và poly(trox este).

Mỗi trong các vật liệu sợi polyme này có thể có chức năng là các đoạn đệm để tạo ra không gian bổ sung giữa các đoạn mỗi giải trình tự 20 mà được gắn với vật liệu gel 24. Một số trong các vật liệu sợi polyme này cũng có các đặc tính mà có thể bổ sung tính ưa nước vào vật liệu gel 24 và hạn chế liên kết không đặc hiệu trên vật liệu gel 24. Ví dụ về vật liệu sợi polyme này bao gồm PEG. Theo các ví dụ được bộc lộ ở đây, PEG có trọng lượng phân tử có phạm vi từ khoảng 0,5 KDa đến khoảng 10 KDa. Các vật liệu sợi polyme khác cũng là đa chức, ví dụ, poly(trolox este) có thể là đoạn đệm và có thể là chất chống oxy hóa.

Sợi polyme bao gồm nhóm chức mà có thể phản ứng với (các) nhóm của vật liệu gel 24, hoặc được biến đổi để bao gồm nhóm chức mà có thể phản ứng với (các) nhóm của vật liệu gel 24. Các ví dụ về các nhóm chức này bao gồm alkyn, norbornyl, gốc kích hoạt không chứa đồng (ví dụ, dibenzoxycyclooctyn (DIBO) hoặc các nhóm chức khác), và thiol. Các alkyn, các norbornyl, và các gốc kích hoạt không chứa đồng có thể phản ứng với các azit của PAZAM thông qua các phản ứng click. Các thiol có thể phản ứng với SFA. Ví dụ về vật liệu sợi polyme mà bao gồm một trong các nhóm chức được liệt kê là PMA, mà bao gồm alkyn. Các ví dụ về được biến đổi các sợi polyme bao gồm PEG kết thúc bằng alkyn, PMMA kết thúc bằng alkyn, PMMA kết thúc bằng norbornyl, PNIPAM kết thúc bằng thiol, PVA kết thúc bằng alkyn, PVA kết thúc bằng thiol, PAA kết thúc bằng alkyn, và PAA kết thúc bằng thiol.

Theo một số ví dụ, các sợi polyme như được mô tả có thể được ghép với vật liệu gel 24 là thực thể không giải trình tự 22.

Theo các ví dụ khác, các sợi polyme như được mô tả có thể là chất liên kết phân tử mà gắn chất tăng cường huỳnh quang, như chất dập tắt trạng thái bộ ba, chất chống oxy hóa, hoặc chất cho FRET, với vật liệu gel 24. Ví dụ, sợi polyme có thể kết thúc bằng alkyn trên một đầu để gắn với vật liệu gel 24, và nhóm chức (ví dụ, thiol, amine, andehit, hoặc axit carboxylic) trên đầu còn lại để gắn với chất dập tắt trạng thái bộ ba, chất chống oxy hóa, hoặc chất cho FRET.

Các ví dụ về các chất dập tắt trạng thái bộ ba thích hợp được chọn từ nhóm bao gồm xyclo-octyltetraen (COT), Trolox (axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-

carboxylic (Hoffmann-La Roche AG)), và rượu nitrobenzyl (NBA). Các ví dụ về các chất chống oxy hóa thích hợp được chọn từ nhóm bao gồm ascobat, glutathion, axit galic, catechin, Trolox, và vitamin E. Chất cho FRET được gắn được điều chỉnh hoặc được chọn để có sự trùng phổ và hiệu suất FRET tối ưu với các nucleotit đầy đủ chức năng (FFN) (chất màu được phát hiện trong giải trình tự, được kết hợp trong giải trình tự bằng tổng hợp (SBS)). Các ví dụ của chất cho FRET được chọn từ nhóm bao gồm chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu xanh lá (được kết hợp trong các nucleotit trong quy trình giải trình tự) và chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu đỏ (được kết hợp trong các nucleotit trong quy trình giải trình tự). Các ví dụ cụ thể về chất cho nhuộm FRET với các nucleotit đầy đủ chức năng phát ra màu xanh lá (các FFN) bao gồm Cy2® (chất màu cyanin, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), các chất màu Alexa Fluor® (ví dụ, 488) (ThermoFisher Scientific), và các chất màu Atto (ví dụ, 465, 488, và 490) (Atto-Tec); và các ví dụ cụ thể về chất cho nhuộm FRET với các FFN phát ra màu đỏ bao gồm Cy3® (chất màu cyanin, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), các chất màu Alexa Fluor® (ví dụ, 546, 555, 568, và 594) (ThermoFisher Scientific), và các chất màu Atto (ví dụ, 532) (Atto-Tec). Các chất cho FRET có thể là thích hợp để sử dụng trong một hoặc hai kết cấu giải trình tự bằng tổng hợp nhuộm đối với 542 nm, 550 nm, 565 nm (độ dài bước sóng hấp thụ) và/hoặc Rhodamin 6G.

Theo các ví dụ khác, các sợi polyme và chất tăng cường huỳnh quang được gắn cùng tạo thành thực thể không giải trình tự 22. Theo các ví dụ khác này, đầu còn lại của sợi polyme (ví dụ, đầu đối diện với đầu mà được gắn với vật liệu gel 24) bao gồm nhóm chức mà có thể kết hợp hoặc phản ứng với (các) nhóm của chất tăng cường huỳnh quang, hoặc được biến đổi để bao gồm nhóm chức mà có thể kết hợp hoặc phản ứng với (các) nhóm của chất tăng cường huỳnh quang. Các ví dụ về các nhóm chức như vậy bao gồm thiol, amin, andehit, và axit carboxylic. Các nhóm chức khác mà có thể gắn chất tăng cường huỳnh quang với sợi polyme có thể được sử dụng làm giếng.

Như các ví dụ, vitamin E có thể được kết hợp với PAA, và glutathion, axit ascorbic, axit galic hoặc catechin có thể được liên hợp với PEG hoặc PMMA.

Như các ví dụ khác, chất cho FRET có thể được liên hợp với bất kỳ trong các sợi polyme có hoặc được biến đổi với nhóm alkyn.

Ví dụ khác nữa về thực thể không giải trình tự là peptit.

(Các) đoạn môi giải trình tự được ghép 20 và đối tượng/các thực thể không giải trình tự 22 được thể hiện trên các hình Fig.2D và Fig.3. Tỷ lệ mol của thực thể không giải trình tự được ghép 22 so với đoạn môi giải trình tự được ghép 20 có phạm vi từ khoảng 0,25:1 đến khoảng 5:1. Theo ví dụ khác, tỷ lệ mol của thực thể không giải trình tự được ghép 22 so với đoạn môi giải trình tự được ghép 20 có phạm vi từ khoảng 0,5:1 đến khoảng 2:1. Đối tượng/các thực thể không giải trình tự được ghép 22 sẽ không tham gia vào các kỹ thuật giải trình tự được thực hiện tiếp theo, nhưng tốt hơn là tách (các) đoạn môi giải trình tự 20 trong vị trí 16 ra và có thể tạo ra chức năng bổ sung với vị trí 16.

Chip 10 được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng trong nhiều phương pháp hoặc kỹ thuật giải trình tự, bao gồm các kỹ thuật thường được gọi là giải trình tự bằng tổng hợp (sequencing-by-synthesis - SBS), giải trình tự kết nối, giải trình tự pyro, và v.v. với bất kỳ trong các kỹ thuật này, vì vật liệu gel 24 và được gắn các đoạn môi giải trình tự 20 có trong các vị trí 16 và không có trên các vùng kẽ 18, sự khuếch đại sẽ được giới hạn ở các vị trí 16.

Nói một cách ngắn gọn, phản ứng giải trình tự bằng tổng hợp (SBS) có thể được chạy trên hệ thống như các hệ thống giải trình tự HiSeq®, HiSeqX®, MiSeq® hoặc NextSeq® từ Illumina (San Diego, CA). Bộ các phân tử ADN đích để được giải trình tự được lai với các đoạn môi giải trình tự liên kết 20 (và không với thực thể không giải trình tự 22) và sau đó được khuếch đại bằng sự khuếch đại cầu hoặc bằng sự khuếch đại loại trừ động học. Sự biến tính làm cho các mẫu sợi đơn được neo vào vật liệu gel 24, và vài triệu chùm ADN sợi đôi dày đặc được tạo ra (ví dụ, sự tạo chùm). Các phản ứng giải trình tự được thực hiện, và theo một số ví dụ, các đoạn môi giải trình tự 20 và các đối tượng không tham gia giải trình tự 22 (và các đơn vị siêu sao chép bao gồm các đoạn môi được kéo dài trong các bước khuếch đại để bao gồm các bản sao của ADN đích) sau đó không liên kết khỏi vật liệu gel 24 sao cho bề mặt có thể tái sử dụng trong các phản ứng giải trình tự trong tương lai. Do đó, một hoặc nhiều bước gắn các đoạn môi giải trình tự 20 và các đối tượng không tham

gia giải trình tự 22 với vật liệu gel 24, lai ADN đích các phân tử với các đoạn môi giải trình tự 20, khuếch đại cầu, giải trình tự ADN đích, và loại bỏ các đoạn môi giải trình tự 20 và các đối tượng không tham gia giải trình tự 22 và các đơn vị siêu sao chép có thể được lặp lại. Một hoặc nhiều lần lặp có thể được thực hiện.

Để minh họa sáng chế hơn nữa, các ví dụ được đưa ra ở đây. Cần phải hiểu rằng các ví dụ này được tạo ra cho các mục đích minh họa và không được hiểu là để giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Các đoạn môi giải trình tự (ví dụ, P5/P7 với các đuôi poly T) được ghép với đoạn môi không giải trình tự (ví dụ, 5'-hexyn-TTT, được gọi là NSP) trong các giếng của mao quản dẫn dòng có sẵn trên thị trường được bán bởi Illumina, Inc. Tỷ lệ mol của đoạn môi không giải trình tự so với đoạn môi giải trình tự được thay đổi giữa các mẫu. Đoạn môi giải trình tự được sử dụng mà không có đoạn môi không giải trình tự cho hai mẫu thử kiểm soát.

Hỗn hợp được điều chế cho mỗi mẫu thử. Hỗn hợp được bao gồm nước siêu tinh khiết, chất đệm, và lượng dư các chất xúc tác (ví dụ, CuSO₄ (20 mM – 200 mM), ascorbat (20 mM - 200 mM), và pentametyldietyltri-amin (PMDTA) (105 mM – 1050 mM). Nồng độ của (các) đoạn môi giải trình tự là khoảng 1 µM. Tổng lượng chất xúc tác là giống nhau trong mỗi mẫu thử. Tỷ lệ mol của đoạn môi không giải trình tự (NSP) so với đoạn môi giải trình tự (P5/P7) được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1

Đường mao quản dẫn dòng	1	2	3	4	5	6	7
Mẫu thử	Kiểm soát 1	2	3	4	Kiểm soát 5	6	7
NSP:P5/P7	0:1	2:1	5:1	10:1	0:1	20:1	50:1

Mỗi hỗn hợp được áp dụng với đường mao quản dẫn dòng tương ứng và được ủ ở khoảng 60°C. Mao quản dẫn dòng được rửa để loại bỏ các đoạn môi không liên kết.

Hỗn hợp tetrachloro-fluorescein (TET) bao gồm chất đệm và các oligo TET (ví dụ, các oligonucleotit được dẫn nhãn là chất màu có các trình tự bù với các đoạn môi T10)

được áp dụng với các đường mao quản dẫn dòng để làm biến đổi màu bề mặt các đoạn môi giải trình tự. TET có thể được lai với các đoạn môi P10 trên bề mặt; TET dư có thể được rửa sạch, và nồng độ chất màu được gắn (về mặt cường độ) có thể được đo bằng sự phát hiện huỳnh quang bằng cách sử dụng thiết bị quét, như Máy quét Typhoon (General Electric). Từ dữ liệu về cường độ, sự phân bố không gian và mật độ đoạn môi có thể được xác định. Các kết quả được thể hiện trên Fig.4. Các kết quả thể hiện việc ghép các đoạn môi giải trình tự với đoạn môi không giải trình tự có thể so sánh với việc ghép các đoạn môi giải trình tự mà không có đoạn môi không giải trình tự ở các tỷ lệ mol dưới 10:1.

Ví dụ 2

Các đoạn môi giải trình tự (ví dụ, P5/P7 với các đuôi poly T) được ghép với đoạn môi không giải trình tự (ví dụ, 5'-hexyn-TTT) trong các giếng của mao quản dẫn dòng có sẵn trên thị trường được bán bởi Illumina, Inc. Tỷ lệ mol của đoạn môi không giải trình tự so với đoạn môi giải trình tự được thay đổi theo các mẫu. Đoạn môi giải trình tự được sử dụng mà không có đoạn môi không giải trình tự cho một mẫu thử kiểm soát.

Hỗn hợp được điều chế mỗi mẫu thử. Hỗn hợp được bao gồm nước siêu tinh khiết, chất đệm, và lượng dư các chất xúc tác (ví dụ, CuSO_4 (20 mM – 200 mM), ascobat (20 mM - 200 mM), và pentametyldietyltri-amin (PMDTA) (105 mM – 1050 mM). Nồng độ của các đoạn môi giải trình tự P5/P7 là khoảng 1 μM . Tổng lượng chất xúc tác thay đổi đối với một số hỗn hợp. Tỷ lệ mol của đoạn môi không giải trình tự so với đoạn môi giải trình tự và các biến thể trong lượng chất xúc tác được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

Đường mao quản dẫn dòng	1	2	3	4	5	6	7
Mẫu thử	8	9	Kiểm soát 10	11	12	13	14
NSP:P5/P7	0,25:1	0,5:1	0:1	1:1	2:1	2:1	5:1
Tổng chất xúc tác	1X*	1X	1X	1X	1,5X	1X	4X

*X = lượng bazơ của cả ba chất xúc tác

Mỗi hỗn hợp được áp dụng với đường mao quản dẫn dòng tương ứng và được ủ ở khoảng 60°C. Mao quản dẫn dòng được rửa để loại bỏ các đoạn mồi không liên kết.

Mao quản dẫn dòng được tiếp xúc với sự lai hóa để chụp ảnh, tạo chùm, và giải trình tự. Các cường độ của Read 2 C1A được đo, và các kết quả này được thể hiện trên Fig.5. Các kết quả này minh họa việc ghép đoạn mồi giải trình tự với đoạn mồi không giải trình tự mà không có lượng dư chất xúc tác có thể tăng cường độ giải trình tự.

Ví dụ 3

Các đoạn mồi giải trình tự P5/P7 với các đuôi poly T được ghép với sợi polyme, là thực thể không giải trình tự (được gọi là sợi polyme không tham gia giải trình tự hoặc NSPS), với hai mao quản dẫn dòng có sẵn trên thị trường được bán bởi Illumina Inc. Sợi polyme là PEG-alkyn, và trọng lượng phân tử của PEG alkyn được thay đổi theo các mẫu. Tỷ lệ mol của sợi polyme không tham gia giải trình tự so với đoạn mồi giải trình tự cũng được thay đổi theo các mẫu. Đoạn mồi giải trình tự được sử dụng mà không có sợi polyme không tham gia giải trình tự cho bốn các mẫu thử kiểm soát.

Hai hỗn hợp được điều chế. Đoạn mồi giải trình tự hỗn hợp được bao gồm nước siêu tinh khiết, chất đệm, và lượng dư các chất xúc tác (ví dụ, CuSO₄ (20 mM – 200 mM), ascorbat (20 mM - 200 mM), và pentametyldiethylentriamin (PMDTA) (105 mM – 1050 mM). Nồng độ của các đoạn mồi giải trình tự P5/P7 là khoảng 1 µM. Các dung dịch PEG-alkyn mới được điều chế được sử dụng (ví dụ, các PEG-alkyn với trọng lượng phân tử khác nhau được hòa tan trong nước).

Đoạn mồi giải trình tự hỗn hợp được áp dụng với đường mao quản dẫn dòng tương ứng, với hoặc không có một trong các dung dịch sợi polyme không tham gia giải trình tự với các tỷ lệ mol mong muốn, như được thể hiện trong bảng 3. Bảng 3 cũng biểu thị trọng lượng phân tử PEG-alkyn mà được sử dụng trong mỗi đường. Các mao quản dẫn dòng được ủ ở khoảng 60°C, và được rửa để loại bỏ các vật liệu không được liên kết.

Bảng 3

MAO QUẢN DẪN DÒNG 1								
Đường	1	2	3	4	5	6	7	8

Mẫu thử	Kiểm soát 15	16	17	18	19	Kiểm soát 20	21	22
NSPS: P5/P7	0:1	0,5:1	2:1	0,5:1	2:1	0:1	0,5:1	2:1
PEG-alkyn MW (KDa)	Không có	0,5	0,5	1	1	Không có	2	2
MAO QUẢN DẪN DÒNG 2								
Đường	1	2	3	4	5	6	7	8
Mẫu thử	Kiểm soát 23	24	25	26	Kiểm soát 27	28	29	30
NSPS: P5/P7	0:1	0,5:1	1:1	2:1	0:1	0,5:1	1:1	2:1
PEG-alkyn MW (KDa)	Không có	5	5	5	Không có	10	10	10

Các mao quản dẫn dòng được tiếp xúc với sự lai hóa để chụp ảnh, tạo chùm, và giải trình tự. Dữ liệu giải trình tự được thu thập và các kết quả cho phần trăm của các chùm xuyên qua bộ lọc (% phần xuyên qua bộ lọc (PF)) được thể hiện trên các hình Fig.6A (mao quản dẫn dòng 1) và Fig.6B (mao quản dẫn dòng 2) và các kết quả cho phần nhảy cách (PH) được thể hiện trên các hình Fig.7A (mao quản dẫn dòng 1) và Fig.7B (mao quản dẫn dòng 2). % Phần xuyên qua bộ lọc (PF) là hệ mét được sử dụng để mô tả các chùm mà qua ngưỡng thuần và được sử dụng cho việc xử lý và phân tích thêm dữ liệu giải trình tự. % Phần nhảy cách là hệ mét mô tả lượng các chùm giống hệt nhau được đặt trong vùng lân cận của chùm duy nhất. % Phần xuyên qua bộ lọc cao hơn và % phần nhảy cách thấp hơn dẫn đến hiệu suất tăng của các chùm duy nhất được sử dụng cho dữ liệu giải trình tự. Các kết quả này minh họa việc ghép các đoạn môi giải trình tự với trọng lượng phân tử PEG-alkyn thấp hơn (ví dụ, KDa > 10) có thể so sánh với việc ghép các đoạn môi giải trình tự mà không có bất kỳ PEG-alkyn nào. Như vậy, việc đưa thực thể không giải trình tự sợi polyme vào không ảnh hưởng có hại đến các kết quả giải trình tự, và có thể bổ sung tính ưa nước vào vật liệu gel trong mao quản dẫn dòng các giếng, hạn chế liên kết không đặc hiệu, v.v.

Các lưu ý bổ sung

Nên được hiểu rõ rằng tất cả các kết hợp của các khái niệm đã nêu ở trên (miễn là các khái niệm không mâu thuẫn với nhau) được dự tính là một phần của sáng chế được bộc lộ ở đây. Cụ thể, tất cả các kết hợp của yêu cầu bảo hộ xuất hiện ở cuối sáng chế được dự tính là một phần của sáng chế được bộc lộ ở đây. Cũng nên được hiểu rõ rằng thuật ngữ được sử dụng rõ ràng ở đây mà cũng có thể xuất hiện trong sáng chế bất kỳ được kết hợp bằng cách tham khảo nên được thống nhất nghĩa nhất quán nhất với các khái niệm cụ thể được bộc lộ ở đây.

Tất cả các công bố, bằng sáng chế và các ứng dụng bằng sáng chế được trích dẫn trong bản mô tả này được kết hợp bằng cách tham khảo toàn bộ.

Tham chiếu trong suốt bản mô tả đến “một ví dụ”, “ví dụ khác”, “ví dụ”, và v.v, nghĩa là yếu tố cụ thể (ví dụ, đặc tính, kết cấu, và/hoặc tính năng) được mô tả liên quan đến ví dụ được bao gồm trong ít nhất một ví dụ được mô tả ở đây, và có thể hoặc không thể có theo các ví dụ khác. Ngoài ra, được hiểu rằng các yếu tố được mô tả cho ví dụ bất kỳ có thể được kết hợp theo cách phù hợp bất kỳ theo các ví dụ khác nhau trừ khi được quy định cụ thể.

Cần phải hiểu rằng các phạm vi được bố trí ở đây bao gồm phạm vi đã được nêu và trị số hoặc phạm vi phụ bất kỳ trong phạm vi đã được nêu. Ví dụ, phạm vi từ khoảng 0,5 KDa đến ít hơn khoảng 10 KDa nên được giải thích để bao gồm không chỉ các giới hạn được nêu rõ ràng từ khoảng 0,5 KDa đến ít hơn khoảng 10 KDa, nhưng cũng để bao gồm các trị số riêng lẻ, như khoảng 0,8 KDa, khoảng 3,25 KDa, khoảng 5 KDa, khoảng 7,5 KDa, v.v., và các phạm vi phụ, như từ khoảng 4,25 KDa đến khoảng 9 KDa, từ khoảng 5,4 KDa đến khoảng 7,75 KDa, v.v. Hơn nữa, khi “khoảng” và/hoặc “hầu như” được sử dụng để mô tả trị số, điều này có nghĩa là bao gồm các biến thể nhỏ (lên đến +/- 10%) từ trị số đã được đề cập.

Trong khi vài ví dụ đã được mô tả chi tiết, cần hiểu rằng các ví dụ được bộc lộ có thể được biến đổi. Do đó, mô tả trên cần được xem là không giới hạn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chip, bao gồm:

vật đỡ có nhiều giếng riêng biệt;
 vật liệu gel được đặt trong mỗi giếng riêng biệt;
 đoạn môi giải trình tự được ghép với vật liệu gel; và
 thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel và được kết nối qua chất liên kết với chất đập tắt trạng thái bộ ba hoặc chất chống oxy hóa;
 mỗi trong số đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự ở dạng ghép;
 trong đó

thực thể không giải trình tự được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyethyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(N-isopropylacrylamit), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(trolox este), peptit, và đoạn môi không có chức năng là trình tự axit nucleic ở dạng sợi đơn bất kỳ mà sẽ không tham gia vào quá trình tổng hợp ADN hoặc ARN.

2. Chip theo điểm 1, trong đó thực thể không giải trình tự là đoạn môi không có chức năng, và trong đó đoạn môi không có chức năng là polyT hoặc polyA;
 hoặc

thực thể không giải trình tự là poly(etylen glycol) có trọng lượng phân tử có phạm vi từ khoảng 0,5 KDa đến khoảng 10 KDa.

3. Chip theo điểm 1, trong đó thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel qua nhóm chức đầu cuối được chọn từ nhóm bao gồm alkyn, norbornyl, gốc kích hoạt không chứa đồng, và thiol.

4. Chip theo điểm bất kỳ trong số điểm 1 hoặc điểm 3, trong đó thực thể không giải trình tự bao gồm chất liên kết và chất dập tắt trạng thái bộ ba hoặc chất chống oxy hóa được liên kết với chất liên kết;

trong đó theo tùy chọn

chất liên kết được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(N-isopropylacrylamit), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, và poly(trolox este); và

một trong số:

chất dập tắt trạng thái bộ ba được chọn từ nhóm bao gồm xyclo-octyltetraen (COT), Trolox (axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-carboxylic), và rượu nitrobenzyl (NBA); hoặc

chất chống oxy hóa được chọn từ nhóm bao gồm ascobat, glutathion, axit galic, catechin, Trolox (axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-carboxylic), và vitamin E.

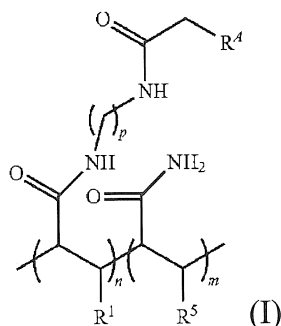
5. Chip theo điểm bất kỳ trong số điểm 1 hoặc điểm 4, trong đó chất cho truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET- fluorescence resonance energy transfer) được liên kết với chất liên kết; và

chất cho FRET được chọn từ nhóm bao gồm chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu xanh lá và chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu đỏ.

6. Chip theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó tỷ lệ mol của thực thể không giải trình tự so với đoạn mồi giải trình tự có phạm vi từ khoảng 0,25:1 đến khoảng 5:1.

7. Chip theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó:

vật liệu gel bao gồm đơn vị tuần hoàn có công thức (I):



trong đó:

R^1 là H hoặc alkyl được thể tùy ý;

R^4 được chọn từ nhóm bao gồm azido, amino được thể tùy ý, alkenyl được thể tùy ý, hydrazon được thể tùy ý, hydrazin được thể tùy ý, carboxyl, hydroxy, tetrazol được thể tùy ý, tetrazin được thể tùy ý, nitril oxit, nitron, và thiol;

R^5 được chọn từ nhóm bao gồm H và alkyl được thể tùy ý;

mỗi nhóm $-(CH_2)_p-$ có thể được thể tùy ý;

p là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 50;

n là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 50000; và

m là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 100000.

8. Chip, bao gồm:

vật đỡ có nhiều giếng riêng biệt;

vật liệu gel được đặt trong mỗi giếng riêng biệt;

đoạn mỗi giải trình tự được ghép với vật liệu gel;

đoạn đệm được ghép với vật liệu gel và được kết nối qua chất liên kết với chất dập tắt trạng thái bộ ba, chất chống oxy hóa, hoặc chất cho truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (FRET); và

đoạn đệm được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyethyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(N-isopropylacrylamit), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(trox este), và các dạng kết hợp của chúng.

9. Chip theo điểm 8 trong đó

chất dập tắt trạng thái bộ ba được liên kết với đoạn đệm; và
 chất dập tắt trạng thái bộ ba được chọn từ nhóm bao gồm xyclo-octyltetraen (COT), Trolox (axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic), và rượu nitrobenzyl (NBA);

hoặc trong đó

chất chống oxy hóa được liên kết với đoạn đệm; và
 chất chống oxy hóa được chọn từ nhóm bao gồm ascobat, glutathion, axit galic, catechin, Trolox (axit 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic), và vitamin E;

hoặc trong đó

chất cho FRET được liên kết với đoạn đệm; và
 chất cho FRET được chọn từ nhóm bao gồm chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu xanh lá và chất cho nhuộm FRET với chất màu phát ra màu đỏ.

10. Chip theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 9 trong đó tỷ lệ mol của đoạn đệm so với đoạn mồi giải trình tự có phạm vi từ khoảng 0,25:1 đến khoảng 5:1;

và/hoặc

trong đó đoạn đệm được ghép với vật liệu gel qua nhóm chức đầu cuối được chọn từ nhóm bao gồm alkyn, norbornyl, gốc kích hoạt không chứa đồng, và thiol.

11. Phương pháp tạo ra chip theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1-10, bao gồm:

bước đặt vật liệu gel trong mỗi giếng trong số nhiều giếng riêng biệt của vật đỡ;

bước ghép đoạn mồi giải trình tự với vật liệu gel; và

bước ghép thực thể không giải trình tự với vật liệu gel và kết nối thực thể không giải trình tự nói trên qua chất liên kết với chất dập tắt trạng thái bộ ba hoặc chất chống oxy hóa; trong đó

thực thể không giải trình tự được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyethyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(N-isopropylacrylamit),

poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(trolox este), peptit, và đoạn môi không có chức năng là trình tự axit nucleic ở dạng sợi đơn bất kỳ mà sẽ không tham gia vào quá trình tổng hợp ADN hoặc ARN.

12. Phương pháp theo điểm 11 trong đó đoạn môi giải trình tự được ghép với vật liệu gel trước khi hoặc sau khi thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel;

hoặc

đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự được đồng ghép với vật liệu gel.

13. Phương pháp theo điểm 12 trong đó việc đồng ghép được thực hiện bằng cách:

lắc động hỗn hợp gồm đoạn môi giải trình tự và thực thể không giải trình tự lên trên vật đỡ có vật liệu gel trên đó; và

ủ vật đỡ ở nhiệt độ được xác định trước.

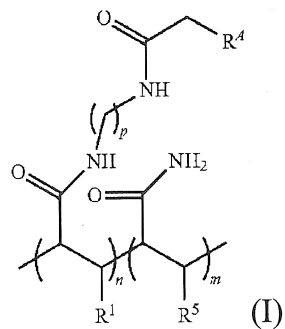
14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 13 trong đó:

thực thể không giải trình tự được chọn từ nhóm bao gồm dendrime, polydextran, metacryloyloxyetyl phosphorylcolin, poly(etylen glycol), poly(etylen imin), poly-L-lyzin, propargyl metacrylat, poly(metyl metacrylat), poly(etylen glycol) acrylat, poly(propylen imin), poly(rượu vinyl), poly(2-etyl-2-oxazolin), axit polyacrylic, poly(trolox este), peptit, và đoạn môi không có chức năng; và

thực thể không giải trình tự được ghép với vật liệu gel qua nhóm chức đầu cuối được chọn từ nhóm bao gồm alkyn, norbornyl, gốc kích hoạt không chứa đồng, và thiol.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 11 đến 14 trong đó:

vật liệu gel bao gồm đơn vị tuần hoàn có công thức (I):



trong đó:

R^1 là H hoặc alkyl được thế tùy ý;

R^4 được chọn từ nhóm bao gồm azido, amino được thế tùy ý, alkenyl được thế tùy ý, hydrazon được thế tùy ý, hydrazin được thế tùy ý, carboxyl, hydroxy, tetrazol được thế tùy ý, tetrazin được thế tùy ý, nitril oxit, nitron, và thiol;

R^5 được chọn từ nhóm bao gồm H và alkyl được thế tùy ý;

mỗi nhóm $-(CH_2)_p-$ có thể được thế tùy ý;

p là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 50;

n là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 50000; và

m là số nguyên trong phạm vi từ 1 đến 100000;

thực thể không giải trình tự ở dạng ghép.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Illumina, Inc.

<120> CHIP CHỨA ĐOẠN MỖI GIẢI TRÌNH TỰ VÀ THỰC THỂ KHÔNG GIẢI TRÌNH TỰ, VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA CHIP NÀY

<130> IP-1486-PCT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi_liên kết

<400> 1

aatgatacgg cgaccaccga gaductacac

30

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi_liên kết

<220>

<221> đặc tính_hỗn hợp

<222> (22)..(22)

<223> 8-oxoguanine

<400> 2

caagcagaag acggcatacg anat

24

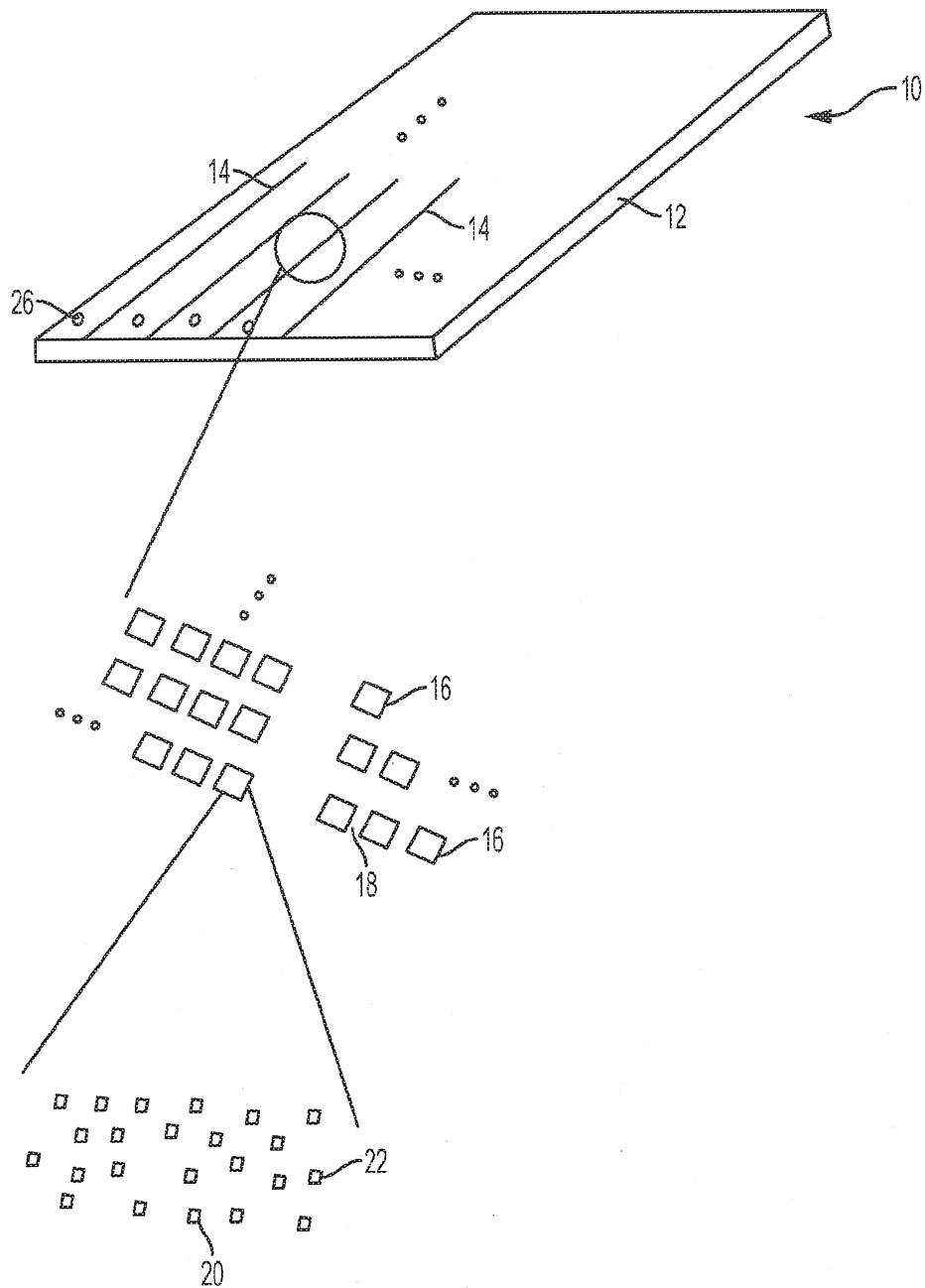


FIG. 1

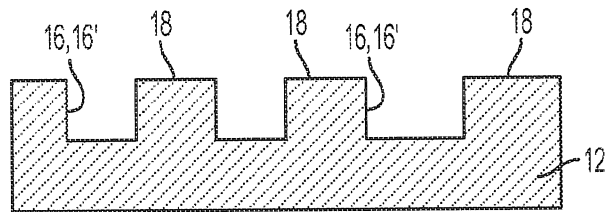


FIG. 2A

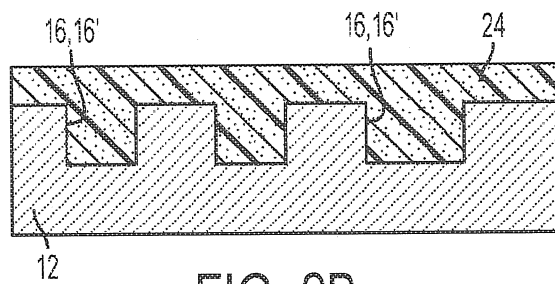


FIG. 2B

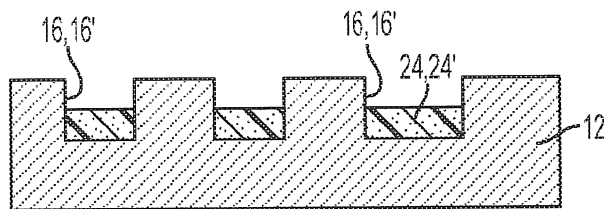


FIG. 2C

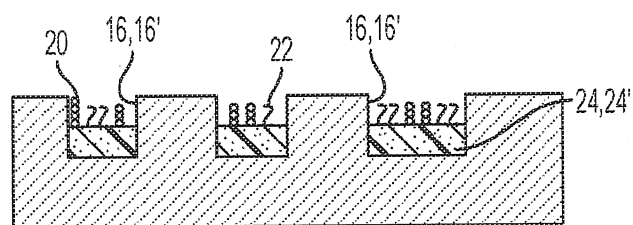


FIG. 2D

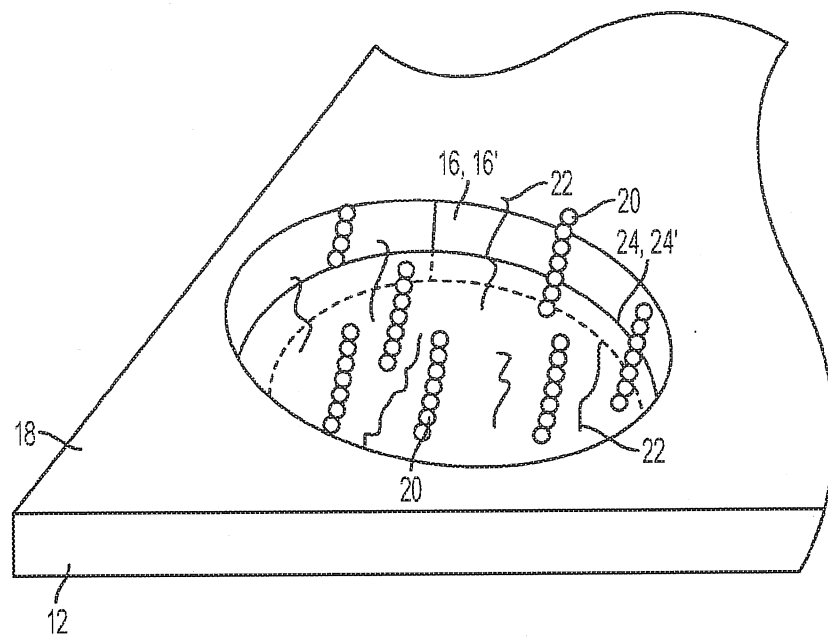


FIG. 3

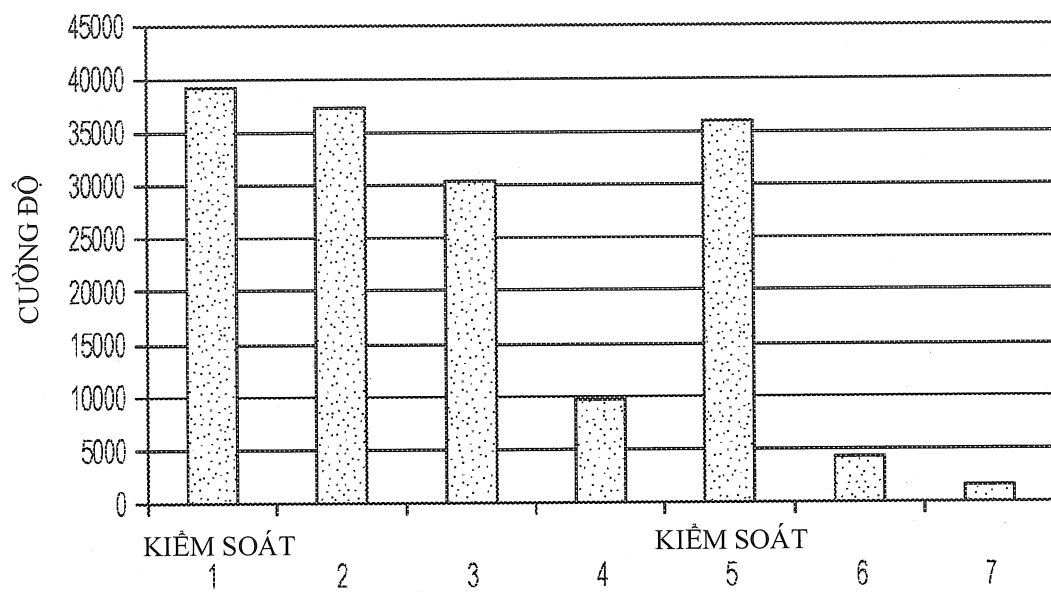


FIG. 4

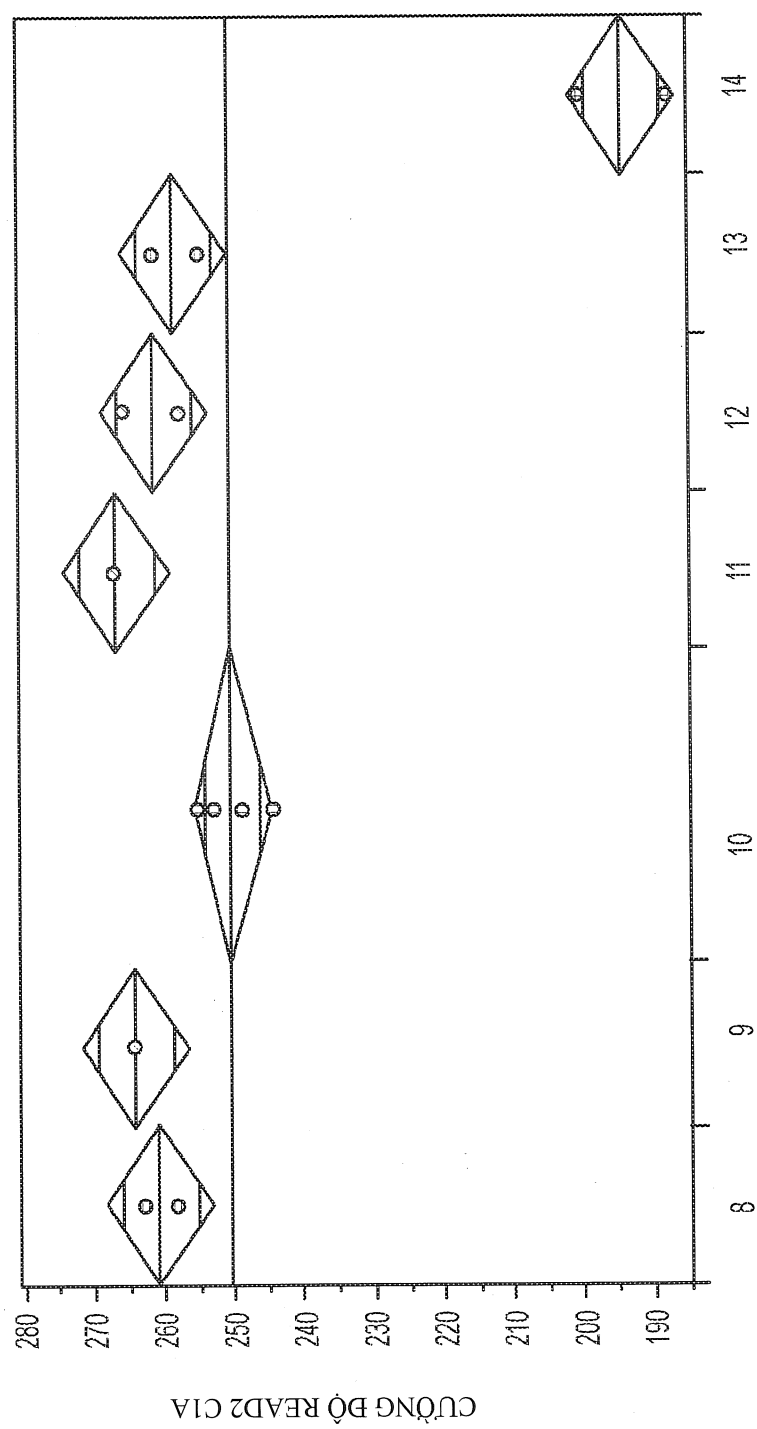


FIG. 5

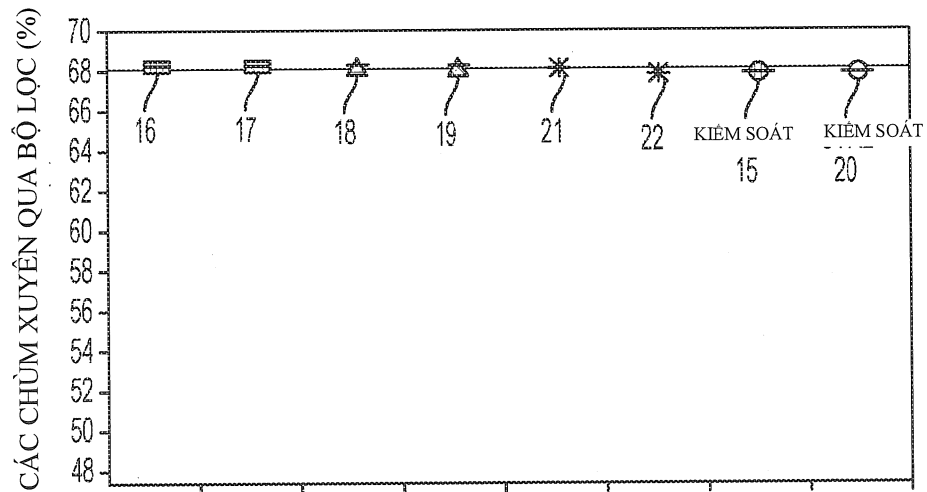


FIG. 6A

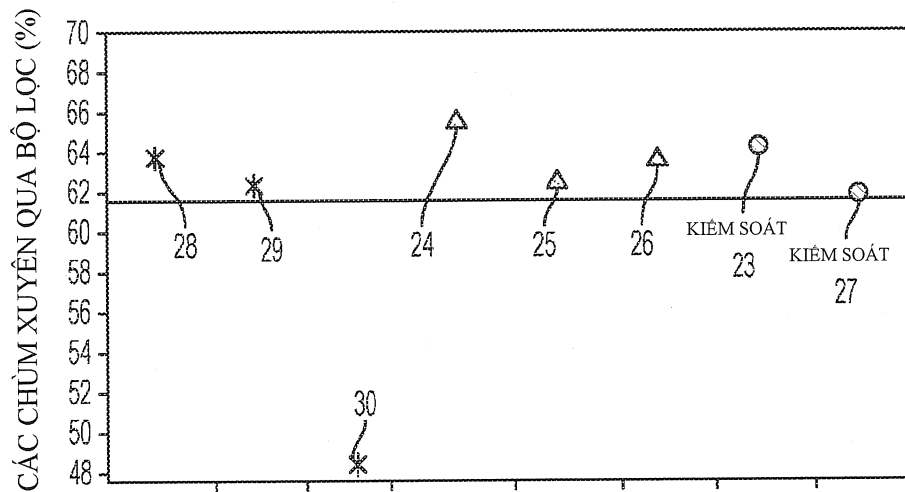


FIG. 6B

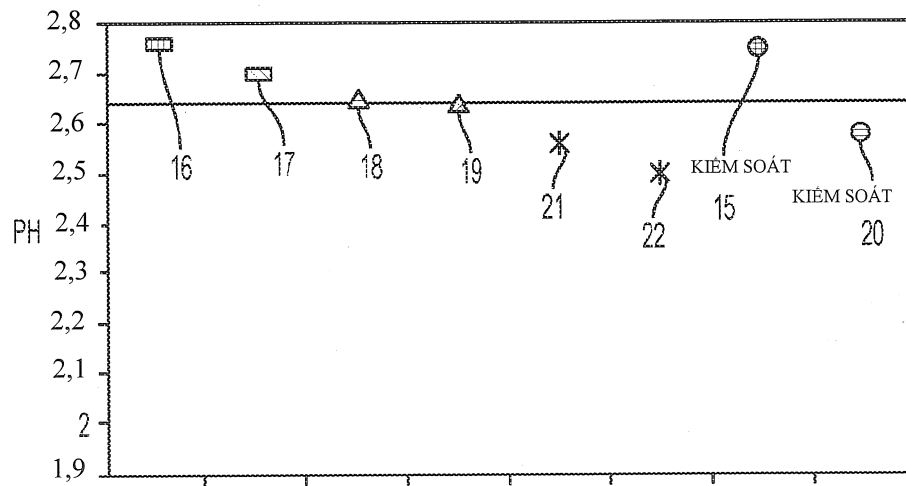


FIG. 7A

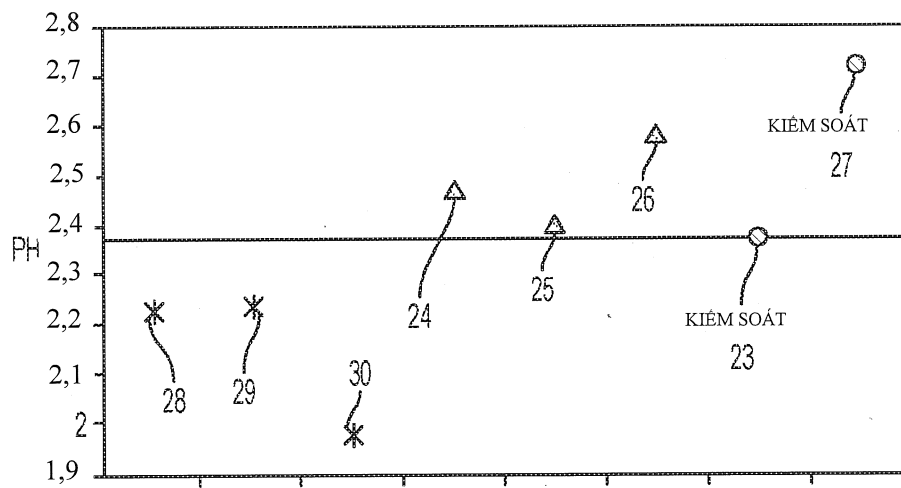


FIG. 7B