



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

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

(11)



1-0048882

(51)^{2020.01} C12Q 1/6806; C12Q 1/6869

(13) B

(21) 1-2021-08273

(22) 22/12/2020

(86) PCT/US2020/066549 22/12/2020

(87) WO 2021/133770 01/07/2021

(30) 62/952,866 23/12/2019 US; 62/952,799 23/12/2019 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/11/2022 416A

(73) 1. ILLUMINA, INC. (US)

5200 Illumina Way, San Diego, CA 92122, United States of America

2. ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (GB)

19 Granta Park, Great Abington, Cambridge Cambridgeshire CB21 6DF, United Kingdom

3. ILLUMINA SINGAPORE PTE. LTD. (SG)

29 Woodlands Industrial Park E1, North Tech Lobby 3, #02-13/18, Singapore 757716, Singapore

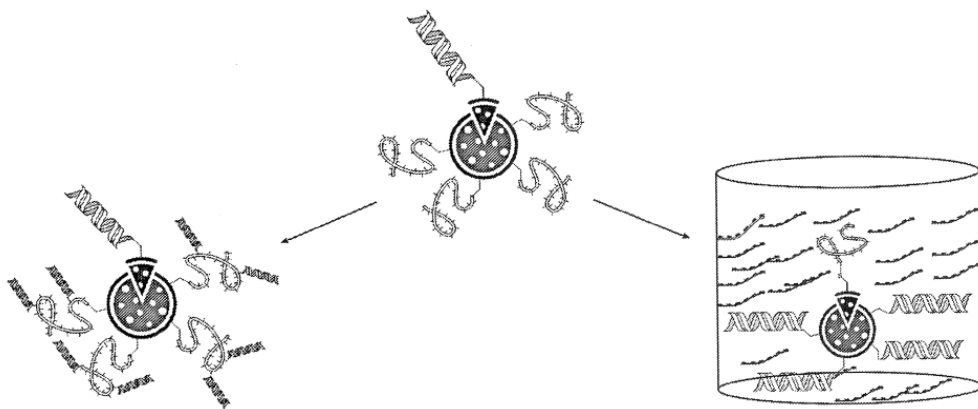
(72) YANG, Xiangyuan (SG); GEORGE, Wayne N. (GB); GATTI LAFRANCONI, Pietro (IT); TEO, Yin Nah (SG); BROWN, Andrew, A. (GB); BACIGALUPO, Maria, Rogert (AR); BRUSTAD, Eric (US); BOHRA, Hassan (IN); WANG, Clifford (US).

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

(54) HẠT NANO CÓ VỊ TRÍ MẪU ĐƠN LẺ ĐỂ LIÊN KẾT POLYNUCLEOTIT MẪU VÀ PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ SỬ DỤNG HẠT NANO NÀY

(21) 1-2021-08273

(57) Sáng chế đề cập đến hạt nano bao gồm khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung, trong đó khung được chọn từ polyme acrylamit bất đối một hoặc dendrime bao gồm các đơn vị cấu tạo lặp lại lysyl, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung được chọn từ một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị và một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung được chọn từ các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị và các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp giải trình tự sử dụng hạt nano này.



HÌNH 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hạt nano bao gồm khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp giải trình tự sử dụng hạt nano này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nhiều nền tảng giải trình tự hiện nay sử dụng công nghệ “giải trình tự bằng phương pháp tổng hợp” (SBS) và các phương pháp dựa trên huỳnh quang để phát hiện. Theo một số ví dụ, nhiều polynucleotit đích được phân lập từ thư viện thành các trình tự, hoặc polynucleotit mẫu, được gắn vào bề mặt của lớp nền trong quy trình được biết đến là gieo mầm. Sau đó, nhiều bản sao của polynucleotit mẫu có thể được tổng hợp ở điểm gắn vào bề mặt ở vùng lân cận với nơi gieo mầm polynucleotit mẫu đơn lẻ mà nó là bản sao, trong quy trình tạo cụm. Tiếp đó, các bản sao mới hình thành của các polynucleotit đã tạo cụm được tổng hợp trong các điều kiện mà tại đó, chúng phát ra tín hiệu nhận biết từng nucleotit khi nó được gắn vào sợi mới hình thành. Việc tạo cụm cho nhiều bản sao của polynucleotit mẫu đã gieo mầm ở vùng lân cận với nơi mà nó được gieo mầm ban đầu dẫn đến việc khuếch đại tín hiệu tạo ra trong quá trình polyme hóa dễ thấy, giúp cải thiện khả năng phát hiện.

Việc gieo mầm và tạo cụm đối với quy trình SBS diễn ra tốt đẹp khi nhiều bề mặt lớp nền khả dụng nhất có thể được gieo mầm với các polynucleotit mẫu, từ đó có thể tối đa hóa lượng thông tin giải trình tự thu được trong quá trình tiến hành giải trình tự. Ngược lại, nói chung là, càng ít diện tích bề mặt lớp nền khả dụng dùng cho gieo mầm và tạo cụm, thì quy trình SBS có thể càng kém hiệu quả, làm tăng thời lượng, chất phản ứng, chi phí và khiến quá trình xử lý dữ liệu để thu được lượng thông tin giải trình tự cho trước của một thư viện cho trước trở nên phức tạp.

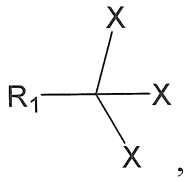
Việc gieo mầm và tạo cụm cũng diễn ra tốt đẹp khi các polynucleotit mẫu từ một thư viện có các trình tự khác nhau gieo mầm trên, hoặc gắn vào, các vị trí trên bề mặt đủ

xa khỏi nhau sao cho quy trình tạo cụm sẽ tạo ra các cụm polynucleotit được sao chép riêng biệt trong không gian, mỗi bản sao này là do việc gieo mầm polynucleotit mẫu đơn lẻ, một tình trạng thường được gọi là tình trạng đơn dòng. Tức là thông thường, thư viện gồm các polynucleotit mẫu có thể bao gồm một số lượng lớn phân tử polynucleotit mẫu có các trình tự nucleotit khác nhau. Nếu hai polynucleotit mẫu như vậy gieo mầm quá gần nhau trên bề mặt của lớp nền, thì quy trình tạo cụm có thể tạo ra các quần thể polynucleotit được sao chép xáo trộn trong không gian, một vài trong số đó có trình tự của một trong các polynucleotit mẫu được gieo mầm gần đó và số còn lại có trình tự của polynucleotit mẫu đơn lẻ khác cũng được gieo mầm gần đó trên bề mặt này. Hoặc hai cụm tạo nên từ hai polynucleotit mẫu khác nhau mà được gieo mầm ở vùng lân cận quá gần nhau có thể quá liên kết với nhau hoặc nối liền nhau đến mức mà hệ thống chụp hình dùng trong quy trình SBS có thể không phân biệt được chúng là các cụm riêng rẽ, mặc dù có thể không có sự xáo trộn trong không gian hoặc có sự xáo trộn rất nhỏ của các trình tự gắn vào lớp nền giữa các cụm. Tình trạng bất lợi này thường được gọi là tình trạng đa dòng. Vì vậy, có thể sẽ khó khăn hơn, mất nhiều thời gian hơn, tốn kém hơn và hiệu quả thấp hơn cũng như đòi hỏi nhiều quy trình phân tích số liệu phức tạp hơn mới có thể thu được thông tin trình tự rõ ràng từ cụm đa dòng (nếu có).

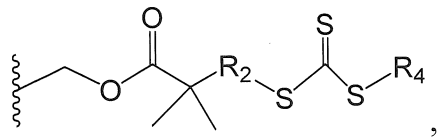
Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, nên thực hiện được quy trình SBS trong các điều kiện mà tại đó nhiều diện tích bề mặt khả dụng nhất có thể của bề mặt lớp nền được sử dụng để gieo mầm và tạo cụm, đồng thời thúc đẩy việc tách các polynucleotit mẫu đã gieo mầm để tối đa nhất có thể tính đơn dòng của các cụm và giảm thiểu cụm đa dòng nhiều nhất có thể. Sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp có thể sử dụng để làm tăng một cách thuận lợi mật độ gieo mầm và khả năng tạo cụm đơn dòng trong SBS.

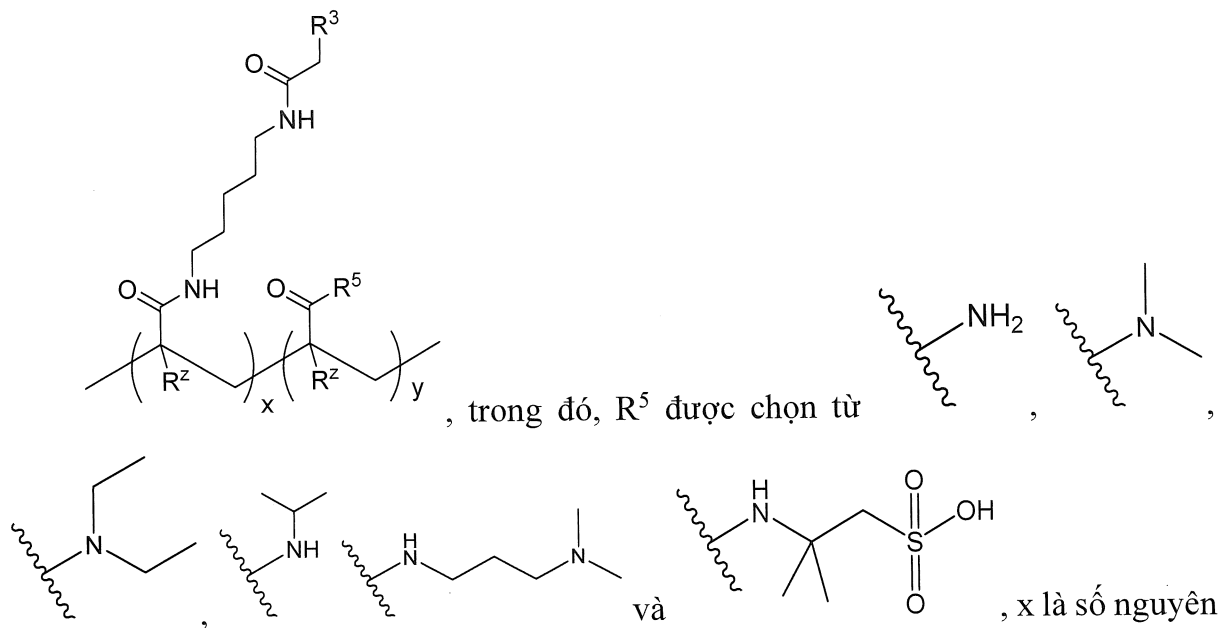
Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất một loại hạt nano, bao gồm một khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với khung được chọn từ một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị và một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị, và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung được chọn từ vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị và vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị, trong đó khung là hợp chất có Công thức I:



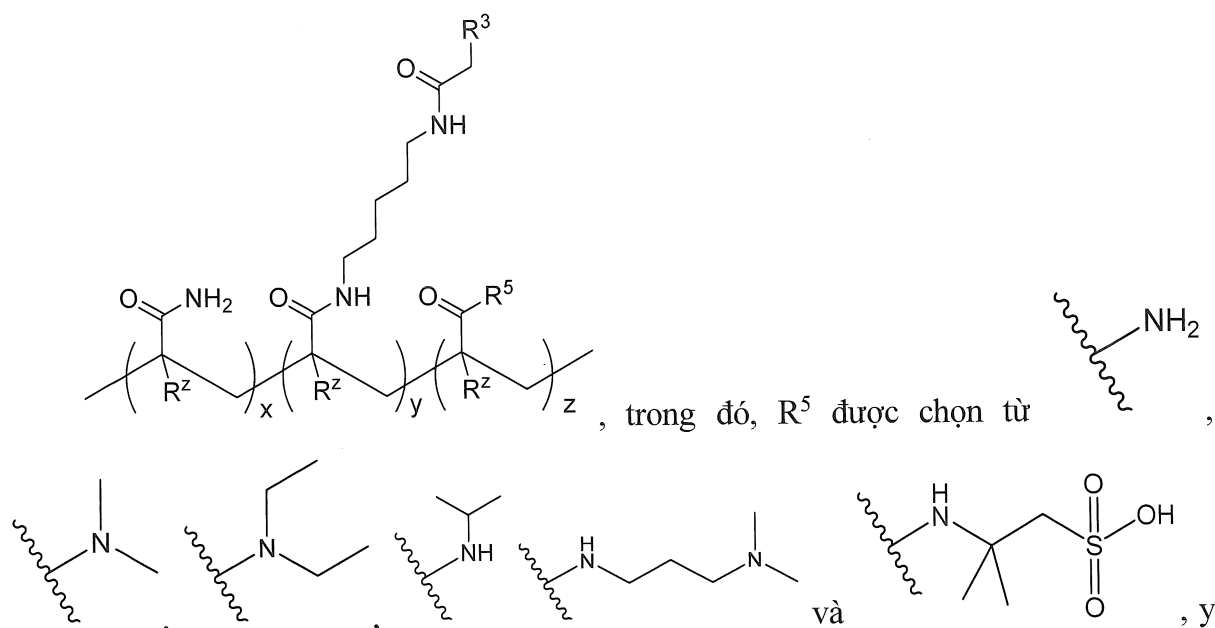
mỗi X là một hợp chất có công thức II:



trong đó, R_2 được chọn từ Công thức IIIa:



nằm trong khoảng từ 1 đến 2.000 còn y là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 và tỷ lệ của x:y có thể nằm trong khoảng từ 10:90 đến khoảng 1:99, và trong đó, mỗi R^z độc lập là H hoặc C₁₋₄ alkyl, và Công thức IIIb:



là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.000 còn x và z là các số nguyên có tổng nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 và tỷ lệ của $(x:y):z$ có thể nằm trong khoảng từ (85):15 đến khoảng (95):5, và trong đó, mỗi R^z độc lập là H hoặc C_{1-4} alkyl, R_1 bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với khung, R^4 được chọn từ một C_1 - C_{20} alkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkenyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkynyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} oxaalkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C_1 - C_{20} azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C_1 - C_{20} alkyl, oxy liên kết đôi, và nhóm hydroxyl, và R^3 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ.

Theo một ví dụ, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, một vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag- O^6 -Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag- O^2 -benzylxytosin và vị trí liên kết ghép cặp sortaza.

Theo một ví dụ khác, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và một vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimide, vị trí liên kết thiol-maleimide, vị trí liên kết thiol-haloacetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transcycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-cyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanine, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylcytosine, vị trí liên kết ghép cặp sortaza và tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn hai vị trí nêu trên.

Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết oligonucleotit phụ bao gồm vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, hạt nano còn bao gồm polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ. Theo một ví dụ khác nữa, khung còn bao gồm nhiều oligonucleotit phụ liên kết với nhiều vị trí phụ.

Theo một ví dụ khác, hạt nano có đường kính ít nhất 10 nm, đường kính ít nhất 20 nm, đường kính ít nhất 30 nm, đường kính ít nhất khoảng 40 nm, đường kính ít nhất khoảng 50 nm, đường kính ít nhất khoảng 60 nm, đường kính ít nhất khoảng 70 nm,

đường kính ít nhất khoảng 80 nm, đường kính ít nhất khoảng 90 nm, đường kính ít nhất khoảng 100 nm, đường kính ít nhất khoảng 125 nm, đường kính ít nhất khoảng 150 nm, đường kính ít nhất khoảng 175 nm, đường kính ít nhất khoảng 200 nm, đường kính ít nhất khoảng 225 nm, đường kính ít nhất khoảng 250 nm, đường kính ít nhất khoảng 275 nm, đường kính ít nhất khoảng 300 nm, đường kính ít nhất khoảng 325 nm, đường kính ít nhất khoảng 350 nm, đường kính ít nhất khoảng 375 nm, đường kính ít nhất khoảng 400 nm, đường kính ít nhất khoảng 425 nm, đường kính ít nhất khoảng 450 nm, đường kính ít nhất khoảng 475 nm, đường kính ít nhất khoảng 500 nm, đường kính ít nhất khoảng 550 nm, đường kính ít nhất khoảng 600 nm, đường kính ít nhất khoảng 650 nm, đường kính ít nhất khoảng 700 nm, đường kính ít nhất khoảng 750 nm, đường kính ít nhất khoảng 800 nm, đường kính ít nhất khoảng 850 nm, đường kính ít nhất khoảng 900 nm hoặc đường kính ít nhất khoảng 950 nm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với vị trí mẫu đơn lẻ của hạt nano. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết nhiều oligonucleotit phụ với nhiều vị trí phụ của hạt nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào khung được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào khung kéo dài từ các oligonucleotit phụ. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước gắn khung vào lớp nền, trong đó bước gắn bao gồm công đoạn lai các oligonucleotit phụ với các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

Theo một ví dụ, lớp nền bao gồm nhiều giếng kích thước nano và các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền được gắn bên trong nhiều giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác, chỉ có tối đa một khung liên kết bên trong giếng bất kỳ trong số các giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào lớp nền được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào lớp nền kéo dài từ các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước giải trình tự ít nhất một trong số các bản sao được

gắn vào khung và các bản sao được gắn vào lớp nền, trong đó bước giải trình tự bao gồm công đoạn giải trình tự bằng phương pháp tổng hợp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một loại hạt nano, bao gồm một khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung được chọn từ một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị và một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị, và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung được chọn từ vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị và vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị, trong đó khung này bao gồm dendrime, trong đó dendrime này bao gồm từ 2 đến 10 nhánh của các đơn vị cấu tạo lặp lại, các đơn vị cấu tạo lặp lại này bao gồm lysin, trong đó lysin của nhánh ngược dòng tạo ra liên kết peptit với lysin thứ nhất của nhánh xuôi dòng ngay sau và liên kết isopeptit với lysin thứ hai của nhánh xuôi dòng ngay sau này, vị trí mẫu đơn lẻ kéo dài từ đầu tận cùng C của lysin trong nhánh đầu tiên của dendrime và nhiều vị trí phụ kéo dài từ nhóm NH_2 trong lysin của nhánh cuối cùng của dendrime.

Theo một ví dụ, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, một vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag- O^6 -Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag- O^2 -benzylxytosin và vị trí liên kết ghép cặp sortaza.

Theo một ví dụ khác, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết

peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và một vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimide, vị trí liên kết thiol-maleimide, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transcycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-cyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanine, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, vị trí liên kết ghép cặp sortaza và tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn hai vị trí nêu trên.

Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết oligonucleotit phụ bao gồm vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, hạt nano còn bao gồm polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ. Theo một ví dụ khác nữa, khung còn bao gồm nhiều oligonucleotit phụ liên kết với nhiều vị trí phụ.

Theo một ví dụ khác, hạt nano có đường kính ít nhất 10 nm, đường kính ít nhất 20 nm, đường kính ít nhất 30 nm, đường kính ít nhất khoảng 40 nm, đường kính ít nhất khoảng 50 nm, đường kính ít nhất khoảng 60 nm, đường kính ít nhất khoảng 70 nm, đường kính ít nhất khoảng 80 nm, đường kính ít nhất khoảng 90 nm, đường kính ít nhất khoảng 100 nm, đường kính ít nhất khoảng 125 nm, đường kính ít nhất khoảng 150 nm, đường kính ít nhất khoảng 175 nm, đường kính ít nhất khoảng 200 nm, đường kính ít nhất khoảng 225 nm, đường kính ít nhất khoảng 250 nm, đường kính ít nhất khoảng

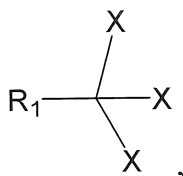
275 nm, đường kính ít nhất khoảng 300 nm, đường kính ít nhất khoảng 325 nm, đường kính ít nhất khoảng 350 nm, đường kính ít nhất khoảng 375 nm, đường kính ít nhất khoảng 400 nm, đường kính ít nhất khoảng 425 nm, đường kính ít nhất khoảng 450 nm, đường kính ít nhất khoảng 475 nm, đường kính ít nhất khoảng 500 nm, đường kính ít nhất khoảng 550 nm, đường kính ít nhất khoảng 600 nm, đường kính ít nhất khoảng 650 nm, đường kính ít nhất khoảng 700 nm, đường kính ít nhất khoảng 750 nm, đường kính ít nhất khoảng 800 nm, đường kính ít nhất khoảng 850 nm, đường kính ít nhất khoảng 900 nm hoặc đường kính ít nhất khoảng 950 nm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với vị trí mẫu đơn lẻ của hạt nano. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết nhiều oligonucleotit phụ với nhiều vị trí phụ của hạt nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào khung được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào khung kéo dài từ các oligonucleotit phụ. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước gắn khung vào lớp nền, trong đó bước gắn bao gồm công đoạn lai các oligonucleotit phụ với các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

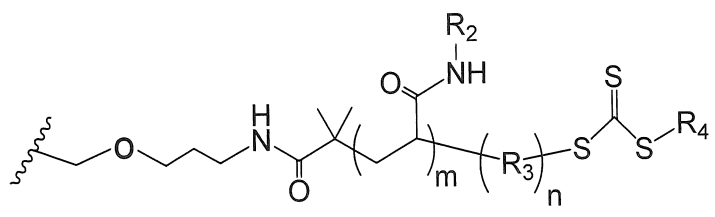
Theo một ví dụ, lớp nền bao gồm nhiều giếng kích thước nano và các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền được gắn bên trong nhiều giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác, chỉ có tối đa một khung liên kết bên trong giếng bất kỳ trong số các giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào lớp nền được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào lớp nền kéo dài từ các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước giải trình tự ít nhất một trong số các bản sao được gắn vào khung và các bản sao được gắn vào lớp nền, trong đó bước giải trình tự bao gồm công đoạn giải trình tự bằng phương pháp tổng hợp.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một loại hạt nano, bao gồm một khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung được chọn từ một vị trí liên kết mẫu

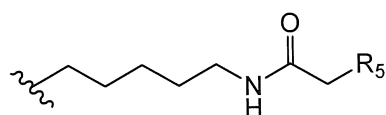
cộng hóa trị và một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị, và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung được chọn từ vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị và vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị, trong đó khung là hợp chất có Công thức IV:



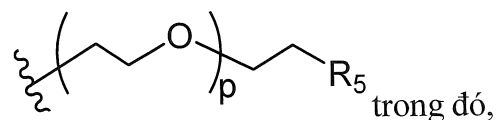
mỗi X là một hợp chất có công thức V:



trong đó, R₂ được chọn từ Công thức VIa:

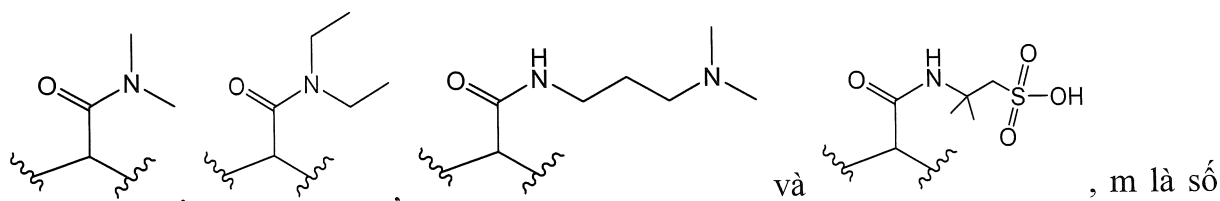
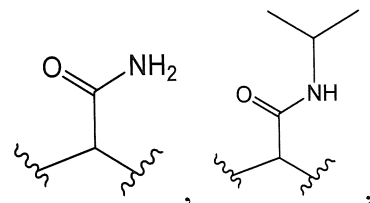


và Công thức VIb:



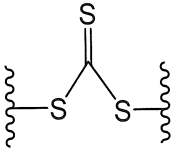
p là số nguyên được chọn từ 1 đến 20, và R₅ bao gồm vị trí phụ để liên kết các

oligonucleotit phụ, R₃ được chọn từ liên kết trực tiếp,



nguyên từ 1 đến 2.000 và n là số nguyên từ 1 đến 10.000, R¹ bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, R⁴ được chọn từ một C₁-C₂₀ alkyl được thay thế

tùy ý, C₁-C₂₀ alkenyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ alkynyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ oxaalkyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C₁-C₂₀ azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C₁-C₂₀ alkyl, một oxy liên kết đôi và một nhóm hydroxyl, và R³ bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ. Theo ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ

nêu trên, nhóm trithiocarbonat  có thể được thay thế tùy ý bằng một liên kết trực tiếp, liên kết -CH₂-, liên kết -S-, liên kết -N- hoặc liên kết -O-.

Theo một ví dụ, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, một vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin và vị trí liên kết ghép cặp sortaza.

Theo một ví dụ khác, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và một vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-

hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, vị trí liên kết ghép cặp sortaza và tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn hai vị trí nêu trên.

Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết oligonucleotit phụ bao gồm vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, hạt nano còn bao gồm polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ. Theo một ví dụ khác nữa, khung còn bao gồm nhiều oligonucleotit phụ liên kết với nhiều vị trí phụ.

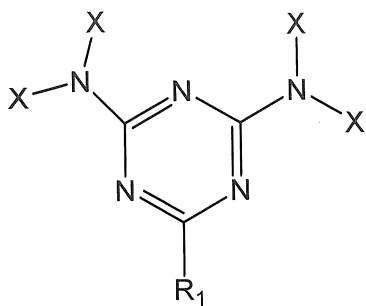
Theo một ví dụ khác, hạt nano có đường kính ít nhất 10 nm, đường kính ít nhất 20 nm, đường kính ít nhất 30 nm, đường kính ít nhất khoảng 40 nm, đường kính ít nhất khoảng 50 nm, đường kính ít nhất khoảng 60 nm, đường kính ít nhất khoảng 70 nm, đường kính ít nhất khoảng 80 nm, đường kính ít nhất khoảng 90 nm, đường kính ít nhất khoảng 100 nm, đường kính ít nhất khoảng 125 nm, đường kính ít nhất khoảng 150 nm, đường kính ít nhất khoảng 175 nm, đường kính ít nhất khoảng 200 nm, đường kính ít nhất khoảng 225 nm, đường kính ít nhất khoảng 250 nm, đường kính ít nhất khoảng 275 nm, đường kính ít nhất khoảng 300 nm, đường kính ít nhất khoảng 325 nm, đường kính ít nhất khoảng 350 nm, đường kính ít nhất khoảng 375 nm, đường kính ít nhất khoảng 400 nm, đường kính ít nhất khoảng 425 nm, đường kính ít nhất khoảng 450 nm, đường kính ít nhất khoảng 475 nm, đường kính ít nhất khoảng 500 nm, đường kính ít nhất khoảng 550 nm, đường kính ít nhất khoảng 600 nm, đường kính ít nhất khoảng 650 nm, đường kính ít nhất khoảng 700 nm, đường kính ít nhất khoảng 750 nm, đường

kính ít nhất khoảng 800 nm, đường kính ít nhất khoảng 850 nm, đường kính ít nhất khoảng 900 nm hoặc đường kính ít nhất khoảng 950 nm.

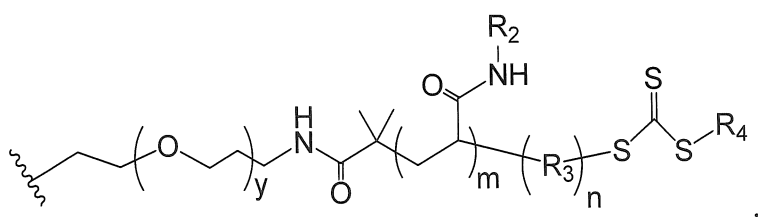
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với vị trí mẫu đơn lẻ của hạt nano. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết nhiều oligonucleotit phụ với nhiều vị trí phụ của hạt nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào khung được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào khung kéo dài từ các oligonucleotit phụ. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước gắn khung vào lớp nền, trong đó bước gắn bao gồm công đoạn lai các oligonucleotit phụ với các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

Theo một ví dụ, lớp nền bao gồm nhiều giếng kích thước nano và các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền được gắn bên trong nhiều giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác, chỉ có tối đa một khung liên kết bên trong giếng bất kỳ trong số các giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào lớp nền được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào lớp nền kéo dài từ các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước giải trình tự ít nhất một trong số các bản sao được gắn vào khung và các bản sao được gắn vào lớp nền, trong đó bước giải trình tự bao gồm công đoạn giải trình tự bằng phương pháp tổng hợp.

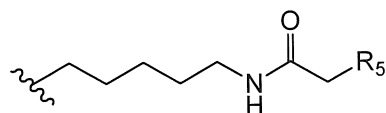
Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một loại hạt nano, bao gồm một khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với khung được chọn từ một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị và một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị, và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung được chọn từ vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị và vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị, trong đó khung là hợp chất có Công thức VII:



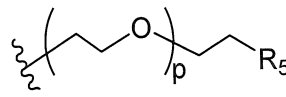
mỗi X là một hợp chất có công thức VIII:



trong đó, y là số nguyên từ 1 đến 20, R₂ được chọn từ Công thức IXa:



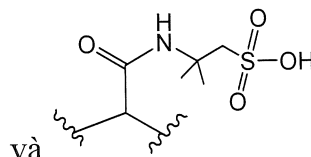
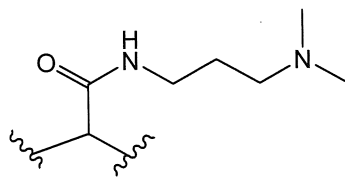
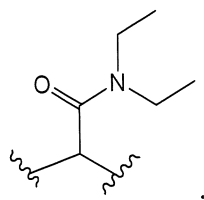
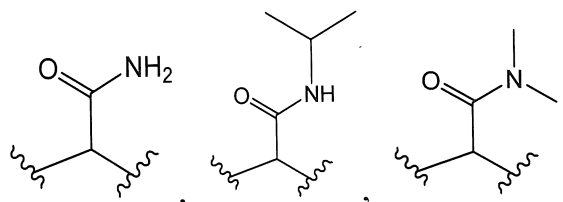
và Công thức IXb:



trong đó, p là

số nguyên được chọn từ 1 đến 20, và R₅ bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit

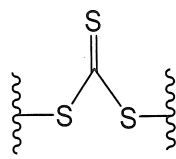
phụ, R₃ được chọn từ liên kết trực tiếp,



và , m là số nguyên từ 1 đến

2.000 và n là số nguyên từ 1 đến 10.000, R¹ bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, R⁴ được chọn từ một C₁-C₂₀ alkyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ alkenyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ alkynyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ oxaalkyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C₁-C₂₀ azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong

số C₁-C₂₀ alkyl, một oxy liên kết đôi và một nhóm hydroxyl, và R³ bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ. Theo ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ nêu trên, nhóm

trithiocarbonat  có thể được thay thế tùy ý bằng một liên kết trực tiếp, liên kết -CH₂-, liên kết -S-, liên kết -N- hoặc liên kết -O-.

Theo một ví dụ, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, một vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin và vị trí liên kết ghép cặp sortaza.

Theo một ví dụ khác, vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm một vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm một vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và một vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết

aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, vị trí liên kết ghép cặp sortaza và tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn hai vị trí nêu trên.

Theo một ví dụ khác, vị trí liên kết oligonucleotit phụ bao gồm vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí lai hóa polynucleotit. Theo một ví dụ khác nữa, vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

Theo một ví dụ khác, hạt nano còn bao gồm polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ. Theo một ví dụ khác nữa, khung còn bao gồm nhiều oligonucleotit phụ liên kết với nhiều vị trí phụ.

Theo một ví dụ khác, hạt nano có đường kính ít nhất 10 nm, đường kính ít nhất 20 nm, đường kính ít nhất 30 nm, đường kính ít nhất khoảng 40 nm, đường kính ít nhất khoảng 50 nm, đường kính ít nhất khoảng 60 nm, đường kính ít nhất khoảng 70 nm, đường kính ít nhất khoảng 80 nm, đường kính ít nhất khoảng 90 nm, đường kính ít nhất khoảng 100 nm, đường kính ít nhất khoảng 125 nm, đường kính ít nhất khoảng 150 nm, đường kính ít nhất khoảng 175 nm, đường kính ít nhất khoảng 200 nm, đường kính ít nhất khoảng 225 nm, đường kính ít nhất khoảng 250 nm, đường kính ít nhất khoảng 275 nm, đường kính ít nhất khoảng 300 nm, đường kính ít nhất khoảng 325 nm, đường kính ít nhất khoảng 350 nm, đường kính ít nhất khoảng 375 nm, đường kính ít nhất khoảng 400 nm, đường kính ít nhất khoảng 425 nm, đường kính ít nhất khoảng 450 nm, đường kính ít nhất khoảng 475 nm, đường kính ít nhất khoảng 500 nm, đường kính ít nhất khoảng 550 nm, đường kính ít nhất khoảng 600 nm, đường kính ít nhất khoảng 650 nm, đường kính ít nhất khoảng 700 nm, đường kính ít nhất khoảng 750 nm, đường kính ít nhất khoảng 800 nm, đường kính ít nhất khoảng 850 nm, đường kính ít nhất khoảng 900 nm hoặc đường kính ít nhất khoảng 950 nm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với vị trí mẫu đơn lẻ của hạt nano. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất một phương pháp bao gồm bước liên kết nhiều oligonucleotit phụ với nhiều vị trí phụ của hạt nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào khung được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào khung kéo dài từ các oligonucleotit phụ. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước gắn khung vào lớp nền, trong đó bước gắn bao gồm công đoạn lai các oligonucleotit phụ với các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

Theo một ví dụ, lớp nền bao gồm nhiều giếng kích thước nano và các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền được gắn bên trong nhiều giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác, chỉ có tối đa một khung liên kết bên trong giếng bất kỳ trong số các giếng kích thước nano. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào lớp nền được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào lớp nền kéo dài từ các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền. Theo một ví dụ khác nữa, phương pháp này còn bao gồm bước giải trình tự ít nhất một trong số các bản sao được gắn vào khung và các bản sao được gắn vào lớp nền, trong đó bước giải trình tự bao gồm công đoạn giải trình tự bằng phương pháp tổng hợp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Những đặc điểm, khía cạnh, ưu điểm này và khác của sáng chế sẽ được hiểu rõ hơn khi đọc phần mô tả chi tiết sau đây kèm theo nội dung tham khảo các hình vẽ đi kèm, trong đó:

HÌNH 1 minh họa một ví dụ về một hạt nano theo các khía cạnh của sáng chế.

HÌNH 2 minh họa một ví dụ về các phần trong một khung của một hạt nano theo các khía cạnh của sáng chế.

HÌNH 3 minh họa một ví dụ về một vị trí polynucleotit mẫu và các vị trí gắn phụ của một hạt nano theo các khía cạnh của sáng chế.

HÌNH 4 minh họa một ví dụ về phương pháp tổng hợp một hạt nano theo sáng chế.

HÌNH 5 minh họa các ví dụ về một hạt nano có cấu trúc dendrime có các đơn vị cấu tạo lặp lại gồm lysin.

HÌNH 6 minh họa một phương pháp tổng hợp để tổng hợp các ví dụ về một hạt nano theo các khía cạnh của sáng chế.

HÌNH 7 minh họa một ví dụ về việc gắn một mẫu vào một hạt nano theo các khía cạnh của sáng chế.

HÌNH 8 minh họa một ví dụ về việc gắn một cách không cộng hóa trị polynucleotit mẫu đơn lẻ vào một hạt nano bằng phương pháp lai hóa, theo các khía cạnh của sáng chế.

HÌNH 9 minh họa một ví dụ về việc gắn một cách không cộng hóa trị polynucleotit mẫu đơn lẻ vào một hạt nano thông qua một vị trí liên kết peptit cuộn xoắn đôi, theo các khía cạnh của sáng chế.

HÌNH 10 là biểu đồ minh họa số lượng hạt nano trong mỗi giếng kích thước nano theo diện tích bề mặt của giếng kích thước nano, theo các khía cạnh của sáng chế.

Các HÌNH 11A-11C minh họa một ví dụ về việc gieo mầm các polynucleotit mẫu vào lớp nền bằng cách sử dụng khung theo các khía cạnh của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Tham chiếu trong toàn bộ sáng chế đến “một ví dụ”, “ví dụ khác”, “ví dụ”, v.v., có nghĩa là phần tử cụ thể (ví dụ: tính năng, cấu trúc, cấu hình và/hoặc đặc tính) được mô tả liên quan đến ví dụ được bao gồm trong ít nhất một ví dụ được mô tả trong tài liệu này và có thể hiện diện hoặc có thể không hiện diện trong các ví dụ khác. Ngoài ra, cần hiểu rằng các yếu tố được mô tả cho mọi ví dụ có thể được kết hợp theo mọi phương thức phù hợp trong các ví dụ khác nhau trừ khi ngữ cảnh quy định rõ ràng khác.

Sáng chế này đề cập đến các chế phẩm và phương pháp giúp tăng mức tạo cụm đơn dòng trong quy trình SBS. Theo một ví dụ, các nguyên tắc về loại trừ theo kích cỡ được sử dụng để ngăn chặn việc các polynucleotit mẫu riêng rẽ sẽ gieo mầm và từ đó thúc đẩy việc tạo cụm quá gần với nhau. Bằng cách kết hợp từng polynucleotit mẫu riêng rẽ với một hạt nano có kích thước cho trước và phù hợp trong không gian, các polynucleotit mẫu này có thể được cảm ứng để gắn vào bề mặt lớp nền đủ xa nhau để làm giảm sự hình thành các cụm đa dòng và làm tăng sự hình thành các cụm đơn dòng. Một hạt nano có thể bao gồm một vị trí liên kết cho polynucleotit mẫu đơn lẻ. Hạt nano có thể chỉ có một vị trí duy nhất để gắn polynucleotit mẫu. Do đó, một và chỉ polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể có khả năng gắn vào một hạt nano, sao cho việc gắn polynucleotit mẫu vào khung ngăn chặn việc polynucleotit mẫu thứ hai gắn vào cùng hạt nano đó, polynucleotit mẫu đã được gắn này chiếm một vị trí liên kết polynucleotit mẫu của nó. Việc gắn chỉ polynucleotit mẫu đơn lẻ trong mỗi hạt nano, và sự phân bố trong không gian thu được so với nhau của các polynucleotit mẫu được gắn vào các hạt nano như vậy do, trực tiếp hoặc gián tiếp, kích thước của các hạt nano được gắn, sẽ làm giảm sự hình thành của các cụm đa dòng.

Hạt nano cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều vị trí liên kết thuộc loại khác để gắn hạt nano vào các hợp phần hoặc bề mặt ngoài polynucleotit mẫu, được đề cập đến là các vị trí liên kết phụ trong bản mô tả này. Ví dụ, ngoài một vị trí liên kết polynucleotit mẫu, một hạt nano còn có thể bao gồm các vị trí liên kết phụ cho phép gắn hạt nano vào bề mặt của chất nền để sử dụng trong quy trình SBS. Theo một ví dụ khác, một hạt nano có thể có một hoặc nhiều vị trí liên kết phụ để gắn một hoặc nhiều polyme bề mặt vào hạt nano. Theo một ví dụ khác, một hạt nano có thể bao gồm một hoặc nhiều vị trí liên kết phụ để gắn một oligonucleotit phụ vào hạt nano, trong đó oligonucleotit này có thể liên kết với một đầu của polynucleotit mẫu hoặc bản sao của nó như là một phần của quy trình tạo cụm, theo phần mô tả đầy đủ hơn dưới đây. Theo một ví dụ khác, các oligonucleotit phụ này có thể lai được với các oligonucleotit đã được gắn vào bề mặt của lớp nền để sử dụng trong quy trình SBS sao cho hạt nano có polynucleotit mẫu đơn lẻ đã được gắn vào đó có thể gắn vào bề mặt lớp nền này.

Trong khi một khung có thể bao gồm một vị trí liên kết cho polynucleotit mẫu và một hoặc nhiều vị trí phụ để gắn, ví dụ như oligonucleotit phụ, một vị trí liên kết polynucleotit mẫu có thể khác biệt về mặt hóa học hoặc cấu trúc với các vị trí liên kết

phụ. Trong tất cả các vị trí liên kết, một vị trí liên kết polynucleotit mẫu có thể là vị trí duy nhất có thành phần hóa học hoặc cấu trúc được thiết kế để gắn vào polynucleotit mẫu với thành phần hóa học hoặc cấu trúc tương ứng để gắn vào đó. Thông qua phép so sánh, một hoặc nhiều vị trí liên kết phụ có thể có thành phần hóa học hoặc cấu trúc khác, mà không tương thích với việc liên kết hoặc gắn vào polynucleotit mẫu đơn lẻ. Thay vào đó, một hoặc nhiều vị trí liên kết phụ có thể có thành phần hóa học hoặc cấu trúc tương thích để liên kết hoặc gắn vào các hợp phần hoặc cấu trúc khác mà các vị trí liên kết phụ được dự định sẽ liên kết vào đó, như oligonucleotit phụ, polyme, v.v., và không tương thích với việc liên kết hoặc gắn vào polynucleotit mẫu đơn lẻ. Do đó, polynucleotit mẫu đơn lẻ không có khả năng liên kết hoặc gắn vào một hoặc nhiều vị trí liên kết phụ, dẫn đến việc chỉ gắn polynucleotit mẫu đơn lẻ trong mỗi hạt nano, ở một vị trí liên kết polynucleotit mẫu của hạt nano.

Polynucleotit mẫu có thể là polynucleotit thu được từ mẫu, như axit polydeoxyribonucleic được phân lập từ mẫu, hoặc phân tử ADN bổ sung được sao chép từ phân tử ARN thông tin thu được từ mẫu. Quy trình SBS có thể được thực hiện nhằm mục đích như để xác định trình tự nucleotit của polynucleotit mẫu, hoặc để nhận biết một hoặc nhiều hiện tượng đa hình hoặc thay đổi ở trình tự di truyền của polynucleotit mẫu so với trình tự tham chiếu. Một thư viện có thể được tạo ra từ một hoặc nhiều mẫu, thư viện này bao gồm nhiều polynucleotit mẫu thu được từ một hoặc nhiều mẫu. Các polynucleotit mẫu có thể thu được bằng cách thu các trình tự polynucleotit là các phần trình tự có mặt trong mẫu hoặc được sao chép từ mẫu. Bằng cách giải trình tự nhiều polynucleotit mẫu trong một quy trình SBS, trình tự, kiểu gen, hoặc thông tin khác liên quan đến trình tự có thể được xác định như đối với các polynucleotit mẫu và, khi thông tin trình tự về nhiều polynucleotit mẫu trong một thư viện được thu thập và phân tích về mẫu mà thư viện thu được từ đó.

Polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể được xử lý như là một phần của quy trình thu được polynucleotit mẫu đơn lẻ từ mẫu. Phần xử lý có thể bao gồm bước bổ sung trình tự polynucleotit, như vào đầu môi 5, đầu môi 3, hoặc cả hai đầu của mẫu để hỗ trợ xử lý SBS trình tự con. Như được đề xuất thêm trong bản mô tả này, polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể còn được cải biến bằng cách thêm các đặc điểm thúc đẩy hoặc cho phép tạo liên kết với một vị trí trên hạt nano.

Polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể có độ dài cho trước bất kỳ thích hợp để thu được thông tin giải trình tự trong quy trình SBS. Ví dụ, polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể có độ dài khoảng 50 nucleotit, độ dài khoảng 75 nucleotit, độ dài khoảng 100 nucleotit, độ dài khoảng 125 nucleotit, độ dài khoảng 150 nucleotit, độ dài khoảng 175 nucleotit, độ dài khoảng 200 nucleotit, độ dài khoảng 225 nucleotit, độ dài khoảng 250 nucleotit, độ dài khoảng 275 nucleotit, độ dài khoảng 300 nucleotit, độ dài khoảng 325 nucleotit, độ dài khoảng 350 nucleotit, độ dài khoảng 375 nucleotit, độ dài khoảng 400 nucleotit, độ dài khoảng 425 nucleotit, độ dài khoảng 450 nucleotit, độ dài khoảng 475 nucleotit, độ dài khoảng 500 nucleotit, độ dài khoảng 525 nucleotit, độ dài khoảng 550 nucleotit, độ dài khoảng 575 nucleotit, độ dài khoảng 600 nucleotit, độ dài khoảng 625 nucleotit, độ dài khoảng 650 nucleotit, độ dài khoảng 675 nucleotit, độ dài khoảng 700 nucleotit, độ dài khoảng 725 nucleotit, độ dài khoảng 750 nucleotit, độ dài khoảng 775 nucleotit, độ dài khoảng 800 nucleotit, độ dài khoảng 825 nucleotit, độ dài khoảng 850 nucleotit, độ dài khoảng 875 nucleotit, độ dài khoảng 900 nucleotit, độ dài khoảng 925 nucleotit, độ dài khoảng 950 nucleotit, độ dài khoảng 975 nucleotit, độ dài khoảng 1.000 nucleotit, độ dài khoảng 1.025 nucleotit, độ dài khoảng 1.050 nucleotit, độ dài khoảng 1.075 nucleotit, độ dài khoảng 1.100 nucleotit, độ dài khoảng 1.125 nucleotit, độ dài khoảng 1.150 nucleotit, độ dài khoảng 1.175 nucleotit, độ dài khoảng 1.200 nucleotit, độ dài khoảng 1.225 nucleotit, độ dài khoảng 1.250 nucleotit, độ dài khoảng 1.275 nucleotit, độ dài khoảng 1.300 nucleotit, độ dài khoảng 1.325 nucleotit, độ dài khoảng 1.350 nucleotit, độ dài khoảng 1.375 nucleotit, độ dài khoảng 1.400 nucleotit, độ dài khoảng 1.425 nucleotit, độ dài khoảng 1.450 nucleotit, độ dài khoảng 1.475 nucleotit, độ dài khoảng 1.500 nucleotit, hoặc dài hơn.

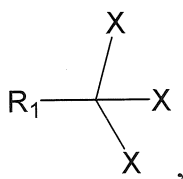
Theo một số ví dụ, có thể có hai hoặc nhiều hơn hai tập hợp vị trí liên kết phụ khác nhau trên hạt nano, một số thuộc một loại hóa học hoặc cấu trúc tương thích với việc liên kết hoặc gắn vào một tập hợp hợp phần hoặc cấu trúc, và số còn lại thuộc loại hóa học hoặc cấu trúc thứ hai tương thích với việc liên kết hoặc gắn vào một tập hợp hợp phần hoặc cấu trúc khác. Ví dụ, một tập hợp vị trí phụ có thể có thành phần hóa học hoặc cấu trúc tương thích với việc liên kết với các oligonucleotit phụ mà các oligonucleotit phụ có thể liên kết với các bản sao của polynucleotit mẫu tham gia vào quá trình, ví dụ như tạo cụm polynucleotit mẫu trên hạt nano, như được mô tả đầy đủ hơn dưới đây, còn các vị trí phụ còn lại có thể có thành phần hóa học hoặc cấu trúc

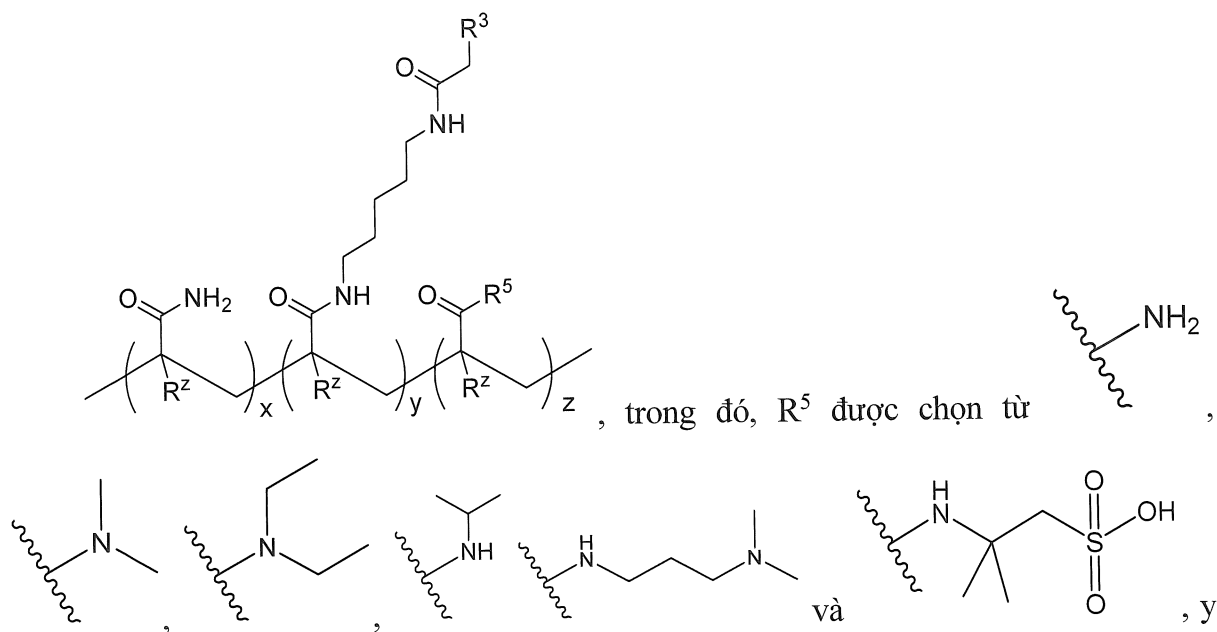
khác tương thích với việc liên kết hoặc gắn vào bề mặt của lớp nền để thực hiện quy trình SBS.

Một hạt nano có thể bao gồm một khung. Khung là thành phần có cấu trúc của hạt nano chiếm thể tích theo lượng nhỏ nhất của khoảng cách mong muốn giữa các hạt nano mẫu hoặc mật độ lớn nhất của các hạt nano mẫu đã được gắn vào các hạt nano như có thể được mong đợi đối với ứng dụng cho trước. Một khung có thể bao gồm các vị trí liên kết đề cập ở trên, như trong một vị trí liên kết polynucleotit mẫu và một hoặc nhiều vị trí liên kết phụ. Khung cùng với các vị trí liên kết có thể cấu thành một hạt nano. Khung có thể được tổng hợp để bao gồm, và có thể bao gồm mỗi khi được tổng hợp, nhiều hơn một loại thành phần hóa học hoặc cấu trúc để gắn. Tức là, nó có thể được tổng hợp để bao gồm hoặc được cải biến để bao gồm một vị trí gắn vào polynucleotit mẫu đơn lẻ, cộng với một hoặc nhiều vị trí liên kết phụ thêm có thành phần hóa học hoặc cấu trúc khác với một vị trí liên kết polynucleotit mẫu tương ứng với các vị trí liên kết phụ.

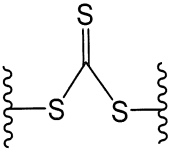
Một khung có thể bao gồm một polyme bất đối, trong đó một vài chuỗi polyme kéo dài từ lõi khung, cũng bao gồm vị trí liên kết khác cho polynucleotit mẫu. Chuỗi polyme, mạch thẳng hoặc phân nhánh, có thể kéo dài từ lõi khung, với các vị trí liên kết phụ trên polyme, và một vị trí liên kết khác có thành phần hóa học liên kết trực giao so với thành phần hóa học liên kết của các vị trí liên kết phụ có mặt trên lõi khung để liên kết với polynucleotit mẫu đơn lẻ. Theo một ví dụ, một khung có thể bao gồm một lõi mà heteropolyme hoặc homopolyme chứa acrylamit monome kéo dài từ đó bao gồm các vị trí liên kết phụ, và một vị trí liên kết khác có cấu trúc hóa học liên kết khác để liên kết polynucleotit mẫu. Theo một ví dụ, một lõi khung có thể bao gồm các điểm gắn cho hai hoặc ba polyme mạch thẳng hoặc phân nhánh.

Theo một ví dụ, một khung có thể bao gồm hai hoặc ba polyme mạch thẳng hoặc phân nhánh liên kế riêng rẽ với một lõi khung. Một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn về khung là hợp chất có Công thức I:

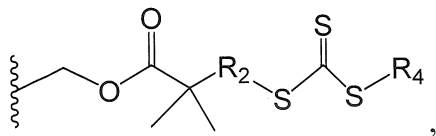




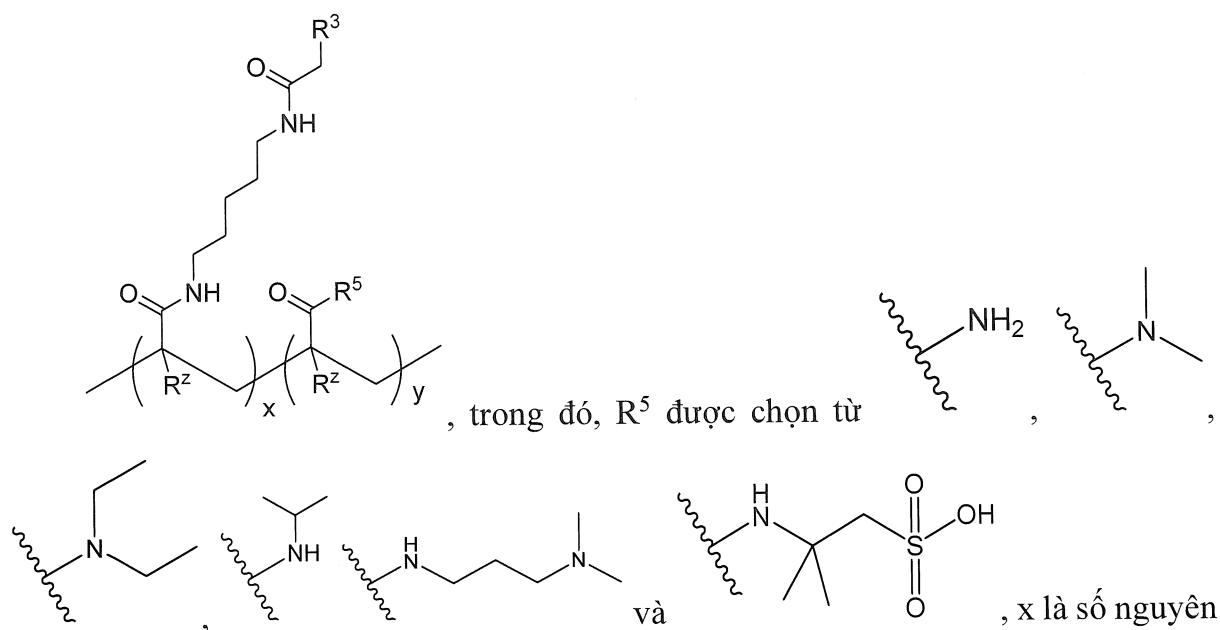
là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.000 còn x và z là các số nguyên có tổng nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 và tỷ lệ của (x:y):z có thể nằm trong khoảng từ (85):15 đến khoảng (95):5, và trong đó, mỗi R^z độc lập là H hoặc C_{1-4} alkyl, R_1 bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với khung, R^4 được chọn từ một C_1 - C_{20} alkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkenyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkynyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} oxaalkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C_1 - C_{20} azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C_1 - C_{20} alkyl, oxy liên kết đôi, và nhóm hydroxyl, và R^3 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ. Theo ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ nêu trên,

nhóm trithiocarbonat  có thể được thay thế tùy ý bằng một liên kết trực tiếp, liên kết $-CH_2-$, liên kết $-S-$, liên kết $-N-$ hoặc liên kết $-O-$.

mỗi X là một hợp chất có công thức II:

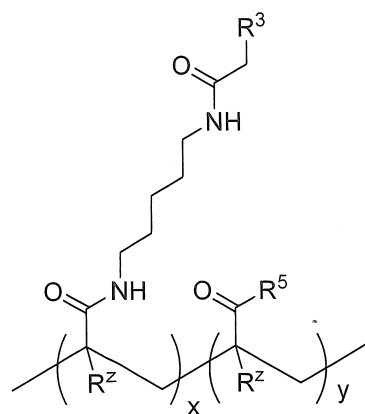


trong đó, R_2 được chọn từ Công thức IIIa:



nằm trong khoảng từ 1 đến 2.000 còn y là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 và tỷ lệ của $x:y$ có thể nằm trong khoảng từ 10:90 đến khoảng 1:99, và trong đó, mỗi R^Z độc lập là H hoặc C_{1-4} alkyl, và Công thức IIIb:

Theo một ví dụ khác, trong đó, R_2 là hợp chất có công thức IIIa



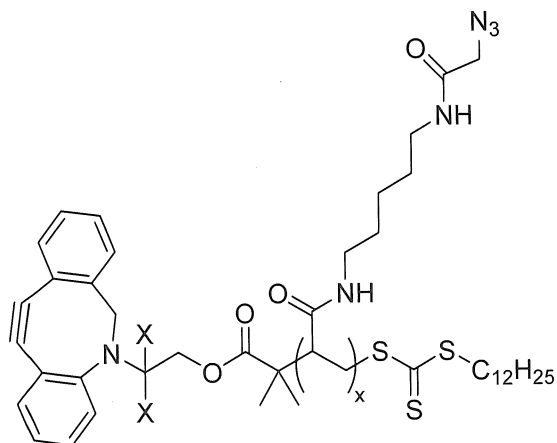
, y có thể bằng 0 và x có thể là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 2.000.

Theo một ví dụ, R_1 bao gồm vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, hoặc vị trí liên kết ghép cặp sortaza. Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, R_1 bao gồm nhóm amin, nhóm tetrazin hoặc nhóm dibenzoxycloocten.

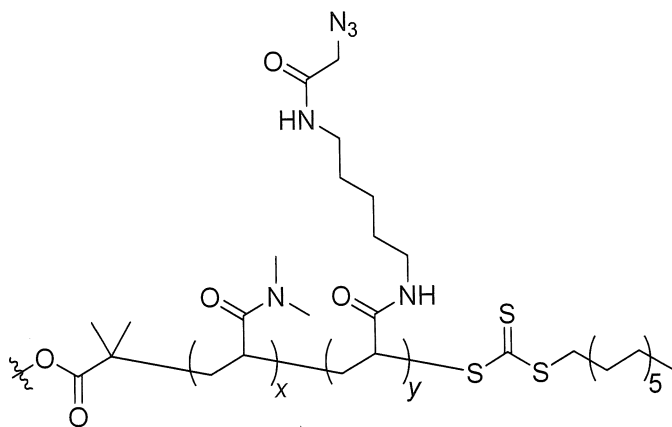
Theo một ví dụ, mỗi R^3 có thể bao gồm một vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, hoặc vị trí liên kết ghép cặp

sortaza. Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, mỗi R^3 bao gồm một nhóm azit.

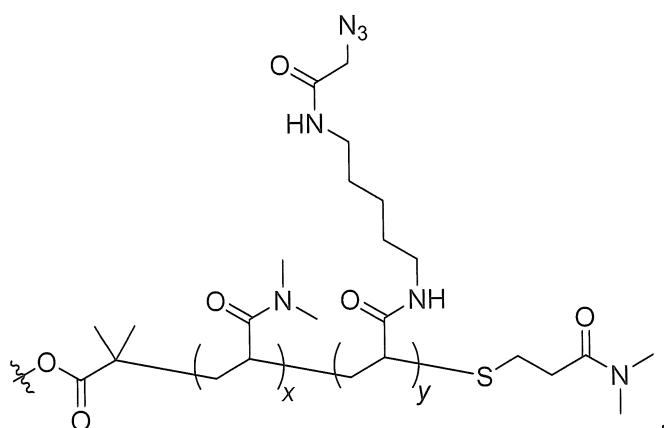
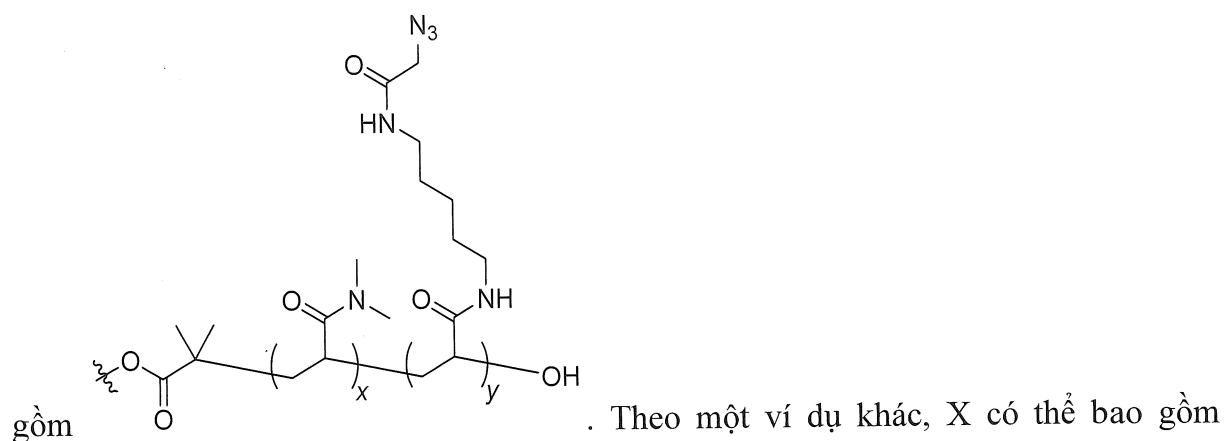
Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):



Theo một ví dụ khác, X có thể bao gồm

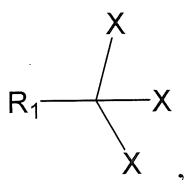


. Theo một ví dụ khác, X có thể bao

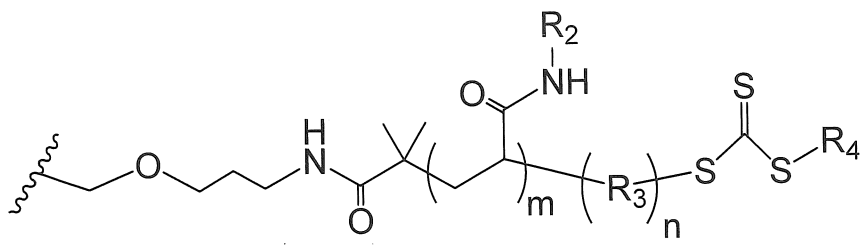


Theo một ví dụ khác, R^1 được liên kết với polynucleotit mẫu đơn lẻ, và một hoặc nhiều R^3 được liên kết với một thành phần phụ, như oligonucleotit phụ. Theo một ví dụ khác, oligonucleotit phụ được gắn vào trình tự nucleotit là bản sao của polynucleotit mẫu hoặc hỗ trợ cho polynucleotit mẫu.

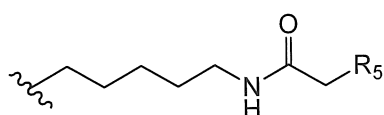
Một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn khác về khung là hợp chất có Công thức IV



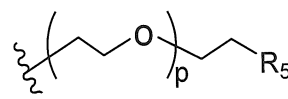
mỗi X là một hợp chất có công thức V:



trong đó, R_2 được chọn từ Công thức VIa:



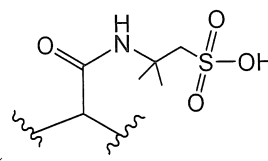
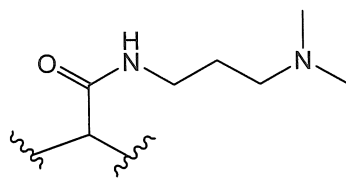
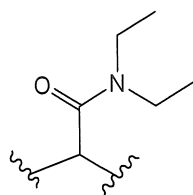
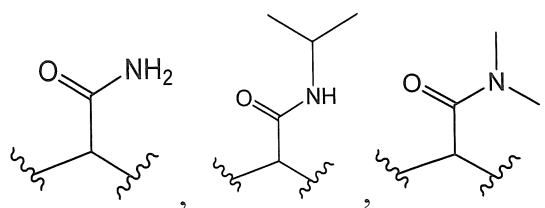
và Công thức VIb:



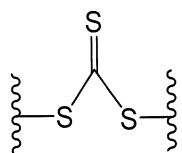
trong đó, p là

số nguyên được chọn từ 1 đến 20, và R_5 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit

phụ, R_3 được chọn từ liên kết trực tiếp,



, và , m là số nguyên từ 1 đến 2000 và n là số nguyên từ 1 đến 10.000, R^1 bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, R^4 được chọn từ C_1 - C_{20} alkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkenyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkynyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} oxaalkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C_1 - C_{20} azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C_1 - C_{20} alkyl, oxy liên kết đôi, và nhóm hydroxyl, và R^3 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ. Theo ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ nêu trên, nhóm trithiocarbonat



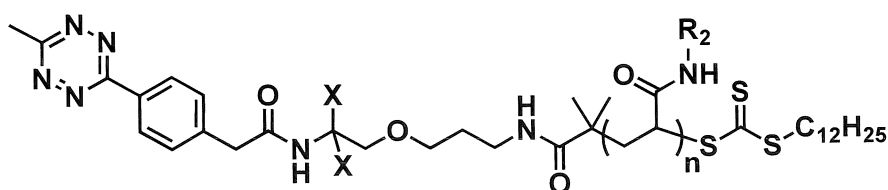
có thể được thay thế tùy ý bằng một liên kết trực tiếp, liên kết $-CH_2-$, liên kết $-S-$, liên kết $-N-$ hoặc liên kết $-O-$.

Theo một ví dụ, R_1 bao gồm vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimide, vị trí liên kết thiol-maleimide, vị trí liên kết

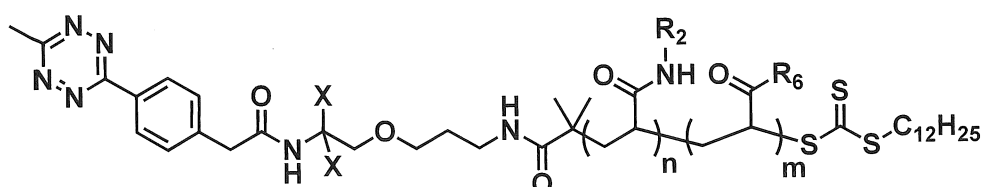
thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, hoặc vị trí liên kết ghép cặp sortaza. Theo một ví dụ khác, R₁ bao gồm vị trí liên kết cuộn xoắn đôi hoặc vị trí liên kết avidin-biotin. Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, R₁ bao gồm nhóm amin, nhóm tetrazin hoặc nhóm dibenzoxycloocten.

Theo một ví dụ, mỗi R₅ có thể bao gồm một vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, hoặc vị trí liên kết ghép cặp sortaza. Theo một ví dụ khác, mỗi R₅ bao gồm một vị trí liên kết cuộn xoắn đôi hoặc một vị trí liên kết avidin-biotin. Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, mỗi R₅ bao gồm một nhóm azit.

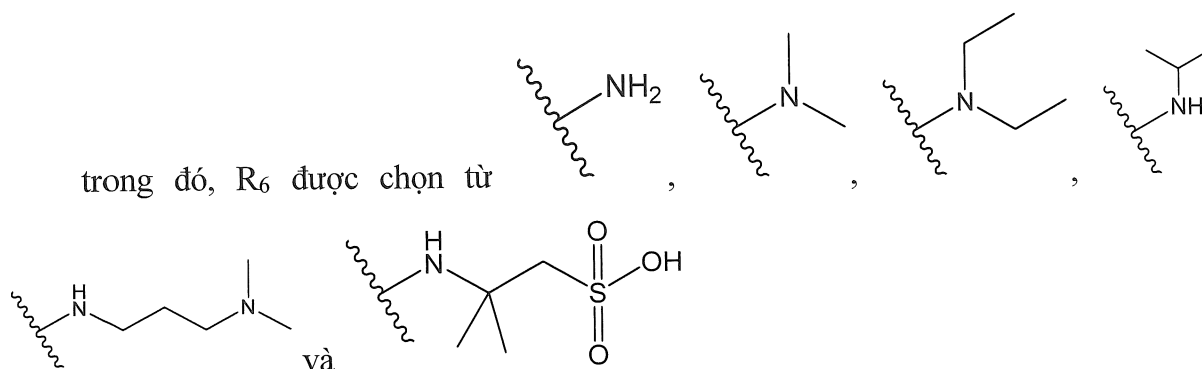
Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):



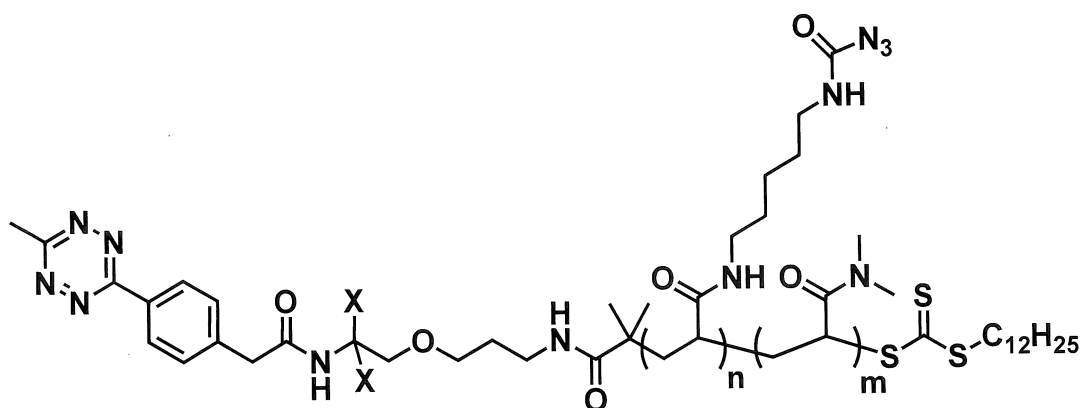
Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):



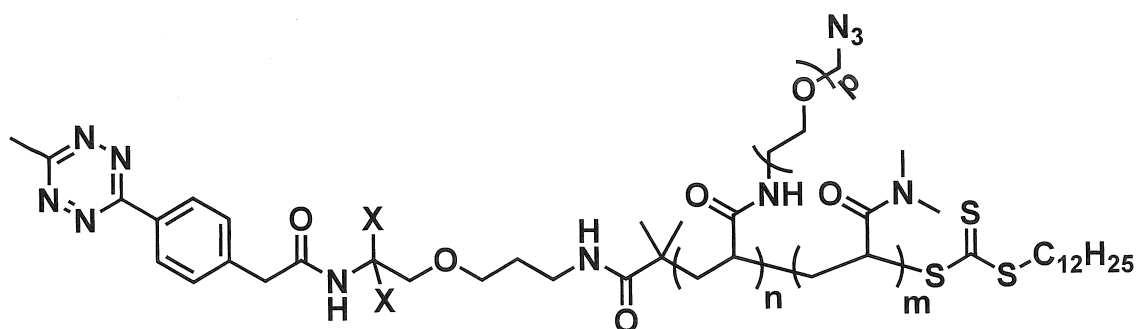
trong đó, R₆ được chọn từ



Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể khác, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):

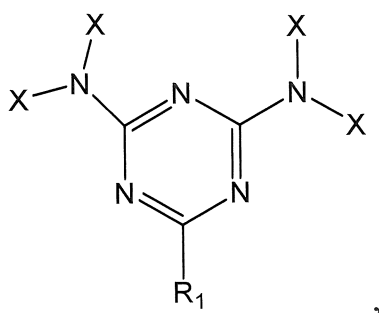


Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể khác, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):

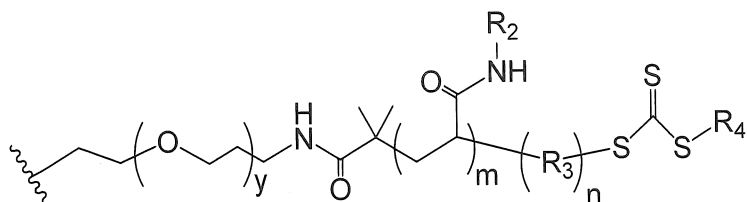


Theo một ví dụ khác, R^1 được liên kết với polynucleotit mẫu đơn lẻ, và một hoặc nhiều R^5 được liên kết với một thành phần phụ, như oligonucleotit phụ. Theo một ví dụ khác, oligonucleotit phụ được gắn vào trình tự nucleotit là bản sao của polynucleotit mẫu hoặc hỗ trợ cho polynucleotit mẫu.

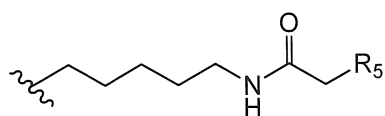
Theo một ví dụ khác, lõi khung có thể là hoặc có thể có nguồn gốc từ một phân tử triazin tiền chất. Một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn về khung là hợp chất có Công thức IV:



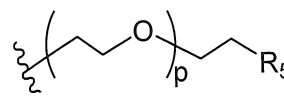
mỗi X là một hợp chất có công thức VIII:



trong đó, y là số nguyên từ 1 đến 20, R_2 được chọn từ Công thức IXa:

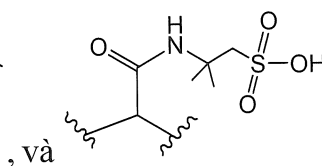
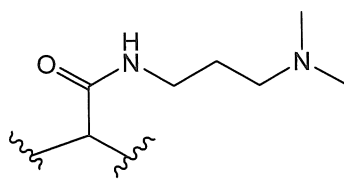
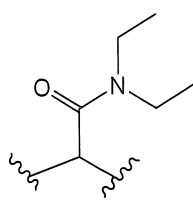
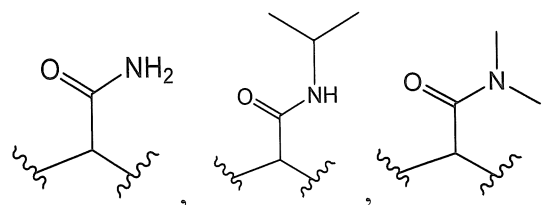


và Công thức IXb:

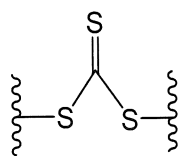


trong đó, p là số nguyên được chọn từ 1 đến 20, và R_5 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit

phụ, R_3 được chọn từ liên kết trực tiếp,



, và , m là số nguyên từ 1 đến 2000 và n là số nguyên từ 1 đến 10.000, R^1 bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, R^4 được chọn từ C_1 - C_{20} alkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkenyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkynyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} oxaalkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C_1 - C_{20} azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C_1 - C_{20} alkyl, oxy liên kết đôi, và nhóm hydroxyl, và R^3 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ. Theo ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ nêu trên, nhóm trithiocarbonat



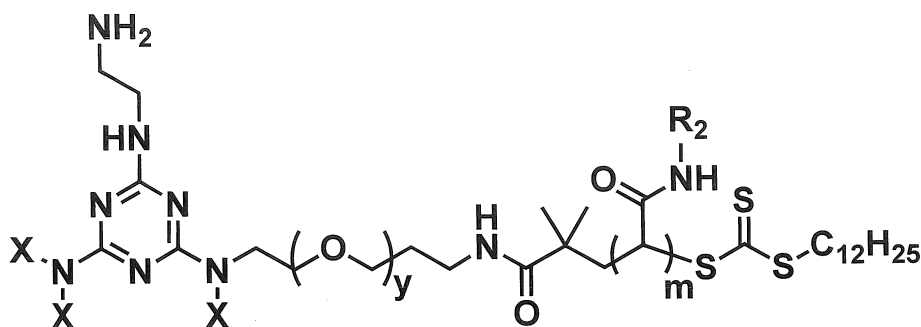
có thể được thay thế tùy ý bằng một liên kết trực tiếp, liên kết $-CH_2-$, liên kết $-S-$, liên kết $-N-$ hoặc liên kết $-O-$.

Theo một ví dụ, R_1 bao gồm vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimide, vị trí liên kết thiol-maleimide, vị trí liên kết

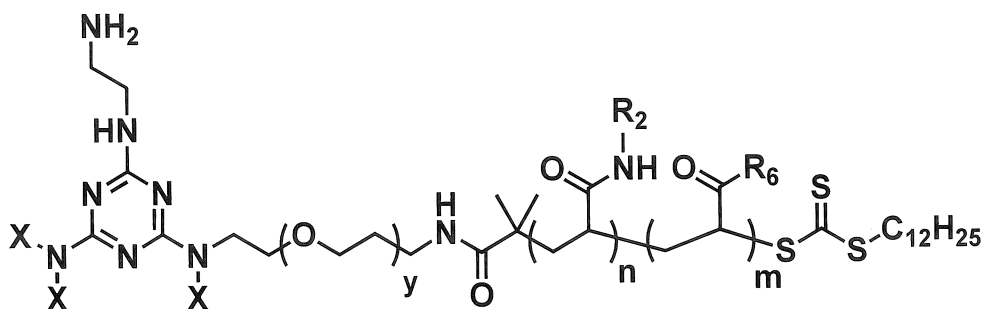
thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, hoặc vị trí liên kết ghép cặp sortaza. Theo một ví dụ khác, R₁ bao gồm vị trí liên kết cuộn xoắn đôi hoặc vị trí liên kết avidin-biotin. Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, R₁ bao gồm nhóm amin, nhóm tetrazin hoặc nhóm dibenzoxycloocten.

Theo một ví dụ, mỗi R₅ có thể bao gồm một vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, hoặc vị trí liên kết ghép cặp sortaza. Theo một ví dụ khác, mỗi R₅ bao gồm một vị trí liên kết cuộn xoắn đôi hoặc một vị trí liên kết avidin-biotin. Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, mỗi R₅ bao gồm một nhóm azit.

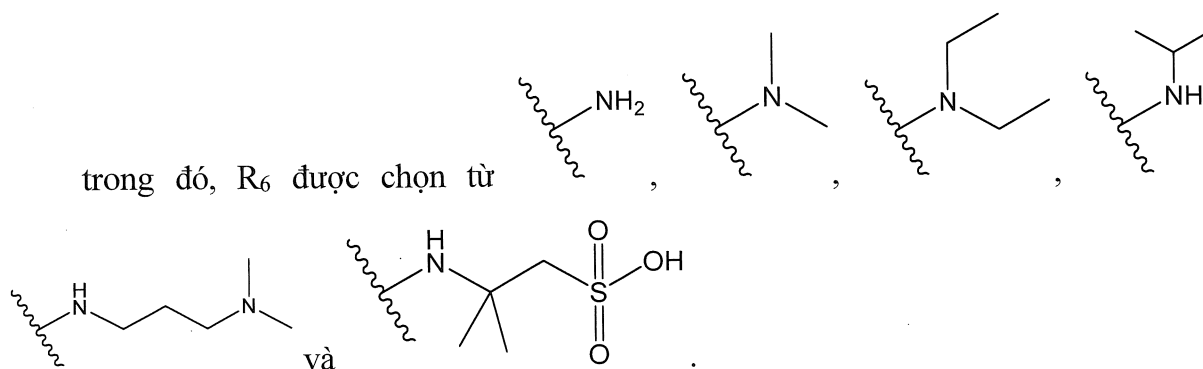
Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):



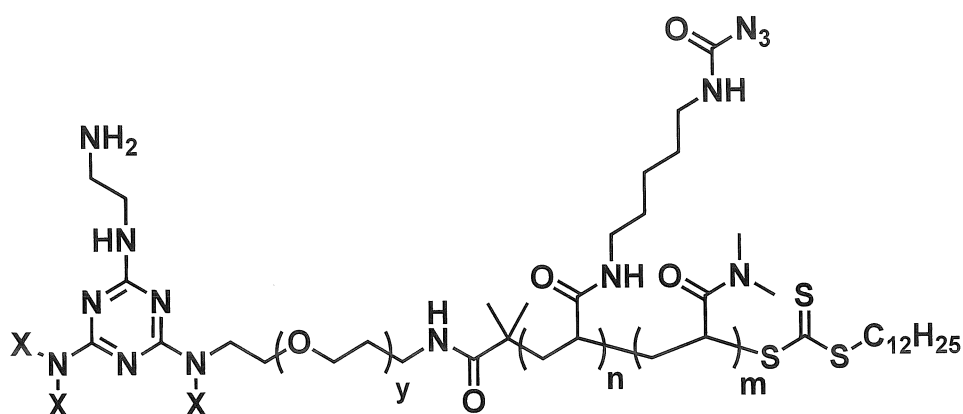
Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể khác, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):



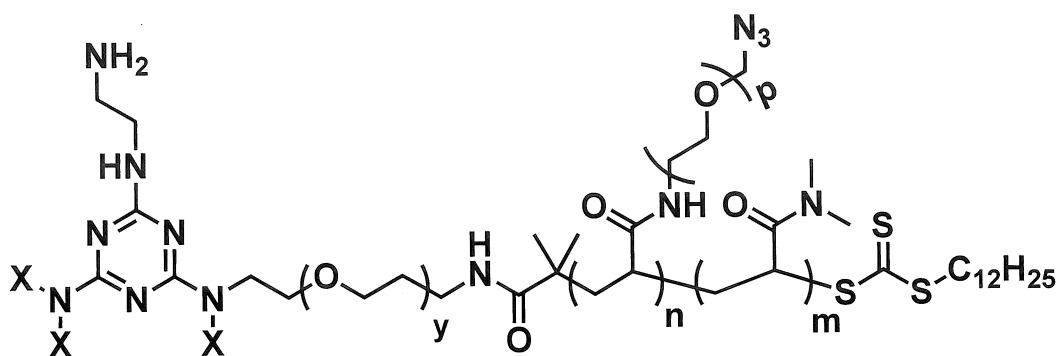
trong đó, R_6 được chọn từ



Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể khác, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):



Theo một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn cụ thể khác, khung bao gồm cấu trúc sau (trong đó chỉ một X được vẽ hoàn chỉnh, để đơn giản hóa việc minh họa, nhưng hai X còn lại có cấu trúc giống như cấu trúc của X đã được vẽ hoàn chỉnh):



Theo một ví dụ khác, R¹ được liên kết với polynucleotit mẫu đơn lẻ, và một hoặc nhiều R⁵ được liên kết với một thành phần phụ, như oligonucleotit phụ. Theo một ví dụ khác, oligonucleotit phụ được gắn vào trình tự nucleotit là bản sao của polynucleotit mẫu hoặc bổ trợ cho polynucleotit mẫu.

Các chuỗi polyme có thể được phát triển từ một lõi khung bằng cách sử dụng phương pháp polyme hóa gốc có kiểm soát (CRP). Polyme có thể được phát triển từ lõi khung bằng phương pháp polyme hóa bổ sung thuận nghịch-chuyển chuỗi phân mảnh (RAFT), phương pháp polyme hóa gốc chuyển nguyên tử ATRP hoặc phương pháp polyme hóa gốc qua trung gian nitroxit NMP. Theo một ví dụ khác, polyme có thể được tổng hợp sau đó được liên kết với lõi khung. Phương pháp CRP có thể bao gồm bước kiểm soát chặt trên mức độ polyme hóa (DP) của các polyme đã được gắn vào lõi khung,

và từ đó kiểm soát phân tử lượng của polyme và kích cỡ hạt nano. Ví dụ, DP bằng khoảng 100 trên mỗi chuỗi, khoảng 150 trên mỗi chuỗi, khoảng 200 trên mỗi chuỗi, khoảng 250 trên mỗi chuỗi, khoảng 300 trên mỗi chuỗi, khoảng 350 trên mỗi chuỗi, khoảng 400 trên mỗi chuỗi, khoảng 450 trên mỗi chuỗi, khoảng 500 trên mỗi chuỗi, khoảng 550 trên mỗi chuỗi, khoảng 600 trên mỗi chuỗi, khoảng 650 trên mỗi chuỗi, khoảng 700 trên mỗi chuỗi, khoảng 750 trên mỗi chuỗi có thể được sử dụng, khoảng 800 trên mỗi chuỗi, khoảng 850 trên mỗi chuỗi, khoảng 900 trên mỗi chuỗi, khoảng 950 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.000 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.050 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.100 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.150 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.200 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.250 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.300 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.350 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.400 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.450 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.500 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.550 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.600 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.650 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.700 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.750 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.800 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.850 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.900 trên mỗi chuỗi, khoảng 1.950, hoặc khoảng 2.000 trên mỗi chuỗi. Theo một số ví dụ, sau khi phát triển polyme thứ nhất như vậy từ lõi khung, polyme thứ hai như vậy có thể được kéo dài thêm từ polyme thứ nhất bằng quy trình RAFT, dưới dạng quy trình polyme hóa RAFT “sống”.

Theo một ví dụ khác, một khung có thể bao gồm một sợi nhánh, trong đó đơn vị lặp cấu trúc bao gồm axit amin lysin, và trong đó lysin là điểm nhánh, quá trình polyme hóa diễn ra bằng cách tạo ra liên kết peptit giữa axit carboxylic của axit amin nhóm alpha-amino trong lysin của nhánh ngược dòng ngay trước, và liên kết isopeptit giữa đầu tận epsilon-amino trong lysin của nhánh ngược dòng ngay trước này. Theo đó, lysin có chức năng làm điểm nhánh trong cấu trúc dendrime. Theo một ví dụ, một đơn vị lõi của dendrime có thể bao gồm một lysin. Ví dụ, axit carboxylic của đơn vị lõi lysin có thể gắn vào một vị trí liên kết polynucleotit mẫu, trong khi đó các nhóm alpha- và epsilon- amino có thể phân nhánh và gắn vào các axit amin xuôi dòng. Ví dụ, xystein có thể được gắn vào lysin lõi, tạo ra một vị trí liên kết polynucleotit mẫu thiol đơn lẻ. Theo các ví dụ khác, các axit amin khác, các axit amin cải biến, hoặc các cấu trúc khác có thể kéo dài từ lysin lõi để tạo ra một vị trí liên kết polynucleotit mẫu. Các nhóm cuối của sợi nhánh ngay sau các phân nhánh có thể bao gồm các vị trí liên kết phụ. Ví dụ, các vị trí liên kết phụ có thể bao gồm các nhóm lysyl alpha- và epsilon-amino của nhánh cuối

cùng của sợi nhánh. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ xuôi dòng và ngược dòng dùng để chỉ các hướng dọc theo chuỗi của phân nhánh so với đơn vị lõi của sợi nhánh, trong đó ngược dòng nghĩa là theo hướng của đơn vị lõi và xuôi dòng nghĩa là theo hướng của các đơn vị cuối của các chuỗi phân nhánh. Một sợi nhánh có thể có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 hoặc nhiều hơn 40 nhánh.

Theo một ví dụ, lysin ngược dòng gắn vào hai lysin xuôi dòng thông qua các nhóm alpha- và epsilon- amino của nó. Mỗi lysin xuôi dòng này có thể có khả năng gắn vào thêm hai lysin khác nữa thông qua việc tạo ra liên kết peptit và liên kết isopeptit với các nhóm alpha- và epsilon-amino của chúng, tạo ra sợi nhánh gồm các đơn vị cấu tạo lặp lại của các lysin, mỗi sợi nhánh được gắn thông qua axit carboxylic ngược dòng của chúng với nhóm amino của lysin ngược dòng và hai lysin xuôi dòng thông qua nhóm amino của nó.

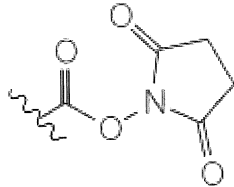
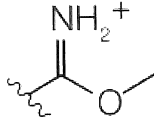
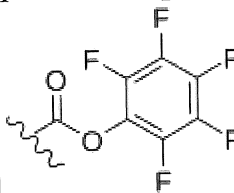
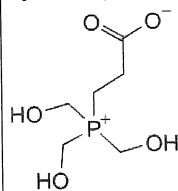
Theo một ví dụ khác, một khung có thể bao gồm một trình tự polypeptit thứ nhất bao gồm một hoặc nhiều gốc lysin trong polypeptit. Một hoặc nhiều lysin đó có thể tạo ra liên kết isopeptit với polypeptit kế tiếp thông qua nhóm epsilon amino của nó cũng như liên kết peptit với axit amin lân cận trong polypeptit thông qua nhóm alpha-amino của nó. Polypeptit kế tiếp này cũng có thể là hoặc bao gồm một hoặc nhiều lysin, và một hoặc nhiều lysin của polypeptit kế tiếp này có thể tạo ra liên kết isopeptit với polypeptit bổ sung thông qua nhóm epsilon amino của nó cũng như liên kết peptit với axit amin lân cận trong polypeptit kế tiếp này thông qua nhóm alpha-amino của nó. Polypeptit bổ sung này có thể có khả năng bao gồm một hoặc nhiều lysin tạo ra một hoặc nhiều liên kết isopeptit với một hoặc nhiều polypeptit khác, v.v. Các polynucleotit liên ứng với các điểm nhánh lysin liên ứng cũng có thể được bao gồm. Theo ví dụ này, một khung bao gồm các polypeptit được gắn vào nhau khi hình thành phân nhánh, được nối ở các gốc lysin. Trình tự polypeptit thứ nhất có thể bao gồm hoặc được gắn vào một vị trí liên kết polynucleotit mẫu, và các polypeptit cuối cùng (ví dụ: polypeptit kế tiếp, bổ sung, khác, hoặc tiếp theo mà không bao gồm lysin tạo ra liên kết isopeptit với polypeptit liên ứng) có thể bao gồm các vị trí liên kết phụ (ví dụ như trên nhóm amino tận cùng của axit amin đầu tận cùng N, axit amin epsilon của lysin của polypeptit cuối cùng, hoặc cả hai) của các polypeptit cuối cùng.

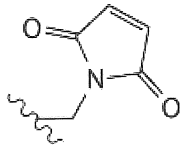
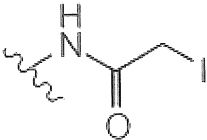
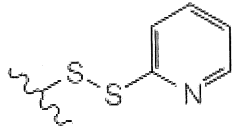
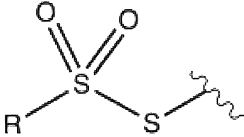
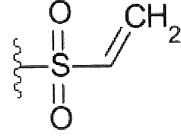
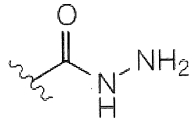
Polynucleotit mẫu để gắn vào khung có thể có độ dài thích hợp bất kỳ, bao gồm để giải trình tự trong quy trình SBS. Ví dụ, polynucleotit mẫu có thể có độ dài khoảng 50 nucleotit, độ dài khoảng 75 nucleotit, độ dài khoảng 100 nucleotit, độ dài khoảng 125 nucleotit, độ dài khoảng 150 nucleotit, độ dài khoảng 175 nucleotit, độ dài khoảng 200 nucleotit, độ dài khoảng 225 nucleotit, độ dài khoảng 250 nucleotit, độ dài khoảng 275 nucleotit, độ dài khoảng 300 nucleotit, độ dài khoảng 325 nucleotit, độ dài khoảng 350 nucleotit, độ dài khoảng 375 nucleotit, độ dài khoảng 400 nucleotit, độ dài khoảng 425 nucleotit, độ dài khoảng 450 nucleotit, độ dài khoảng 475 nucleotit, độ dài khoảng 500 nucleotit, độ dài khoảng 525 nucleotit, độ dài khoảng 550 nucleotit, độ dài khoảng 575 nucleotit, độ dài khoảng 600 nucleotit, độ dài khoảng 625 nucleotit, độ dài khoảng 650 nucleotit, độ dài khoảng 675 nucleotit, độ dài khoảng 700 nucleotit, độ dài khoảng 725 nucleotit, độ dài khoảng 750 nucleotit, độ dài khoảng 775 nucleotit, độ dài khoảng 800 nucleotit, độ dài khoảng 825 nucleotit, độ dài khoảng 850 nucleotit, độ dài khoảng 875 nucleotit, độ dài khoảng 900 nucleotit, độ dài khoảng 925 nucleotit, độ dài khoảng 950 nucleotit, độ dài khoảng 975 nucleotit, độ dài khoảng 1.000 nucleotit, độ dài khoảng 1.100 nucleotit, độ dài khoảng 1.200 nucleotit, độ dài khoảng 1.300 nucleotit, độ dài khoảng 1.400 nucleotit, độ dài khoảng 1.500 nucleotit, độ dài khoảng 1.600 nucleotit, độ dài khoảng 1.700 nucleotit, khoảng độ dài 1.800 nucleotit, độ dài khoảng 1.900 nucleotit, độ dài khoảng 2.000 nucleotit, hoặc dài hơn.

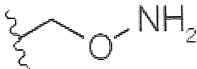
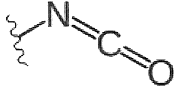
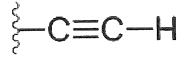
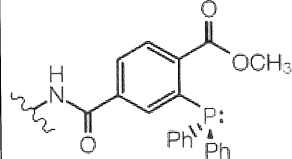
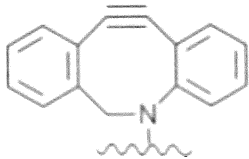
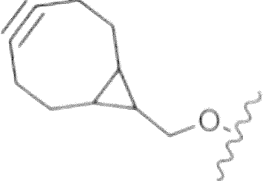
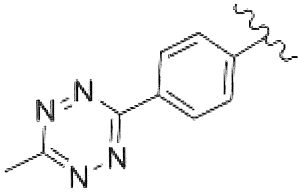
Việc gắn polynucleotit mẫu đơn lẻ hoặc thành phần phụ (ví dụ: oligonucleotit phụ, hợp phần phụ, hoặc cấu trúc phụ) vào khung có thể được thực hiện bằng cách bao gồm các gốc hoặc cấu trúc trên khung và polynucleotit mẫu hoặc thành phần phụ mà hỗ trợ cho nhau, nghĩa là chúng được cấu tạo để liên kết với polynucleotit mẫu đơn lẻ hoặc thành phần phụ khác, cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị, để tạo ra một điểm gắn giữa chúng. Chúng có thể hỗ trợ cho liên kết cộng hóa trị hoặc hỗ trợ cho liên kết không cộng hóa trị. Một khung có thể bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ có một gốc hoặc cấu trúc mà hỗ trợ cho hoặc có gốc hoặc cấu trúc (vị trí mẫu đơn lẻ) mà được gắn vào polynucleotit mẫu. Khung cũng có thể bao gồm hoặc được gắn vào các gốc hoặc cấu trúc khác mà hỗ trợ cho hoặc có gốc hoặc cấu trúc (vị trí phụ) được gắn vào một thành phần phụ. Cần phải tránh sự phản ứng chéo giữa gốc hoặc cấu trúc được gắn vào polynucleotit mẫu và gốc hoặc cấu trúc của vị trí phụ, để ngăn chặn việc nhiều hơn polynucleotit mẫu đơn lẻ sẽ gắn vào một khung. Cũng cần tránh sự phản ứng chéo giữa gốc hoặc cấu trúc được gắn vào thành phần phụ và gốc hoặc cấu

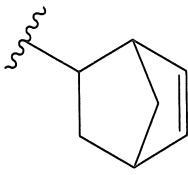
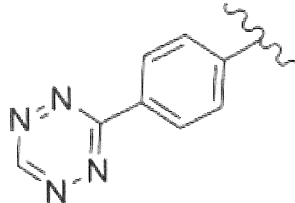
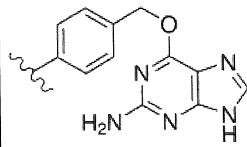
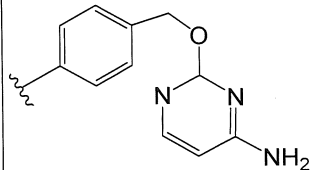
trúc của vị trí mẫu đơn lẻ, để ngăn chặn việc các thành phần phụ chiếm chỗ của vị trí mẫu đơn lẻ mà ngăn chặn việc polynucleotit mẫu đơn lẻ gắn vào đó. Theo một số ví dụ, có thể tránh được sự phản ứng chéo như vậy bằng cách phong bế vị trí mẫu đơn lẻ hoặc các vị trí phụ bằng phương pháp hóa học trong khi các thành phần phụ liên kết với các vị trí phụ hoặc polynucleotit mẫu đơn lẻ gắn vào vị trí mẫu đơn lẻ, một cách tương ứng, sau đó bỏ phong bế vị trí không bị chiếm để cho phép polynucleotit mẫu đơn lẻ hoặc thành phần phụ gắn vào đó.

Danh sách chưa đầy đủ về các thành phần liên kết hỗ trợ đi đôi được trình bày trong Bảng 1:

Vị trí liên kết	Gốc/cấu trúc ví dụ trên (a) vị trí liên kết được gắn vào khung hoặc (b) polynucleotit mẫu hoặc thành phần phụ	Gốc/cấu trúc ví dụ trên (a) polynucleotit mẫu hoặc thành phần phụ hoặc (b) vị trí liên kết được gắn vào khung
amin-NHS	nhóm amin, $-NH_2$	N-hydroxysuccinimide este 
amin-imidoeste	nhóm amin, $-NH_2$	imidoeste 
amin-pentofluorophenyl este	nhóm amin, $-NH_2$	pentofluorophenyl este, 
amin-hydroxymethyl phosphin	nhóm amin, $-NH_2$	hydroxymethyl phosphin 

amin-axit carboxylic	nhóm amin, -NH ₂	nhóm axit carboxylic, -C(=O)OH (ví dụ: sau khi hoạt hóa axit carboxylic bằng carbodiimit như EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimit hydroclorua) hoặc DCC (N', N'-dixyclohexyl carbodiimit) để cho phép tạo ra liên kết amit của axit carboxylic đã hoạt hóa với nhóm amin)
thiol-maleimit	thiol, -SH	maleimit 
thiol-haloaxetyl	thiol, -SH	haloaxetyl (ví dụ: iodoaxetyl hoặc haloaxetyl khác) 
thiol-pyridyl disulfua	thiol, -SH	pyridyl disulfua 
thiol-thiosulfonat	thiol, -SH	thiosulfonat 
thiol-vinyl sulfon	thiol, -SH	vinyl sulfon 
aldehyt-hydrazit	aldehyt, -C(=O)H	hydrazit 

aldehyt-alkoxyamin	aldehyt, $-C(=O)H$	alkoxyamin 
hydroxy-isoxyanat	hydroxyl, $-OH$	isoxyanat 
azit-alkyn	azit, $-N_3$	alkyn 
azit-phosphin	azit, $-N_3$	phosphin, ví dụ: 
azit-xyclooctyn	azit, $-N_3$	xyclooctyn, ví dụ như dibenzoxycyclooctyn  hoặc BCN (bixyclo[6.1.0]nonyn) 
azit-norbornen	azin, $-N_3$	norbornen
transxycloocten-tetrazin	transxycloocten	tetrazin, ví dụ như benzyl-metyltetrazin: 

norbornen-tetrazin	norbornen 	tetrazin, ví dụ như benzyl-tetrazin 
oxim	aldehyt hoặc keton (ví dụ: nhóm amin hoặc đầu tận cùng N của polypeptit đã được chuyển hóa thành aldehyt hoặc keton bằng pyroxidal phosphat)	alkoxyamin
SpyTag-SpyCatcher	SpyTag: trình tự axit amin AHIVMVDAYKPTK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 1)	SpyCatcher trình tự axit amin: MKGSSHHHHHHVDIPTTE NLYFQGAMVDTL SGLSSE QGQSGDMTIEEDSATHIK FSKRDEDGKELAGATMEL RDSSGKTISTWISDGQVK DFYLYPGKYTFVETAAPD GYEVATAITFTVNEQGQV TVNGKATK (SỐ ID TRÌNH TỰ: 2)
SNAP-tag-O ⁶ -Benzylguanin	SNAP-tag (O-6-metylguanin-ADN metyltransferaza)	O ⁶ -Benzylguanin 
CLIP-tag-O ² -benzylxytosin	CLIP-tag (O-6-metylguanin cải biến-ADN metyltransferaza)	O ² -benzylxytosin 
Ghép cặp sortaza	-Leu-Pro-X-Thr-Gly	-Gly ₍₃₋₅₎

Thành phần bất kỳ trong số các thành phần nêu trên có thể được thêm vào hoặc được bao gồm trong khung như được đề xuất trong bản mô tả này để gắn vào polynucleotit mẫu hoặc các thành phần phụ như các oligonucleotit phụ, trong đó

polynucleotit mẫu hoặc thành phần phụ có thể bao gồm hoặc được cải biến để bao gồm một gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ cho các cặp nêu trên để liên kết với khung.

Các phương pháp liên hợp sinh học thích hợp bất kỳ để thêm hoặc tạo ra các liên kết giữa các cặp gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ như vậy có thể được sử dụng. Các nucleotit cải biến có thể là các ví dụ xử lý đã có bán trên thị trường của một hoặc ví dụ còn lại về cặp gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ như vậy, và phương pháp để bao gồm một hoặc nhiều ví dụ về các gốc hoặc cấu trúc như vậy trong hoặc gắn hoặc bao gồm chúng vào polyme, nucleotit, hoặc polynucleotit cũng đã được biết đến. Cũng đã có bán trên thị trường có thể là phân tử liên kết hai chức có gốc hoặc cấu trúc từ một cặp thành phần liên kết đi đôi hỗ trợ được liệt kê trong Bảng 1 ở một đầu và gốc hoặc cấu trúc từ một cặp thành phần liên kết đi đôi hỗ trợ khác được liệt kê trong Bảng 1. Gốc hoặc cấu trúc của khung, polynucleotit mẫu, hoặc của thành phần phụ, hoặc oligo hoặc polypeptit đang được gắn vào đặc điểm bất kỳ trong số các đặc điểm nêu trên là nhằm tạo ra gốc hoặc cấu trúc để liên kết giữa đặc điểm bất kỳ trong số các đặc điểm nêu trên, có thể được liên kết với một đầu của tác nhân liên kết này, dẫn đến việc gốc hoặc cấu trúc ban đầu được thay thế một cách hiệu quả bằng một gốc hoặc cấu trúc khác, tức là, gốc hoặc cấu trúc có mặt trên đầu còn lại của tác nhân liên kết đó.

Các axit amin cải biến có thể là các ví dụ xử lý đã có bán trên thị trường của một hoặc ví dụ còn lại về cặp gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ như vậy, và phương pháp để bao gồm một hoặc nhiều ví dụ về các gốc hoặc cấu trúc như vậy trong hoặc gắn chúng vào axit amin hoặc polypeptit cũng đã được biết đến. Các phương pháp để tạo ra liên kết giữa các thành viên của cặp gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ này đã được biết đến. Do đó, gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ này có thể được thêm vào hoặc được bao gồm trong khung và polynucleotit mẫu hoặc khung và thành phần phụ để tạo ra các vị trí liên kết và cho phép gắn kết giữa chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “polypeptit” được định nghĩa là chuỗi các axit amin được liên kết với nhau bởi các liên kết peptit. Thuật ngữ “protein” và “polypeptit” có thể được sử dụng thay thế cho nhau. Polypeptit có thể bao gồm chuỗi một số axit amin được liên kết với nhau bởi các liên kết peptit và số lượng axit amin có thể là khoảng 2 hoặc nhiều hơn, khoảng 5 hoặc nhiều hơn, khoảng 10 hoặc nhiều hơn, khoảng 15 hoặc nhiều hơn, khoảng 20 hoặc nhiều hơn, khoảng 25 hoặc nhiều hơn, khoảng 30 hoặc

nhiều hơn, khoảng 35 hoặc nhiều hơn, khoảng 40 hoặc nhiều hơn, khoảng 45 hoặc nhiều hơn, khoảng 50 hoặc nhiều hơn, khoảng 55 hoặc nhiều hơn, khoảng 60 hoặc nhiều hơn, khoảng 65 hoặc nhiều hơn, khoảng 70 hoặc nhiều hơn, khoảng 75 hoặc nhiều hơn, khoảng 80 hoặc nhiều hơn, khoảng 85 hoặc nhiều hơn, khoảng 90 hoặc nhiều hơn, khoảng 95 hoặc nhiều hơn, khoảng 100 hoặc nhiều hơn, khoảng 110 hoặc nhiều hơn, khoảng 120 hoặc nhiều hơn, khoảng 130 hoặc nhiều hơn, khoảng 140 hoặc nhiều hơn, khoảng 150 hoặc nhiều hơn, khoảng 160 hoặc nhiều hơn, khoảng 170 hoặc nhiều hơn, khoảng 180 hoặc nhiều hơn, khoảng 190 hoặc nhiều hơn, khoảng 200 hoặc nhiều hơn, khoảng 225 hoặc nhiều hơn, khoảng 250 hoặc nhiều hơn, khoảng 275 hoặc nhiều hơn, khoảng 300 hoặc nhiều hơn, khoảng 325 hoặc nhiều hơn, khoảng 350 hoặc nhiều hơn, khoảng 375 hoặc nhiều hơn, khoảng 400 hoặc nhiều hơn, khoảng 425 hoặc nhiều hơn, khoảng 450 hoặc nhiều hơn, khoảng 475 hoặc nhiều hơn, khoảng 500 hoặc nhiều hơn, khoảng 550 hoặc nhiều hơn, khoảng 600 hoặc nhiều hơn, khoảng 650 hoặc nhiều hơn, khoảng 700 hoặc nhiều hơn, khoảng 750 hoặc nhiều hơn, khoảng 800 hoặc nhiều hơn, khoảng 850 hoặc nhiều hơn, khoảng 900 hoặc nhiều hơn, khoảng 950 hoặc nhiều hơn, khoảng 1000, hoặc cao hơn.

Trong một số trường hợp, polypeptit, hoặc protein, có thể chấp nhận cấu trúc hoặc cấu dạng ba chiều để thúc đẩy hoặc cho phép liên kết với một thành phần liên kết đi đôi khác như một polypeptit khác mà cũng chấp nhận cấu trúc ba chiều có lợi cho việc liên kết này, hoặc các thành phần liên kết đi đôi không phải protein khác. Polypeptit cũng có thể chấp nhận cấu dạng ba chiều có lợi cho việc thực hiện các phản ứng enzym hóa trên các lớp nền polypeptit khác hoặc các phân tử khác, hoặc để làm lớp nền cho một phản ứng enzym hóa khác hoặc phản ứng khác. Polypeptit cũng có thể chấp nhận cấu dạng ba chiều sao cho một vị trí hoặc các vị trí, như đầu tận cùng amino, đầu tận cùng carboxyl, nhóm bên của axit amin, hoặc cải biến đối với axit amin, có thể dễ tiếp cận để liên kết với một phân tử khác.

Các thành phần hóa học liên hợp sinh học khác nhau có thể được sử dụng để gắn polynucleotit mẫu đơn lẻ vào một khung. Gốc hóa học có thể được bao gồm trong hoặc được thêm vào vị trí có khả năng tạo ra sự liên hợp cộng hóa trị với gốc hóa học hỗ trợ, mà gốc hỗ trợ có thể được gắn vào hoặc được bao gồm trong polynucleotit mẫu. Sau đó, polynucleotit mẫu có thể được liên hợp với khung, như thông qua việc gắn cộng hóa trị giữa các gốc hóa học bổ sung.

Theo một ví dụ khác, khung có thể bao gồm hoặc được gắn vào, như là vị trí mẫu đơn lẻ, trình tự polypeptit có khả năng tạo ra sự gắn cộng hóa trị với một trình tự polypeptit khác hoặc gốc hóa học khác. Sau đó, các polypeptit khác hoặc gốc hóa học khác như vậy có thể được bao gồm trong hoặc được gắn vào polynucleotit mẫu đơn lẻ, sao cho vị trí mẫu đơn lẻ này của khung và polynucleotit mẫu có thể liên kết cộng hóa trị với nhau. Theo cách khác, polynucleotit mẫu có thể có trình tự polypeptit thứ nhất như vậy, và vị trí mẫu đơn lẻ của khung có thể có trình tự polypeptit khác như vậy hoặc gốc hóa học khác có khả năng liên kết cộng hóa trị với trình tự polypeptit của polynucleotit mẫu. Các ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn về các cặp này bao gồm hệ SpyTag/SpyCatcher, hệ Snap-tag/ O⁶-Benzylguanin, và hệ CLIP-tag/O²-benzylxytosin.

Các trình tự axit amin dùng cho các cặp bổ trợ của hệ SpyTag/SpyCatcher và các polynucleotit mã hóa chúng có thể có sẵn. Các ví dụ về trình tự được trình bày trong Bảng 1. Các đột biến một vài vị trí axit amin đối với trình tự SpyTag và đối với trình tự SpyCatcher có thể sẵn có để bao gồm trong các polypeptit tái tổ hợp. Snap-tag là O-6-methylguanin-ADN metyltransferaza chức năng, và CLIP-tag là phiên bản được cải biến của Snap-tag. Các trình tự nucleotit mã hóa Snap-tag, CLIP-tag, SpyCatcher, có thể đã có bán trên thị trường để tái tạo dòng thuần và bao gồm trong trình tự polypeptit được xử lý kỹ thuật.

Theo cách khác, các cặp bổ trợ để gắn cộng hóa trị trên vị trí mẫu đơn lẻ của khung và polynucleotit mẫu có thể được gắn cộng hóa trị vào nhau thông qua việc tạo ra liên kết cộng hóa trị có enzym xúc tác. Ví dụ, vị trí mẫu đơn lẻ của khung và polynucleotit mẫu có thể bao gồm các motif có khả năng gắn cộng hóa trị với nhau bằng cách ghép cặp qua trung gian sortaza, ví dụ trình tự axit amin LPXTG trên một motif và trình tự ưa nhân oligoglyxin trên motif còn lại (có đoạn lặp gồm, ví dụ như từ 3 đến 5 glyxin). Sau đó, quy trình chuyển peptit qua trung gian sortaza có thể được tiến hành để dẫn đến việc gắn cộng hóa trị khung và polynucleotit mẫu ở vị trí mẫu đơn lẻ.

Theo một ví dụ khác, một khung có thể bao gồm một vùng để gắn không cộng hóa trị polynucleotit mẫu đơn lẻ ở vị trí mẫu đơn lẻ. Ví dụ, một khung có thể bao gồm một oligonucleotit để lai với một đầu của polynucleotit mẫu bằng phương pháp ghép cặp

base Watson-Crick. Theo một ví dụ khác, một khung và polynucleotit mẫu có thể bao gồm hoặc được gắn vào vị trí liên kết peptit hỗ trợ. Ví dụ, khung và polynucleotit mẫu có thể bao gồm hoặc được gắn vào trình tự peptit mà có thể liên kết với nhau dưới dạng cặp hỗ trợ của môtip cuộn xoắn đôi. Môtip cuộn xoắn đôi là đặc điểm cấu trúc của một số polypeptit, trong đó hai hoặc nhiều hơn hai sợi polypeptit, mỗi sợi tạo ra cấu trúc thứ cấp xoắn alpha và các xoắn alpha này cuộn vào nhau để tạo ra liên kết không cộng hóa trị chặt chẽ. Trình tự cuộn xoắn đôi có thể bao gồm đoạn lặp nhóm bảy, một hình mẫu lặp của bảy axit amin HPPHCPC (trong đó H chỉ axit amin kỵ nước, C thường tượng trưng cho axit amin tích điện và P tượng trưng cho axit amin ưa nước phân cực). Một ví dụ về đoạn lặp nhóm bảy được tìm thấy trong cuộn xoắn đôi khóa kéo loxin, trong đó axit amin thứ tư của nhóm bảy thường là loxin.

Một khung có thể bao gồm hoặc được gắn vào một trình tự axit amin mà tạo ra một phần của cặp liên kết cuộn xoắn đôi và polynucleotit mẫu có thể được gắn vào một trình tự axit amin khác mà tạo ra một phần khác của cặp liên kết cuộn xoắn đôi, hỗ trợ cho trình tự là hoặc được gắn vào khung, sao cho hai trình tự này gắn vào nhau. Ví dụ, khung có thể được gắn cộng hóa trị vào một trình tự axit amin mà tạo ra một phần của cặp liên kết cuộn xoắn đôi và polynucleotit mẫu có thể được gắn vào một trình tự axit amin khác mà tạo ra một phần khác của cặp liên kết cuộn xoắn đôi, hỗ trợ cho trình tự là hoặc được gắn vào khung, sao cho hai trình tự này gắn vào nhau.

Theo một ví dụ khác, mỗi trong số khung và polynucleotit mẫu có thể bao gồm hoặc được gắn vào các thành phần hỗ trợ đi đôi khác của cặp peptit liên kết với nhau không cộng hóa trị. Một ví dụ bao gồm cặp liên kết biotin-avidin. Biotin và avidin peptit (như avidin, streptavidin và neutravidin, tất cả được đề cập chung là “avidin” trong bản mô tả này, trừ khi được nêu cụ thể khác đi) tạo ra liên kết không cộng hóa trị mạnh với nhau. Một phần của cặp này, dù là phần liên kết của biotin hay của avidin, có thể là một phần của hoặc được gắn vào khung hoặc polynucleotit mẫu, với phần hỗ trợ tương ứng với phần của hoặc được gắn vào khung hoặc polynucleotit mẫu, cho phép gắn không cộng hóa trị giữa chúng.

Nhiều phương pháp có sẵn để bao gồm một hoặc nhiều gốc biotin trong hoặc thêm một hoặc nhiều gốc biotin vào phân tử ADN, polynucleotit mẫu, khung, oligo-ADN, polypeptit khác, hoặc hợp phần khác để liên kết các phân tử với nhau như được đề xuất

trong bản mô tả này (như polynucleotit mẫu với khung, hoặc các thành phần phụ với khung). Ví dụ, các nucleotit được biotin hóa đã có bán trên thị trường để kết hợp vào phân tử ADN bằng polymeaza, và các bộ kit đã có bán trên thị trường để thêm một gốc biotin vào một polynucleotit hoặc một polypeptit. Các gốc biotin cũng có thể được thêm vào axit amin hoặc axit amin cải biến hoặc nucleotit hoặc nucleotit cải biến. Các chất hóa học liên kết được trình bày trong Bảng 1 cũng có thể được dùng để thêm một nhóm biotin vào protein như trên nhóm axit carboxylic, nhóm amin, hoặc nhóm thiol. Một vài enzym biotin ligaza cũng có sẵn cho quy trình biotin hóa hướng đích bằng enzym như của polypeptit (ví dụ: của gốc lysin trong trình tự axit amin AviTag GLNDIFEAQKIEWHE (SỐ ID TRÌNH TỰ: 3) được bao gồm trong polypeptit). Ascorbat peroxidaza được thiết kế di truyền (APEX) cũng có sẵn để cải biến biotin nhằm cho phép biotin hóa các axit amin giàu điện tử như tyrosin, và có thể là tryptophan, xystein hoặc histidin.

Theo một ví dụ khác, một polypeptit bao gồm trình tự axit amin DSLEFIASKLA (SỐ ID TRÌNH TỰ: 4) có thể được biotin hóa (ở đầu tận cùng N hơn giữa hai gốc S có mặt trong trình tự), mà là nền để gắn cộng hóa trị có xúc tác Sfp phosphopantetheinyl transferaza vào đó bằng các phân tử nhỏ liên hợp với coenzym A (CoA). Ví dụ, polypeptit bao gồm trình tự này có thể được biotin hóa thông qua việc gắn cộng hóa trị vào đó bởi thể liên hợp CoA-biotin. Hệ này cũng có thể được dùng để gắn nhiều loại gốc liên kết hoặc cấu trúc liên kết khác đã được nhận biết trong Bảng 1 để sử dụng để tạo ra các vị trí liên kết cho khung để liên kết với phân tử ADN hoặc polypeptit hoặc phân tử khác như được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, CoA được liên hợp với gốc bất kỳ của các cặp gốc phản ứng được nhận biết trong Bảng 1 có thể được gắn cộng hóa trị vào polypeptit chứa trình tự được nhận biết ở trên bằng Sfp phosphopantetheinyl transferaza, nhờ đó cho phép liên kết một hợp phần khác với nó mà bao gồm thành phần liên kết đi đôi hỗ trợ.

Các enzym khác có thể được sử dụng để thêm gốc liên kết và polypeptit. Ví dụ, enzym ligaza axit lipoic có thể thêm phân tử axit lipoic, hoặc phân tử axit lipoic cải biến gồm gốc liên kết được nhận biết trong Bảng 1 như alkyn hoặc nhóm azit, có thể được liên kết cộng hóa trị với amin của nhóm bên của gốc lysin trong trình tự axit amin DEVLVEIETDKAVLEVPGGEEE (SỐ ID TRÌNH TỰ: 5) hoặc GFEIDKVWYDLDA (SỐ ID TRÌNH TỰ: 6) được bao gồm trong polypeptit. Theo một ví dụ khác, khung,

polynucleotit mẫu, hoặc polypeptit khác hoặc phân tử ADN được bao gồm trong đó hoặc được dự định là được liên kết với nó có thể bao gồm hoặc được gắn vào enzym serin hydrolaza có hoạt tính. Các phân tử Fluorophosphonat bắt đầu được liên kết cộng hóa trị với gốc serin trong vị trí hoạt tính của enzym serin hydrolaza. Các chất tương tự đã có bán trên thị trường của phân tử fluorophosphonat bao gồm các gốc liên kết được nhận biết trong Bảng 1, như nhóm azit hoặc nhóm desthiobiotin (chất tương tự của biotin mà có thể liên kết với avidin). Do đó, các nhóm này có thể được gắn cộng hóa trị vào enzym serin hydrolaza được bao gồm trong hoặc được gắn vào polypeptit hoặc phân tử ADN dùng trong hoặc được gắn vào khung như được đề xuất trong bản mô tả này và gốc liên kết hoặc cấu trúc này có thể được thêm cộng hóa trị vào đó bằng cách sử dụng phương pháp gắn phân tử fluorophosphonat cải biến thích hợp để tạo ra vị trí liên kết trên protein này cho thành phần liên kết đi đôi bổ trợ từ Bảng 1 (như để liên kết azit-alkyn, azit-phosphin, azit-xyclooctyn, azit-norbornen hoặc desthiobiotin-avidin).

Phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên để biotin hóa các hợp phần nhằm thúc đẩy liên kết với polypeptit bao gồm trình tự avidin (như avidin polypeptit được bao gồm trong hoặc được gắn vào một hợp phần khác), hoặc thêm nhóm chức vào polypeptit, như là một phần của khung, được gắn vào khung, một phần của thành phần phụ, hoặc được gắn vào thành phần phụ hoặc polynucleotit mẫu, để liên kết giữa khung và polynucleotit mẫu hoặc giữa khung và thành phần phụ, có thể được sử dụng để cho phép hoặc thúc đẩy liên kết giữa các thành phần này như được đề xuất trong bản mô tả này.

Để gắn vào vị trí mẫu đơn lẻ của khung, polynucleotit mẫu có thể có gốc gắn bổ trợ hoặc cấu trúc gắn bổ trợ được thêm vào đó. Theo một ví dụ, trong quá trình tạo ra mẫu thư viện, nhiều polynucleotit mẫu có thể được tạo ra để giải trình tự. Thông thường trong quá trình tạo ra mẫu như vậy, các polynucleotit mẫu của mẫu thư viện được cải biến để bao gồm các trình tự nucleotit cụ thể ngoài các trình tự đã được bao gồm trong đó như là một phần của thư viện cần được giải trình tự. Các trình tự nucleotit đã được thêm vào như vậy có thể có chức năng bất kỳ trong số nhiều chức năng, bao gồm để nhận biết sau đó polynucleotit mẫu hoặc gắn vào bề mặt của lớp nền SBS như là một phần của quy trình gieo mầm. Theo sáng chế, quá trình tạo ra các polynucleotit

mẫu như vậy cũng có thể bao gồm gốc gắn hỗ trợ hoặc cấu trúc gắn hỗ trợ được gắn vào đó hoặc được bao gồm trong đó.

Ví dụ, quá trình tạo ra polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể bao gồm bước gắn trình tự nucleotit trong polynucleotit mẫu, như kéo dài từ một trong các đầu của nó, và trình tự này hỗ trợ cho một trình tự khác mà trình tự khác được bao gồm trong hoặc được gắn vào vị trí mẫu đơn lẻ của khung. Quá trình lai hóa do ghép cặp base Watson-Crick dẫn đến việc liên kết giữa hai thành phần. Theo một ví dụ khác, một thành phần phụ, như oligonucleotit phụ, có thể được cải biến để cho phép gắn cộng hóa trị vào gốc của nó hoặc cấu trúc mà hỗ trợ cho nó. Ví dụ, các cải biến đối với nucleotit được bao gồm trong thành phần phụ như oligonucleotit phụ, như trên nhóm phosphat, base, hoặc đường, có thể được bao gồm để tạo ra vị trí để gắn cộng hóa trị vào các vị trí phụ của khung. Các vị trí phụ của khung có thể lần lượt bao gồm một gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ cho phép gắn vào các thành phần phụ như các thành phần phụ oligo-ADN. Theo một ví dụ, các nucleotit được cải biến để bao gồm một gốc gắn với một gốc hỗ trợ của một vị trí liên kết phụ của khung, được bao gồm trong trình tự polynucleotit đã được thêm vào polynucleotit mẫu đơn lẻ trong quá trình tạo ra mẫu. Nhiều nucleotit cải biến mang các gốc hóa học này đã có bán trên thị trường để gắn cộng hóa trị các hợp phần vào phân tử ADN, trong đó các nucleotit cải biến này đã được kết hợp.

Theo một ví dụ khác, polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể được cải biến, như trong quá trình tạo ra mẫu, bằng cách gắn vào polypeptit của nó. Polypeptit này có thể có một trình tự axit amin và/hoặc cấu trúc để hỗ trợ cho một cấu trúc axit amin của vị trí mẫu đơn lẻ của khung, sao cho polynucleotit mẫu có thể gắn, thông qua polypeptit đã được gắn của nó, vào vị trí mẫu đơn lẻ này của khung. Các ví dụ về cặp polypeptit để liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị giữa vị trí mẫu đơn lẻ của khung và polynucleotit mẫu được đề cập ở trên và bao gồm, dưới dạng các ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn, trình tự axit amin xoắn alpha có các đoạn lặp nhóm bẫy để tạo ra các điểm gắn cuộn xoắn đôi với một điểm gắn khác, cặp liên kết biotin-avidin, hệ SpyTag/SpyCatcher, cặp ưa nhân LPXTG/oligoglyxin để liên kết chuyển peptit qua trung gian sortaza. Theo một ví dụ khác, polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể được cải biến trong quá trình tạo ra mẫu để bao gồm một trong số trình tự Snap-tag hoặc O⁶-Benzylguanin, và vị trí mẫu đơn lẻ của khung có thể bao gồm trình tự còn lại trong hai trình tự, để cho phép liên kết cộng hóa

trị giữa hai trình tự theo hệ Snap-tag/O⁶-Benzylguanin. Theo một ví dụ khác, polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể được cải biến trong quá trình tạo ra mẫu để bao gồm một trong số trình tự CLIP-tag hoặc O²-benzylxytosin, và vị trí mẫu đơn lẻ của khung có thể bao gồm trình tự còn lại trong hai trình tự, để cho phép liên kết cộng hóa trị giữa hai trình tự theo hệ CLIP-tag/O²-benzylxytosin., và hệ CLIP-tag/O²-benzylxytosin.

Ví dụ bất kỳ trong số các ví dụ nêu trên có thể có khả năng được sử dụng để gắn một hoặc nhiều thành phần phụ vào một hoặc nhiều vị trí phụ trên khung. Để gắn vào vị trí phụ của khung ADN hoặc của khung polypeptit, thành phần phụ (như thành phần phụ oligo-ADN) có thể có gốc gắn hỗ trợ hoặc cấu trúc gắn hỗ trợ được thêm vào đó. Theo một ví dụ, một trình tự nucleotit có thể được bao gồm trong hoặc được gắn vào một thành phần phụ và có thể bao gồm một gốc gắn hỗ trợ hoặc cấu trúc gắn hỗ trợ được gắn vào đó hoặc được bao gồm trong đó.

Theo một ví dụ khác, một thành phần phụ (như thành phần phụ oligo-ADN) có thể bao gồm hoặc được gắn vào trình tự nucleotit, như kéo dài từ một trong các đầu của nó trong trường hợp thành phần phụ oligo-ADN, và trình tự này hỗ trợ cho một trình tự khác mà trình tự khác được bao gồm trong hoặc được gắn vào các vị trí phụ của khung. Quá trình ghép cặp base Watson-Crick giữa các trình tự hỗ trợ dẫn đến việc lai và liên kết giữa hai trình tự và, do đó, gắn các thành phần phụ vào các vị trí liên kết phụ. Theo một ví dụ khác, thành phần phụ có thể bao gồm cải biến cộng hóa trị của nó để cho phép gắn cộng hóa trị vào gốc của nó hoặc cấu trúc mà hỗ trợ cho nó. Ví dụ, các cải biến đối với nucleotit được bao gồm trong polynucleotit mẫu, như trên nhóm phosphat, base, hoặc đường, có thể được bao gồm để tạo ra vị trí để gắn cộng hóa trị vào vị trí phụ của khung. Các vị trí phụ của khung có thể lần lượt bao gồm một gốc hoặc cấu trúc hỗ trợ cho phép gắn vào các thành phần phụ như các thành phần phụ oligo-ADN. Theo một ví dụ, các nucleotit được cải biến để bao gồm gốc gắn với gốc hỗ trợ của vị trí liên kết phụ của khung có thể được bao gồm trong trình tự polynucleotit đã được thêm vào hoặc được bao gồm trong thành phần phụ như thành phần phụ oligo-ADN để cho phép liên kết giữa chúng. Nhiều nucleotit cải biến mang các gốc hóa học này đã có bán trên thị trường để gắn cộng hóa trị các hợp phần vào phân tử ADN, trong đó các nucleotit cải biến này đã được kết hợp.

Theo một ví dụ khác, một thành phần phụ có thể được cải biến bằng cách gắn vào polypeptit của nó. Polypeptit này có thể có một trình tự và cấu trúc axit amin để

bổ trợ cho một cấu trúc axit amin của vị trí phụ của khung, sao cho các thành phần phụ này có thể gắn, thông qua các polypeptit đã được gắn của chúng, vào các vị trí phụ của khung. Các ví dụ về cặp polypeptit để liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị giữa các vị trí phụ và các thành phần phụ được đề cập ở trên và bao gồm, dưới dạng các ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn, trình tự axit amin xoắn alpha có các đoạn lặp nhóm bảy để tạo ra các điểm gắn cuộn xoắn đôi với một điểm gắn khác, cặp liên kết biotin-avidin, hệ SpyTag/SpyCatcher, cặp ưa nhân LPXTG/oligoglyxin để liên kết chuyển peptit qua trung gian sortaza. Theo một ví dụ khác, một thành phần phụ, như thành phần phụ oligo-ADN, có thể được cải biến để bao gồm một trong số trình tự Snap-tag hoặc O⁶-Benzylguanin, và các vị trí phụ của khung có thể bao gồm trình tự còn lại trong hai trình tự, để cho phép liên kết cộng hóa trị giữa hai trình tự theo hệ Snap-tag/O⁶-Benzylguanin. Theo một ví dụ khác, một thành phần phụ có thể bao gồm một trong số trình tự CLIP-tag hoặc O²-benzylxytosin, và các vị trí phụ của khung có thể bao gồm trình tự còn lại trong hai trình tự, để cho phép liên kết cộng hóa trị giữa hai trình tự theo hệ CLIP-tag/O²-benzylxytosin.

Theo một ví dụ, polynucleotit mẫu đơn lẻ có thể được liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ của khung, và nhiều thành phần phụ nucleotit, như các phân tử oligo-ADN phụ, có thể được liên kết với các vị trí phụ của khung. Các ví dụ về các phân tử oligo-ADN có thể là đoạn mồi để thực hiện quy trình tạo cụm trên khung. Như là một phần của quy trình tạo cụm thông thường, các bản sao của polynucleotit mẫu hoặc bộ thể của nó được tạo ra trên bề mặt của lớp nền. Như được giải thích ở trên, trong một số trường hợp, quy trình tạo cụm trên bề mặt này có thể dẫn đến việc tạo ra một hoặc nhiều cụm đa dòng không theo ý muốn. Như được đề xuất trong bản mô tả này, quy trình tạo cụm có thể được thực hiện trên khung, như trong dung dịch, mà không gắn trước khung đó vào bề mặt. Theo các ví dụ khác, khung có polynucleotit mẫu đơn lẻ đã được gắn có thể được gắn vào bề mặt của lớp nền và sau đó quy trình tạo cụm có thể được thực hiện trên bề mặt của lớp nền, trên khung, hoặc trên khung và trên bề mặt của lớp nền.

Đối với quy trình tạo cụm, cải biến có thể được tạo ra cho polynucleotit mẫu như trong quá trình tạo ra mẫu để bao gồm một hoặc nhiều trình tự nucleotit ở một trong hai hoặc cả hai đầu mồi 3 và mồi 5 của nó. Một bản sao hoặc các bản sao của nucleotit mẫu và các trình tự nucleotit bổ trợ cho nucleotit mẫu sau đó có thể được tổng hợp trên, như được đề xuất

trong bản mô tả này, khung, tạo ra cụm. Quy trình tạo cụm trên khung có thể dẫn đến việc tạo ra cụm đơn dòng.

Ví dụ, polynucleotit mẫu có thể liên kết với một vị trí gắn mẫu có đầu môi 5 của nó hướng về khung và đầu môi 3 của nó hướng ra xa khỏi vị trí liên kết với khung. Đầu môi 3 có thể bao gồm trình tự nucleotit mà bổ trợ cho trình tự nucleotit được bao gồm trong môi thứ nhất. “Môi” được định nghĩa là một trình tự axit nucleic sợi đơn (ví dụ như ADN sợi đơn hoặc ARN sợi đơn) đóng vai trò là điểm khởi đầu để tổng hợp ADN hoặc ARN. Một môi có thể dài bằng bất kỳ số lượng base nào và có thể bao gồm hàng loạt nucleotit không tự nhiên. Trong một ví dụ thực hiện sáng chế, môi là một sợi ngắn, dao động từ 20 đến 40 base, hoặc từ 10 đến 20 base. Các bản sao của các môi bổ trợ cho đầu môi 3 của polynucleotit mẫu có thể còn được gắn vào các vị trí phụ của khung.

Sau đó, phản ứng polyme hóa có thể được thực hiện, trong đó đầu môi 3 của polynucleotit mẫu lai thông qua ghép cặp base Watson-Crick với đoạn môi thứ nhất liên kết với khung bổ trợ cho nó. Polymeaza trong phản ứng polyme hóa có thể tạo ra bổ thể sợi mới hình thành cho polynucleotit mẫu như được gắn vào khung, bắt đầu từ đoạn môi gắn vào khung mà đầu môi 3 của polynucleotit mẫu được lai với. Polynucleotit mẫu và bổ thể của nó sau đó có thể được bỏ lại.

Bổ thể cho polynucleotit mẫu, ở đầu môi 3 của bổ thể, có thể bao gồm trình tự nucleotit mà bổ trợ cho trình tự đoạn môi thứ hai. Các bản sao của đoạn môi thứ hai bổ trợ cho đầu môi 3 của bổ thể cho polynucleotit mẫu có thể còn được gắn vào các vị trí phụ của khung. Sau đó, phản ứng polyme hóa thứ hai có thể được thực hiện, trong đó đầu môi 3 của polynucleotit mẫu lai thông qua ghép cặp base Watson-Crick với đoạn môi thứ nhất liên kết với khung bổ trợ cho nó và đầu môi 3 của bổ thể cho polynucleotit mẫu lai thông qua ghép cặp base Watson-Crick với đoạn môi thứ hai liên kết với khung bổ trợ cho nó. Polymeaza trong phản ứng polyme hóa thứ hai có thể tạo ra một bổ thể sợi mới hình thành khác cho polynucleotit mẫu như được gắn vào khung, bắt đầu từ đoạn môi gắn vào khung thứ nhất mà đầu môi 3 của polynucleotit mẫu được lai với. Và polymeaza trong phản ứng polyme hóa thứ hai có thể còn tạo ra bản sao sợi mới hình thành của polynucleotit mẫu như được gắn vào khung, bắt đầu từ môi thứ hai gắn vào khung mà đầu môi 3 của bổ thể cho mẫu đã

được polyme hóa trong phản ứng polyme hóa trước được lai với. Polynucleotit mẫu và bản sao của nó và bộ thể của nó sau đó có thể được bỏ lại.

Sau đó, các phản ứng polyme hóa kế tiếp có thể được thực hiện trong quy trình lặp lại. Các đầu mỗi 3 của polynucleotit mẫu liên kết với khung và các bản sao của nó lai với đoạn mỗi thứ nhất liên kết với khung hỗ trợ cho nó, và các đầu mỗi 3 của bộ thể liên kết với khung cho polynucleotit mẫu lai với đoạn mỗi thứ hai liên kết với khung hỗ trợ cho nó. Các sợi mới hình thành được polyme hóa bằng polymeaza, được bắt đầu ở mỗi thứ nhất liên kết với khung và đoạn mỗi thứ hai liên kết với khung mà polynucleotit mẫu liên kết với khung và các bộ thể và các bản sao của nó được lai với. Sau khi bỏ lại các sợi sau polyme hóa, các phản ứng polyme hóa liên tiếp được thực hiện, nhờ đó làm tăng theo cấp số nhân số lượng bản sao của polynucleotit mẫu và bộ thể với nó mà đã được gắn vào khung. Theo cách này, các bản sao và bộ thể cho polynucleotit mẫu được khuếch đại, với các bản sao đã khuếch đại này liên kết với khung, tạo ra cụm. Như được đề xuất trong bản mô tả này, quy trình tạo cụm này có thể được thực hiện trên khung, như trong dung dịch, như trái ngược với quy trình tạo cụm thông thường được thực hiện trên bề mặt của lớp nền trong quy trình SBS thông thường. Do có các bản sao và bộ thể cho chỉ polynucleotit mẫu đơn lẻ đã được tạo cụm trên khung, nên cụm đơn dòng có mặt trên khung.

Theo một ví dụ như vậy, khi trình tự ở hoặc được gắn vào đầu mỗi 5 của polynucleotit mẫu liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ, định hướng đầu mỗi 3 của polynucleotit mẫu ra xa khỏi khung, thì polynucleotit mẫu có thể liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ của khung bằng phương pháp lai với trình tự đoạn mỗi được gắn vào hoặc một phần của vị trí mẫu đơn lẻ, được đề cập đến là đoạn mỗi vị trí mẫu. Theo một ví dụ, polynucleotit mẫu đơn lẻ, như được tạo ra bằng quy trình tạo ra mẫu, có thể có ở hoặc được gắn vào đầu mỗi 5 của nó một trình tự nucleotit hỗ trợ cho đoạn mỗi vị trí mẫu. Mỗi 3 đối với trình tự nucleotit này hỗ trợ cho đoạn mỗi vị trí mẫu, polynucleotit mẫu có thể bao gồm trình tự nucleotit mà tương ứng với trình tự nucleotit của đoạn mỗi thứ hai được mô tả ở trên (mỗi thứ hai là đoạn mỗi được gắn vào khung mà đầu mỗi 3 của một bộ thể cho polynucleotit mẫu có thể lai với bằng cách ghép cặp base Watson-Crick phụ). Việc bao gồm trình tự này trong polynucleotit mẫu nghĩa là một bộ thể cho polynucleotit mẫu, được tổng hợp trong bước polyme hóa, sẽ có, về phía đầu mỗi 3 của nó, trình tự

polynucleotit mà hỗ trợ cho trình tự của đoạn mỗi thứ hai này. Việc có trình tự như vậy về phía đầu mỗi 3 của bộ thể cho polynucleotit mẫu cho phép lai đầu mỗi 3 của bộ thể với đoạn mỗi thứ hai này trong phản ứng polyme hóa sau đó trong quy trình tạo cụm.

Ở đầu mỗi 3 của polynucleotit mẫu, được định hướng ra xa khỏi đầu mỗi 5 của polynucleotit mẫu liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ, polynucleotit mẫu có thể bao gồm trình tự hỗ trợ cho đoạn mỗi thứ nhất như được mô tả ở trên. Trong bước polyme hóa thứ nhất, như được mô tả ở trên, trình tự nucleotit như vậy ở đầu mỗi 3 của polynucleotit mẫu có thể lai với đoạn mỗi thứ nhất, sau đó polyme hóa bộ thể mới hình thành cho polynucleotit mẫu. Có thể có lợi khi có sự ngắt quãng polyme hóa đối với một bộ thể cho polynucleotit mẫu giữa phần polynucleotit mẫu đã được lai với đoạn mỗi vị trí mẫu và trình tự nucleotit nằm ở mỗi 3 với nó trong polynucleotit mẫu mà bao gồm trình tự của đoạn mỗi thứ hai. Tức là, có thể có lợi cho bộ thể của polynucleotit mẫu khi có ở đầu mỗi 3 của nó một trình tự hỗ trợ cho đoạn mỗi thứ hai. Tuy nhiên, nếu không có sự ngắt quãng polyme hóa sau khi thêm vào bộ thể mới hình thành cho polynucleotit mẫu một trình tự nucleotit hỗ trợ cho trình tự tương ứng với đoạn mỗi thứ hai, thì đầu mỗi 3 của bộ thể cho polynucleotit mẫu sẽ dừng ở đó.

Ví dụ, nếu trình tự nucleotit hỗ trợ cho đoạn mỗi vị trí mẫu là đoạn mỗi 5 và liên kết với trình tự hỗ trợ cho đoạn mỗi thứ hai, thì đầu mỗi 3 của bộ thể đã được tổng hợp cho polynucleotit mẫu có thể bao gồm trình tự nucleotit được bao gồm trong đoạn mỗi vị trí mẫu. Ví dụ, ADN polymeaza, trong quá trình polyme hóa bộ thể cho polynucleotit mẫu, có thể dịch chuyển đoạn mỗi vị trí mẫu để không lai với đầu mỗi 5 của polynucleotit mẫu và polyme hóa công đoạn thêm trình tự nucleotit tương ứng với nó vào đầu mỗi 3 của bộ thể cho polynucleotit mẫu. Kết quả này có thể không đạt được như mong muốn nếu nó làm suy yếu khả năng của đầu mỗi 3 của bộ thể cho polynucleotit mẫu trong việc lai với đoạn mỗi thứ hai được mô tả ở trên ở vị trí phụ.

Do đó, theo một ví dụ, kết quả mong đợi có thể là kết hợp sự ngắt quãng polyme hóa mỗi 3 với đầu mỗi 5 của polynucleotit mẫu trong đó đầu mỗi 5 của polynucleotit mẫu này liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ bằng cách lai với đoạn mỗi vị trí mẫu. Ví dụ, tác nhân liên kết, như tác nhân liên kết PEG, tác nhân liên kết alkyl, hoặc gốc hóa học khác có thể được bao gồm để nối trình tự nucleotit mà lai với đoạn mỗi vị trí mẫu với đầu mỗi 5 của polynucleotit mẫu. Sự có mặt của tác nhân liên kết này, thay vì nối trình

tự nucleotit liền kề, sẽ ngăn chặn việc polymeaza thêm trình tự nucleotit tương ứng với đoạn mỗi vị trí mẫu vào đầu mỗi 3 của bộ thể của polynucleotit mẫu, điều này sẽ thay thế đầu bằng trình tự nucleotit bổ trợ cho trình tự nucleotit của đoạn mỗi thứ hai như có thể được mong đợi.

Theo các ví dụ khác, polynucleotit mẫu có thể có hoặc được gắn vào trình tự polynucleotit ở đầu mỗi 3 của polynucleotit mẫu mà bổ trợ cho đoạn mỗi mà là một phần của hoặc được gắn vào vị trí mẫu đơn lẻ của khung, được đề cập đến là đoạn mỗi vị trí mẫu. Sau khi lai trình tự này của hoặc được gắn vào đầu mỗi 3 của polynucleotit mẫu với đoạn mỗi vị trí mẫu, thì quy trình polyme hóa có thể được thực hiện trong đó ADN polymeaza polyme hóa công đoạn tạo ra polynucleotit mới hình thành bổ trợ cho polynucleotit mẫu, bắt đầu từ đoạn mỗi vị trí mẫu. Sau đó, công đoạn bỏ lai polynucleotit mẫu khỏi bộ thể gắn vào khung cho polynucleotit mẫu được thực hiện. Đầu mỗi 3 của bộ thể gắn vào khung cho polynucleotit mẫu, được định hướng ra xa khỏi vị trí gắn vào khung, có thể bao gồm trình tự nucleotit mà bổ trợ cho trình tự đoạn mỗi thứ hai được mô tả ở trên (mỗi thứ hai là đoạn mỗi được gắn vào khung mà đầu mỗi 3 của một bộ thể cho polynucleotit mẫu có thể lai với bằng cách ghép cặp base Watson-Crick phụ). Các bản sao của đoạn mỗi thứ hai bổ trợ cho đầu mỗi 3 của bộ thể cho polynucleotit mẫu có thể còn được gắn vào các vị trí phụ của khung. Sau đó, phản ứng polyme hóa thứ hai có thể được thực hiện, trong đó đầu mỗi 3 của bộ thể cho polynucleotit mẫu lai thông qua ghép cặp base Watson-Crick với đoạn mỗi thứ hai liên kết với khung bổ trợ cho nó. Polymeaza trong phản ứng polyme hóa thứ hai có thể tạo ra bản sao sợi mới hình thành của polynucleotit mẫu (tức là bổ trợ cho bộ thể liên kết với khung cho polynucleotit mẫu), bắt đầu từ mỗi thứ hai gắn vào khung mà đầu mỗi 3 của bộ thể cho mẫu đã được polyme hóa trong phản ứng polyme hóa trước đó được lai với. Sau đó, bước bỏ lai có thể được thực hiện để bỏ lai giữa bộ thể liên kết với khung cho polynucleotit mẫu và bản sao của polynucleotit mẫu đó khỏi nhau.

Bản sao của polynucleotit mẫu, ở đầu mỗi 3 của bản sao này, có thể bao gồm trình tự nucleotit mà bổ trợ cho trình tự đoạn mỗi thứ nhất được mô tả ở trên. Các bản sao của các đoạn mỗi thứ nhất bổ trợ cho đầu mỗi 3 của bản sao của polynucleotit mẫu, được mô tả ở trên, có thể còn được gắn vào các vị trí phụ của khung. Sau đó, phản ứng polyme hóa thứ ba có thể được thực hiện, trong đó đầu mỗi 3 của bản sao của polynucleotit mẫu lai thông qua ghép cặp base Watson-Crick với đoạn mỗi thứ nhất liên kết với khung bổ trợ cho nó và

đầu mỗi 3 của bộ thể cho polynucleotit mẫu lai thông qua ghép cặp base Watson-Crick với đoạn mỗi thứ hai liên kết với khung bộ trợ cho nó. Polymeaza trong phản ứng polyme hóa thứ ba có thể tạo ra một bộ thể sợi mới hình thành khác cho polynucleotit mẫu như được gắn vào khung, bắt đầu từ đoạn mỗi gắn vào khung thứ nhất mà đầu mỗi 3 của bản sao của polynucleotit mẫu được lai với. Và polymeaza trong phản ứng polyme hóa thứ ba có thể còn tạo ra bản sao sợi mới hình thành của polynucleotit mẫu, bắt đầu từ mỗi thứ hai gắn vào khung mà đầu mỗi 3 của bộ thể cho khuôn đã được polyme hóa trong phản ứng polyme hóa trước được lai với. Bước bỏ lai để bỏ lai các bản sao của và các bộ thể cho polynucleotit mẫu khỏi nhau sau đó có thể được thực hiện.

Sau đó, các phản ứng polyme hóa kế tiếp có thể được thực hiện trong quy trình lặp lại. Các đầu mỗi 3 của các bản sao liên kết với khung của polynucleotit mẫu lai với đoạn mỗi thứ nhất liên kết với khung bộ trợ cho nó, và các đầu mỗi 3 của bộ thể liên kết với khung cho polynucleotit mẫu lai với đoạn mỗi thứ hai liên kết với khung bộ trợ cho đó. Các sợi mới hình thành được polyme hóa bằng polymeaza, được bắt đầu ở mỗi thứ nhất liên kết với khung và đoạn mỗi thứ hai liên kết với khung mà polynucleotit mẫu liên kết với khung và các bộ thể và các bản sao của nó được lai với. Công đoạn bỏ lai các sợi được thực hiện sau khi polyme hóa, sau đó các phản ứng polyme hóa liên tiếp được thực hiện sau đó bỏ lai tiếp. Theo cách này, các bản sao của và bộ thể cho polynucleotit mẫu được khuếch đại, với các bản sao đã khuếch đại và bộ thể liên kết với khung, tạo ra cụm. Như được đề xuất trong bản mô tả này, quy trình tạo cụm này có thể được thực hiện trên khung, như trong dung dịch, như trái ngược với quy trình tạo cụm thông thường được thực hiện trên bề mặt của lớp nền trong quy trình SBS thông thường. Do có các bản sao và bộ thể cho chỉ polynucleotit mẫu đơn lẻ đã được tạo cụm trên khung, nên cụm đơn dòng có mặt trên khung.

Theo một ví dụ, một đầu của polynucleotit mẫu bao gồm hoặc được gắn vào trình tự nucleotit mà bộ trợ cho trình tự nucleotit được bao gồm trong hoặc được gắn vào vị trí mẫu đơn lẻ của khung, được đề cập đến là đoạn mỗi vị trí mẫu thứ ba. Theo một ví dụ, một bộ thể cho polynucleotit mẫu có thể được tổng hợp trên khung được bắt đầu ở đoạn mỗi vị trí mẫu thứ ba.

Theo các ví dụ về tạo cụm trên khung như được đề xuất trong bản mô tả này, polynucleotit mẫu có thể được liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ của khung theo liên kết bất kỳ

trong số các liên kết cộng hóa trị hoặc liên kết không cộng hóa trị khác nhau được đề xuất trong bản mô tả này. Ví dụ, một đầu của polynucleotit mẫu có thể bao gồm một gốc hoặc cấu trúc từ một cặp vị trí liên kết như được nhận biết trong Bảng 1, và gốc hoặc cấu trúc bổ trợ của cùng cặp đó có thể có mặt ở vị trí mẫu đơn lẻ của khung. Sau đó, các chu trình polyme hóa liên tiếp có thể tuân theo trình tự như được mô tả ở trên. Ví dụ, một đầu mỗi 3 của polynucleotit mẫu liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ của khung ở hoặc hướng về đầu mỗi 5 của polynucleotit mẫu có thể lai với oligonucleotit mỗi liên kết với vị trí phụ của khung và bổ thể với nó được tổng hợp bằng ADN polymeaza. Sau đó, các chu trình polyme hóa liên tiếp có thể tuân theo trình tự như được mô tả ở trên, dẫn đến việc polyme hóa nhiều bản sao của polynucleotit mẫu và các bổ thể với nó bắt nguồn từ các vị trí phụ của khung. Do chỉ polynucleotit mẫu đơn lẻ được liên kết với khung, khung này chỉ có một vị trí polynucleotit mẫu duy nhất, nên các bản sao này sẽ cấu thành cụm đơn dòng trên khung.

Theo một ví dụ khác, khung có thể gắn vào bề mặt của lớp nền, như bề mặt của lớp nền để sử dụng trong quy trình SBS. Ví dụ, các vị trí phụ của khung có thể bao gồm hoặc bắt đầu được gắn vào các vị trí đã được gắn vào bề mặt của lớp nền, hoặc các hợp phần liên kết với bề mặt của lớp nền. Theo một ví dụ, bề mặt của lớp nền có thể được liên kết với đoạn môi, như ví dụ, các bản sao của môi là bổ trợ cho đoạn môi thứ nhất hoặc đoạn môi thứ hai như được mô tả ở trên, hoặc cả hai, dưới dạng các ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn. Các môi bổ trợ này có thể được gắn trực tiếp vào bề mặt của lớp nền hoặc có thể được gắn vào bề mặt cải biến, như bề mặt mà các phân tử polyme đã được gắn vào (ví dụ: PAZAM hoặc các polyme liên quan) với đoạn môi được gắn vào các polyme này. Đoạn môi thứ nhất và đoạn môi thứ hai đề cập ở trên có thể được gắn vào các vị trí phụ của khung (trực tiếp, hoặc thông qua polyme như PAZAM hoặc các polyme giống PAZAM khác như được đề xuất ở trên dưới dạng các ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn, hoặc đoạn đệm hoặc hợp phần khác). Đoạn môi thứ nhất và đoạn môi thứ hai này của hoặc được gắn vào khung có thể lai với các môi bổ trợ cho nó như được gắn vào bề mặt của lớp nền, nhờ đó liên kết khung với bề mặt của lớp nền.

Các ví dụ về môi thứ nhất và đoạn môi thứ hai như được mô tả ở trên có thể bao gồm các môi được sử dụng trong các quy trình SBS hiện có. Ví dụ cụ thể về các môi phù hợp bao gồm môi P5 và/hoặc đoạn môi P7 được dùng trên bề mặt của tiêu bản tế bào dòng thương mại được bán bởi Illumina Inc. để giải trình tự trên HISEQ™, HISEQX™,

MISEQ™, MISEQDX™, MINISEQ™, NEXTSEQ™, NEXTSEQDX™, NOVASeq™, GENOME ANALYZER™, ISEQ™, và các nền tảng thiết bị khác. Và phần polynucleotit mẫu mà bao gồm trình tự nucleotit tương ứng với, hoặc hỗ trợ cho, đoạn mỗi thứ nhất hoặc đoạn mỗi thứ hai như được đề xuất ở trên có thể có, ví dụ như trình tự tương ứng với hoặc hỗ trợ cho đoạn mỗi P5 (bao gồm trình tự nucleotit là AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC (SỐ ID TRÌNH TỰ: 7)), đoạn mỗi P7 (bao gồm trình tự nucleotit là CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT (SỐ ID TRÌNH TỰ: 8)), hoặc cả hai, theo các trình tự đoạn mỗi như được sử dụng trong nền tảng SBS được mô tả ở trên, hoặc các nền tảng khác.

Lớp nền dùng cho quy trình SBS có thể bao gồm, dưới dạng các ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn, các lớp nền được sử dụng trong nền tảng SBS bất kỳ trong số các nền tảng SBS nêu trên hoặc các nền tảng khác. Một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn là, nền này có thể là tiêu bản dạng dòng chảy tế bào. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tiêu bản dạng tế bào dòng chảy" được dùng để đề cập đến bình có khoang (tức là kênh dòng chảy) nơi có thể thực hiện phản ứng, đầu vào để cung cấp (các) thuốc thử vào khoang và đầu ra để loại bỏ (các) thuốc thử khỏi khoang. Theo một số ví dụ, khoang cho phép phát hiện phản ứng hoặc tín hiệu xảy ra trong khoang. Ví dụ, khoang có thể bao gồm một hoặc nhiều bề mặt trong suốt cho phép phát hiện các mảng theo phương thức quang, các phân tử được đánh dấu quang học hoặc tương tự, trong khoang. Như được sử dụng trong bản mô tả này, “kênh dòng chảy” hoặc “vùng kênh dòng chảy” có thể là vùng được xác định giữa hai thành phần được liên kết, vùng này có thể nhận mẫu chất lỏng một cách chọn lọc. Theo một số ví dụ, kênh dòng chảy có thể được xác định giữa đế có hoa văn và nắp, và do đó có thể giao tiếp linh hoạt với một hoặc nhiều lỗ được xác định trong đế có hoa văn. Theo các ví dụ khác, kênh dòng chảy có thể được xác định giữa một đế không có hoa văn và một nắp.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "lỗ" dùng để chỉ đặc điểm lõm rìu rạc trong đế có hoa văn có miệng trên bề mặt mà được bao quanh hoàn toàn bởi (các) vùng kề của bề mặt đế có hoa văn đó. Lỗ có thể có mọi hình dạng bất kỳ ở miệng của chúng trên bề mặt, bao gồm, như hình tròn, hình elip, hình vuông, hình đa giác, hình sao (với số đỉnh bất kỳ), v.v. Mặt cắt của lỗ được lấy trực giao với bề mặt có thể cong, vuông, đa giác, hypebol, hình nón, góc cạnh, v.v. Ví dụ, lỗ có thể là giếng. Cũng như được sử

dụng trong bản mô tả này, “lỗ được tạo chức năng” dùng để chỉ đặc điểm lõm rời rạc trong đó mỗi được gắn, theo một số ví dụ là được gắn vào bề mặt của lỗ bằng polyme (như PAZAM hoặc polyme tương tự).

Thuật ngữ “đế” hoặc “lớp nền” của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy dùng để chỉ đế hoặc lớp nền mà hóa chất bề mặt có thể được thêm vào. Thuật ngữ “lớp nền có hoa văn” dùng để chỉ đế trong đó hoặc trên đó các lỗ được xác định. Thuật ngữ “lớp nền không có hoa văn” dùng để chỉ đế gần như phẳng. Lớp nền trong bản mô tả này cũng có thể được đề cập đến là “đế”, “đế có hoa văn”, hoặc “đế không có hoa văn”. Đế có thể là màng nhện, panen, tấm hình chữ nhật, khuôn dập hoặc bất kỳ cấu hình phù hợp nào khác. Đế thường cứng và không hòa tan trong chất lỏng chứa nước. Đế có thể trở với chất hóa học được sử dụng để biến đổi các lỗ. Ví dụ, đế có thể trở với chất hóa học được sử dụng để tạo ra lớp phủ polyme, để gắn mỗi như với lớp phủ polyme đã kết lắng, v.v. Các ví dụ về đế thích hợp bao gồm epoxy siloxan, thủy tinh và thủy tinh biến đổi hoặc thủy tinh chức hóa, silsequioxan dạng oligome đa diện (POSS) và các dẫn xuất của chúng, chất dẻo (bao gồm acrylic, polystyren và copolyme của styren và các vật liệu khác, polypropylen, polyetylen, polybutylen, polyuretan, polytetrafluoroetylen (như TEFLON® từ Chemours), polyme olefin có vòng/xyclo-olefin (COP) (như ZEONOR® từ Zeon), polyimit, v.v.), nylon, gốm/oxit gốm, silica, silica nung chảy, hoặc vật liệu gốc silica, nhôm silicat, silic và silic biến đổi (ví dụ: boron pha p+ silicon), silic nitrit (Si_3N_4), silic oxit (SiO_2), tantali pentoxit (TaO_5) hoặc (các) tantali oxit khác (TaO_x), hafni oxit (HfO_2), carbon, kim loại, thủy tinh vô cơ, hoặc các vật liệu tương tự. Đế cũng có thể là thủy tinh hoặc silic hoặc polyme gốc silic như một vật liệu POSS, tùy ý có một lớp phủ tantali oxit hoặc một oxit gốm khác tại bề mặt. Vật liệu POSS có thể được mô tả trong Kehagias và cộng sự, *Microelectronic Engineering* 86 (2009), 776-668, được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn.

Theo một ví dụ, lỗ có thể là giếng sao cho lớp nền có hoa văn bao gồm dãy các giếng ở bề mặt của nó. Các giếng này có thể là giếng micro hoặc giếng kích thước nano. Kích thước của mỗi giếng có thể được đặc trưng ở thể tích, diện tích miệng giếng, độ sâu và/hoặc đường kính của nó.

Mỗi giếng có thể có thể tích bất kỳ chứa được chất lỏng. Có thể chọn thể tích tối thiểu hoặc tối đa, ví dụ như để điều chỉnh thông lượng (ví dụ: tính đa hợp), phân giải,

phân tích chế phẩm hoặc phân tích khả năng phản ứng được mong đợi cho các mục đích sử dụng cuối của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy. Ví dụ, thể tích có thể là ít nhất khoảng $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, khoảng $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$, khoảng $0,1 \mu\text{m}^3$, khoảng $1 \mu\text{m}^3$, khoảng $10 \mu\text{m}^3$, khoảng $100 \mu\text{m}^3$, hoặc lớn hơn. Theo cách khác hoặc ngoài ra, 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 $100 \mu\text{m}^3$, khoảng $10 \mu\text{m}^3$, khoảng $1 \mu\text{m}^3$, khoảng $0,1 \mu\text{m}^3$, hoặc nhỏ hơn.

Có thể lựa chọn diện tích bị chiếm bởi mỗi miệng giếng trên bề mặt dựa trên các tiêu chí tương tự như các tiêu chí đã nêu ở trên cho thể tích giếng. Ví dụ, diện tích đối với mỗi miệng giếng trên bề mặt có thể ít nhất khoảng $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$, khoảng $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, khoảng $0,1 \mu\text{m}^2$, khoảng $1 \mu\text{m}^2$, khoảng $10 \mu\text{m}^2$, khoảng $100 \mu\text{m}^2$, hoặc lớn hơn. Theo cách khác hoặc ngoài ra, diện tích có thể nhiều nhất khoảng $1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$, khoảng $100 \mu\text{m}^2$, khoảng $10 \mu\text{m}^2$, khoảng $1 \mu\text{m}^2$, khoảng $0,1 \mu\text{m}^2$, khoảng $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$, hoặc nhỏ hơn. Diện tích bị chiếm bởi từng miệng giếng có thể lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị được nêu cụ thể ở trên.

Độ sâu của mỗi giếng có thể ít nhất khoảng $0,1 \mu\text{m}$, khoảng $1 \mu\text{m}$, khoảng $10 \mu\text{m}$, khoảng $100 \mu\text{m}$, hoặc lớn hơn. Theo cách khác hoặc ngoài ra, độ sâu có thể nhiều nhất khoảng $1 \times 10^3 \mu\text{m}$, khoảng $100 \mu\text{m}$, khoảng $10 \mu\text{m}$, khoảng $1 \mu\text{m}$, khoảng $0,1 \mu\text{m}$, hoặc nhỏ hơn. Độ sâu của mỗi giếng 14' có thể lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị quy trình ở trên.

Trong một số trường hợp, đường kính của mỗi giếng có thể ít nhất khoảng 50 nm , khoảng $0,1 \mu\text{m}$, khoảng $0,5 \mu\text{m}$, khoảng $1 \mu\text{m}$, khoảng $10 \mu\text{m}$, khoảng $100 \mu\text{m}$, hoặc lớn hơn. Theo cách khác hoặc ngoài ra, đường kính có thể nhiều nhất khoảng $1 \times 10^3 \mu\text{m}$, khoảng $100 \mu\text{m}$, khoảng $10 \mu\text{m}$, khoảng $1 \mu\text{m}$, khoảng $0,5 \mu\text{m}$, khoảng $0,1 \mu\text{m}$, hoặc nhỏ hơn (ví dụ: khoảng 50 nm). Đường kính có thể bằng khoảng 150 nm , khoảng 200 nm , khoảng 250 nm , khoảng 300 nm , khoảng 350 nm , khoảng 400 nm , khoảng 450 nm , khoảng 500 nm , khoảng 550 nm , khoảng 600 nm , khoảng 650 nm , khoảng 700 nm , khoảng 750 nm , khoảng 800 nm , khoảng 900 nm , khoảng 950 nm , khoảng $1 \mu\text{m}$, khoảng $1,25 \mu\text{m}$, khoảng $1,5 \mu\text{m}$, khoảng $1,74 \mu\text{m}$, khoảng $2 \mu\text{m}$, khoảng $2,25 \mu\text{m}$, khoảng $2,5 \mu\text{m}$, khoảng $2,75 \mu\text{m}$, khoảng $3 \mu\text{m}$, khoảng $3,25 \mu\text{m}$, khoảng $3,5 \mu\text{m}$, khoảng $3,75 \mu\text{m}$, khoảng $4 \mu\text{m}$, khoảng $4,25 \mu\text{m}$, khoảng $4,5 \mu\text{m}$, khoảng $4,75 \mu\text{m}$, khoảng $5 \mu\text{m}$, khoảng $5,25 \mu\text{m}$, khoảng $5,5 \mu\text{m}$, khoảng $5,75 \mu\text{m}$, khoảng

6 μm , khoảng 6,25 μm , khoảng 6,5 μm , khoảng 6,75 μm , khoảng 7 μm , khoảng 7,25 μm , khoảng 7,5 μm , khoảng 7,75 μm , khoảng 8 μm , khoảng 8,25 μm , khoảng 8,5 μm , khoảng 8,75 μm , khoảng 9 μm , khoảng 9,25 μm , khoảng 9,5 μm , hoặc khoảng 9,75 μm . Đường kính của mỗi giếng có thể lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị quy định ở trên. Giếng kích thước nano như thuật ngữ được sử dụng trong bản mô tả này được dự định nghĩa là giếng có miệng tròn có đường kính lớn nhất là khoảng 1 μm hoặc nhỏ hơn.

Cần phải hiểu rằng các phạm vi được đề xuất trong tài liệu này bao gồm phạm vi đã nêu và mọi giá trị hoặc phạm vi phụ bất kỳ trong phạm vi đã nêu. Ví dụ, phạm vi từ khoảng 100 nm đến khoảng 1 μm (1000 nm), nên được diễn giải để không chỉ bao gồm các giới hạn được trình bày rõ ràng là từ khoảng 100 nm đến khoảng 1 μm , mà còn bao gồm các giá trị riêng lẻ, như khoảng 708 nm, khoảng 945,5 nm, v.v., và các phạm vi phụ, như từ khoảng 425 nm đến khoảng 825 nm, từ khoảng 550 nm đến khoảng 940 nm, v.v. Ngoài ra, khi “khoảng” và/hoặc “về cơ bản” được sử dụng để mô tả một giá trị, chúng có nghĩa là bao gồm các biến số nhỏ (lên đến $\pm 10\%$) so với giá trị đã nêu.

Theo một ví dụ, kích cỡ hạt nano có thể là sao cho sự có mặt của hạt nano trong giếng như giếng kích thước nano chiếm quá nhiều thể tích của giếng đến mức mà một hạt nano khác không thể chiếm được trong giếng đó cùng lúc. Kích cỡ hạt nano có thể được thiết kế hoặc xác định, dựa trên cỡ giếng đã biết trong bề mặt của lớp nền, sao cho nó có thể đi vào giếng khi không có hạt nano nào khác trong đó nhưng việc nó đi vào giếng sẽ bị cản trở khi có mặt một hạt nano khác đã đi vào trước đó và vẫn có mặt trong giếng. Hạt nano đã được định cỡ để không cho phép nhiều hơn hai hạt vừa với giếng có thể thúc đẩy tính đơn dòng của cụm bên trong giếng. Ví dụ, trong quy trình SBS thông thường, các polynucleotit mẫu có thể được đưa vào tiêu bản dạng dòng chảy tế bào đã được tạo hoa văn bằng các giếng trong dung dịch ở nồng độ được hiệu chỉnh để tối đa hóa số lượng giếng trong đó polynucleotit mẫu sẽ gieo mầm (tức là liên kết, như với đoạn môi được gắn vào giếng, trực tiếp hoặc thông qua polyme gắn vào bề mặt, mà hỗ trợ cho trình tự nucleotit của phần nucleotit mẫu), nhưng đủ thấp để giảm thiểu nhiều nhất có thể sự tạo ra cụm đa dòng.

Theo một ví dụ, tiêu bản dạng dòng chảy tế bào có thể bao gồm vùng có kích thước nano không phải là lỗ hay giếng kích thước nano là các vùng đã phân tách trong không gian mà polynucleotit mẫu hoặc khung có thể liên kết với, hoặc gieo hạt trong đó, trong bản mô tả này được đề cập đến là đệm kích thước nano. Theo một số ví dụ, bề mặt tiêu bản dạng dòng chảy tế bào bao gồm đệm kích thước nano, được tách khỏi nhau bởi các vùng của bề mặt mà polynucleotit mẫu hoặc khung có thể không liên kết. Các đệm kích thước nano có thể được đặt cách xa khỏi nhau để thúc đẩy sự tạo ra cụm đơn dòng. Ví dụ, các đệm kích thước nano có thể được tách khỏi nhau sao cho cụm đã tạo ra trong một đệm kích thước nano được gieo mầm với polynucleotit mẫu đơn lẻ sẽ được tách đủ khỏi một đệm kích thước nano khác mà được gieo mầm với chỉ polynucleotit mẫu đơn lẻ. Tuy nhiên, có thể khó ngăn chặn được việc gieo mầm của đệm kích thước nano với nhiều hơn polynucleotit mẫu đơn lẻ, dẫn đến việc tạo ra một hoặc nhiều cụm đa dòng. Theo một ví dụ như được đề xuất trong bản mô tả này, hạt nano có thể thúc đẩy sự tạo ra cụm đơn dòng hơn so với cụm đa dòng bằng cách ngăn chặn việc nhiều hơn polynucleotit mẫu đơn lẻ gieo mầm hoặc gắn bên trong đệm kích thước nano cho trước. Ví dụ, kích cỡ hạt nano có thể nhằm để không có đủ không gian trên đệm kích thước nano để nhiều hơn một hạt nano sẽ liên kết, trong đó polynucleotit mẫu liên kết với một vị trí polynucleotit mẫu của khung.

Trong một số trường hợp, cụm đa dòng có thể xuất hiện nếu hai hoặc nhiều hơn hai polynucleotit mẫu mà có trình tự nucleotit khác nhau liên kết bên trong, hoặc gieo mầm, cùng một giếng như nhau. Các phân tử có thể phân bố giữa các giếng dựa trên nồng độ của chúng trong dung dịch được đưa vào trên cơ sở phân bố Poisson, theo đó có sự cân bằng giữa việc giảm thiểu số lượng giếng không bị chiếm (để gia tăng hiệu suất vận hành SBS) đồng thời giảm thiểu số lượng giếng được chiếm bởi nhiều polynucleotit mẫu khác loại. Sự chênh lệch giữa kích cỡ giếng nhỏ nhất và kích cỡ của polynucleotit mẫu (ví dụ: đường kính của phân tử B-ADN có thể là khoảng 2 nm) có thể dẫn đến việc lựa chọn giữa nồng độ không sử dụng nhiều bề mặt lớp nền, như bề mặt bên trong giếng, như có sẵn hoặc được ưu tiên về một mặt và dẫn đến tạo ra các cụm đa dòng với số lượng cao không mong đợi hoặc không theo ý muốn.

Như được đề xuất trong bản mô tả này, polynucleotit mẫu có thể liên kết với hạt nano, với chỉ polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết trong mỗi hạt nano. Hạt nano có thể được

định cỡ để cho phép hạt nano đi vào trong giếng của tiêu bản dạng dòng chảy tế bào trong đó một hạt nano khác không có mặt sẵn, nhưng không đi vào giếng của tiêu bản dạng dòng chảy tế bào trong đó một hạt nano đã có mặt. Quy trình tạo cụm, như tạo cụm đơn dòng, có thể diễn ra trên hạt nano trước khi hạt nano đi vào giếng, dẫn đến việc các cụm đơn dòng có mặt trong các giếng. Hoặc, polynucleotit mẫu có thể liên kết với vị trí mẫu của hạt nano và hạt nano này có thể đi vào và liên kết bên trong giếng (ví dụ: bằng cách liên kết các vị trí phụ với bề mặt hoặc cải biến đối với bề mặt của giếng), nhờ đó gieo mầm giếng chỉ với một hạt nano, và quy trình tạo cụm sau đó có thể tiếp diễn bên trong giếng, dẫn đến việc các cụm đơn dòng có mặt trong các giếng. Theo một số ví dụ, mức độ tạo cụm nào đó có thể diễn ra trên hạt nano trước khi chúng đi vào giếng và việc tạo cụm thêm có thể diễn ra sau khi hạt nano đi vào giếng. Tất cả các ví dụ như vậy bao gồm các ví dụ trong đó các cụm đơn dòng tạo ra bên trong giếng. Hơn nữa, việc điều chỉnh kích cỡ hạt nano để làm giảm, giảm thiểu, hoặc theo một ví dụ là loại bỏ sự có mặt đồng thời của nhiều hơn một hạt nano trong giếng cùng một thời điểm có thể làm giảm, giảm thiểu, hoặc theo một ví dụ là loại bỏ sự tạo ra cụm đa dòng.

Kích cỡ hạt nano có thể được điều chỉnh bằng cách cải biến kích cỡ của khung, cải biến kích cỡ của các thành phần phụ liên kết với các vị trí phụ như polyme được gắn vào đó, hoặc cả hai. Kích cỡ hạt nano cũng có thể được biến đổi bởi lượng tạo cụm đã diễn ra hoặc chưa diễn ra trên hạt nano, như bằng cách cải biến một số vị trí trên hạt nano mà các bản sao của và bổ thể cho polynucleotit mẫu có thể liên kết trên đó trong các chu trình polyme hóa trong quy trình tạo cụm, trong ít vị trí như vậy hơn có thể khiến giới hạn trên hơn của kích cỡ hạt nano nhỏ hơn và nhiều vị trí như vậy hơn có thể khiến giới hạn trên của kích cỡ hạt nano lớn hơn. Một số chu kỳ polyme hóa trong quy trình tạo cụm cũng có thể biến đổi kích cỡ hạt nano, trong đó nhiều chu kỳ hơn dẫn đến nhiều bản sao của và bổ thể cho polynucleotit mẫu được liên kết với hạt nano hơn và do đó có thể làm tăng giới hạn kích cỡ trên của nó và ít chu kỳ hơn dẫn đến ít bản sao của và bổ thể cho polynucleotit mẫu được liên kết với hạt nano hơn và do đó có thể làm giảm giới hạn kích cỡ trên của nó. Kích cỡ của hạt nano có thể được xác định theo kích cỡ của nó trước khi quy trình tạo cụm trên khung đã diễn ra hoặc sau khi quy trình tạo cụm trên khung đã diễn ra.

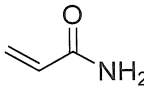
Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “hạt nano” được dự định nghĩa là hạt có kích thước lớn nhất lên đến kích cỡ đến khoảng 1000 nm. Tùy vào hình thái, kích thước có thể dùng để chỉ độ dài, độ rộng, độ cao, đường kính, v.v. Mặc dù “đường kính” thường được sử dụng để mô tả kích thước như là một ví dụ ở đây, hạt nano được mô tả trong bản mô tả này không cần có hình cầu hoặc hình tròn. Hạt nano như được đề xuất trong bản mô tả này có thể có đường kính bằng khoảng 2 nm, khoảng 5 nm, khoảng 7 nm, khoảng 10 nm, khoảng 12 nm, khoảng 15 nm, khoảng 17 nm, khoảng 20 nm, khoảng 22 nm, khoảng 25 nm, khoảng 27 nm, khoảng 30 nm, khoảng 32 nm, khoảng 35 nm, khoảng 40 nm, khoảng 42 nm, khoảng 45 nm, khoảng 47 nm, khoảng 50 nm, khoảng 52 nm, khoảng 55 nm, khoảng 57 nm, khoảng 60 nm, khoảng 62 nm, khoảng 65 nm, khoảng 67 nm, khoảng 70 nm, khoảng 72 nm, khoảng 75 nm, khoảng 77 nm, khoảng 80 nm, khoảng 82 nm, khoảng 85 nm, khoảng 87 nm, khoảng 90 nm, khoảng 92 nm, khoảng 95 nm, khoảng 97 nm, khoảng 100 nm, khoảng 125 nm, khoảng 150 nm, khoảng 175 nm, khoảng 200 nm, khoảng 225 nm, khoảng 250 nm, khoảng 275 nm, khoảng 300 nm, khoảng 325 nm, khoảng 350 nm, khoảng 375 nm, khoảng 400 nm, khoảng 425 nm, khoảng 450 nm, khoảng 475 nm, khoảng 500 nm, khoảng 525 nm, khoảng 550 nm, khoảng 575 nm, khoảng 600 nm, khoảng 625 nm, khoảng 650 nm, khoảng 675 nm, khoảng 700 nm, khoảng 725 nm, khoảng 750 nm, khoảng 775 nm, khoảng 800 nm, khoảng 825 nm, khoảng 850 nm, khoảng 875 nm, khoảng 900 nm, khoảng 925 nm, khoảng 950 nm, khoảng 975 nm, hoặc khoảng 1.000 nm. Đường kính của hạt nano được đo bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động học (DLS), còn được biết đến là tán xạ ánh sáng quasi-elastic, được biểu diễn dưới dạng gấp hai lần bán kính thủy động học (R_h), mà có thể được xác định trên hệ thống DLS hoặc hệ thống khác mà bao gồm DLS và nhóm chức khác (ví dụ: ZETASIZER®, Malvern Instruments Limited).

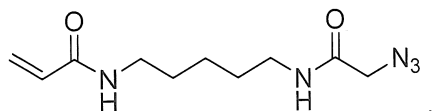
Hạt nano như được đề xuất trong bản mô tả này có thể có đường kính nằm trong khoảng từ khoảng 2 nm đến khoảng 10 nm, khoảng 5 nm đến khoảng 15 nm, khoảng 7 nm đến khoảng 20 nm, khoảng 10 nm đến khoảng 25 nm, khoảng 15 nm đến khoảng 30 nm, khoảng 20 nm đến khoảng 50 nm, khoảng 40 nm đến khoảng 60 nm, khoảng 50 nm đến khoảng 75 nm, khoảng 60 nm đến khoảng 100 nm, khoảng 70 nm đến khoảng 100 nm, khoảng 75 nm đến khoảng 100 nm, khoảng 80 nm đến khoảng 110 nm, khoảng 90 nm đến khoảng 130 nm, khoảng 100 nm đến khoảng 150 nm,

khoảng 100 nm đến khoảng 200 nm, khoảng 150 nm đến khoảng 225 nm, khoảng 200 nm đến khoảng 250 nm, khoảng 200 nm đến khoảng 300 nm, khoảng 225 nm đến khoảng 275 nm, khoảng 250 nm đến khoảng 300 nm, khoảng 275 nm đến khoảng 325 nm, khoảng 300 nm đến khoảng 400 nm, khoảng 300 nm đến khoảng 350 nm, khoảng 325 nm đến khoảng 375 nm, khoảng 350 nm đến khoảng 400 nm, khoảng 375 nm đến khoảng 425 nm, khoảng 400 nm đến khoảng 500 nm, khoảng 400 nm đến khoảng 450 nm, khoảng 425 nm đến khoảng 475 nm, khoảng 450 nm đến khoảng 500 nm, khoảng 475 nm đến khoảng 525 nm, khoảng 500 nm đến khoảng 600 nm, khoảng 500 nm đến khoảng 550 nm, khoảng 525 nm đến khoảng 575 nm, khoảng 550 nm đến khoảng 600 nm, khoảng 575 nm đến khoảng 625 nm, khoảng 600 nm đến khoảng 700 nm, khoảng 600 nm đến khoảng 625 nm, khoảng 625 nm đến khoảng 675 nm, khoảng 650 nm đến khoảng 700 nm, khoảng 675 nm đến khoảng 725 nm, khoảng 700 nm đến khoảng 800 nm, khoảng 700 nm đến khoảng 725 nm, khoảng 725 nm đến khoảng 775 nm, khoảng 750 nm đến khoảng 800 nm, khoảng 775 nm đến khoảng 825 nm, khoảng 800 nm đến khoảng 900 nm, khoảng 800 nm đến khoảng 850 nm, khoảng 825 nm đến khoảng 875 nm, khoảng 850 nm đến khoảng 900 nm, khoảng 875 nm đến khoảng 925 nm, khoảng 900 nm đến khoảng 1.000 nm, khoảng 900 nm đến khoảng 950 nm, khoảng 925 nm đến khoảng 975 nm, khoảng 950 nm đến khoảng 1.000 nm, khoảng 300 nm đến khoảng 450 nm, khoảng 350 nm đến khoảng 500 nm, khoảng 400 nm đến khoảng 550 nm, khoảng 450 nm đến khoảng 600 nm, khoảng 500 nm đến khoảng 650 nm, khoảng 550 nm đến khoảng 700 nm, khoảng 600 nm đến khoảng 750 nm, khoảng 650 nm đến khoảng 800 nm, khoảng 700 nm đến khoảng 850 nm, khoảng 750 nm đến khoảng 900 nm, khoảng 800 nm đến khoảng 950, hoặc khoảng 850 nm đến khoảng 1.000 nm.

Để thuận tiện và rõ ràng, một số thuật ngữ được sử dụng trong sáng chế, ví dụ và yêu cầu bảo hộ sẽ được mô tả trong tài liệu này.

“Nhóm acrylat” bao gồm các muối, este, và base liên hợp của axit acrylic và các dẫn xuất của nó (ví dụ: axit metacrylic). Ion acrylat có công thức phân tử $\text{CH}_2=\text{CHCOO}^-$.

“Monome acrylamit” là monome có cấu trúc  hoặc chất tương tự thay thế của nó (ví dụ: metacrylamit hoặc N-isopropylacrylamit). Một ví dụ về monome bao gồm nhóm acrylamit và nhóm azido là azido axetamido pentyl acrylamit:



Trong bản mô tả này, “alkyl” đề cập đến một chuỗi hydrocarbon mạch thẳng hoặc mạch nhánh bão hòa hoàn toàn (tức là không chứa liên kết đôi hoặc ba). Nhóm alkyl có thể có từ 1 đến 20 nguyên tử carbon. Các nhóm alkyl ví dụ bao gồm metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, butyl bậc ba, pentyl, hexyl, và các nhóm tương tự. Ví dụ, ký hiệu “C1-4 alkyl” biểu thị rằng có một đến bốn nguyên tử carbon trong chuỗi alkyl, tức là chuỗi alkyl được chọn từ nhóm bao gồm metyl, etyl, propyl, iso-propyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl và t-butyl.

Trong bản mô tả này, “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 carbon. Các nhóm alkenyl ví dụ bao gồm etenyl, propenyl, butenyl, pentenyl, hexenyl, và các nhóm tương tự.

Trong bản mô tả này, “alkyne” hoặc “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 carbon.

Alkoxy hoặc alkoxy dùng để chỉ các nhóm có từ 1 đến 20 nguyên tử carbon - ví dụ, 1 đến 10 nguyên tử carbon, chẳng hạn như 1 đến 6 nguyên tử carbon, v.v. có cấu trúc thẳng hoặc phân nhánh được gắn vào cấu trúc cha qua oxy. Ví dụ bao gồm metoxy, etoxy, propoxy, isopropoxy và các loại tương tự.

Oxaalkyl đề cập đến đơn phân alkyl mà trong đó một hoặc nhiều carbon (và các hydro liên quan của chúng) đã được thay thế bằng oxy. Ví dụ bao gồm metoxypropoxy, 3,6,9-trioxadexyl và các loại tương tự. Thuật ngữ oxaalkyl dùng để chỉ các hợp chất trong đó nguyên tử oxy được liên kết thông qua liên kết đơn với nguyên tử liền kề của nó (tạo ra liên kết ete); nó không dùng để chỉ nguyên tử oxy liên kết đôi, như được tìm thấy trong nhóm carbonyl. Tương tự, thiaalkyl và azaalkyl đề cập đến đơn phân alkyl

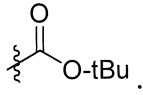
mà trong đó một hay nhiều carbon được thay thế bằng lưu huỳnh hoặc nitơ tương ứng. Ví dụ về azaalkyl bao gồm etylaminoethyl và aminohexyl.

Thuật ngữ “aryl” được dùng để chỉ hệ vòng hoặc vòng thơm (nghĩa là hai hoặc nhiều vòng hợp nhất chia sẻ hai nguyên tử carbon liên kề) chỉ chứa carbon trong xương sống của vòng. Khi aryl là hệ vòng, mọi vòng trong hệ thống là vòng thơm. Nhóm aryl có thể có từ 6 đến 18 nguyên tử carbon. Ví dụ về các nhóm aryl bao gồm phenyl, naphthyl, azulenyl và anthracenyl.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “được gắn” dùng để chỉ trạng thái của hai vật đang được tiếp nối, thắt chặt, kết dính, nối, hoặc được liên kết với nhau, cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị (ví dụ: bằng liên kết hydro, liên kết ion, lực van der Waals, tương tác ưa nước và tương tác kỵ nước). Ví dụ, axit nucleic có thể được gắn vào polyme đã được chức hóa bằng liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị.

Nhóm chức “azit” hoặc “azido” đề cập đến -N₃.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “vùng liên kết” dùng để chỉ vùng trên nền mà được liên kết với một vật liệu khác, mà có thể là, dưới dạng ví dụ, lớp đệm, nắp, một nền khác, v.v., hoặc tổ hợp của chúng (ví dụ: lớp đệm và nắp). Liên kết được tạo thành ở vùng liên kết có thể là liên kết hóa học (như được mô tả ở trên), hoặc liên kết cơ học (ví dụ: sử dụng móc cài, v.v.).

“Nhóm tert-butyloxycarbonyl” (Boc) dùng để chỉ nhóm . “Nhóm butyloxycarbonyloxy” dùng để chỉ nhóm -OCO₂tBu.

Trong bản mô tả này, “carboxycyl” có nghĩa là vòng hoặc hệ vòng tuần hoàn không thơm chỉ chứa nguyên tử carbon trong xương sống của hệ vòng. Khi carboxycyl là hệ vòng, hai hoặc nhiều vòng có thể được kết hợp với nhau theo kiểu hợp nhất, cầu nối hoặc kết nối hình xoắn ốc. Carboxycyl có thể có mức độ bão hòa bất kỳ, với điều kiện là ít nhất một vòng trong hệ vòng không thơm. Do đó, carboxycyl bao gồm các xycloalkyl, xycloalkenyl và xycloalkynyl. Nhóm carboxycyl có thể có 3 đến 20 nguyên tử carbon. Ví dụ về vòng carboxycyl bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, 2,3-dihydro-inden, bixyclo[2.2.2]octanyl, adamantyl và spiro[4.4]nonanyl.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “axit carboxylic” hoặc “carboxyl” dùng để chỉ -COOH.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “xycloalkylen” nghĩa là vòng carboxycyl no hoàn toàn hoặc hệ vòng được gắn vào phần còn lại của phân tử thông qua hai điểm gắn.

Trong bản mô tả này, “xycloalkenyl” hoặc “xycloalken” có nghĩa là vòng hoặc hệ vòng carbocycyl có ít nhất một liên kết đôi, trong đó không có vòng nào trong hệ vòng là vòng thơm. Ví dụ bao gồm xyclohexenyl hoặc xyclohexen và norbornenyl hoặc norbornen. Cũng như được sử dụng trong bản mô tả này, “heteroxycloalkenyl” hoặc “heteroxycloalken” nghĩa là vòng carboxycyl hoặc hệ vòng có ít nhất một dị nguyên tử trong mạch chính của vòng, có ít nhất một liên kết đôi, trong đó không có vòng nào trong hệ vòng này là vòng thơm.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hydroxy” hoặc “hydroxyl” chỉ nhóm -OH.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, “mồi” được định nghĩa là một trình tự axit nucleic sợi đơn (ví dụ như ADN sợi đơn hoặc ARN sợi đơn) đóng vai trò là điểm khởi đầu để tổng hợp ADN hoặc ARN. Đầu tận 5' của mồi có thể được cải biến để cho phép phản ứng ghép cặp với lớp polyme được tạo chức. Chiều dài mồi có thể dài bằng bất kỳ số lượng base nào và có thể bao gồm hàng loạt nucleotit không tự nhiên. Trong một ví dụ, đoạn mồi là một sợi ngắn, dao động từ 20 đến 40 base.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “được tùy chọn thay thế” có thể được dùng thay cho “không được thay thế hoặc được thay thế”. Thuật ngữ “được thay thế” đề cập đến sự thay thế một hoặc nhiều nguyên tử hydro trong một nhóm xác định bằng gốc đã xác định. Ví dụ, alkyl, aryl, xycloalkyl, heteroxycyl được thay thế, v.v. đề cập đến alkyl, aryl, xycloalkyl hoặc heteroxycyl, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử H trong mỗi đơn phân được thay thế bằng halogen, haloalkyl, alkyl, axyl, alkoxyalkyl, hydroxyloweralkyl, carbonyl, phenyl, heteroaryl, benzensulfonyl, hydroxy, loweralkoxy, haloalkoxy, oxaalkyl, carboxy, alkoxy carbonyl [-C(=O)O-alkyl], alkoxy carbonylamino [HNC(=O)O-alkyl], carboxamido [-C(=O)NH₂], alkylaminocarbonyl [-C(=O)NH-alkyl], xyano, axetoxy, nitro, amino, alkylamino, dialkylamino, (alkyl)(aryl)aminoalkyl, alkylaminoalkyl (bao gồm xycloalkylaminoalkyl), dialkylaminoalkyl, dialkylaminoalkoxy, heteroxycylalkoxy, mercapto, alkylthio, sulfoxit, sulfon,

sulfonylamino, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, alkylsulfonylamino, arylsulfonyl, arylsulfonylamino, axylaminoalkyl, axylaminoalkoxy, axylamino, amidino, aryl, benzyl, heterocyclyl, heterocyclalkyl, phenoxy, benzyloxy, heteroaryloxy, hydroxyimino, alkoxyimino, oxaalkyl, aminosulfonyl, trityl, amidino, guanidino, ureido, benzyloxyphenyl và benzyloxy. “Oxo” cũng có trong số các nhóm thế được đề cập đến trong “được thay thế tùy ý”; những người có kỹ năng trong ngành sẽ đánh giá cao rằng, vì oxo là gốc hóa trị hai nên có những trường hợp mà oxo sẽ không thích hợp làm chất thế (ví dụ như trên phenyl). Theo một ví dụ, 1, 2 hoặc 3 nguyên tử hydro có thể được thay bằng gốc đã xác định. Trong trường hợp của alkyl và xycloalkyl, hơn ba nguyên tử hydro có thể được thay thế bằng flo; thực vậy, tất cả nguyên tử hydro có sẵn đều có thể được thay thế bằng flo. Các hợp chất này (ví dụ: perfluoroalkyl) thuộc nhóm “fluorohydrocarbon”. Nói rõ hơn, thuật ngữ chung có thể bao gồm nhiều hơn một nhóm thế, nghĩa là, ví dụ như “haloalkyl” hoặc “halophenyl” đề cập đến alkyl hoặc phenyl mà trong đó ít nhất một, nhưng có lẽ nhiều hơn một, hydro được thay bằng halogen. Theo một số ví dụ, các nhóm thế là halogen, haloalkyl, alkyl, axyl, hydroxyalkyl, hydroxy, alkoxy, haloalkoxy, oxaalkyl, carboxy, xyano, axetoxy, nitro, amino, alkylamino, dialkylamino, alkylthio, alkylsulfinyl, alkylsulfonyl, alkylsulfonylamino arylsulfonyl, arylsulfonylamino và benzyloxy.

Khi mô tả hợp chất trong tài liệu này, thuật ngữ “được thay thế bằng ít nhất một nhóm thế oxy hóa” được sử dụng. Nhóm thế được oxy hóa là nhóm thế có chứa oxy ngoài carbon và hydro; nhóm thế được oxy hóa cũng có thể bao gồm thêm các dị nguyên tử, chẳng hạn như nitơ (ví dụ: carboxamit hoặc metanesulfonyl). Ví dụ điển hình về nhóm thế được oxy hóa bao gồm alkoxy, hydroxy, fluoroalkoxy, formyl, axetyl và các chuỗi C₁ đến C₆ acyl khác.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Những ví dụ sau được dùng để minh họa các phương án cụ thể của sáng chế, nhưng không có nghĩa là giới hạn phạm vi của sáng chế trong những ví dụ đó.

HÌNH 1 minh họa một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn về hạt nano như được đề xuất trong bản mô tả này. Theo ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn này, một vị trí polynucleotit mẫu được minh họa dưới dạng phần có hình nêm của phần khung của hạt

nano như được đề xuất. Polynucleotit mẫu đơn lẻ được minh họa là được liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ. Cũng theo ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn này, nhiều thành phần phụ được minh họa kéo dài từ các vị trí phụ của khung. Trong phần minh họa chính, các thành phần phụ được minh họa là polyme. Trong panen bên trái, một số bản sao của polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu và các bản sao của polynucleotit mẫu được minh họa, trong đó các bản sao này được gắn vào và kéo dài từ khung. Theo ví dụ này, chúng kéo dài từ các polyme, mà lần lượt kéo dài từ khung.

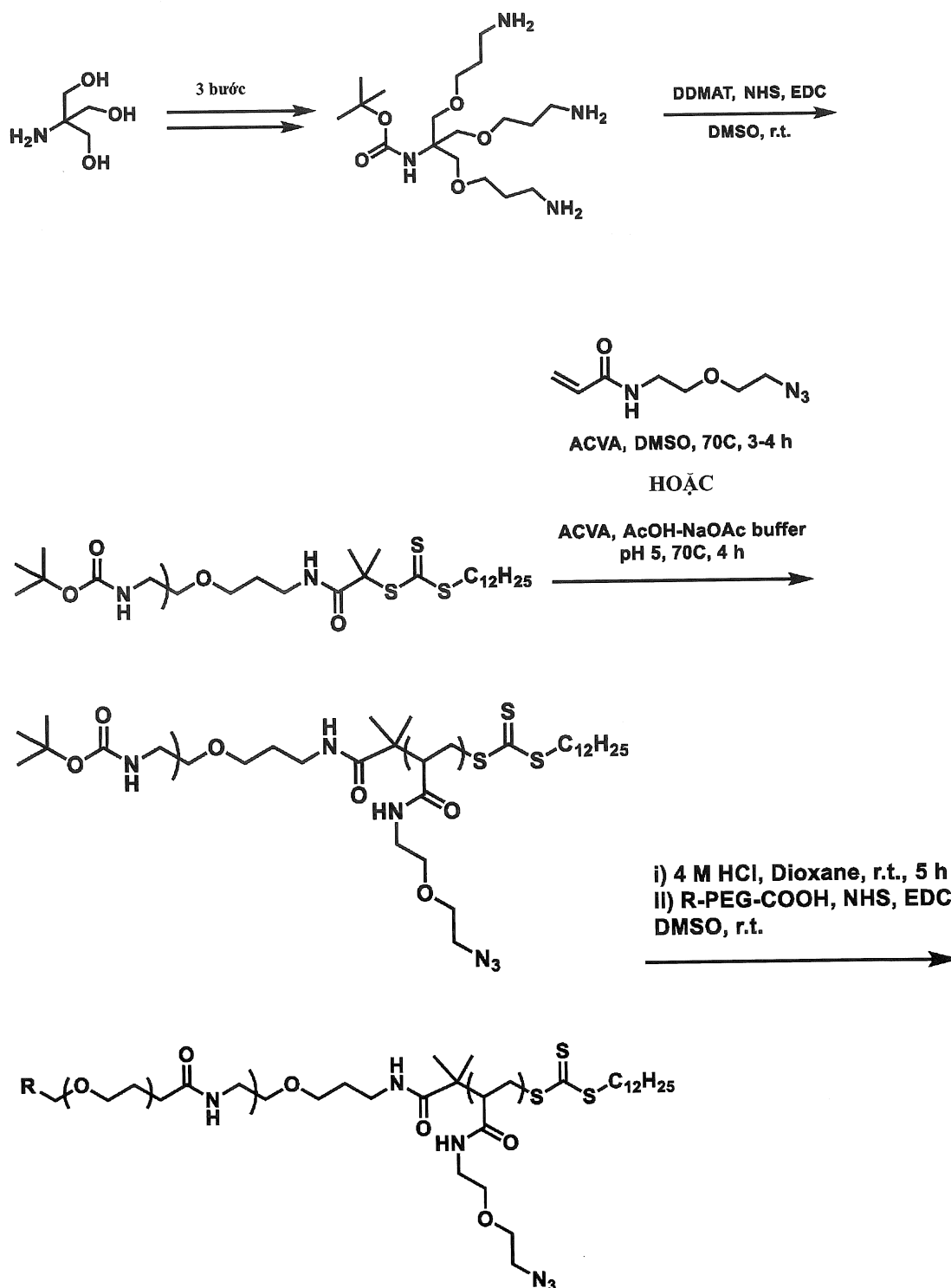
Trong panen bên phải, hạt nano với polynucleotit mẫu liên kết với nó ở vị trí mẫu đơn lẻ được minh họa trong một giếng của lớp nền. Nhiều oligonucleotit phụ được minh họa kéo dài từ khung. Mặc dù không được minh họa trong panen bên tay phải, theo ví dụ này, các oligonucleotit phụ kéo dài từ các polyme đã được gắn vào khung. Trình tự nucleotit của các oligonucleotit phụ là hỗ trợ cho đoạn môi đã được gắn vào bề mặt của giếng. Các oligonucleotit phụ nhờ đó lai với đoạn môi gắn vào giếng và gắn vào bề mặt của giếng. Ở đây, chỉ một hạt nano có thể có mặt trong giếng cùng lúc do kích cỡ của hạt nano so với kích cỡ của giếng. Do đó, quy trình tạo cụm bắt đầu từ một mẫu

HÌNH 2 là hình vẽ minh họa một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn về khung hạt nano theo sáng chế. Ở bên trái, khung được chỉ ra là khung bất đối, mang ba đuôi polyme và polynucleotit mẫu đơn lẻ được gắn vào khung. Ở bên phải, một ví dụ về cấu trúc phân tử của hạt nano được minh họa (bao gồm lõi chất RAFT 3 nhánh), với một điểm gắn mẫu được minh họa và các polyme kéo dài từ lõi của khung. Cũng được minh họa là một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn về monome acrylamit mà có thể tạo ra một phần của khung, bao gồm các vị trí phụ, được minh họa theo ví dụ này là nhóm azit (ví dụ: monome cơ chất và mỗi điểm gắn).

HÌNH 3 minh họa một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn khác về khung polyme như được đề xuất trong bản mô tả này. Ở bên phải, lõi khung với ba nhánh polyme kéo dài từ đó được minh họa, và một vị trí gắn polynucleotit mẫu. Ở bên trái, cấu trúc hóa học của lõi và một trong các nhánh polyme được minh họa (các nhánh polyme còn lại được lược bỏ nhằm mục đích minh họa cho rõ ràng nhưng vẫn được bao gồm trong khung). Nhóm dibenzoxycycloocten được minh họa là một vị trí gắn polynucleotit mẫu, các vị trí liên kết phụ được thể hiện trên nhánh polyme đã minh họa.

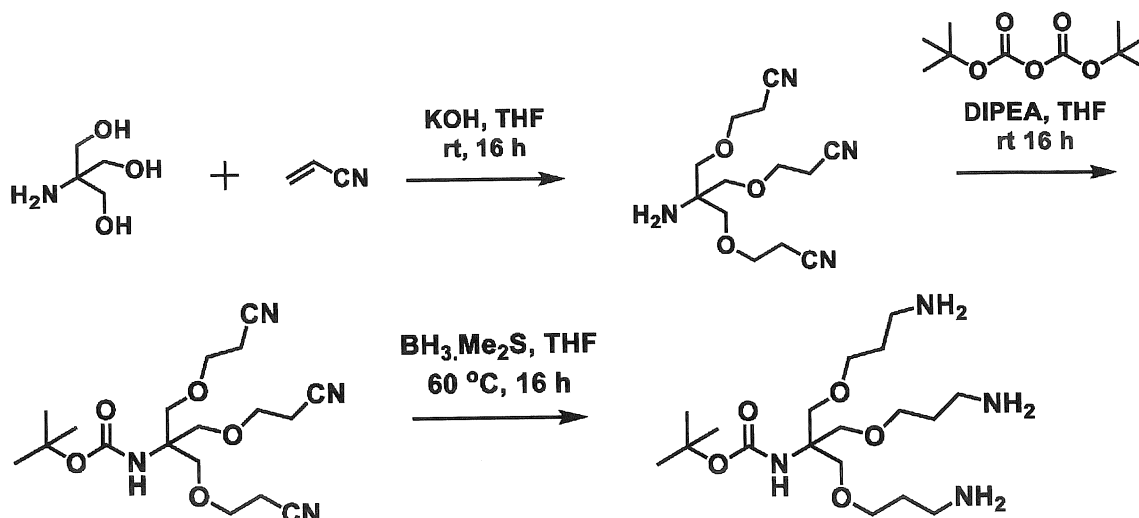
HÌNH 4 minh họa một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn khác về sơ đồ tổng hợp cho một ví dụ về khung theo các khía cạnh của sáng chế. Theo ví dụ này, đầu tận cùng amin của phân tử tris được phong bế (t-butyl dicarbonat, hoặc Boc₂O, DIPEA, hoặc N,N-diisopropyletylamin, và THF, hoặc Tetrahydrofuran), và nhóm axit 2-(dodexylthiocarbonothioylthio)-2-metylpropionic (DDMAT) được thêm vào các đầu hydroxyl của lõi tris. Hai lựa chọn để polyme hóa sau đó được minh họa. Trong lộ trình 1, quy trình polyme hóa RAFT chứa nước tiêu chuẩn được thực hiện để thêm monome vào chuỗi, sau đó khử bảo vệ nhóm amin và gắn nhóm dibenzoxycloocten (DBCO) vào đó. Trong lộ trình thay thế 2, thể phong bế của nhóm amin được loại bỏ đầu tiên bằng axit triflouoroaxetic (TFA), và nhóm dibenzoxycloocten được gắn (DBCO-PEG1-NHS este) đầu tiên trước khi bước polyme hóa RAFT được thực hiện để thêm nhóm monome vào.

Sơ đồ thay thế để tổng hợp khung theo sáng chế là như sau.

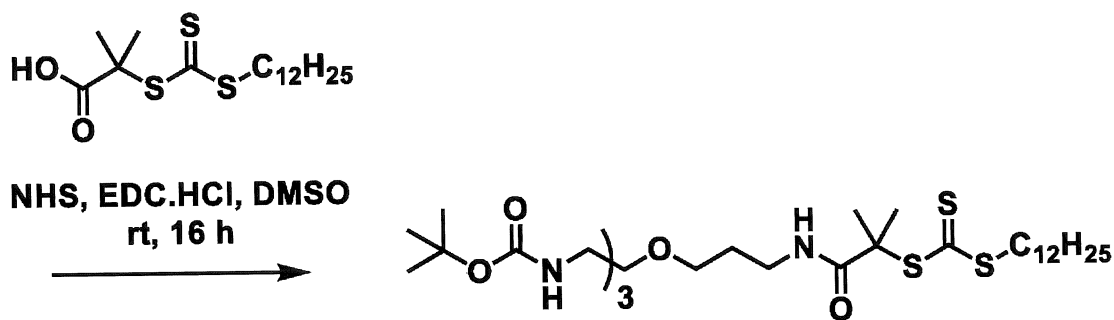


(Theo ví dụ này, để đơn giản hóa việc minh họa, chỉ một trong các nhánh polyme được chỉ ra sau khi bổ sung DDMAT, dù tất cả ba nhánh có cùng cấu trúc). Trong ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn này, tác nhân liên kết PEG đã được thêm vào giữa vị trí polynucleotit mẫu (R) và các nhánh polyme, mà bao gồm các vị trí phụ, nhóm azit theo ví dụ này.

Một sơ đồ khác để tổng hợp khung được thực hiện theo các khía cạnh của sáng chế là tuân theo ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn sau:



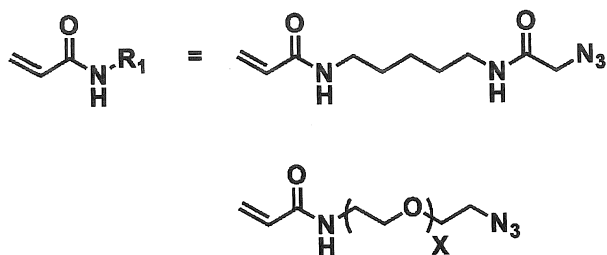
Từ đó, ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn sau về sơ đồ tổng hợp có thể được thực hiện (lại minh họa chỉ một trong ba nhánh polyme nhằm mục đích minh họa cho rõ dù tất cả ba nhánh polyme đều được tổng hợp theo cùng một sơ đồ):



Chất RAFT lõi Tris

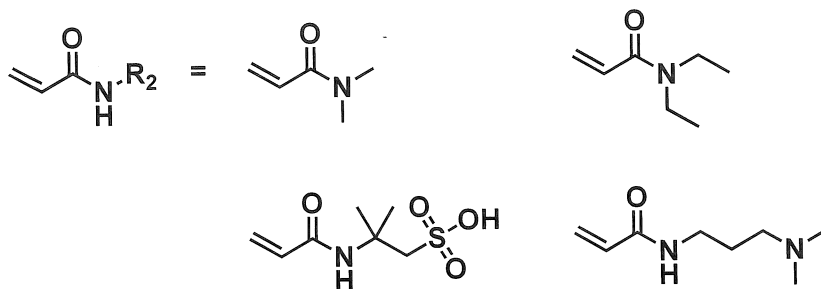


74

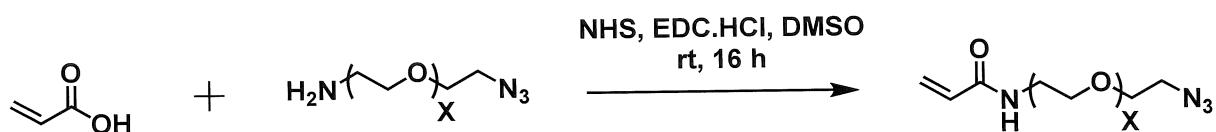


trong đó $X = 1 - 11$

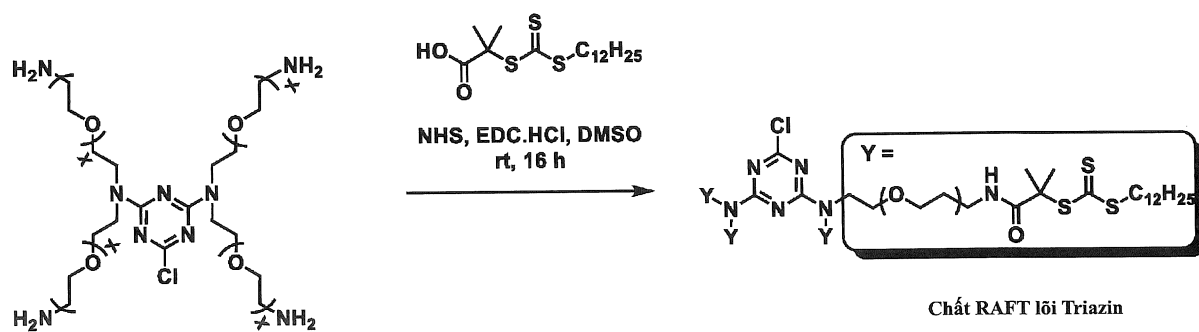
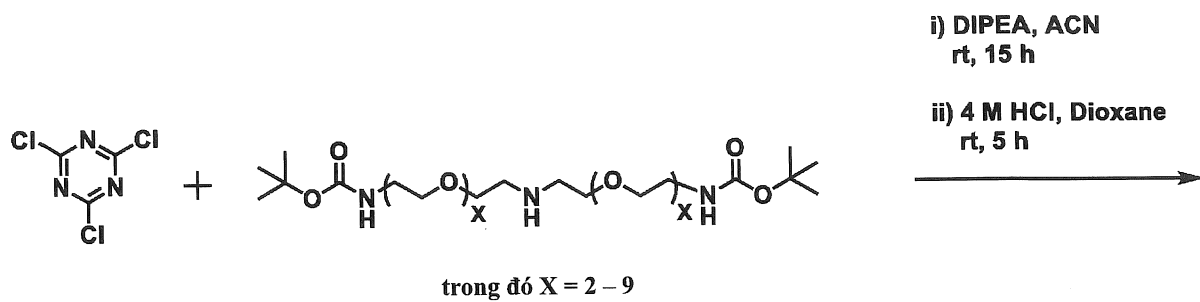
Monome mang R_2 sau có thể được thêm vào một cách tùy chọn trong quá trình polyme hóa để tổng hợp các loại khung khác nhau như được đề xuất trong bản mô tả này:

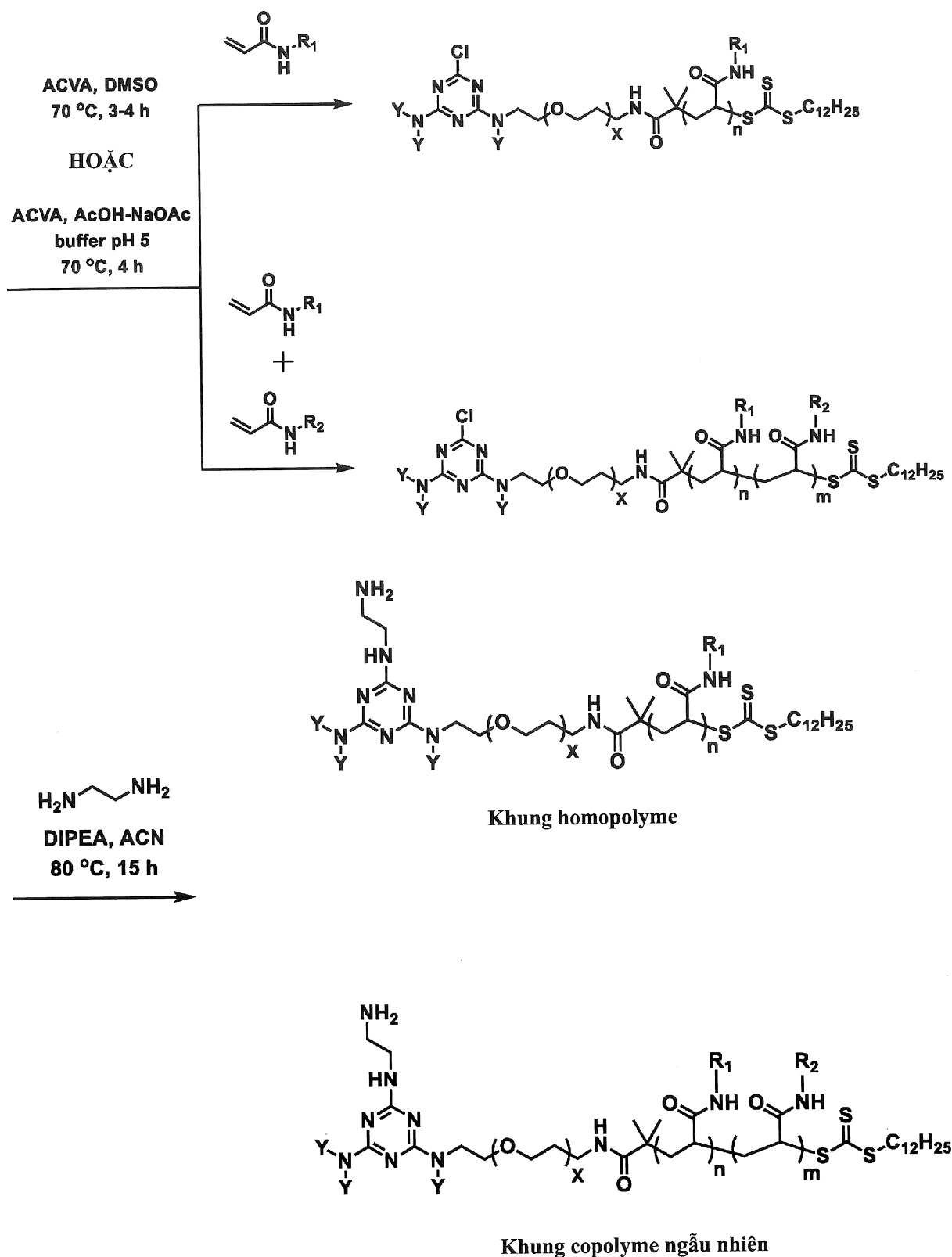


Các monome acrylamit có thể được PEG hóa một cách tùy chọn theo sơ đồ sau:



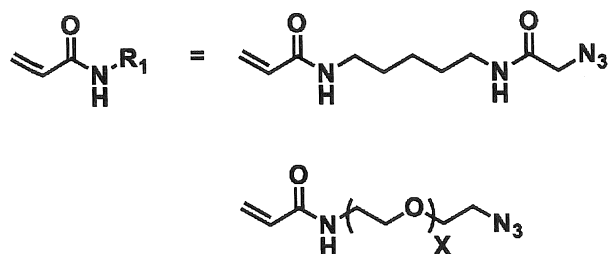
Một sơ đồ thay thế để tổng hợp khung, từ lõi triazin, theo sáng chế là theo ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn sau:





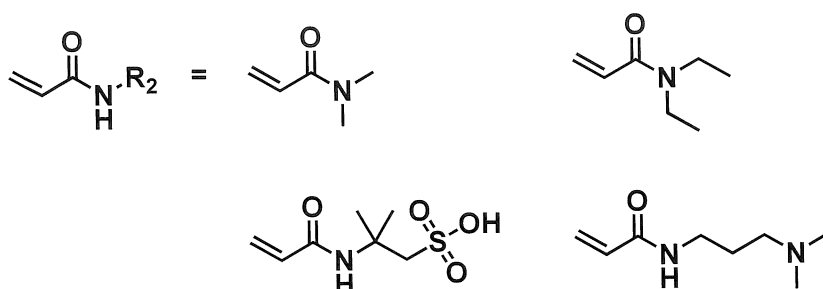
Theo ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn này, một vị trí polynucleotit mẫu là amin, kéo dài từ đỉnh của lõi tetrazin như được minh họa ở trên. Monome mang R_1 sau có thể được thêm vào trong quá trình polyme hóa để tổng hợp các loại khung khác

nhau như được đề xuất trong bản mô tả này (để thêm nhóm azit cho các vị trí liên kết phụ, một ví dụ thực hiện sáng chế không giới hạn là):

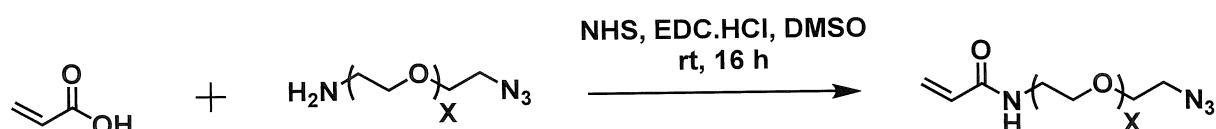


trong đó $X = 1 - 11$

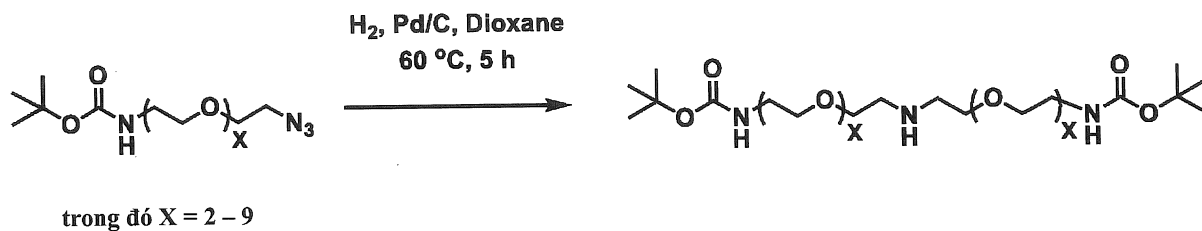
Monome mang R_2 sau có thể được thêm vào một cách tùy chọn trong quá trình polyme hóa để tổng hợp các loại khung khác nhau như được đề xuất trong bản mô tả này:



Các monome acrylamit có thể được PEG hóa một cách tùy chọn theo sơ đồ sau:



Amin bậc hai đã PEG hóa hai chức để thêm vào lõi khung triazin có thể được tổng hợp theo sơ đồ sau:



Kiểm soát hóa học lượng pháp các thành phần đã được thêm vào trong quá trình bổ sung ban đầu của amin bậc hai đã PEG hóa hai chức vào lõi khung triazin và phương pháp tinh chế (ví dụ như dựa trên độ chênh lệch phân cực) có thể được sử dụng để ưu tiên tạo ra và phân lập triazin được thay thế hai lần (với hai amin bậc hai hai chức được thêm vào) như trái ngược với sản phẩm được thay thế một lần và ba lần.

HÌNH 5 minh họa một ví dụ về khung dendrime theo các khía cạnh của sáng chế. Theo ví dụ này, polypeptit bao gồm bốn lysin và kết thúc bằng xystein đầu tận cùng C được minh họa. Lysin thứ hai, thứ ba, và thứ tư bao gồm các chạc bao gồm liên kết isopeptit thông qua nhóm epsilon amino của chúng với một nhóm lysin khác. Lysin thứ hai có lysin đơn lẻ đã được gắn bằng liên kết isopeptit. Lysin được gắn vào dilysin, có một lysin khác được liên kết với nó bằng liên kết isopeptit với nhóm epsilon amino của lysin đầu tận cùng C của nó. Lysin thứ tư được gắn vào gốc trilysin, mà một lysin được gắn vào lysin thứ hai của nó bằng liên kết isopeptit, và gốc dilysin với một lysin khác được gắn vào đó bằng liên kết isopeptit được gắn vào lysin đầu tận cùng C của nó.

Do đó, theo ví dụ này về khung sợi nhánh, một số lượng nhánh khác bắt nguồn từ các phân nhánh kéo dài từ lõi xystein. Theo một ví dụ khác, nhiều nhánh hoặc ít nhánh hơn có thể được bao gồm, và các phân nhánh khác nhau có thể có cùng số nhánh như nhau hoặc số lượng nhánh khác với nhau. Theo các ví dụ khác, các loại axit amin bổ sung có thể được bao gồm, như thông qua liên kết peptit vào gốc lysin, giữa đầu chạc lysyl hoặc ở đầu mang một vị trí polynucleotit mẫu.

HÌNH 6 minh họa sơ đồ tổng hợp cho hạt nano có các nhóm thế lysin phân nhánh với liên kết peptit alpha amino và liên kết isopeptit epsilon-amino, như trong khung có cấu trúc dendrime lysyl hoặc khung có polypeptit chứa lysin được liên kết với nhau bằng liên kết isopeptit ở nhóm epsilon-amino của nhóm thế lysin để tạo ra khung

polypeptit phân nhánh. Tổng hợp peptit pha rắn có thể được sử dụng để tổng hợp trình tự axit amin cùng với nhau, ví dụ như trong chuỗi polypeptit thẳng theo panen trên theo HÌNH 6 (chiến lược tổng hợp theo trình tự bằng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn (SPSS)). Nhóm amin được phong bế bằng fluorenylmetyloxycarbonyl (Fmoc) hoặc tert-butyloxycarbonyl (Boc). Nhóm bảo vệ được loại bỏ một cách có chọn lọc trong sự có mặt của chế phẩm/thuốc thử ghép cặp thêm vào. Bằng cách bảo vệ lặp lại các nhóm amino tự do (thêm số lượng n monome trong đó n = số lượng chu kỳ), sau đó loại bỏ nó và bổ sung axit amin hoạt hóa, polypeptit mạch thẳng có thể được tổng hợp (thêm số n monome trong đó n = số lượng chu kỳ). Sợi thẳng của các axit amin tích điện bao gồm một hoặc nhiều gốc lysin nhờ đó có thể được tạo ra dưới dạng các thành phần của khung. Sau đó, chế phẩm có thể được phân tách khỏi nhựa nền và được cải biến thêm như có thể được mong đợi.

Như được mô tả thêm ở panel dưới của HÌNH 6, phương pháp tổng hợp protein pha rắn hội tụ có thể được sử dụng trong đó độ dài của các chuỗi polypeptit tạo ra riêng rẽ bao gồm một hoặc nhiều gốc lysin có thể được thêm vào dưới dạng tập hợp polyme trong bước tổng hợp (panen bên dưới, chiến lược tổng hợp hội tụ bằng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn (SPPS)). Theo một số ví dụ không được mô tả ở HÌNH 6, các axit amin hoặc polypeptit có thể được thêm một cách độc lập dưới dạng các phân nhánh vào chạc trong đó chạc này là cấu trúc chứa hai nhóm amino (tức là đầu tận cùng N, như nhóm alpha-amino của lysin, hoặc của một axit amin khác) và axit amin epsilon của lysin), thay vì nối thẳng chuỗi từ một nhóm amino đơn lẻ như được minh họa trên HÌNH. 22. Ví dụ, axit amin lysin, có hai nhóm amino có thể nhằm làm điểm gắn phân chạc mà hai phân nhánh của polypeptit mạch thẳng, hoặc hai gốc lysin riêng rẽ, có thể được gắn vào, từng nhóm amino một theo sơ đồ tổng hợp protein pha rắn được minh họa trên HÌNH. 6.

HÌNH 7 là hình minh họa các phương pháp khác nhau để liên kết polynucleotit mẫu với khung. Ở bên trên, khung được minh họa với một vị trí polynucleotit mẫu. Sang bên trái, đoạn mỗi vị trí mẫu được bao gồm trong một vị trí polynucleotit mẫu, và đầu của nó hỗ trợ cho một đầu của polynucleotit mẫu, để cho phép sự liên kết không cộng hóa trị của polynucleotit mẫu với khung bằng phương pháp lai cặp base Watson-Crick. Ở giữa, polynucleotit mẫu và một vị trí polynucleotit mẫu lần lượt có gốc hoặc

cấu trúc hỗ trợ dẫn đến việc tạo ra liên kết cộng hóa trị hình thành giữa polynucleotit mẫu và khung. Ở bên phải, polypeptit được bao gồm trong vị trí mẫu đơn lẻ, và polypeptit hỗ trợ cho nó được gắn vào một đầu của polynucleotit mẫu. Liên kết không cộng hóa trị giữa polypeptit của vị trí mẫu đơn lẻ và polynucleotit mẫu liên kết polynucleotit mẫu này với khung.

HÌNH 8 minh họa các ví dụ về polynucleotit mẫu liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ của protein khung bằng phương pháp lai với đoạn mỗi vị trí mẫu được tượng trưng bởi PX (thể liên hợp GFP-oligo). Hai ví dụ về polynucleotit mẫu của thư viện được minh họa, một phân tử thư viện tiêu chuẩn có các trình tự P5 và P7, với vùng hỗ trợ cho đoạn mỗi vị trí mẫu PX (đặt tên là PX') ở đầu mỗi 3, hoặc phiên bản cải biến trong đó trình tự PX' được tách ra khỏi trình tự P5 bởi tác nhân liên kết PEG. Sợi ete liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ của khung. Trình tự thư viện tiêu chuẩn có thể được sử dụng trong phản ứng polyme hóa kéo dài sợi thứ nhất, với đoạn mỗi PX nhằm làm mỗi khởi đầu để polyme hóa sợi mới hình thành hỗ trợ cho polynucleotit mẫu.

HÌNH 9 minh họa một ví dụ về liên kết không cộng hóa trị, cụ thể là liên kết không cộng hóa trị peptit cuộn xoắn đôi (theo một ví dụ, với K_D trong khoảng picomol $< 1 \times 10^{-10}$ M). Hai trình tự axit amin cho cấu trúc polypeptit xoắn alpha được minh họa rằng tạo ra hai thành phần liên kết đi đôi hỗ trợ của điểm gắn cuộn xoắn đôi. Bằng cách gắn một trình tự như vậy vào khung hoặc vào thư viện polynucleotit mẫu, polynucleotit mẫu có thể được liên kết với khung thông qua liên kết không cộng hóa trị giữa các xoắn alpha. Theo một ví dụ khác, một trong hai trình tự xoắn alpha hỗ trợ cho trình tự được gắn vào khung có thể được gắn vào thành phần phụ như oligonucleotit phụ để gắn oligonucleotit phụ và vị trí phụ.

HÌNH 10 minh họa biểu đồ (sự kiện gieo mầm so với diện tích bề mặt giếng kích thước nano) của một ví dụ về các thử nghiệm số lượng khung có kích cỡ cho trước mà có thể có mặt trong giếng kích thước nano (dendrime/giếng kích thước nano) có diện tích bề mặt giếng kích thước nano (SA) hoặc đường kính (D) cho trước. Hạt nano (có cấu trúc khác với cấu trúc của các hạt nano như được đề xuất trong bản mô tả này) có đường kính khoảng 100 nm được gieo mầm vào các giếng kích thước nano có đường kính 185, 285, hoặc 375 nm và số lượng dendrime trong mỗi giếng kích thước nano được đo. Ngoại suy từ đường cong khớp tốt nhất của các kết quả ($y = 3E-0,5x - 3,4874$, $R^2 = 0,9991$) chỉ ra rằng

việc gieo mầm một hạt nano trong giếng kích thước nano sẽ dẫn đến, trong các ví dụ này, việc sử dụng hạt nano có đường kính bằng khoảng 100 nm và giếng kích thước nano có đường kính bằng khoảng 100 nm.

Các HÌNH 11A-11C minh họa một ví dụ về việc gieo mầm các polynucleotit mẫu vào lớp nền bằng cách sử dụng khung theo các khía cạnh của sáng chế. Khung, được cấu tạo như khung dendrime ADN theo Đơn yêu cầu cấp sáng chế Hoa Kỳ số 62/952,799, có đường kính từ 50 nm đến 150 nm. Khung bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ (Pa) để liên kết polynucleotit mẫu và nhiều vị trí phụ (cPX). HÌNH 11A minh họa polynucleotit mẫu và bộ thể của nó, có trình tự đoạn mỗi được thêm vào mỗi đầu (P5/cP5 và P7/cP7). Đầu đoạn mỗi P5 của polynucleotit mẫu được nối với đoạn mỗi (cPa) bởi tác nhân liên kết PEG. Mỗi cPa hỗ trợ cho vị trí mẫu đơn lẻ (Pa) của khung. HÌNH 11B là hình minh họa phân tử của khung được lai, thông qua vị trí mẫu đơn lẻ (Pa) của nó, với polynucleotit mẫu và bộ thể của nó được minh họa trên HÌNH. 11A, thông qua mỗi cPa. Khung được gắn vào lớp nền. Lớp nền được gắn vào mỗi (PX) mà hỗ trợ cho các vị trí phụ (cPX) của khung. Lớp nền cũng được gắn vào mỗi để cho phép lai các đầu mẫu với nó để cho phép tạo cụm trên nền

HÌNH 11C minh họa một ví dụ theo quy trình gieo mầm nêu trên cho lớp nền với polynucleotit mẫu sử dụng khung có vị trí mẫu đơn lẻ sau đó tạo cụm. Khung được gắn vào polynucleotit mẫu theo các khía cạnh của sáng chế và các HÌNH. 11A và 11B. Các khung được kết hợp với polynucleotit mẫu (thư viện) ở tỷ lệ mol được minh họa, nền (tiêu bản dạng dòng chảy tế bào có các giếng kích thước nano dùng để gieo mầm) được gieo mầm với nó, sau đó việc tạo cụm được thực hiện theo quy trình khuếch đại cụm điều khiển bởi recombinaza (khuếch đại cụm ExAmp). Đối chứng âm bao gồm khung không có mẫu và mẫu không có khung. Dưới dạng đối chứng dương (đối chứng +), việc tạo cụm trên nền được thực hiện mà không có khung, sử dụng kỹ thuật tạo cụm trên nền sau đó lai các phân tử mẫu với đoạn mỗi đã được gắn vào lớp nền không thông qua khung.

Panên bên trái là hình ảnh của tiêu bản dạng dòng chảy tế bào sau quy trình tạo cụm theo các điều kiện ở trên (2 đối chứng âm, 5 điều kiện có tỷ lệ mol khung:mẫu khác nhau, và 1 đối chứng dương). Huỳnh quang trong tất cả các điều kiện trừ đối chứng âm chỉ ra rằng khung có một vị trí liên kết mẫu có thể gieo mầm nền với polynucleotit mẫu và hỗ

trợ cho quy trình tạo cụm. Biểu đồ cột là các đại lượng đo về kết quả tạo cụm của 8 điều kiện. Biểu đồ trên, cường độ C1 là cường độ chu kỳ 1 dưới dạng số đo gián tiếp của kích cỡ cụm hoặc hiệu suất (với cường độ tỷ lệ trực tiếp với kích cỡ hoặc hiệu suất cụm). Biểu đồ dưới, %PF là bộ lọc qua tính theo %, là phần trăm giống kích thước nano đi qua bộ lọc ngưỡng chỉ độ tinh khiết của cụm tạo ra trong đó, tức là tỷ lệ trực tiếp với số lượng giống kích thước nano có các cụm đơn dòng.

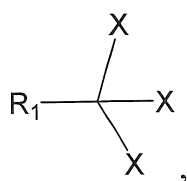
Cần đánh giá cao rằng tất cả sự kết hợp của các khái niệm ở trên và các khái niệm bổ sung được trình bày chi tiết hơn ở đây (miễn là các khái niệm đó không mâu thuẫn lẫn nhau) đều được xem là một phần của chủ đề sáng chế được trình bày trong tài liệu này. Cụ thể, tất cả các tổ hợp của chủ đề được yêu cầu bảo hộ xuất hiện ở cuối sáng chế này được xem là một phần của đối tượng sáng chế được đề xuất trong tài liệu này và có thể được sử dụng để đạt được các lợi ích và ưu điểm được mô tả trong bản mô tả này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

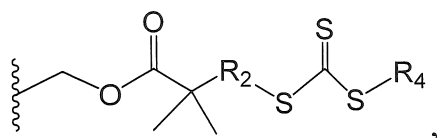
1. Hạt nano, bao gồm:

khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung được chọn từ vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị và vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị, và nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung được chọn từ vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị và vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị, trong đó:

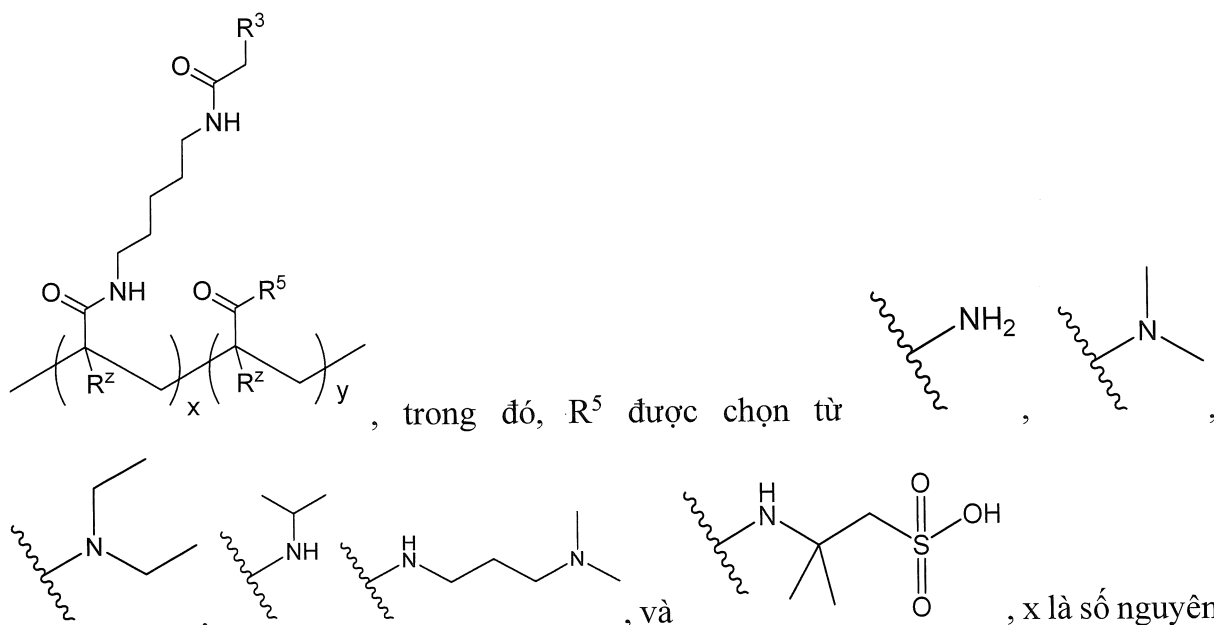
khung là hợp chất có công thức I:



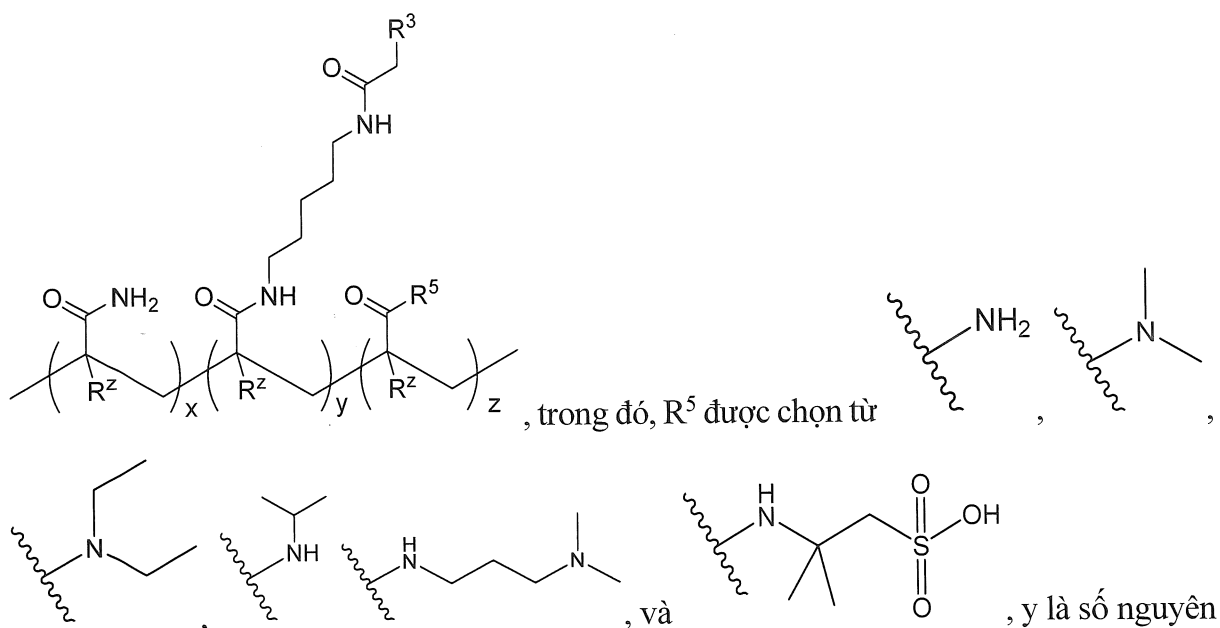
mỗi X là hợp chất có công thức II:



trong đó, R₂ được chọn từ Công thức IIIa:



nằm trong khoảng từ 1 đến 20.000 còn y là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 100.000 và tỷ lệ của x:y có thể nằm trong khoảng từ 10:90 đến khoảng 1:99, và trong đó, mỗi R^z độc lập là H hoặc C₁₋₄ alkyl, và Công thức IIIb:



nằm trong khoảng từ 1 đến 2000 còn x và z là các số nguyên có tổng nằm trong khoảng từ 1 đến 10.000 và tỷ lệ của (x:y):z có thể nằm trong khoảng từ (85):15 đến khoảng (95):5, và trong đó, mỗi R^z độc lập là H hoặc C_{1-4} alkyl,

R_1 bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, R^4 được chọn từ C_1 - C_{20} alkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkenyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkynyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} oxaalkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C_1 - C_{20} azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C_1 - C_{20} alkyl, oxy liên kết đôi, và nhóm hydroxyl, và R^3 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ.

2. Hạt nano theo điểm 1, trong đó vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị.

3. Hạt nano theo điểm 2, trong đó vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết aldehyt-NHS este, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí

liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, và vị trí liên kết ghép cặp sortaza.

4. Hạt nano theo điểm 1, trong đó vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị.

5. Hạt nano theo điểm 4, trong đó vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm vị trí lai hóa polynucleotit.

6. Hạt nano theo điểm 4, trong đó vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

7. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị.

8. Hạt nano theo điểm 7, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimide, vị trí liên kết thiol-maleimide, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transcycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-cyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, vị trí liên kết ghép cặp sortaza, và tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn hai vị trí nêu trên.

9. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị.

10. Hạt nano theo điểm 9, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm các vị trí lai hóa polynucleotit.

11. Hạt nano theo điểm 9, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm các vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị và các vị trí liên kết peptit

không cộng hóa trị được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

12. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, còn bao gồm polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ.

13. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12, còn bao gồm nhiều oligonucleotit phụ liên kết với nhiều vị trí phụ.

14. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 13, trong đó hạt nano này có đường kính ít nhất khoảng 10 nm.

15. Phương pháp giải trình tự, phương pháp này bao gồm bước liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với vị trí mẫu đơn lẻ của hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

16. Phương pháp giải trình tự, phương pháp này bao gồm bước liên kết nhiều oligonucleotit phụ với nhiều vị trí phụ của hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14.

17. Phương pháp theo điểm 15 hoặc 16, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào khung được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào khung kéo dài từ các oligonucleotit phụ.

18. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 17, phương pháp này còn bao gồm bước gắn khung vào lớp nền, trong đó bước gắn này bao gồm công đoạn lai các oligonucleotit phụ với các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

19. Phương pháp theo điểm 18, trong đó nền bao gồm nhiều giếng kích thước nano và các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền được gắn bên trong nhiều giếng kích thước nano.

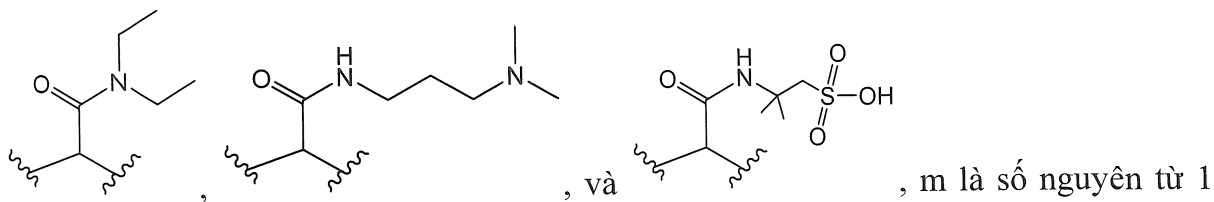
20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó chỉ có tối đa một khung liên kết bên trong giếng bất kỳ trong số các giếng kích thước nano.

21. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 18 đến 20, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào lớp nền được chọn

$$\begin{array}{c} \text{X} \\ | \\ \text{R}_1 - \text{C} - \text{X} \\ | \\ \text{X} \end{array}$$
$$\text{---} \text{O} \text{---} \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{NH} \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}(\text{CH}_3)_2 \text{---} (\text{CH}_2)_m \text{---} \text{C}(\text{NH} \text{R}_2) \text{---} (\text{CH}_2)_n \text{---} \text{S} \text{---} \text{C}(=\text{S}) \text{---} \text{S} \text{---} \text{R}_4$$


 và Công thức VIb:
 
 trong đó, p là

phụ, R₃ được chọn từ liên kết trực tiếp,



đến 20.000 và n là số nguyên từ 1 đến 100.000,

R^1 bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, R^4 được chọn từ C_1 - C_{20} alkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkenyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} alkynyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} oxaalkyl được thay thế tùy ý, C_1 - C_{20} thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C_1 - C_{20} azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C_1 - C_{20} alkyl, oxy liên kết đôi, và nhóm hydroxyl, và R^3 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ.

24. Hạt nano theo điểm 23, trong đó vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị.

25. Hạt nano theo điểm 24, trong đó vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymetyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag- O^6 -Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag- O^2 -benzylxytosin, và vị trí liên kết ghép cặp sortaza.

26. Hạt nano theo điểm 23, trong đó vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị.

27. Hạt nano theo điểm 26, trong đó vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm vị trí lai hóa polynucleotit.

28. Hạt nano theo điểm 26, trong đó vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

29. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 28, trong đó nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị.

30. Hạt nano theo điểm 29, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, vị trí liên kết ghép cặp sortaza, và tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn hai vị trí nêu trên.

31. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 28, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị.

32. Hạt nano theo điểm 31, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm các vị trí lai hóa polynucleotit.

33. Hạt nano theo điểm 31, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm các vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị và các vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

34. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 33, còn bao gồm polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ.

35. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 34, còn bao gồm nhiều oligonucleotit phụ liên kết với nhiều vị trí phụ.

36. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 35, trong đó hạt nano này có đường kính ít nhất khoảng 10 nm.

37. Phương pháp giải trình tự, phương pháp này bao gồm bước liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với vị trí mẫu đơn lẻ của hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 36.

38. Phương pháp giải trình tự, phương pháp này bao gồm bước liên kết nhiều oligonucleotit phụ với nhiều vị trí phụ của hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 23 đến 36.

39. Phương pháp theo điểm 37 hoặc 38, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào khung được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào khung kéo dài từ các oligonucleotit phụ.

40. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 37 đến 39, phương pháp này còn bao gồm bước gắn khung vào lớp nền, trong đó bước gắn này bao gồm công đoạn lai các oligonucleotit phụ với các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

41. Phương pháp theo điểm 40, trong đó nền bao gồm nhiều giếng kích thước nano và các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền được gắn bên trong nhiều giếng kích thước nano.

42. Phương pháp theo điểm 41, trong đó chỉ có tối đa một khung liên kết bên trong giếng bất kỳ trong số các giếng kích thước nano.

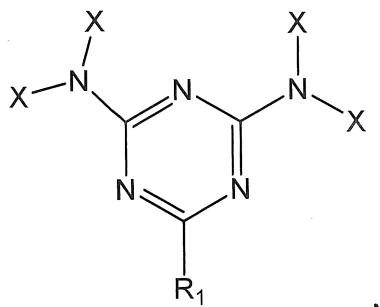
43. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 40 đến 40, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào lớp nền được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào lớp nền kéo dài từ các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

44. Phương pháp theo điểm 39 hoặc 43, phương pháp này còn bao gồm bước giải trình tự ít nhất một trong các bản sao được gắn vào khung và các bản sao được gắn vào lớp nền, trong đó bước giải trình tự bao gồm công đoạn giải trình tự bằng phương pháp tổng hợp.

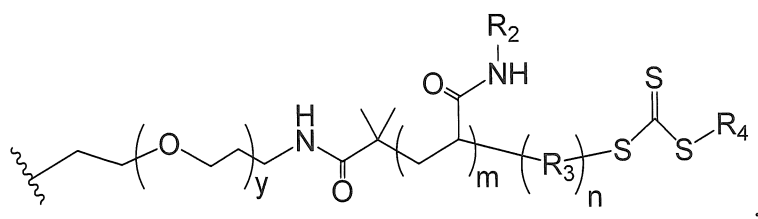
45. Hạt nano, bao gồm:

khung, vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung được chọn từ vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị và vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị, và nhiều vị trí phụ để liên

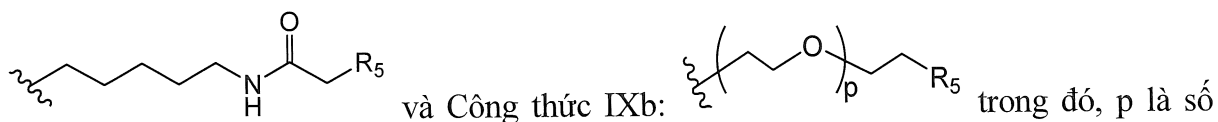
khung là hợp chất có công thức VII:



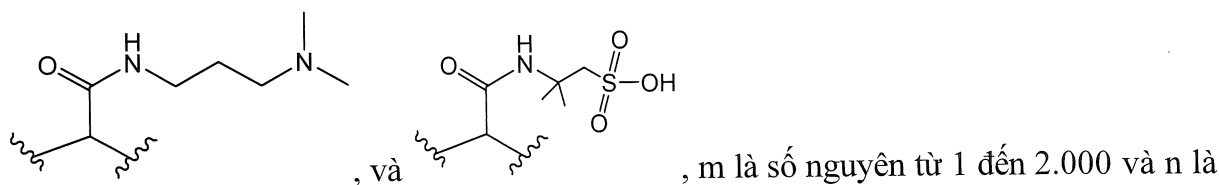
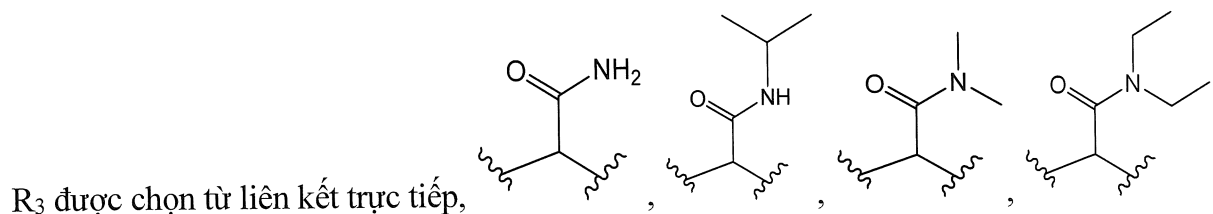
mỗi X là hợp chất có công thức VIII:



trong đó, y là số nguyên từ 1 đến 20, R_2 được chọn từ Công thức IXa:



nguyên được chọn từ 1 đến 20, và R_5 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ,



số nguyên từ 1 đến 10.000,

R¹ bao gồm vị trí mẫu đơn lẻ để liên kết polynucleotit mẫu với khung, R⁴ được chọn từ C₁-C₂₀ alkyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ alkenyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ alkynyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ oxaalkyl được thay thế tùy ý, C₁-C₂₀ thiaalkyl được thay thế tùy ý, và C₁-C₂₀ azaalkyl được thay thế tùy ý, trong đó phần được thay thế bao gồm việc

thay thế bằng một hoặc nhiều phần tử trong số C_1 - C_{20} alkyl, oxy liên kết đôi, và nhóm hydroxyl, và R^3 bao gồm vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ.

46. Hạt nano theo điểm 45, trong đó vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị.

47. Hạt nano theo điểm 46, trong đó vị trí liên kết mẫu cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag- O^6 -Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag- O^2 -benzylxytosin, và vị trí liên kết ghép cặp sortaza.

48. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số điểm 45, trong đó vị trí mẫu đơn lẻ bao gồm vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị.

49. Hạt nano theo điểm 48, trong đó vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm vị trí lai hóa polynucleotit.

50. Hạt nano theo điểm 48, trong đó vị trí liên kết mẫu không cộng hóa trị bao gồm vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị, và vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị này được chọn từ vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

51. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 45 đến 50, trong đó nhiều vị trí phụ để liên kết các oligonucleotit phụ với khung bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị.

52. Hạt nano theo điểm 51, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ cộng hóa trị được chọn từ vị trí liên kết amin-NHS este, vị trí liên kết amin-imidoeste, vị trí liên kết amin-pentofluorophenyl este, vị trí liên kết amin-hydroxymethyl phosphin, vị trí liên kết carboxyl-carbodiimit, vị trí liên kết thiol-maleimit, vị trí liên kết thiol-haloaxetyl, vị trí liên kết thiol-pyridyl disulfua, vị trí liên kết thiol-thiosulfonat, vị trí liên kết thiol-vinyl

sulfon, vị trí liên kết aldehyt-hydrazit, vị trí liên kết aldehyt-alkoxyamin, vị trí liên kết hydroxy-isoxyanat, vị trí liên kết azit-alkyn, vị trí liên kết azit-phosphin, vị trí liên kết transxycloocten-tetrazin, vị trí liên kết norbornen-tetrazin, vị trí liên kết azit-xyclooctyn, vị trí liên kết azit-norbornen, vị trí liên kết oxim, vị trí liên kết SpyTag-SpyCatcher, vị trí liên kết Snap-tag-O⁶-Benzylguanin, vị trí liên kết CLIP-tag-O²-benzylxytosin, vị trí liên kết ghép cặp sortaza, và tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều hơn hai vị trí nêu trên.

53. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 45 đến 50, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ bao gồm các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị.

54. Hạt nano theo điểm 53, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm các vị trí lai hóa polynucleotit.

55. Hạt nano theo điểm 53, trong đó các vị trí liên kết oligonucleotit phụ không cộng hóa trị bao gồm các vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị và các vị trí liên kết peptit không cộng hóa trị được chọn từ một trong hai hoặc cả vị trí liên kết cuộn xoắn đôi và vị trí liên kết avidin-biotin.

56. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 45 đến 55, còn bao gồm polynucleotit mẫu đơn lẻ liên kết với vị trí mẫu đơn lẻ.

57. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 45 đến 56, còn bao gồm nhiều oligonucleotit phụ liên kết với nhiều vị trí phụ.

58. Hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 45 đến 57, trong đó hạt nano này có đường kính ít nhất khoảng 10 nm.

59. Phương pháp giải trình tự, phương pháp này bao gồm bước liên kết polynucleotit mẫu đơn lẻ với vị trí mẫu đơn lẻ của hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 45 đến 58.

60. Phương pháp giải trình tự, phương pháp này bao gồm bước liên kết nhiều oligonucleotit phụ với nhiều vị trí phụ của hạt nano theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 45 đến 58.

61. Phương pháp theo điểm 59 hoặc 60, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào khung được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit hỗ trợ cho polynucleotit mẫu, và

các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào khung kéo dài từ các oligonucleotit phụ.

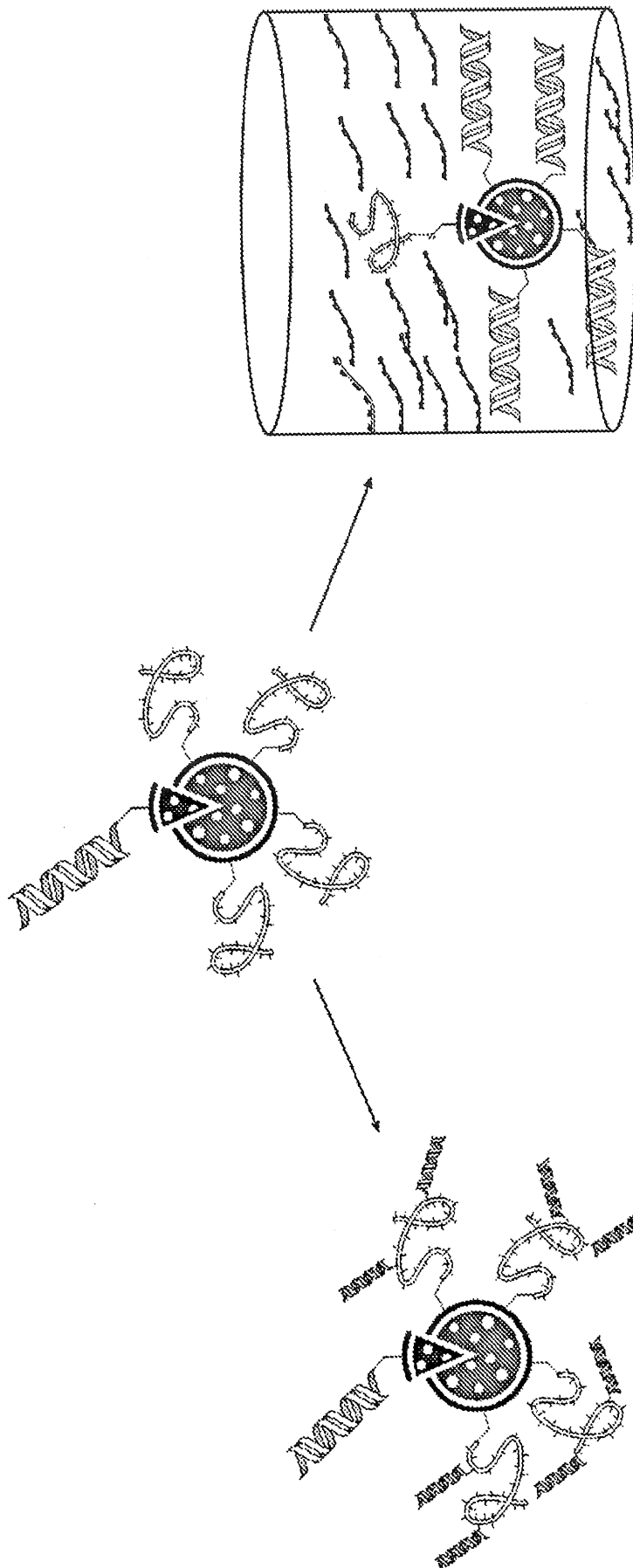
62. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 59 đến 61, phương pháp này còn bao gồm bước gắn khung vào lớp nền, trong đó bước gắn này bao gồm công đoạn lai các oligonucleotit phụ với các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

63. Phương pháp theo điểm 62, trong đó nền bao gồm nhiều giếng kích thước nano và các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền được gắn bên trong nhiều giếng kích thước nano.

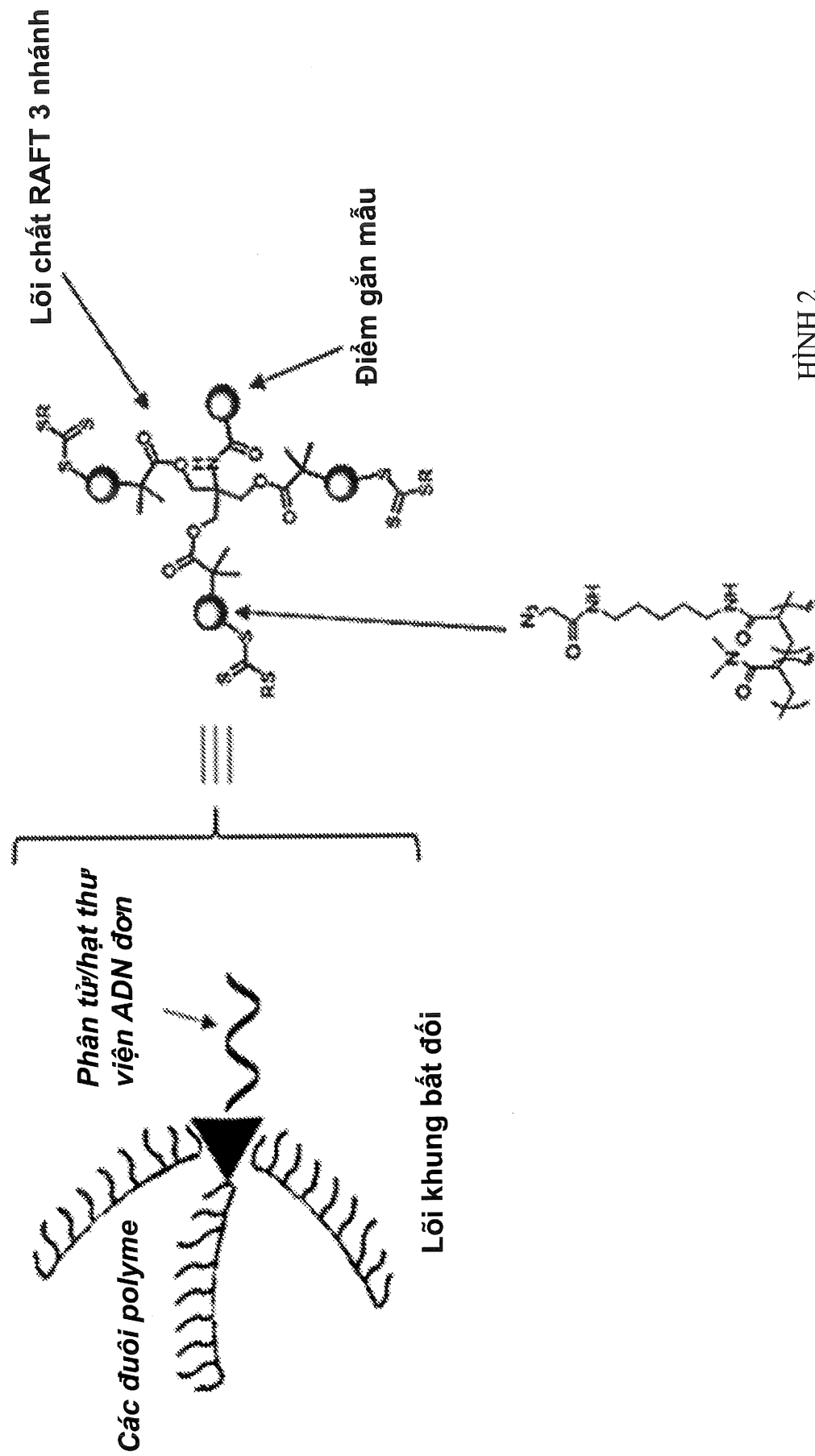
64. Phương pháp theo điểm 63, trong đó chỉ có tối đa một khung liên kết bên trong giếng bất kỳ trong số các giếng kích thước nano.

65. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 62 đến 64, phương pháp này còn bao gồm bước tổng hợp một hoặc nhiều bản sao được gắn vào lớp nền được chọn từ các bản sao của polynucleotit mẫu, các bản sao của các polynucleotit bổ trợ cho polynucleotit mẫu, và các bản sao của cả hai, trong đó các bản sao được gắn vào lớp nền kéo dài từ các oligonucleotit đã được gắn vào lớp nền.

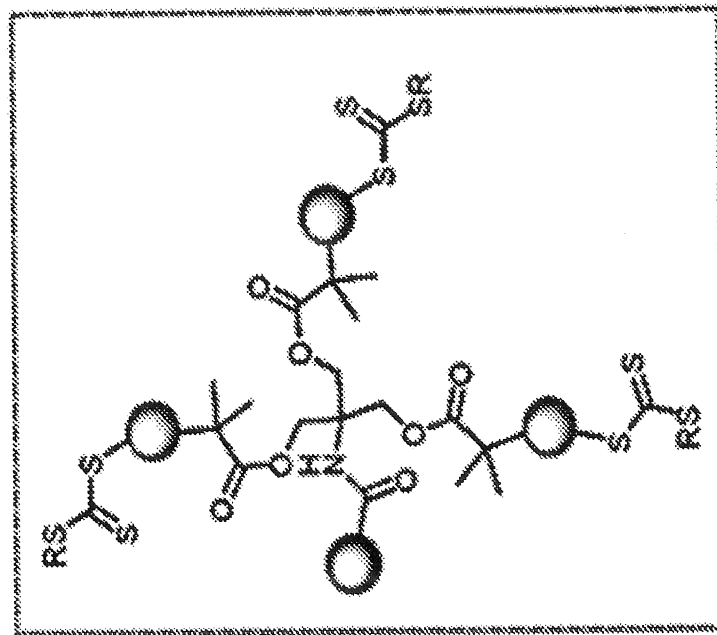
66. Phương pháp theo điểm 61 hoặc 65, phương pháp này còn bao gồm bước giải trình tự ít nhất một trong các bản sao được gắn vào khung và các bản sao được gắn vào lớp nền, trong đó bước giải trình tự bao gồm công đoạn giải trình tự bằng phương pháp tổng hợp.



HÌNH 1

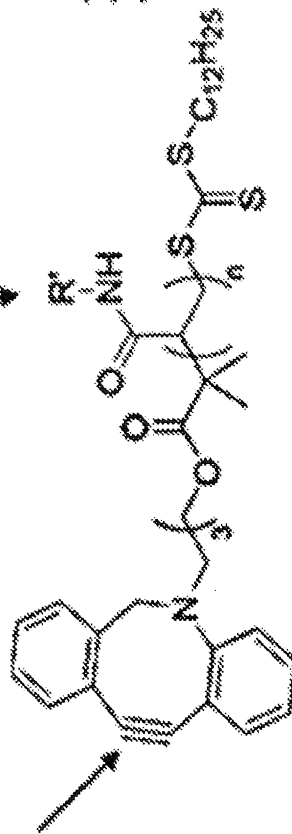


HÌNH 2

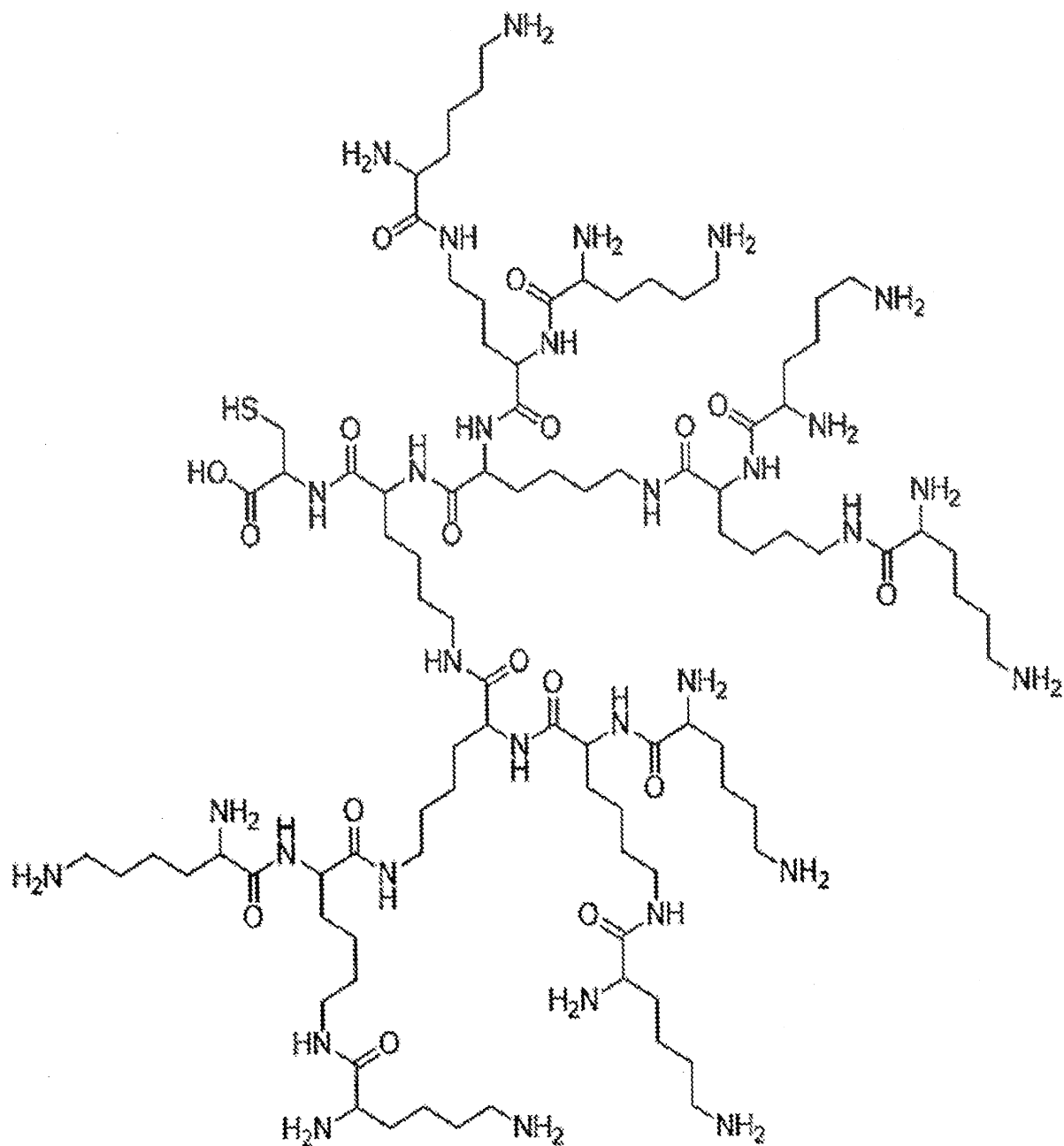


Vị trí liên kết phụ

Một vị trí liên kết
polynucleotit mẫu

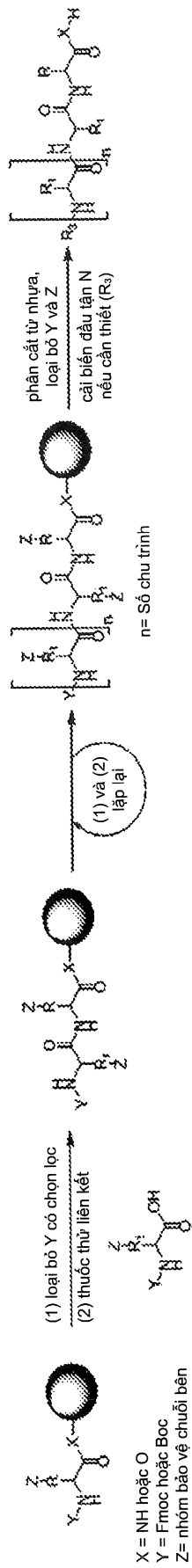


HÌNH 3

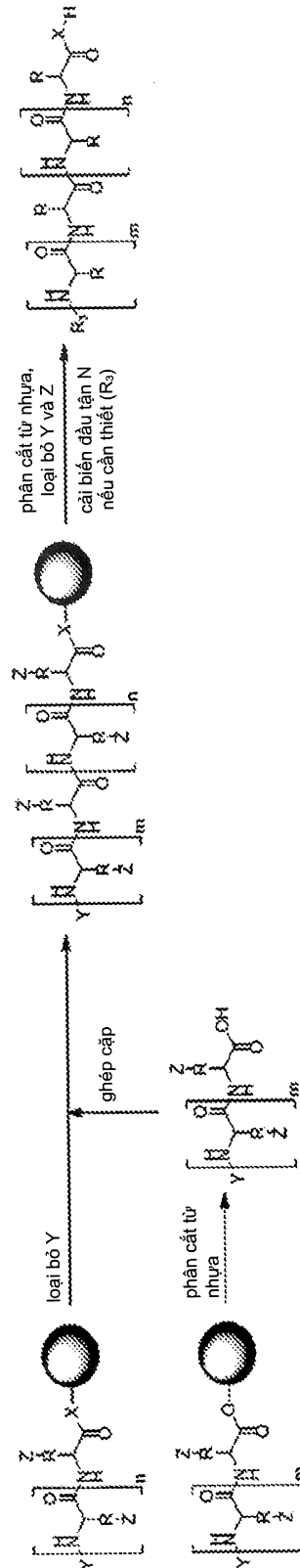


HÌNH 5

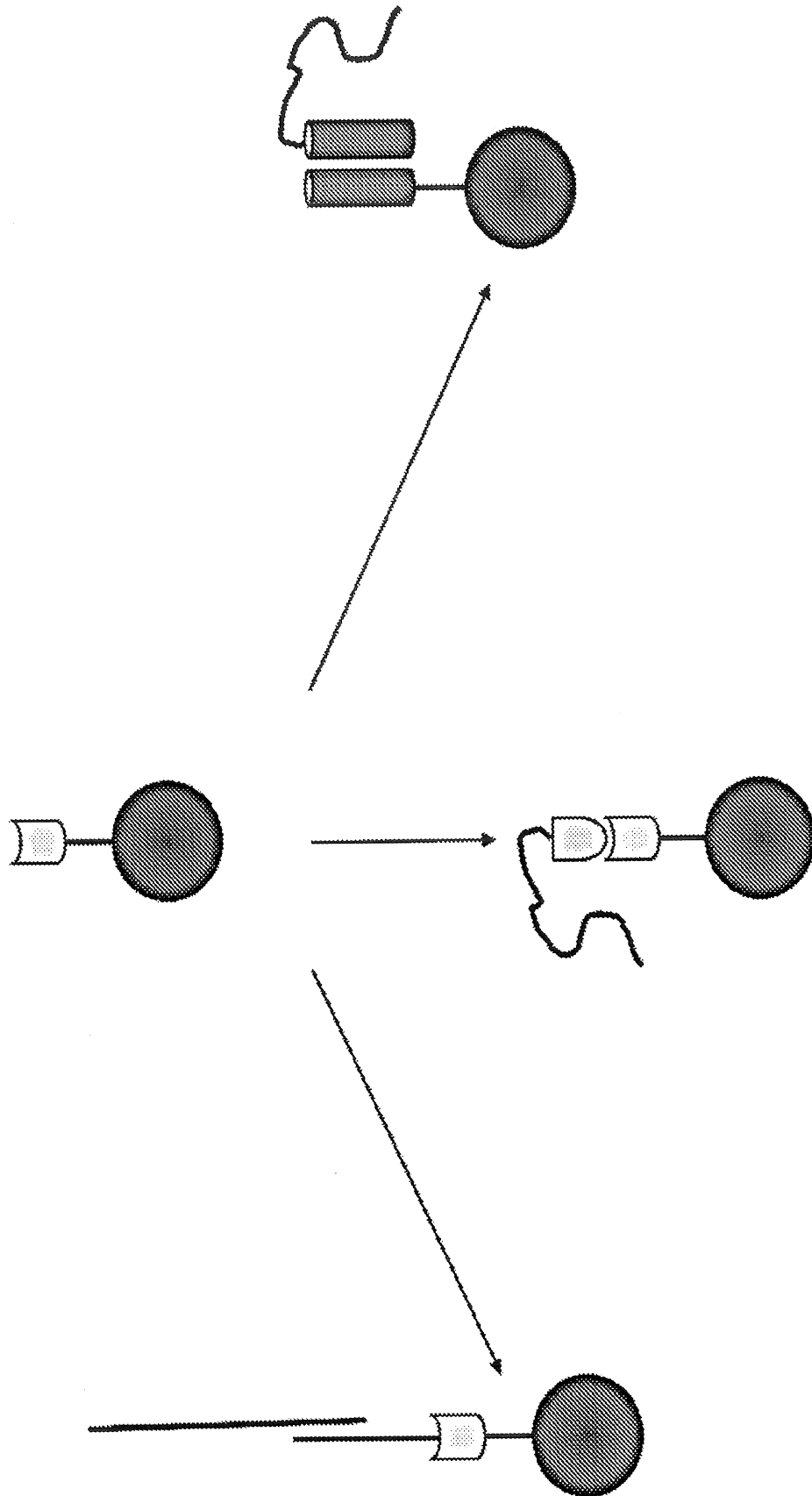
Chiến lược tổng hợp theo trình tự bằng phương pháp tổng hợp peptide pha rắn (SPPS)



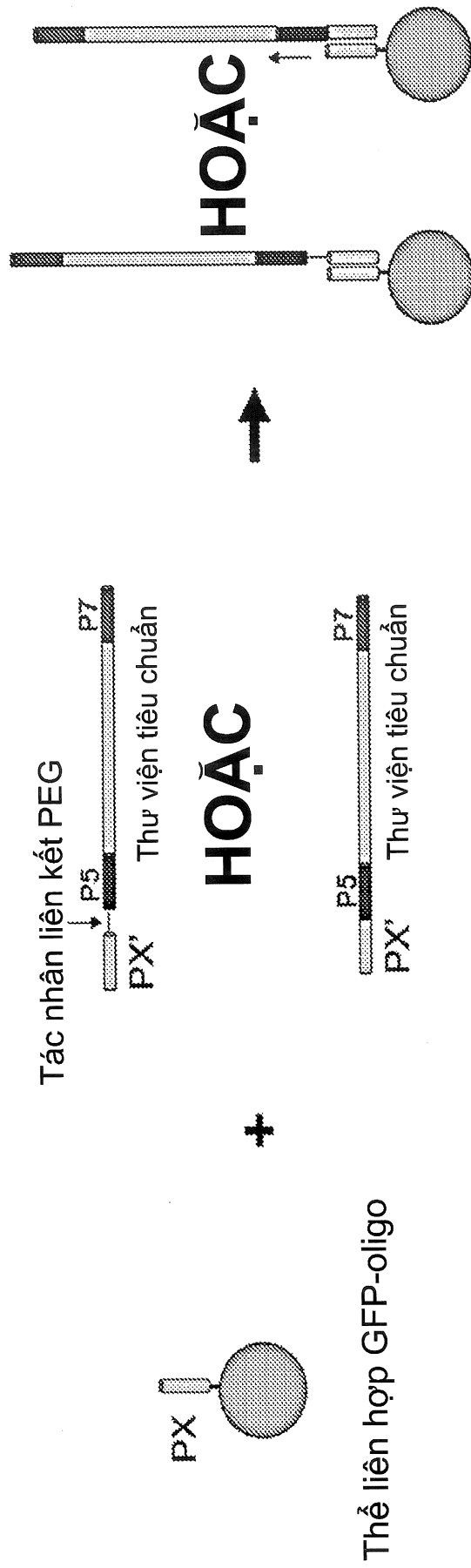
Chiến lược tổng hợp hội tụ bằng phương pháp tổng hợp peptide pha rắn (SPPS)



HÌNH 6



HÌNH 7

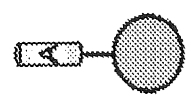


HÌNH 8

Thế hợp nhất GFP~ G EIAALEQ EIAALER ENAALEN EIAALEQ GG -Tính axit
 Oligo~ G KIAALKQ KIAALKY KNAALKK KIAALKQ GG -Tính kiềm
 phpphpp phpphpp phpphpp phpphpp

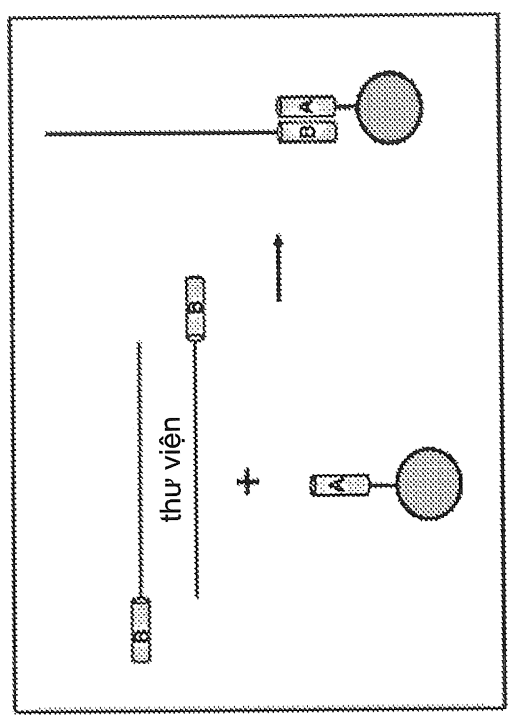


Kd theo ước tính
 $< 1 \times 10^{-10} \text{ M}$



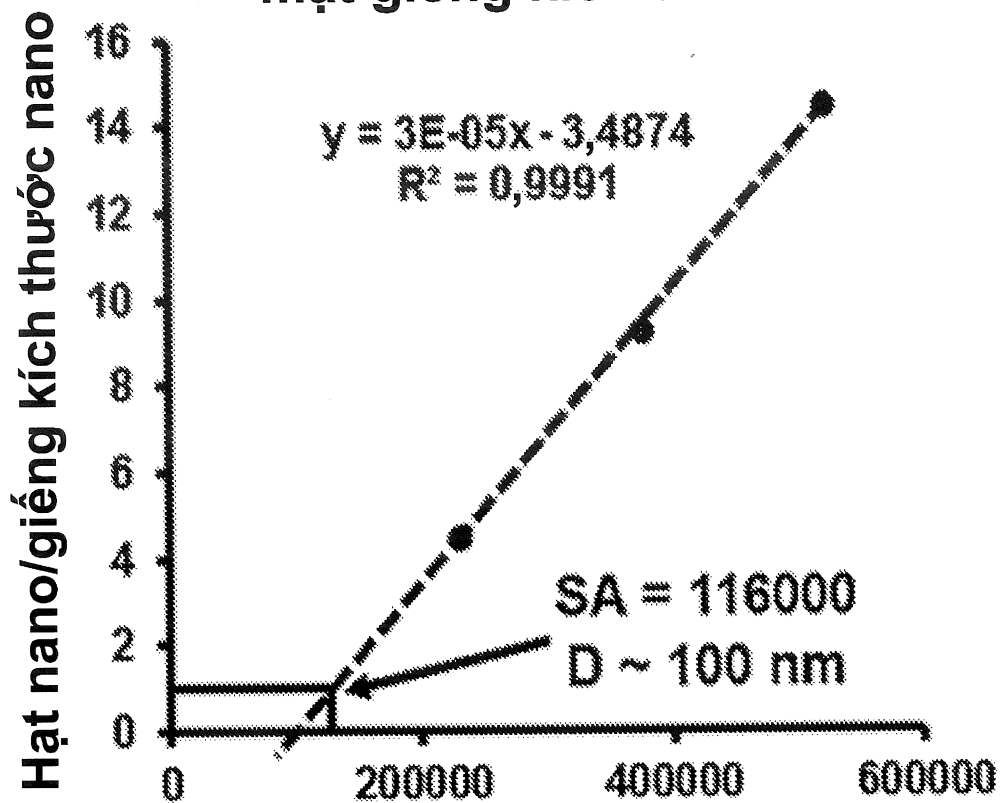
Thế hợp nhất Oligo Peptit

Thế hợp nhất khung-peptit



HÌNH 9

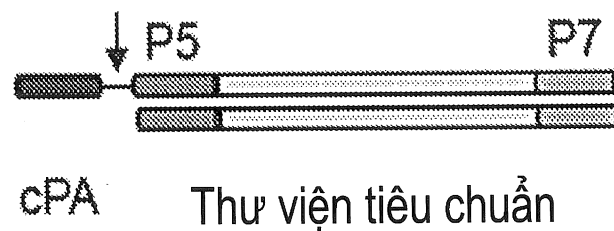
Sự kiện gieo mầm đối với diện tích bề mặt giếng kích thước nano



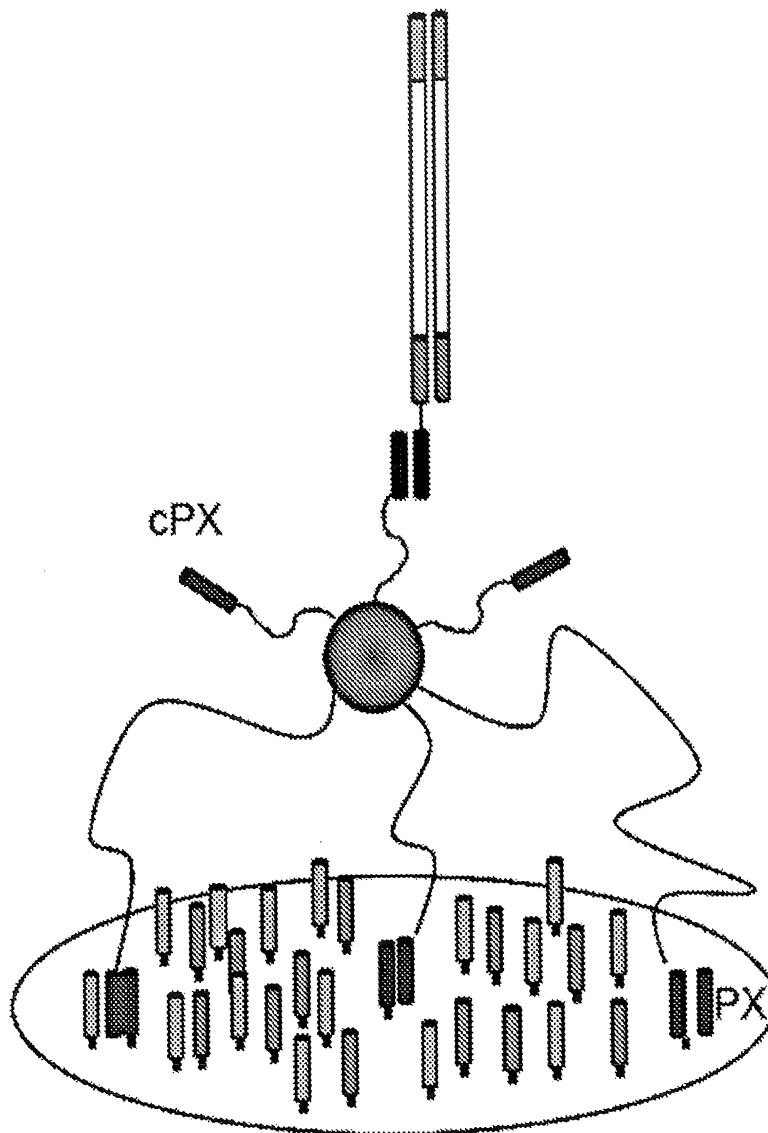
Diện tích bề mặt giếng kích thước nano (nm²)

HÌNH 10

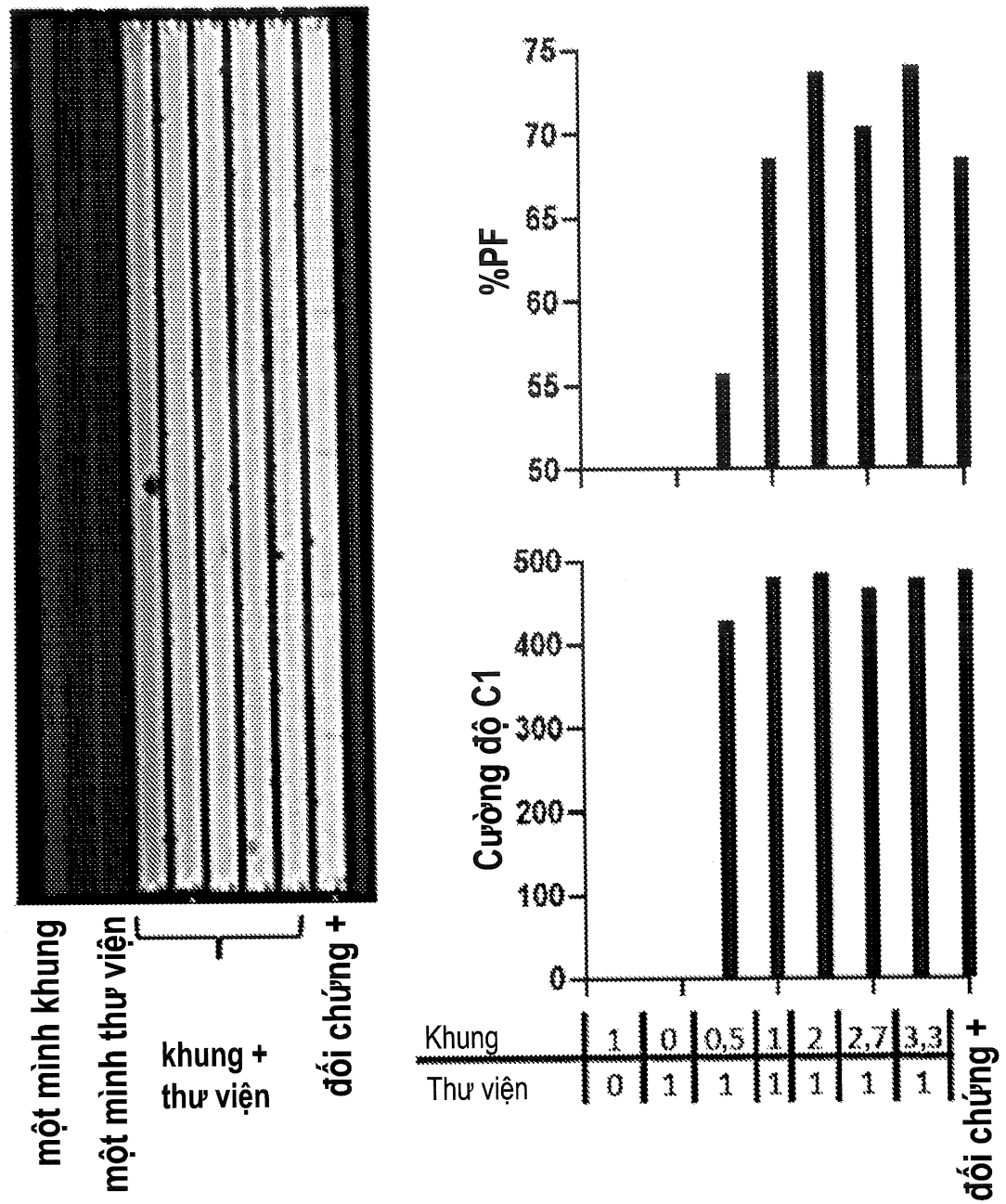
Tác nhân liên kết PEG



HÌNH 11A



HÌNH 11B



HÌNH 11C

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> ILLUMINA, INC.
ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED
ILLUMINA SINGAPORE PTE. LTD.

<120> HẠT NANO CÓ VỊ TRÍ MẪU ĐƠN LẺ ĐỂ LIÊN KẾT POLYNUCLEOTIT MẪU VÀ PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ SỬ DỤNG HẠT NANO NÀY

<130> IP-1936

<160> 8

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

<400> 1

Ala His Ile Val Met Val Asp Ala Tyr Lys Pro Thr Lys
1 5 10

<210> 2
<211> 134
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

<400> 2

Met Lys Gly Ser Ser His His His His His Val Asp Ile Pro Thr
1 5 10 15

Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Val Asp Thr Leu Ser Gly
20 25 30

Leu Ser Ser Glu Gln Gly Gln Ser Gly Asp Met Thr Ile Glu Glu Asp
35 40 45

Ser Ala Thr His Ile Lys Phe Ser Lys Arg Asp Glu Asp Gly Lys Glu
50 55 60

Leu Ala Gly Ala Thr Met Glu Leu Arg Asp Ser Ser Gly Lys Thr Ile
65 70 75 80

Ser Thr Trp Ile Ser Asp Gly Gln Val Lys Asp Phe Tyr Leu Tyr Pro
85 90 95

Gly Lys Tyr Thr Phe Val Glu Thr Ala Ala Pro Asp Gly Tyr Glu Val
100 105 110

Ala Thr Ala Ile Thr Phe Thr Val Asn Glu Gln Gly Gln Val Thr Val
115 120 125

Asn Gly Lys Ala Thr Lys
130

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

<400> 3

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

<400> 4

Asp Ser Leu Glu Phe Ile Ala Ser Lys Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

<400> 5

Asp Glu Val Leu Val Glu Ile Glu Thr Asp Lys Ala Val Leu Glu Val
1 5 10 15

Pro Gly Gly Glu Glu Glu

20

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

 <400> 6

 Gly Phe Glu Ile Asp Lys Val Trp Tyr Asp Leu Asp Ala
 1 5 10

<210> 7
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

 <400> 7
 aatgatacgg cgaccaccga gatctacac

29

<210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> Trình tự được tổng hợp trong phòng thí nghiệm

 <400> 8
 caagcagaag acggcatacg agat

24