



(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)



1-0052853

(51)<sup>2020.01</sup> C12Q 1/6869

(13) B

(21) 1-2021-05848

(22) 25/11/2020

(86) PCT/US2020/062279 25/11/2020

(87) WO 2021/126503 24/06/2021

(30) 62/948,605 16/12/2019 US

(45) 27/10/2025 451

(43) 26/09/2022 414A

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

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

2. ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (GB)

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

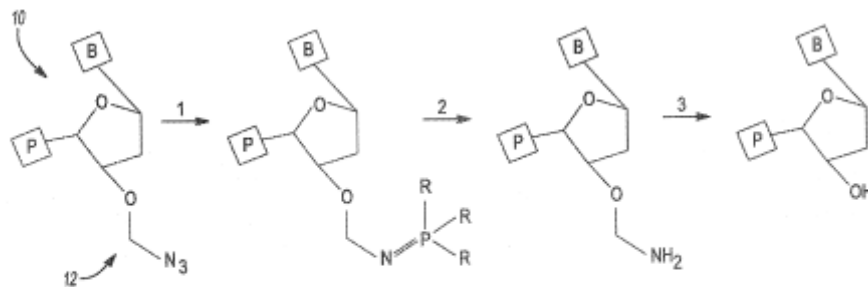
(72) GEORGE, Wayne N. (GB); MATHER, Brian D. (US); BROWN, Andrew A. (GB);  
LAFRANCONI, Pietro Gatti (IT); ROBERT BACIGALUPO, Maria Candelaria  
(AR); FRANCAIS, Antoine (FR); LIU, Xiaohai (GB).

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

(54) BỘ KIT, TIÊU BẢN DẠNG TẾ BÀO DÒNG CHẢY, PHƯƠNG PHÁP GIẢI KHỎI  
NUCLEOTIT CHẶN 3' OH VÀ PHƯƠNG PHÁP GIẢI TRÌNH TỰ AXIT  
NUCLEIC

(21) 1-2021-05848

(57) Sáng chế đề cập đến bộ kit, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, phương pháp giải khối nucleotit chặn 3' OH và phương pháp giải trình tự axit nucleic. Ví dụ về bộ kit bao gồm tiêu bản dạng tế bào dòng chảy và hỗn hợp phân cắt. Ví dụ về tiêu bản dạng tế bào dòng chảy bao gồm phần nền; hydrogel polymer xúc tác trên phần nền này, hydrogel polymer xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối; và đoạn môi khuếch đại được gắn với hydrogel polymer xúc tác. Chất xúc tác giải khối đẩy nhanh sự phân cắt nhóm chặn của nucleotit chặn 3' OH được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy và được hợp nhất vào sợi khuôn mẫu gắn với đoạn môi khuếch đại. Ví dụ về hỗn hợp phân cắt bao gồm thành phần để bắt đầu phân cắt nhóm chặn.



**Hình 1**

**Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến bộ kit, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, phương pháp giải khối nucleotit chặn 3' OH và phương pháp giải trình tự axit nucleic.

**Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Các quy trình khác nhau trong nghiên cứu sinh học hoặc hóa học liên quan đến việc thực hiện nhiều phản ứng có kiểm soát trên bề mặt chất mang cục bộ hoặc trong buồng phản ứng được xác định trước. Sau đó, các phản ứng được chỉ định có thể được quan sát hoặc phát hiện, và phân tích tiếp theo có thể giúp xác định hoặc bộc lộ các đặc tính của hóa chất tham gia phản ứng. Theo một số ví dụ, phản ứng có kiểm soát tạo ra huỳnh quang, và do đó hệ quang học có thể được sử dụng để phát hiện. Theo các ví dụ khác, phản ứng có kiểm soát làm thay đổi điện tích, độ dẫn điện hoặc một số đặc trưng điện khác, và do đó hệ thống điện tử có thể được sử dụng để phát hiện.

**Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Phương án thứ nhất được công bố trong tài liệu này là bộ kit bao gồm tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, bao gồm: phần nền; hydrogel polyme xúc tác trên phần nền, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối; và đoạn môi khuếch đại gắn vào hydrogel polyme xúc tác đó; trong đó chất xúc tác làm tăng sự phân cắt nhóm chặn của nucleotit chặn 3' OH được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy và được hợp nhất vào sợi khuôn mẫu gắn với đoạn môi khuếch đại; và hỗn hợp phân cắt bao gồm thành phần để bắt đầu phân cắt nhóm chặn.

Theo ví dụ về phương án thứ nhất, chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm chất xúc tác axit, chất xúc tác bazơ, enzym, peptit, DNAzyme, chất xúc tác hữu cơ và các tổ hợp của chúng.

Theo ví dụ về phương án thứ nhất, chất xúc tác giải khối là kim loại của phức chất kim loại-phối tử được gắn vào hydrogel polyme.

Theo ví dụ về phương án thứ nhất, chất xúc tác giải khối là chất xúc tác axit được chọn từ nhóm bao gồm axit carboxylic, axit phosphonic, axit sulfonic và các tổ hợp của chúng.

Theo ví dụ về phương án thứ nhất, chất xúc tác giải khối là chất xúc tác bazơ được chọn từ nhóm bao gồm amin, amin dị vòng và các tổ hợp của chúng.

Theo ví dụ về phương án thứ nhất, chất xúc tác giải khối là enzym.

Theo ví dụ về phương án thứ nhất, chất xúc tác giải khối là peptit.

Theo ví dụ về phương án thứ nhất, chất xúc tác giải khối là DNAzyme.

Cần hiểu rằng bất kỳ đặc tính nào của bộ kit được công bố trong tài liệu này có thể được kết hợp với nhau theo bất kỳ cách thức và/hoặc cấu hình mong muốn nào để đạt được các lợi ích như được mô tả trong sáng chế này, bao gồm, ví dụ như tăng cường động học giải khối.

Phương án thứ hai được công bố trong tài liệu này, phương pháp bao gồm bước đưa hỗn hợp kết hợp vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy bao gồm: phần nền; hydrogel polyme xúc tác trên phần nền, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối; và sợi khuôn mẫu gắn vào hydrogel polyme xúc tác; do đó hợp nhất từng nucleotit thành sợi non tương ứng dọc theo sợi khuôn mẫu, từng nucleotit bao gồm: nhãn thuốc nhuộm gắn vào bazơ; và nhóm chặn 3' OH gắn với đường; bước loại bỏ hỗn hợp kết hợp; bước tạo hình ảnh quang học sự hợp nhất từng nucleotit; và bước đưa hỗn hợp phân cắt, bao gồm thành phần để bắt đầu phân cắt nhóm chặn 3' OH, vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, theo đó chất xúc tác giải khối đẩy nhanh sự phân cắt của nhóm chặn 3' OH.

Theo ví dụ về phương án thứ hai, chất xúc tác đẩy nhanh việc loại bỏ nhóm bảo vệ bên ngoài của nhóm chặn 3' OH, và trong đó thuốc thử trong hỗn hợp phân cắt loại bỏ nhóm bảo vệ bên trong của nhóm chặn 3' OH.

Cần phải hiểu rằng mọi tính năng của phương pháp này có thể được kết hợp với nhau theo mọi phương thức mong muốn. Ngoài ra, cần hiểu rằng mọi sự kết hợp đặc tính của phương pháp và/hoặc của bộ kit có thể được sử dụng cùng nhau, và/hoặc được kết hợp với bất kỳ ví dụ nào được công bố trong tài liệu này để đạt các lợi ích như được mô tả trong sáng chế này, bao gồm, ví dụ như cải thiện động học giải khối.

Phương án thứ ba được công bố trong tài liệu này là tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, bao gồm: phần nền; hydrogel polyme xúc tác trên phần nền, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm: axit phosphonic; amin dị vòng; enzym; peptit; DNAzyme; kim loại của phức chất kim loại-phối tử; chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene, và các tổ hợp của chúng; và bộ tạo axit quang (photoacid generator); và đoạn môi khuếch đại gắn vào hydrogel polyme xúc tác.

Theo ví dụ về phương án thứ ba, chất xúc tác được hợp nhất thành đơn vị monome của hydrogel polyme xúc tác.

Theo ví dụ về phương án thứ ba, chất xúc tác được ghép với hydrogel polyme ban đầu.

Theo ví dụ về phương án thứ ba, hydrogel polyme xúc tác bao gồm hydrogel polyme ban đầu và trong đó, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy còn bao gồm oligonucleotit được gắn với hydrogel polyme ban đầu, và trong đó chất xúc tác giải khối được gắn vào liên kết oligonucleotit bổ sung được lai với oligonucleotit.

Cần phải hiểu rằng mọi tính năng của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy này có thể được kết hợp với nhau theo mọi phương thức mong muốn. Ngoài ra, cần hiểu rằng mọi sự kết hợp đặc tính của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy và/hoặc đặc tính của bộ kit và/hoặc của phương pháp này có thể được sử dụng cùng nhau, và/hoặc được kết hợp với mọi ví dụ được công bố trong tài liệu này để đạt các lợi ích như

được mô tả trong sáng chế này, bao gồm, ví dụ như bước tạo hydrogel polyme mà góp phần tăng cường động học giải khối.

Phương án thứ tư được công bố trong tài liệu này là tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, bao gồm: phần nền; hydrogel polyme trên phần nền, hydrogel polyme này bao gồm thành phần thứ nhất của cặp liên kết hydro; chất xúc tác giải khối gắn vào hydrogel polyme thông qua thành phần thứ hai của cặp liên kết hydro; và đoạn môi khuếch đại gắn vào hydrogel polyme xúc tác.

Cần hiểu rằng mọi đặc tính của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy này có thể được kết hợp với nhau theo mọi phương thức mong muốn. Ngoài ra, cần hiểu rằng mọi sự kết hợp đặc tính của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy này và/hoặc tiêu bản dạng tế bào dòng chảy khác và/hoặc đặc tính của bộ kit và/hoặc của phương pháp có thể được sử dụng cùng nhau, và/hoặc được kết hợp với mọi ví dụ được công bố trong tài liệu này để đạt các lợi ích như được mô tả trong sáng chế này, bao gồm, ví dụ như tăng cường động học giải khối.

Phương án thứ năm được công bố trong tài liệu này là phương pháp, bao gồm: bước phủ hydrogel polyme xúc tác lên bề mặt của phần nền tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm: axit phosphonic; amin dị vòng; enzym; peptit; DNAzyme; kim loại của phức chất kim loại-phối tử; chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene, và các tổ hợp của chúng; và bộ tạo axit quang; và bước gắn đoạn môi khuếch đại vào hydrogel polyme xúc tác.

Ví dụ về phương án thứ năm còn bao gồm bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm chất xúc tác giải khối.

Theo ví dụ về phương án thứ năm, bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm bước đồng trùng hợp monome thứ nhất bao gồm nhóm chức ghép đoạn môi với monome thứ hai bao gồm chất xúc tác giải khối.

Theo ví dụ về phương án thứ năm, bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm: bước tổng hợp hydrogel polyme ban đầu; và bước ghép chất xúc tác vào hydrogel polyme ban đầu.

Theo ví dụ về phương án thứ năm, bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm: bước tổng hợp hydrogel polyme ban đầu; bước ghép oligonucleotit vào hydrogel polyme ban đầu; và bước lai liên kết oligonucleotit bổ sung với oligonucleotit, trong đó chất xúc tác được gắn vào liên kết oligonucleotit bổ sung này.

Theo ví dụ về phương án thứ năm, bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm: bước tổng hợp hydrogel polyme ban đầu; và bước gắn phức chất kim loại-phối tử vào hydrogel polyme ban đầu, trong đó kim loại của phức chất kim loại-phối tử là chất xúc tác.

Cần phải hiểu rằng mọi tính năng của phương pháp này có thể được kết hợp với nhau theo mọi phương thức mong muốn. Ngoài ra, cần hiểu rằng mọi sự kết hợp đặc tính của phương pháp này và/hoặc phương pháp khác và/hoặc đặc tính của bộ kit và/hoặc của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy có thể được sử dụng cùng nhau, và/hoặc được kết hợp với mọi ví dụ được công bố trong tài liệu này để đạt các lợi ích như được mô tả trong sáng chế này, bao gồm, ví dụ như tăng cường động học giải khối.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Các đặc điểm của các ví dụ theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng khi tham chiếu đến mô tả chi tiết và hình vẽ sau đây, trong đó số tham chiếu tương tự như các thành phần tương tự, mặc dù có lẽ không đồng nhất. Nhằm mục đích ngắn gọn, chữ số tham chiếu hoặc tính năng có chức năng được mô tả trước đây có thể hoặc không thể được mô tả liên quan đến các hình vẽ khác mà chúng xuất hiện trong đó.

Hình 1 là lưu đồ giản lược minh họa quy trình giải khối nhiều bước ví dụ về nucleotit chặn 3' OH;

Hình 2 là minh họa giản đồ ví dụ về chất xúc tác được có liên quan đến ví dụ về hydrogel polyme thông qua ví dụ về liên kết không cộng hóa trị;

Hình 3A là hình chiếu từ trên xuống theo ví dụ về tiêu bản dạng tế bào dòng chảy;

Hình 3B là hình vẽ cắt trích được phóng to một phần theo ví dụ về kênh dòng chảy của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy bao gồm ví dụ về hydrogel polyme nằm trong kênh dòng chảy; và

Hình 3C là hình vẽ cắt trích được phóng to một phần theo ví dụ về kênh dòng chảy của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy bao gồm ví dụ về hydrogel polyme nằm trong rãnh được tạo thành trong kênh dòng chảy,

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Một số kỹ thuật giải trình tự axit nucleic sử dụng nhóm chặn 3' OH mà được liên kết với nguyên tử oxy của phân tử đường trong nucleotit. Nhóm chặn 3' OH có thể đóng vai trò là phần kết thúc thuận nghịch, chỉ cho phép hợp nhất một bazơ trong mỗi chu kỳ giải trình tự. Cụ thể hơn, trong một số trường hợp, nhóm chặn 3' OH sẽ được loại bỏ để bắt đầu chu kỳ giải trình tự tiếp theo. Sự kết thúc tạm thời quy trình hợp nhất nucleotit cho phép có thời gian để, ví dụ như rửa sạch các nucleotit chưa hợp nhất, kích thích nhãn có thể phát hiện (ví dụ: thuốc nhuộm huỳnh quang) được gắn vào nucleotit đã hợp nhất, tạo hình ảnh nhãn đã kích thích có thể phát hiện.

Sáng chế trong tài liệu này công bố hydrogel polyme xúc tác. Chất xúc tác của hydrogel polyme xúc tác là phân tử phản ứng, hoặc một phần của nó, đẩy nhanh sự phân cắt của nhóm chặn 3' OH khỏi các nucleotit được hợp nhất. Chất xúc tác này có thể được lựa chọn để không hoạt hóa trong lần hợp nhất. Chất xúc tác này có thể được chọn cho phản ứng xảy ra trong quá trình giải khối (sau khi hợp nhất và tạo hình ảnh), và do đó có thể đẩy nhanh sự phân cắt của nhóm chặn 3' OH bất kỳ. Theo một số phương án nhất định, chất xúc tác có thể hữu ích cho các nhóm chặn 3' OH bền hơn trong dung dịch chứa nước nhưng có xu hướng biểu hiện động học giải khối chậm hơn.



Trong những trường hợp này, chất xúc tác có thể giúp, ví dụ như giảm thời gian của mỗi chu kỳ giải trình tự, giúp giảm tổng thời gian quay vòng giải trình tự và giúp giảm vấn đề định pha mà có thể xảy ra khi chậm giải khối.

Nhiều phản ứng có thể xảy ra trong quá trình phân cắt nhóm chặn 3' OH. Hình 1 mô tả một ví dụ về một chuỗi các phản ứng này đối với ví dụ về nucleotit chặn 3' OH 10. Nucleotit chặn 3' OH 10 bao gồm bazơ dị vòng B, đường (được minh họa là deoxyriboza trong Hình 1), một hoặc nhiều nhóm phosphat P và nhóm chặn 3' OH 12 được gắn vào đường này. Theo ví dụ này, nhóm chặn 3' OH 12 là azidometyl. Ở bước 1 trong Hình 1, phosphin ( $PR_3$ , trong đó R là H hoặc  $(CH_2)_nOH$  ( $n = 1-3$ )) được thêm vào để phản ứng với azit. Phản ứng này làm mất nitơ và tạo thành iminophosphoran. Ở bước 2, iminophosphoran được thủy phân để tạo thành ete hemiaminal, và ở bước 3, ete hemiaminal được thủy phân để cho thấy 3' OH. Đối với sự giải khối được minh họa trong Hình 1, chất xúc tác bất kỳ đẩy nhanh bước thủy phân ở 2 và/hoặc bước 3 trong Hình 1 có thể được kết hợp trong hoặc trên hydrogel polyme, hoặc chất xúc tác bất kỳ đẩy nhanh phản ứng ở bước 1 trong Hình 1 có thể được kết hợp trong hoặc trên hydrogel polyme. Khi chất xúc tác được chọn cụ thể để xúc tác ở bước 1 theo Hình 1, chất xúc tác sẽ đẩy nhanh việc loại bỏ nhóm bảo vệ bên ngoài của nhóm chặn 3' OH 12 (ví dụ: nhóm azit minh họa trong Hình 1), và thuốc thử trong hỗn hợp phân cắt có thể được sử dụng để loại bỏ nhóm bảo vệ bên trong của nhóm chặn 3' OH 12 (ví dụ:  $-CH_2-$  được minh họa trong Hình 1).

Trong khi Hình 1 minh họa một ví dụ về quy trình giải khối, và cần hiểu rằng chất xúc tác được sử dụng có thể phụ thuộc vào nhóm chặn 3' OH và (các) phản ứng được sử dụng để phân cắt nhóm chặn 3' OH đó.

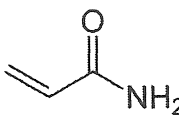
### *Các định nghĩa*

Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ được sử dụng trong tài liệu sẽ được hiểu là mang ý nghĩa thông thường trong ngành liên quan trừ khi có quy định khác. Một số thuật ngữ được sử dụng trong tài liệu này và nghĩa được giải thích bên dưới.

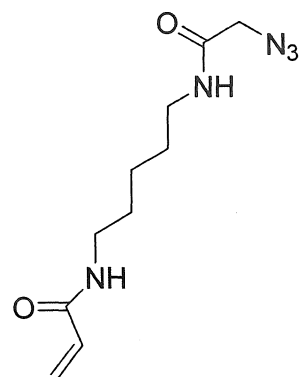
Các dạng số ít “một”, “một” và “một” bao gồm cả các tham chiếu số nhiều trừ khi ngữ cảnh biểu thị nội dung khác một cách rõ ràng.

Các thuật ngữ bao gồm, gồm có, chứa đựng và các dạng khác nhau của các thuật ngữ này đồng nghĩa với nhau và có nghĩa rộng như nhau.

Các thuật ngữ ở trên cùng, dưới cùng, dưới, trên, trên, v.v.. được sử dụng trong tài liệu này để mô tả tiêu bản dạng tế bào dòng chảy và/hoặc các thành phần khác nhau của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy. Cần phải hiểu rằng các thuật ngữ định hướng này không có nghĩa là sự định hướng cụ thể, mà được sử dụng để chỉ định hướng tương đối giữa các thành phần. Việc sử dụng các thuật ngữ định hướng không nên được diễn giải để giới hạn các ví dụ được đề xuất trong tài liệu này đối với (các) định hướng cụ thể.

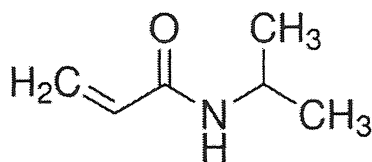
“Monome acrylamit” là monome có cấu trúc  hoặc monome bao gồm nhóm acrylamit có cấu trúc đó. Ví dụ về monome bao gồm nhóm acrylamit bao

gồm azido axetamido pentyl acrylamit:



và N-

isopropylacrylamit:



. Có thể sử dụng các monome acrylamit khác, một số ví dụ về chúng được nêu trong tài liệu này.

Như được sử dụng trong tài liệu này, “ankyl” 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 ankyl có thể có từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Các nhóm ankyl ví dụ bao gồm metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, butyl bậc ba, pentyl,

hexyl, và các nhóm tương tự. Ví dụ như ký hiệu “C1-C6 alkyl” biểu thị rằng có một đến sáu nguyên tử cacbon trong chuỗi ankyl, tức là chuỗi ankyl được chọn từ nhóm bao gồm methyl, ethyl, propyl, iso-propyl, n-butyl, isobutyl, sec-butyl và t-butyl.

Như được sử dụng trong tài liệu 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 cacbon. Các nhóm alkenyl ví dụ bao gồm etenyl, propenyl, butenyl, pentenyl, hexenyl, và các nhóm tương tự.

Như được sử dụng trong tài liệu 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 cacbon.

Như được sử dụng trong tài liệu này, “aralkyl” và “aryl (alkyl)” đề cập đến nhóm aryl được liên kết, như một nhóm thế, thông qua nhóm alkylen thấp hơn. Nhóm alkylen và aryl thấp hơn của aralkyl có thể được thế hoặc không được thế. Ví dụ bao gồm nhưng không giới hạn ở benzyl, 2-phenylalkyl, 3-phenylalkyl và naphthylalkyl.

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

“Amin” hoặc “amino” chỉ nhóm  $-NR_aR_b$ , trong đó mỗi  $R_a$  và  $R_b$  được chọn độc lập từ hydro (ví dụ:  $\text{---NH}_2$ ), C1-C6 alkyl, C2-C6 alkenyl, C2-C6 alkynyl, C3-C7 cacboxycyl, C6-C10 aryl, heteroaryl 5-10 cạnh và heterocycyl 5-10 cạnh như được xác định trong tài liệu này.

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “được gắn” đề cập đến trạng thái của hai vật được hợp nhất, gắn chặt, dính chặt, được kết nối hoặc liên kết với nhau hoặc gián tiếp hoặc trực tiếp. Ví dụ: axit nucleic có thể được gắn vào hydrogel polyme bằng liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị. Liên kết cộng hóa trị có đặc trưng là sự chia sẻ các cặp electron giữa các nguyên tử. Liên kết không cộng

hóa trị là liên kết vật lý không liên quan đến việc chia sẻ các cặp electron và có thể bao gồm, ví dụ như liên kết hydro, liên kết ion, lực Van der Waals, tương tác ưa nước và tương tác kỵ nước.

Nhóm chức “azit” hoặc “azido” đề cập đến  $-N_3$ .

Thuật ngữ “chất đồng trùng hợp khối” và đơn vị monome được tạo thành “trong khối” chỉ chất đồng trùng hợp được tạo thành khi hai hoặc nhiều monome nhóm lại với nhau và tạo thành các khối đơn vị lặp lại. Mỗi khối phải có ít nhất một đặc tính và/hoặc ít nhất một nhóm chức dành riêng cho khối (ví dụ: azit để gắn đoạn mồi, chất xúc tác, v.v.) mà không có trong các khối liền kề.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “hydrogel polyme xúc tác” được sử dụng để chỉ chất đồng trùng hợp có chất xúc tác được hợp nhất vào một trong các đơn vị monome, hoặc chỉ hydrogel polyme ban đầu có chất xúc tác được gắn vào đó. Trong tài liệu này, thuật ngữ “hydrogel polyme ban đầu” được dùng để chỉ hydrogel trùng hợp trước mọi phản ứng/tương tác để tạo ra chất xúc tác.

Như được sử dụng trong tài liệu này, “cacboxyclyl” có nghĩa là vòng hoặc hệ vòng tuần hoàn không thơm chỉ chứa nguyên tử cacbon trong xương sống của hệ vòng. Khi cacboxyclyl 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. Cacboxyclyl có thể có mức độ bão hòa bất kỳ, với điều kiện là ít nhất một vòng trong hệ vòng không thơm. Do đó, cacboxyclyl bao gồm xycloalkyls, xycloalkenyl và xycloalkynyl. Nhóm cacboxyclyl có thể có 3 đến 20 nguyên tử cacbon. Ví dụ về vòng cacboxyclyl bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xyclohexenyl, 2,3-đihydro-inđên, bixyclo[2.2.2]octanyl, adamantyl và spiro[4.4]nonanyl.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “axit carboxylic” hoặc “cacboxyl” được dùng để chỉ  $-COOH$ .

Như được sử dụng trong tài liệu này, “xycloalkyl” dùng để chỉ hệ thống vòng hydrocacbon đơn hoặc đa vòng hoàn toàn bão hòa (không có liên kết đôi hoặc ba). Khi bao gồm hai hoặc nhiều vòng, các vòng có thể được liên kết với nhau theo kiểu hợp nhất. Nhóm xycloalkyl có thể chứa từ 3 đến 10 nguyên tử trong (các) vòng.

Theo một số phương án, nhóm xycloalkyl có thể chứa từ 3 đến 8 nguyên tử trong (các) vòng. Nhóm xycloalkyl có thể không được thay thế hoặc được thay thế. Ví dụ nhóm xycloalkyl bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, xyclohexyl, xycloheptyl và xyclooctyl.

Như được sử dụng trong tài liệu này, “xycloalkenyl” hoặc “xycloalken” có nghĩa là vòng hoặc hệ vòng carbocyclyl 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.

Như được sử dụng trong tài liệu này, “xycloalkynyl” hoặc “xycloalkyn” có nghĩa là vòng hoặc hệ vòng carbocyclyl có ít nhất một liên kết ba, trong đó không có vòng nào trong hệ vòng là vòng thơm. Ví dụ là xyclooctyn. Một ví dụ khác là bixyclononyn.

Thuật ngữ "lắng đọng", như được sử dụng trong tài liệu này, đề cập đến mọi kỹ thuật ứng dụng phù hợp bất kỳ, có thể là thủ công hoặc tự động, và trong một số trường hợp, dẫn đến sự biến đổi các đặc tính bề mặt. Nói chung, có thể thực hiện bước lắng đọng bằng cách sử dụng kỹ thuật lắng đọng hơi, kỹ thuật phủ, kỹ thuật ghép hoặc các kỹ thuật tương tự. Một số ví dụ cụ thể bao gồm phương pháp bay hơi lắng đọng hóa học (CVD), lớp phủ phun (ví dụ: lớp phủ phun siêu âm), lớp phủ quay, lớp mạ nhúng hoặc lớp phủ nhúng, kỹ thuật tạo màng mỏng (doctor blade coating), kỹ thuật puddle dispensing, phủ chất lỏng tự động, in chất lỏng, in lụa, in vi liên kết, in phun, hoặc các kỹ thuật tương tự.

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ "lỗ" dùng để chỉ đặc điểm lõm rời rạc trong phần nền hoặc nhựa có hoa văn có lỗ bề mặt được bao quanh ít nhất một phần bởi (các) vùng kẽ của phần nền hoặc nhựa có hoa văn. Lỗ có thể có mọi hình dạng bất kỳ tại 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 một lỗ hoặc hai lỗ nối thông với nhau. Lỗ cũng có thể có các kiến trúc phức tạp hơn, như các đường gờ, các đặc điểm bước, v.v..

Thuật ngữ “mỗi” được sử dụng để chỉ tập hợp các mục, nhằm xác định từng mục trong tập hợp nhưng không nhất thiết đề cập đến mọi mục trong tập hợp. Trường hợp ngoại lệ có thể xảy ra nếu có sự đề xuất hoặc ngữ cảnh rõ ràng quy định khác.

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “tiêu bản dạng tế bào dòng chảy” được dùng để đề cập đến bình có khoang (ví dụ, 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 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 tài liệu này, “kênh dòng chảy” hoặc “kênh” có thể là vùng được xác định giữa hai thành phần được liên kết hoặc thành phần được gắn khác, vùng này có thể nhận mẫu chất lỏng có chọn lọc. Theo một số ví dụ, kênh dòng chảy có thể được xác định giữa phần nền có hoa văn hoặc không có hoa văn và nắp, và do đó có thể giao tiếp linh hoạt với một hoặc nhiều lỗ được xác định trong nhựa có hoa văn. Kênh dòng chảy cũng có thể được xác định giữa hai bề mặt phần nền có hoa văn hoặc không có hoa văn được liên kết với nhau.

Trong tài liệu này, “amin dị vòng” được sử dụng để chỉ hệ vòng hoặc vòng thơm (tức là hai hoặc nhiều vòng hợp nhất chia sẻ hai nguyên tử liên kề) chứa nitơ amin dưới dạng một hoặc chỉ một nguyên tử khác loại trong xương sống của vòng.

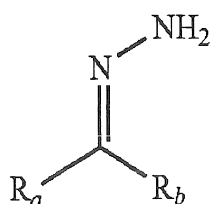
Trong tài liệu này, “heteroaryl” được dùng để chỉ hệ vòng hoặc vòng thơm (nghĩa là hai hoặc nhiều vòng hợp nhất chia sẻ hai nguyên tử liên kề) chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại, nghĩa là nguyên tố không phải là cacbon, bao gồm nhưng không giới hạn ở nitơ, oxy và lưu huỳnh trong xương sống của vòng. Khi heteroaryl là hệ vòng, mọi vòng trong hệ thống đều là vòng thơm. Nhóm heteroaryl có thể có 5-18 cạnh vòng (nghĩa là số nguyên tử tạo nên xương sống của vòng).

Như được sử dụng trong tài liệu này, “heterocyclyl” nghĩa là vòng hoặc hệ vòng tuần hoàn không thơm chứa ít nhất một nguyên tử khác loại trong xương sống của vòng. Các heterocyclyl có thể liên kết với nhau theo kiểu hợp nhất, cầu nối hoặc

kết nối hình xoắn ốc. Các heterocyclyl có thể có mọi mức độ bão hòa, với điều kiện là ít nhất một vòng trong hệ vòng không thơm. Trong hệ vòng, (các) nguyên tử khác loại có thể có trong vòng thơm hoặc vòng không thơm. Nhóm heterocyclyl có thể có 3 đến 20 cạnh vòng (nghĩa là số nguyên tử tạo nên xương sống của vòng, bao gồm nguyên tử cacbon và nguyên tử khác loại). Theo một số ví dụ, (các) nguyên tử khác loại là O, N hoặc S.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “hydrazin” hoặc “hydrazinyl” được dùng để chỉ nhóm  $-NHNH_2$ .

Trong tài liệu này, thuật ngữ “hydrazon” hoặc “hydrazonyl” được dùng để chỉ



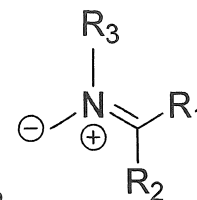
nhóm mà  $R_a$  và  $R_b$  đều được chọn lọc độc lập từ hydro, C1-C6 alkyl, C2-C6 alkenyl, C2-C6 alkynyl, C3-C7 cacboxyclyl, C6-C10 aryl, heteroaryl 5-10 cạnh và heterocyclyl 5-10 cạnh, như được xác định trong tài liệu này.

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

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “vùng kẽ” dùng để chỉ vùng, ví dụ, của phần nền, nhựa có hoa văn hoặc thành phần hỗ trợ khác ngăn cách các lỗ. Ví dụ: vùng kẽ có thể tách một lỗ của mảng với một lỗ khác của mảng. Hai lỗ tách rời nhau có thể rời rạc, nghĩa là không có sự tiếp xúc vật lý với nhau. Theo nhiều ví dụ, vùng kẽ là liên tục trong khi các lỗ rời rạc, ví dụ, như trường hợp của nhiều lỗ được xác định trong một bề mặt liên tục khác. Theo nhiều ví dụ, vùng kẽ và các đặc điểm là rời rạc, ví dụ, như trường hợp của nhiều rãnh được phân tách bởi các vùng kẽ tương ứng. Vùng kẽ thực hiện phân tách có thể là sự phân tách một phần hoặc toàn bộ. Các vùng kẽ có thể có vật liệu bề mặt khác với vật liệu bề mặt của các lỗ được xác định trên bề mặt. Ví dụ: rãnh có thể có polyme và đoạn môi thứ nhất được tạo thành trong đó, và vùng kẽ có thể không có polyme lẫn đoạn môi được tạo thành trên đó.

Như được sử dụng trong tài liệu này, “oxit nitril” có nghĩa là nhóm “ $R_aC\equiv N^+O^-$ ” mà trong đó  $R_a$  được xác định trong tài liệu này. Ví dụ về việc điều chế nitril oxit bao gồm sự tạo *nội vi* từ aldoxim bằng cách xử lý với cloramit-T hoặc thông qua sự hoạt hóa

bazơ trên imidoyl clorua  $[RC(Cl)=NOH]$  hoặc từ phản ứng giữa hydroxylamin và aldehyt.



Như được sử dụng trong tài liệu này, “nitron” có nghĩa là nhóm mà trong đó  $R_1$ ,  $R_2$  và  $R_3$  có thể là nhóm  $R_a$  và  $R_b$  bất kỳ như được xác định trong tài liệu này.

Như được sử dụng trong tài liệu này, “nucleotit” bao gồm nitơ chứa bazơ dị vòng, đường và một hoặc nhiều nhóm phosphat. Nucleotit là đơn vị monome của trình tự axit nucleic. Trong ARN, đường là riboza và trong ADN, đường là deoxyriboza, nghĩa là loại đường thiếu nhóm hydroxyl có ở vị trí 2' trong riboza. Nitơ chứa bazơ dị vòng (tức là nucleobase) có thể là bazơ purin hoặc bazơ pyrimidin. Các bazơ purin bao gồm adenin (A) và guanin (G), và các dẫn xuất đã biến đổi hoặc các chất tương tự của chúng. Các bazơ pyrimidin bao gồm cytosin (C), thymine (T), và uraxil (U), và các dẫn xuất đã biến đổi hoặc các chất tương tự của chúng. Nguyên tử C-1 của deoxyribose được liên kết với N-1 của pyrimidin hoặc N-9 của purin. Chất tương tự axit nucleic có thể có bất kỳ xương sống phosphat, đường hoặc nucleobase đã biến đổi. Ví dụ về các chất tương tự axit nucleic bao gồm, ví dụ, các bazơ phổ quát hoặc các chất tương tự xương sống phosphat, như axit nucleic peptit (PNA).

“Nhựa có hoa văn” dùng để chỉ bất kỳ polyme nào có thể có các lỗ được xác định trong đó. Các ví dụ cụ thể về nhựa và kỹ thuật tạo mẫu cho nhựa sẽ được mô tả thêm bên dưới.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “axit phosphonic” được dùng để chỉ  $R-PO_3H_2$ .

Như được sử dụng trong tài liệu này, “đoạn môi” được định nghĩa là trình tự axit nucleic sợi đơn (ví dụ: ADN sợi đơn hoặc ARN sợi đơn). Một số đoạn môi được đề cập trong tài liệu này dưới dạng đoạn môi khuếch đại đóng vai trò là điểm khởi đầu cho quá trình khuếch đại khuôn mẫu và tạo cụm. Các đoạn môi khác được đề cập trong tài liệu này dưới dạng đoạn môi giải trình tự đóng vai trò là điểm khởi đầu cho quá trình phân tích ADN hoặc ARN. Có thể biến đổi đầu cuối 5' để cho



phép phản ứng ghép cặp với nhóm chức của polyme. Chiều dài mỗi có thể dài bằng bất kỳ số lượng base nào và có thể bao gồm hàng loạt nucleotit không tự nhiên. Theo ví dụ, đoạn mỗi giải trình tự là sợi ngắn, dao động từ 10 đến 60 bazơ, hoặc từ 20 đến 40 bazơ.

Trong tài liệu này, “lớp vùng đệm” được dùng để chỉ vật liệu liên kết hai thành phần lại với nhau. Theo một số ví dụ, lớp vùng đệm này có thể là vật liệu hấp thụ bức xạ hỗ trợ liên kết, hoặc có thể được tiếp xúc với vật liệu hấp thụ bức xạ hỗ trợ liên kết.

Thuật ngữ “phần nền” chỉ cấu trúc mà trên đó các thành phần khác nhau của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy (ví dụ: hydrogel polyme xúc tác, đoạn mỗi, v.v..) có thể được thêm vào. Phần nền có thể là một màng nhện, panen, tấm hình chữ nhật, khuôn dập hoặc bất kỳ cấu hình phù hợp nào khác. Phần nền thường cứng và không hòa tan trong chất lỏng chứa nước. Phần nền có thể trợ với chất hóa học được sử dụng để biến đổi các lỗ hoặc chất có trong các lỗ. Ví dụ: phần nền có thể trợ với chất hóa học được sử dụng để tạo thành hydrogel polyme xúc tác, để gắn đoạn mỗi v.v.. Phần nền này có thể là cấu trúc một lớp hoặc cấu trúc nhiều lớp (ví dụ: bao gồm chất mang và nhựa được tạo mẫu trên chất mang). Ví dụ về phần nền phù hợp sẽ được mô tả thêm bên dưới.

Trong tài liệu này, thuật ngữ “axit sulfonic” được sử dụng để chỉ  $-S(=O)_2-OH$ .

Nhóm chức “thiol” là chỉ  $-SH$ .

Trong tài liệu này, thuật ngữ “tetrazin” và “tetrazinyl” được dùng để chỉ nhóm heteroaryl sáu cạnh bao gồm bốn nguyên tử nitơ. Tetrazin có thể được tùy chọn thay thế.

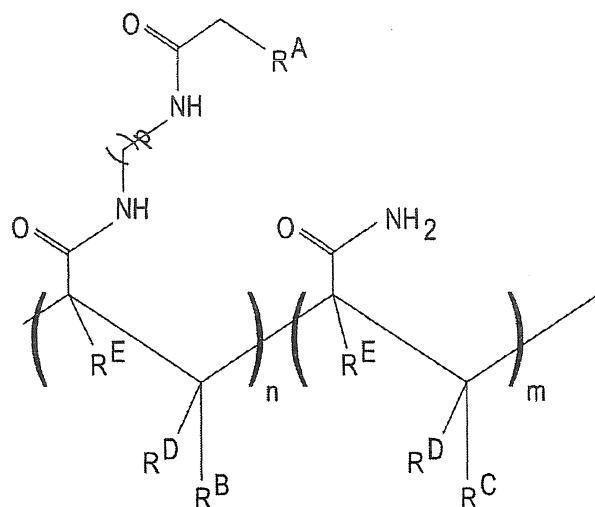
Trong tài liệu này, “tetrazol” được dùng để chỉ nhóm dị vòng năm cạnh bao gồm bốn nguyên tử nitơ. Tetrazol có thể được tùy chọn thay thế.

#### *Hydrogel polyme xúc tác*

Xương sống polyme theo ví dụ bất kỳ về hydrogel polyme xúc tác có thể là vật liệu polyme nửa cứng có thể thấm qua chất lỏng và khí. Theo một số ví dụ,

hydrogel polyme xúc tác bao gồm hydrogel polyme ban đầu có chất xúc tác được gắn vào đó. Theo các ví dụ này, chất xúc tác được thêm vào hydrogel polyme ban đầu bằng quy trình xử lý sau trùng hợp. Theo các ví dụ khác, hydrogel polyme xúc tác có thể là chất đồng trùng hợp bao gồm chất xúc tác ở một trong các thành phần monome của nó.

Ví dụ về hydrogel polyme ban đầu bao gồm chất đồng trùng hợp acrylamit, chẳng hạn như poly(N-(5-azidoacetamidylpentyl)acrylamit-co-acrylamit, PAZAM. PAZAM và một số dạng khác của chất đồng trùng hợp acrylamit được biểu thị bằng cấu trúc sau (I):



trong đó:

$R^A$  được chọn từ nhóm bao gồm azido, amino được tùy chọn thay thế, alkenyl được tùy chọn thay thế, alkyn được tùy chọn thay thế, halogen, hydrazon được tùy chọn thay thế, hydrazin được tùy chọn thay thế, carboxyl, hydroxy, tetrazol được tùy chọn thay thế, tetrazin được tùy chọn thay thế, nitril oxit, nitron, sulfat và thiol;

$R^B$  là H hoặc alkyl được tùy chọn thay thế;

Mỗi  $R^C$ ,  $R^D$  và  $R^E$  được chọn độc lập từ nhóm bao gồm H và alkyl được tùy chọn thay thế;

mỗi  $-(CH_2)_p-$  có thể được tùy chọn thay thế;

$p$  là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 50;

$n$  là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 50,000; và

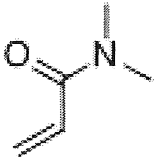
$m$  là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 100,000.

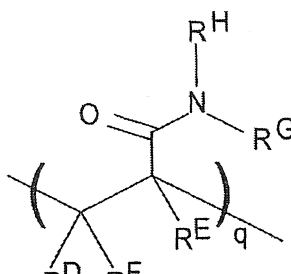
Một người có trình độ trung bình trong ngành sẽ nhận ra rằng sự sắp xếp của các đặc điểm “ $n$ ” và “ $m$ ” lặp lại trong cấu trúc (I) là điển hình và các tiểu đơn vị monome có thể hiện diện ở thứ tự bất kỳ trong cấu trúc polyme (ví dụ: ngẫu nhiên, khối, được tạo mẫu hoặc các sự kết hợp của chúng).

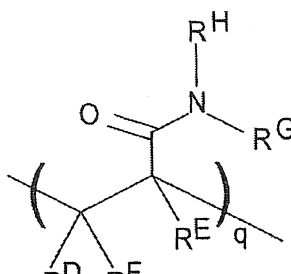
Phân tử lượng của PAZAM và các dạng khác của chất đồng trùng hợp acrylamit có thể trong khoảng từ khoảng 5 kDa đến khoảng 1500 kDa, hoặc từ khoảng 10 kDa đến khoảng 1000 kDa hoặc theo ví dụ cụ thể có thể là khoảng 312 kDa.

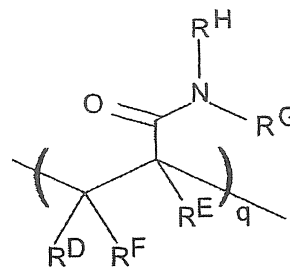
Theo một số ví dụ, PAZAM và các dạng khác của chất đồng trùng hợp acrylamit là polyme mạch thẳng. Theo một số ví dụ khác, PAZAM và các dạng khác của chất đồng trùng hợp acrylamit là polyme liên kết ngang nhẹ.

Theo các ví dụ khác, hydrogel polyme ban đầu có thể là biến thể của cấu trúc (I). Theo một ví dụ, đơn vị acrylamit có thể được thay thế bằng N,N-

đimetylacrylamit (  ). Theo ví dụ này, đơn vị acrylamit trong cấu trúc (I)

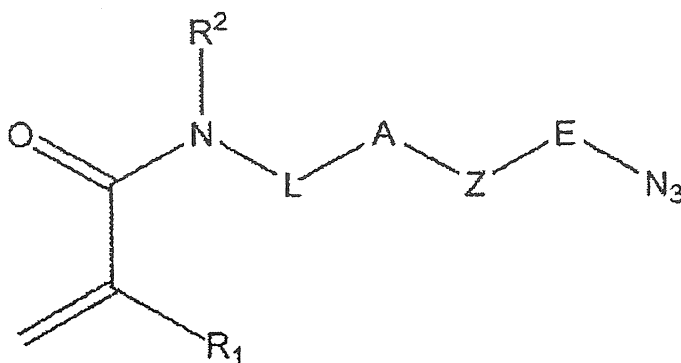


có thể được thay thế bằng , trong đó mỗi  $R^D$ ,  $R^E$  và  $R^F$  là H hoặc C1-C6 alkyl, và mỗi  $R^G$  và  $R^H$  là C1-C6 alkyl (thay vì H như trường hợp với acrylamit). Theo ví dụ này,  $q$  có thể là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 100.000. Theo một ví dụ khác, N,N-đimetylacrylamit có thể được sử dụng ngoài đơn vị



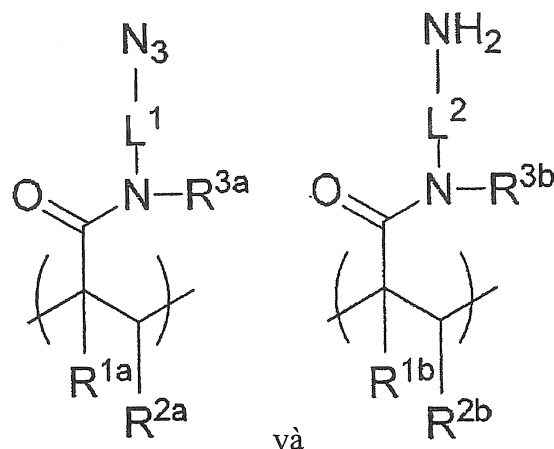
acrylamit. Theo ví dụ này, cấu trúc (I) có thể bao gồm các đặc điểm “n” và “m” lặp lại, trong đó mỗi  $R^D$ ,  $R^E$  và  $R^F$  là H hoặc C1-C6 alkyl và mỗi  $R^G$  và  $R^H$  là C1-C6 alkyl. Theo ví dụ này, q có thể là số nguyên trong khoảng từ 1 đến 100.000.

Như một ví dụ khác về hydrogel polyme ban đầu, đặc điểm “n” lặp lại trong cấu trúc (I) có thể được thay thế bằng monome bao gồm nhóm azido dị vòng có cấu trúc (II):



trong đó  $R^1$  là H hoặc C1-C6 alkyl;  $R^2$  là H hoặc C1-C6 alkyl; L là cầu nối bao gồm chuỗi thẳng có 2 đến 20 nguyên tử được chọn từ nhóm bao gồm cacbon, oxy và nitơ và 10 nhóm thế tùy chọn trên nguyên tử cacbon và nguyên tử nitơ bất kỳ trong chuỗi này; E là chuỗi thẳng bao gồm 1 đến 4 nguyên tử được chọn từ nhóm bao gồm cacbon, oxy và nitơ, và các nhóm thế tùy chọn trên cacbon và nguyên tử nitơ bất kỳ trong chuỗi này; A là amit được thế N bằng H hoặc C1-C4 alkyl gắn với N; và Z là dị vòng chứa nitơ. Các ví dụ về Z bao gồm 5 đến 10 cạnh vòng có mặt dưới dạng cấu trúc mạch vòng đơn hoặc cấu trúc hợp nhất. Một số ví dụ cụ thể về Z bao gồm pyrrolidinyl, pyridinyl hoặc pyrimidinyl.

Vẫn theo một ví dụ khác, hydrogel polyme ban đầu có thể bao gồm đơn vị lặp lại của mỗi cấu trúc (III) và (IV):



trong đó mỗi  $R^{1a}$ ,  $R^{2a}$ ,  $R^{1b}$  và  $R^{2b}$  được chọn độc lập từ hydro, alkyl được tùy chọn thay thế hoặc phenyl được tùy chọn thay thế; mỗi  $R^{3a}$  và  $R^{3b}$  được chọn độc lập từ hydro, alkyl được tùy chọn thay thế, phenyl được tùy chọn thay thế hoặc C7-C14 aralkyl được tùy chọn thay thế; và mỗi  $L^1$  và  $L^2$  được chọn độc lập từ cầu nối alkylen được tùy chọn thay thế hoặc cầu nối heteroalkylen được tùy chọn thay thế.

Cần hiểu rằng các phân tử khác có thể được sử dụng để tạo thành hydrogel polyme ban đầu, miễn là chúng được chức hóa để ghép đoạn mỗi oligonucleotit vào đó. Các ví dụ khác về lớp polyme phù hợp bao gồm các lớp có cấu trúc dạng keo như agarosa; hoặc cấu trúc lưới polyme như gelatin; hoặc cấu trúc polyme liên kết ngang như polyme polyacrylamit và chất đồng trùng hợp, acrylamit không chứa silan (SFA) hoặc dạng azidolyzed của SFA. Ví dụ về polyme polyacrylamit phù hợp có thể được tổng hợp từ acrylamit và axit acrylic hoặc axit acrylic chứa nhóm vinyl, hoặc từ monome tạo thành [2+2] phản ứng cộng vòng quang. Vẫn theo các ví dụ khác về hydrogel polyme ban đầu phù hợp bao gồm hỗn hợp chất đồng trùng hợp của acrylamit và acrylat. Có thể sử dụng nhiều cấu trúc polyme có chứa monome acrylic (ví dụ: acrylamit, acrylat, v.v.) trong các ví dụ được công bố trong tài liệu này, chẳng hạn như polyme phân nhánh bao gồm polyme hình sao, polyme dạng sao hoặc polyme khối sao, dendrime và các loại tương

tự. Ví dụ: các monome (ví dụ: acrylamit, acrylamit có chứa chất xúc tác, v.v.) có thể được kết hợp ngẫu nhiên hoặc theo khối vào các nhánh của polyme dạng sao.

Hydrogel polyme ban đầu có thể được tạo thành bằng quá trình đồng trùng hợp phù hợp bất kỳ. Sau đó, chất xúc tác có thể được gắn vào hydrogel polyme ban đầu để tạo thành hydrogel polyme xúc tác. Có thể sử dụng nhiều kỹ thuật sau trùng hợp khác nhau để gắn chất xúc tác vào hydrogel polyme ban đầu.

Theo một ví dụ, chất xúc tác có thể được ghép vào hydrogel polyme ban đầu. Theo phương pháp ví dụ này, bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm bước tổng hợp hydrogel polyme ban đầu (không bao gồm chất xúc tác); và bước ghép chất xúc tác vào hydrogel polyme ban đầu. Theo một ví dụ, việc ghép nối liên quan đến phản ứng hóa học click, ví dụ như phản ứng hóa học click có đồng xúc tác hoặc sử dụng phản ứng hóa học click không có chất xúc tác được thúc đẩy sức căng, chẳng hạn như với bixyclo[6.1.0] non-4-yne (BCN). Trong một trường hợp, phản ứng hóa học click dẫn đến liên kết cộng hóa trị của chất xúc tác với hydrogel polyme ban đầu. Cần hiểu rằng việc xảy ra phản ứng này sẽ phụ thuộc vào hóa học của hydrogel polyme ban đầu và chất xúc tác.

Bất kỳ phân tử phản ứng, nhóm chức, v.v. nào làm tăng tốc độ phản ứng hóa học phân cắt nhóm chặn 3' OH khỏi nucleotit hợp nhất đều có thể được sử dụng làm chất xúc tác. Cần hiểu rằng bất kỳ chất xúc tác axit, chất xúc tác bazơ, chất xúc tác hữu cơ, chất xúc tác enzym, chất xúc tác peptit hoặc chất xúc tác DNAzyme nào đều có thể được ghép vào hydrogel polyme ban đầu. Một số chất xúc tác được liệt kê có thể thuộc hai trong số các loại chất xúc tác đã liệt kê. Theo một số ví dụ cụ thể, chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm axit phosphonic; amin dị vòng; enzym; peptit; DNAzyme; kim loại của phức chất kim loại-phối tử; chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene và các tổ hợp của chúng; và bộ tạo axit quang.

Theo một số ví dụ, chất xúc tác là chất xúc tác axit được chọn từ nhóm bao gồm axit carboxylic, axit phosphonic, axit sunfonic và các tổ hợp của chúng. Chất xúc tác axit có thể xúc tác phản ứng thủy phân diễn ra trong quá trình giải khối.

Theo các ví dụ khác, chất xúc tác là chất xúc tác bazơ được chọn từ nhóm bao gồm amin, amin dị vòng và các tổ hợp của chúng. Các bazơ Lewis như thioete, triazol, imidazol, v.v., có thể đặc biệt thích hợp để xúc tác phản ứng azit phosphin (bước 1 trong Hình 1). Chất xúc tác bazơ có thể xúc tác phản ứng thủy phân diễn ra trong quá trình giải khối.

Chất xúc tác hữu cơ bao gồm cacbon, hydro, lưu huỳnh và/hoặc các nguyên tố á kim khác được tìm thấy trong hợp chất hữu cơ và làm tăng tốc độ của phản ứng hóa học loại bỏ. Các chất xúc tác hữu cơ dùng làm ví dụ có thể được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene, và các tổ hợp của chúng.

Chất xúc tác enzyme có thể là hydrolaza. Ví dụ về các hydrolaza phù hợp bao gồm phosphatasa, esteraza (ví dụ: axetylcholinesteraza, lipaza, v.v.), proteaza dành riêng cho trình tự (ví dụ: TEV proteaza hoặc thrombin), và glycosidaza (không làm suy giảm ribosa như xenluloza hoặc amylaza). Một hydrolaza phù hợp khác là cacbonic anhydrazaza. Một chất xúc tác enzyme khác là serin proteaza, chất này phân cắt các liên kết peptit trong protein và có thể xúc tác quá trình thủy phân amit và este.

Các chất xúc tác khác bao gồm DNAzyme, còn được gọi là deoxyribozym hoặc enzym ADN. Ví dụ về DNAzyme bao gồm các DNAzyme nhắm đích thủy phân nhóm este như ADN tương tự của enzym, chẳng hạn như esteraza. Theo những ví dụ này, phản ứng hóa học loại bỏ được xúc tác bởi DNAzyme.

Trong khi một số ví dụ đã được cung cấp, người ta cho rằng có thể sử dụng enzym hoặc enzym được cấu tạo có sẵn bất kỳ, miễn là enzym này có khả năng xúc tác loại bỏ nhóm chặn 3' OH.

Ví dụ về chất xúc tác peptit bao gồm esteraza barel  $\beta$  siêu phân tử có mặt ngoài kỵ nước và mặt trong lỗ rỗng giàu histidin, chất xúc tác peptit tự gắn và các tập hợp peptit xúc tác khác. Theo những ví dụ này, phản ứng hóa học loại bỏ do peptit xúc tác.

Theo một ví dụ khác, chất xúc tác có thể được hợp nhất thông qua liên kết không cộng hóa trị vào bề mặt của hydrogel polyme ban đầu. Các liên kết không cộng hóa trị có thể bao gồm, ví dụ như lai với oligonucleotit được ghép bề mặt hydrogel polyme ban đầu, các mảng liên kết hydro, biotin-streptavidin hoặc các liên kết tương tự khác, tạo phức chất kim loại-phối tử hoặc tương tự.

Hình 2 mô tả dưới dạng giản đồ một ví dụ về liên kết không cộng hóa trị của chất xúc tác. Cụ thể, Hình 2 mô tả oligonucleotit 14 được gắn vào hydrogel polyme ban đầu 16, và chất xúc tác 18 được gắn vào liên kết oligonucleotit bổ sung 20 được lai với oligonucleotit 14. Oligonucleotit 14 được gắn với hydrogel polyme ban đầu 16 có thể được ghép như được mô tả trong tài liệu này theo Hình 3A đến 3C dành cho đoạn môi khuếch đại (ví dụ: thông qua phản ứng hóa học click tại azit cuối). Oligonucleotit 14 có thể có từ 5 đến 20 nucleotit (được minh họa là N trong Hình 2), và trình tự có thể giống hoặc khác với trình tự của đoạn môi khuếch đại (được trình bày bên dưới). Chất xúc tác 18 được gắn vào liên kết 20, có trình tự bổ sung cho oligonucleotit 14. Chất xúc tác 18 có thể được gắn theo ví dụ minh họa trong Hình 2 bao gồm mọi chất xúc tác axit, chất xúc tác bazơ, chất xúc tác hữu cơ (ví dụ: imidazol, guanidin, v.v.), chất xúc tác đồng, chất xúc tác enzym, chất xúc tác peptit hoặc chất xúc tác DNAzyme.

Các chất xúc tác đồng phù hợp có thể bao gồm chất xúc tác đồng(I) như đồng(I) axetat, đồng(I) bromit, đồng(I) clorua, đồng(I) iotua, bis(1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene)đồng(I) tetrafluoroborat, Bis[(tetrabutylamonium iotua)đồng(I) iotua], [Bis(trimetylsilyl)axetylen](hexafluoroaxetylacetonato)đồng(I), Bromotris(triphenylphosphin)đồng(I), cloro(1,5-xyclooctadien)đồng(I) đime, Đồng(I) 3-metylsalicylat, v.v.

Ví dụ về phương pháp tạo thành hydrogel polyme xúc tác 16' được minh họa trong Hình 2 bao gồm bước tổng hợp hydrogel polyme ban đầu 16 (không bao gồm chất xúc tác 18); bước ghép oligonucleotit 14 với hydrogel polyme ban đầu 16; và bước lai liên kết oligonucleotit bổ sung 20 với oligonucleotit 14, trong đó chất xúc tác 18 được gắn vào liên kết oligonucleotit bổ sung 20 này.

Một ví dụ khác về liên kết không cộng hóa trị của chất xúc tác 18 với hydrogel polyme ban đầu 16 bao gồm các mảng liên kết hydro. Theo ví dụ này, chất xúc tác



18 được liên kết hydro với hydrogel polyme 16. Có thể sử dụng cặp liên kết hydro bất kỳ, trong đó một thành phần của cặp này được liên kết cộng hóa trị với hydrogel polyme ban đầu và thành phần khác của cặp này được gắn vào chất xúc tác 18. Ví dụ về các cặp liên kết hydro bao gồm  $O\cdots H$ ,  $NH\cdots N$  và  $CH\cdots N$ , v.v.

Vẫn theo một ví dụ khác về liên kết không cộng hóa trị của chất xúc tác 18 với hydrogel polyme ban đầu 16 bao gồm việc tạo phức chất kim loại-phối tử. Theo một ví dụ, chất xúc tác 18 là kim loại của phức chất kim loại-phối tử được gắn vào hydrogel polyme ban đầu 16. Chất xúc tác 18 có thể là kim loại xúc tác phù hợp bất kỳ, chẳng hạn như đồng, paladi, ruthenium, v.v. Kim loại xúc tác này tạo phức với phối tử mà được gắn với hydrogel polyme ban đầu 16. Ví dụ về phức hợp kim loại-phối tử bao gồm phức chất đồng (II) với phối tử, chẳng hạn như bis(2-pyridylmetyl)-amin hoặc xyclodextrin được chức hóa pyridin.

Ví dụ về phương pháp tạo thành ví dụ này về hydrogel polyme xúc tác 16' bao gồm bước tổng hợp hydrogel polyme ban đầu 16; và bước gắn phức chất kim loại-phối tử vào hydrogel polyme ban đầu 16, trong đó kim loại của phức chất kim loại-phối tử là chất xúc tác 18.

Các chất xúc tác khác 18 vẫn có thể được gắn vào hydrogel polyme ban đầu 16 bao gồm bộ tạo axit quang. Khi dùng bộ tạo axit quang làm chất xúc tác 18, hoạt tính xúc tác có thể được khởi tạo hoặc tăng cường khi tiếp xúc với tác nhân kích thích bên ngoài, chẳng hạn như photon ở bước sóng tương ứng với bộ tạo axit quang cụ thể.

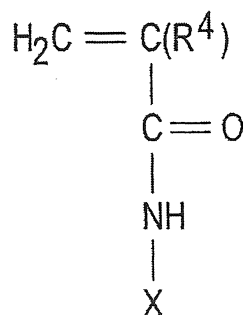
Chất xúc tác bộ tạo axit quang có thể được gắn vào hydrogel polyme 16' thông qua phản ứng hóa học khách-chủ (guest-host chemistry), trong đó chất xúc tác 18 là khách và chủ có khả năng i) gắn vào hydrogel polyme 16' và ii) giữ khách cho đến khi được kích thích bằng kích thích bên ngoài. Ví dụ về các hợp chất chủ bao gồm cucurbituril và xyclodextrin. Ví dụ về loại khách của chất xúc tác bộ tạo axit quang là bộ tạo axit quang dựa trên ánh sáng có thể nhìn thấy/màu xanh dương. Chất xúc tác quang hóa (ví dụ: bộ tạo axit quang) cũng có thể được sử dụng làm khách trong các ví dụ về chủ-khách.

Phân tử khách-chủ có thể được gắn vào hydrogel polyme ban đầu 16 bằng kỹ thuật bất kỳ trong số các kỹ thuật sau trùng hợp (ví dụ: bước ghép, liên kết không cộng hóa trị) được bộc lộ trong tài liệu này.

Trong khi một số ví dụ đã được cung cấp, cần hiểu rằng chất xúc tác 18 được gắn vào hydrogel polyme ban đầu 16 có thể phụ thuộc một phần vào phản ứng hóa học của hydrogel polyme ban đầu 16 và phản ứng hóa học của nhóm chặn 12 có trên nucleotit 10 mà sẽ được đưa vào hydrogel polyme xúc tác 16'.

Theo các ví dụ khác được công bố trong tài liệu này, hydrogel polyme ban đầu 16 không được sử dụng. Thay vào đó, sản phẩm của quá trình đồng trùng hợp là hydrogel polyme xúc tác 16'. Theo các ví dụ này, chất xúc tác 18 được hợp nhất thành đơn vị monome mà được sử dụng trong quá trình đồng trùng hợp.

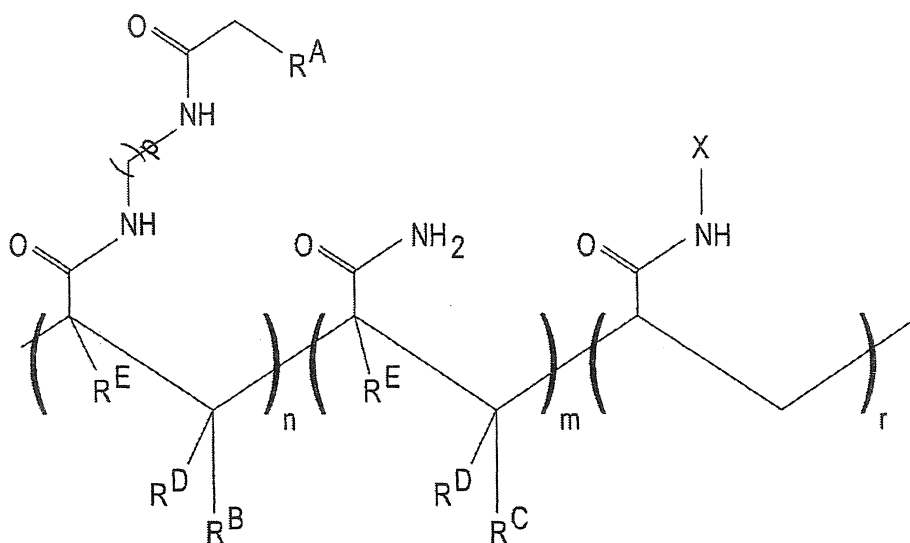
Theo các ví dụ này, chất xúc tác 18 có thể là một phần của đơn vị monome acrylamit bất kỳ được mô tả trong tài liệu này đối với hydrogel polyme ban đầu 16. Ví dụ: R<sup>A</sup> trong cấu trúc (I) có thể là nhóm cacboxyl, đây là một ví dụ về chất xúc tác axit. Đối với một ví dụ khác, R<sub>2</sub> trong cấu trúc (II) có thể là C1-C6 alkyl và chất xúc tác 18 có thể được kết hợp làm nhóm cuối của chuỗi C1-C6 alkyl. Chất xúc tác chứa đơn vị monome có thể được đồng trùng hợp (ngẫu nhiên hoặc theo khối) với đơn vị monome acrylamit bất kỳ được mô tả trong tài liệu này, miễn là một trong các đơn vị này bao gồm nhóm chức ghép đoạn mồi. Một ví dụ về chất xúc tác chứa đơn vị monome acrylamit có thể được sử dụng được minh họa trong cấu trúc (V):



trong đó  $R^4$  là H hoặc  $CH_3$ , và X là nhóm chức có chức năng làm chất xúc tác. Theo một số ví dụ, chất xúc tác (X) này có thể là ví dụ bất kỳ về chất xúc tác axit, chất xúc tác bazơ hoặc chất xúc tác hữu cơ được công bố trong tài liệu này. Theo một số ví dụ, nhóm liên kết (chẳng hạn như nhóm alkyl, chuỗi poly(etylen glycol) ngắn, v.v.) có thể được đặt giữa NH và chất xúc tác (X).

Các ví dụ khác về chất xúc tác chứa đơn vị monome có thể được sử dụng bao gồm monome (meth)acrylic (ví dụ: axit acrylic, axit metacrylic) có chất xúc tác (X) gắn vào đó.

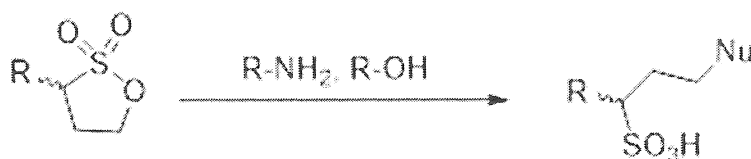
Theo một phương pháp ví dụ, bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác 16 'bao gồm bước đồng trùng hợp monome thứ nhất gồm nhóm chức ghép đoạn môi (ví dụ: azit) với monome thứ hai gồm chất xúc tác 18. Theo một số ví dụ, đơn vị monome acrylamit thứ ba cũng có thể được sử dụng trong quá trình đồng trùng hợp. Một ví dụ về chất đồng trùng hợp được tạo thành theo phương pháp này được thể hiện ở cấu trúc (VI):



trong đó  $R^A$ ,  $R^B$ ,  $R^C$ ,  $R^D$  và  $R^E$ , và p như được mô tả cho cấu trúc (I), X như được mô tả cho cấu trúc (V), n và r trong khoảng độc lập từ 5 mol% đến 30 mol% và m là số mol% còn lại.

Theo một ví dụ, nồng độ bề mặt của chất xúc tác 18 có thể thuộc phạm vi từ khoảng 0,01 % đến khoảng 50 % đơn vị lặp lại của hydrogel polyme 16'. Các nồng độ này có thể vượt quá nồng độ dung dịch chất xúc tác thực tế, điều này góp phần vào hiệu quả cao của các ví dụ được công bố trong tài liệu này.

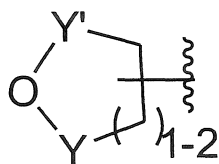
Vẫn theo các ví dụ khác, nhóm chức đáp ứng nucleophile có thể được sử dụng làm điểm neo cho chất xúc tác 18 hoặc tạo ra chất xúc tác *nội vi*. Theo một số ví dụ, nhóm chức đáp ứng nucleophile là este sulfonat vòng (chẳng hạn như vòng sulton) có thể trải qua phản ứng mở vòng khi tiếp xúc với nucleophile, trong một số trường hợp ở điều kiện cơ bản (pH cao), chẳng hạn như pH 9 hoặc cao hơn. Ví dụ về phản ứng mở vòng của sulton là:



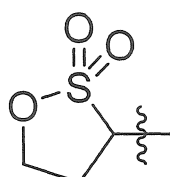
Theo một ví dụ, phản ứng mở vòng này có thể được thực hiện trong quá trình giải khối, do đó chất xúc tác 18 như axit hoặc bazơ, được tạo ra *nội vi*. Nhóm chức đáp ứng nucleophile có thể được coi là tiền chất của chất xúc tác được gắn vào hydrogel polyme xúc tác 16'.

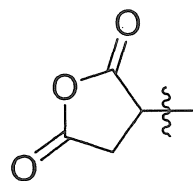
Theo một ví dụ khác, “Nu” là chất xúc tác 18 và phản ứng mở vòng tạo ra liên kết cộng hóa trị với những gì trước đó là sulton. Phản ứng này có thể được tạo thành trước khi giải trình tự để có chất xúc tác 18 khi thực hiện giải khối.

Các ví dụ khác về nhóm chức đáp ứng nucleophile có cấu trúc sau:



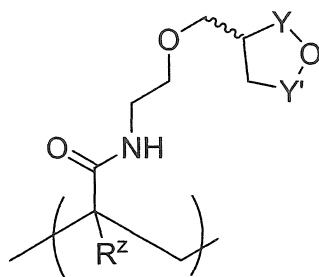
trong đó (a) Y là SO<sub>2</sub> và Y' là CH<sub>2</sub>; hoặc (b) Y và Y' đều là C(O). Theo các

phương án khác, nhóm chức đáp ứng nucleophile là:  hoặc

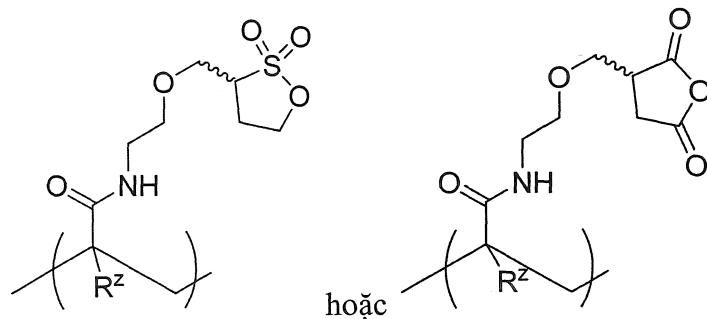


. Các nucleophile phù hợp bao gồm alkyl amin chính và cồn alkyl chính.

Theo một số phương án, monome bao gồm nhóm chức đáp ứng nucleophile là:



Theo các ví dụ cụ thể, monome là:



*Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy*

Hydrogel polyme 16 và chất xúc tác hợp nhất 18 có thể được sử dụng trong tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22, ví dụ được mô tả trong Hình 3A. Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 bao gồm phần nền 24 và hydrogel polyme xúc tác 16' trên phần nền 24.

Phần nền 24 có thể là một lớp/vật liệu. Các ví dụ về các phần nền một lớp phù hợp bao gồm epoxy siloxan, thủy tinh và thủy tinh đã được biến đổi hoặc chức hóa, silsequioxan đa diện và các dẫn xuất của chúng, nhựa (bao gồm acrylic, polystyren và copolyme của styren và các vật liệu khác, polypropylen, polyetylen, polybutylen, polyuretan, polytetrafluoroetylen (chẳng hạn như TEFLON® FROM Chemours), polyme olefin/xyclo-olefin có vòng (COP) (chẳng hạn như ZEONOR® từ Zeon, polyimit, v.v.), nylon (polyamit), gốm/oxit gốm, silica, silica nung chảy hoặc vật liệu gốc silica, nhôm silicat, silic và silic biến đổi (ví dụ: p + silic pha tạp bo), silic nitrit ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), silic oxit ( $\text{SiO}_2$ ), tantali pentoxit hoặc (các) oxit tantali ( $\text{TaO}_x$ ) khác, oxit hafini, cacbon, kim loại, thủy tinh vô cơ hoặc các vật liệu tương tự. Phần nền 24 cũng có thể là cấu trúc nhiều lớp. Một số ví dụ về cấu trúc nhiều lớp bao gồm thủy tinh hoặc silic, với một lớp phủ oxit tantali hoặc một oxit gốm khác ở bề mặt. Các ví dụ khác về cấu trúc nhiều lớp bao gồm thành phần hỗ trợ đỡ bên dưới (ví dụ, thủy tinh hoặc silic) có nhựa có hoa văn trên đó. Vẫn theo những ví dụ khác, phần nền nhiều lớp có thể bao gồm phần nền kỹ thuật SOI (silicon-on-insulator).

Theo ví dụ, phần nền 24 có thể có đường kính trong phạm vi từ khoảng 2 mm đến khoảng 300 mm, hoặc tấm hoặc panel hình chữ nhật có kích thước lớn nhất lên đến khoảng 10 feet (~ 3 mét). Theo ví dụ, phần nền 24 là tấm wafer có đường kính trong phạm vi từ khoảng 200 mm đến khoảng 300 mm. Theo một ví dụ khác, phần nền 24 là khuôn có chiều rộng trong phạm vi từ khoảng 0,1 mm đến khoảng 10 mm. Trong khi các kích thước ví dụ đã được đề xuất, cần hiểu rằng có thể sử dụng phần nền 24 với mọi kích thước phù hợp. Ví dụ khác, phần nền có thể được sử dụng là thành phần đỡ hình chữ nhật, có diện tích bề mặt lớn hơn tấm wafer tròn 300 mm.

Theo ví dụ minh họa trong Hình 3A, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 bao gồm các kênh dòng chảy 26. Trong khi một số kênh dòng chảy 26 được minh họa, cần hiểu rằng số lượng kênh 26 bất kỳ có thể được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 (ví

dụ: một kênh 26, bốn kênh 26, v.v.). Mỗi kênh dòng chảy 26 là vùng được xác định giữa hai thành phần được liên kết (ví dụ: phần nền 24 và nắp hoặc hai phần nền 24), mà có thể có chất lỏng (ví dụ: những chất được mô tả trong tài liệu này) được đưa vào đó và bị loại ra khỏi đó. Mỗi kênh dòng chảy 26 có thể được phân lập với mỗi kênh dòng chảy 26 khác để chất lỏng được đưa vào kênh dòng chảy cụ thể 26 bất kỳ không chảy vào kênh dòng chảy liền kề 26 bất kỳ. Một số ví dụ về chất lỏng được đưa vào kênh dòng chảy 26 có thể đưa vào các thành phần phản ứng (ví dụ: polymeraza, đoạn môi giải trình tự, nucleotit, v.v.), dung dịch rửa, chất giải khối, v.v.

Kênh dòng chảy 26 có thể được xác định trong phần nền 24 bằng mọi kỹ thuật phù hợp, một phần phụ thuộc vào vật liệu của phần nền 24. Theo một ví dụ, kênh dòng chảy 26 được khắc vào phần nền thủy tinh 24. Theo một ví dụ khác, kênh dòng chảy 26 có thể được tạo mẫu thành nhựa của phần nền nhiều lớp 24 bằng kỹ thuật in quang khắc, in thạch bản nano (nanoimprint lithography), v.v.. Vẫn theo một ví dụ khác, vật liệu riêng biệt (không được minh họa) có thể được sử dụng cho phần nền 24 sao cho vật liệu riêng biệt này xác định các thành của kênh dòng chảy 26 và phần nền 24 xác định đáy của kênh dòng chảy 26.

Theo ví dụ, kênh dòng chảy 26 có hình dạng chữ nhật. Chiều dài và chiều rộng của kênh dòng chảy 26 có thể nhỏ hơn tương ứng so với chiều dài và chiều rộng của phần nền 24, sao cho phần bề mặt phần nền 24 bao quanh kênh dòng chảy 26 có sẵn để liên kết với nắp (không được minh họa) hoặc một phần nền 24 khác. Trong một số trường hợp, chiều rộng của mỗi kênh dòng chảy 26 có thể ít nhất khoảng 1 mm, ít nhất khoảng 2,5 mm, ít nhất khoảng 5 mm, ít nhất khoảng 7 mm, ít nhất khoảng 10 mm hoặc hơn. Trong một số trường hợp, chiều dài của mỗi kênh dòng chảy 26 có thể ít nhất khoảng 10 mm, ít nhất khoảng 25 mm, ít nhất khoảng 50 mm, ít nhất khoảng 100 mm hoặc hơn. Chiều rộng và/hoặc chiều dài của mỗi kênh dòng chảy 26 có thể lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị được chỉ định ở trên. Theo một ví dụ khác, kênh dòng chảy 26 là hình vuông (ví dụ: 10 mm x 10 mm).

Độ sâu của mỗi kênh dòng chảy 26 có thể nhỏ như độ dày một lớp khi sử dụng công nghệ bồi đắp vật liệu vi liên kết, sol khí hoặc phun để làm lắng đọng vật liệu riêng biệt xác định các thành của kênh dòng chảy. Đối với các ví dụ khác, độ sâu

của mỗi kênh dòng chảy 26 có thể là khoảng 1  $\mu\text{m}$ , khoảng 10  $\mu\text{m}$ , khoảng 50  $\mu\text{m}$ , khoảng 100  $\mu\text{m}$  hoặc hơn. Theo ví dụ, độ sâu có thể dao động từ khoảng 10  $\mu\text{m}$  đến khoảng 100  $\mu\text{m}$ . Theo ví dụ khác, độ sâu khoảng 5  $\mu\text{m}$  trở xuống. Cần hiểu rằng độ sâu của mỗi kênh dòng chảy 26 lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị được quy định ở trên.

Các ví dụ khác nhau về cấu trúc bên trong kênh dòng chảy 26 của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 được minh họa trong Hình 3B và Hình 3C.

Theo ví dụ được minh họa trong Hình 3B, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 bao gồm phần nền một lớp 24A và kênh dòng chảy 26 được xác định trong phần nền một lớp 24A. Theo ví dụ này, hydrogel polyme xúc tác 16' được đặt trong kênh dòng chảy 26.

Để đưa hydrogel polyme xúc tác 16' vào kênh dòng chảy 26, hỗn hợp hydrogel polyme xúc tác 16' có thể được tạo ra và sau đó được sử dụng cho phần nền 24 (có kênh dòng chảy 26 được xác định trong đó). Theo một ví dụ, hydrogel polyme xúc tác 16' có thể có trong hỗn hợp (ví dụ: với nước hoặc với etanol và nước). Sau đó, hỗn hợp này có thể được sử dụng cho bề mặt phần nền (bao gồm trong kênh dòng chảy 26) bằng cách sử dụng phương pháp phủ quay, hoặc nhúng hoặc phủ nhúng, hoặc lưu lượng vật liệu dưới áp lực dương hoặc âm hoặc kỹ thuật phù hợp khác. Các loại kỹ thuật này lắng đọng toàn bộ hydrogel polyme xúc tác 16' trên phần nền 24 (ví dụ, trong kênh dòng chảy 26 và trên các vùng kẽ 28). Các kỹ thuật lắng đọng chọn lọc khác (ví dụ liên quan đến mặt nạ, kỹ thuật in có kiểm soát, v.v.) có thể được sử dụng để lắng đọng đặc biệt hydrogel polyme xúc tác 16' trong kênh dòng chảy 26 và không phải trên các vùng kẽ 28.

Theo một số ví dụ, bề mặt phần nền (bao gồm cả phần tiếp xúc trong kênh dòng chảy 26) có thể được hoạt hóa, và sau đó hỗn hợp (bao gồm hydrogel polyme xúc tác 16') có thể được sử dụng vào đó. Theo một ví dụ, silan hoặc dẫn xuất silan (ví dụ, silan norbornen) có thể được lắng đọng trên bề mặt phần nền bằng cách sử dụng phương pháp lắng đọng hơi, phương pháp phủ quay, hoặc các phương pháp lắng đọng khác. Theo một ví dụ khác, bề mặt phần nền có thể tiếp xúc với quá trình plasma ashing (quá trình loại bỏ chất cản quang (lớp phủ nhạy sáng) khỏi tấm wafer



đã được khắc) để tạo ra chất hoạt hóa bề mặt (ví dụ: nhóm -OH) có thể bám vào hydrogel polyme xúc tác 16'.

Tùy thuộc vào chất hóa học của hydrogel polyme xúc tác 16', hỗn hợp được áp dụng có thể tiếp xúc với quá trình đóng rắn. Theo ví dụ, quá trình lưu hóa có thể diễn ra ở nhiệt độ từ nhiệt độ phòng (ví dụ: khoảng 25 °C) đến khoảng 95 °C trong thời gian từ khoảng 1 phần nghìn giây đến khoảng vài ngày.

Sau đó cũng có thể thực hiện đánh bóng để loại bỏ hydrogel polyme xúc tác 16' từ vùng kẽ 28 ở chu vi của kênh dòng chảy 26, trong khi vẫn để hydrogel polyme xúc tác 16' trên bề mặt trong kênh dòng chảy 26 ít nhất về cơ bản là còn nguyên vẹn.

Theo một số ví dụ, hydrogel polyme xúc tác 16' được lắng đọng đã có chất xúc tác 18 được gắn vào đó, và do đó không có thêm quy trình xử lý nào được thực hiện để đưa chất xúc tác 18 vào kênh dòng chảy 26. Một ví dụ về điều này là khi chất xúc tác 18 là một phần của đơn vị monome trong xương sống hydrogel polyme. Một ví dụ khác về điều này là khi chất xúc tác 18 đã được gắn vào sau quá trình trùng hợp. Như vậy, một phương pháp ví dụ được công bố trong tài liệu này bao gồm bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác 16' bao gồm chất xúc tác 18; và bước sử dụng hydrogel polyme xúc tác 16' cho bề mặt của phần nền 24.

Theo các ví dụ khác, hydrogel polyme được lắng đọng là hydrogel polyme ban đầu 16 mà không có chất xúc tác 18 gắn vào đó. Vì hydrogel polyme ban đầu 16 không bao gồm chất xúc tác 18, việc xử lý bổ sung được thực hiện để đưa chất xúc tác 18 vào hydrogel polyme ban đầu 16 để tạo thành hydrogel polyme xúc tác 16' trong kênh dòng chảy 26. Theo các ví dụ này, hydrogel polyme ban đầu 16 được lắng đọng trong kênh dòng chảy 26 và được đánh bóng, sau đó bất kỳ kỹ thuật liên kết sau trùng hợp nào được mô tả trong tài liệu này đều có thể được sử dụng để đưa chất xúc tác 18 vào hydrogel polyme ban đầu 16. Vì hydrogel polyme ban đầu 16 có trong kênh dòng chảy 26 chứ không có trên vùng kẽ 28, chất xúc tác 18 sẽ ưu tiên gắn vào hydrogel polyme ban đầu 16 trong kênh dòng chảy 26.

Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 cũng bao gồm đoạn môi khuếch đại 30 được gắn với hydrogel polyme xúc tác 16'. Sự trình bày về liên kết đoạn môi sau đây bao

gồm hydrogel polyme xúc tác 16'. Cần hiểu rằng khi hydrogel polyme ban đầu 16 được đưa vào kênh dòng chảy 26, chất xúc tác 18 có thể được đưa vào trước hoặc sau các đoạn môi khuếch đại 30. Như vậy, sự trình bày về liên kết đoạn môi cũng phù hợp với hydrogel polyme ban đầu 16.

Quá trình ghép có thể được thực hiện để ghép các đoạn môi khuếch đại 30 với hydrogel polyme xúc tác 16' trong kênh dòng chảy 26. Theo ví dụ, đoạn môi khuếch đại 30 có thể được cố định vào hydrogel polyme xúc tác 16' bằng liên kết cộng hóa trị một điểm tại hoặc gần đầu 5' của đoạn môi 30. Sự liên kết này để lại i) một phần đoạn môi 30 dành riêng cho adapter (chuỗi tiếp hợp) được tự do để tái tổ hợp thành phân mảnh axit nucleic sẵn sàng giải trình tự cùng nguồn của nó và ii) nhóm hydroxyl 3' tự do để mở rộng đoạn môi. Có thể sử dụng liên kết cộng hóa trị phù hợp bất kỳ cho mục đích này. Ví dụ về đoạn môi kết thúc có thể được sử dụng bao gồm đoạn môi kết thúc alkyn (ví dụ: có thể gắn vào phần bề mặt azit của hydrogel polyme xúc tác 16'), đoạn môi kết thúc phospho-thioat (ví dụ: có thể gắn vào phần bề mặt brom của hydrogel polyme xúc tác 16'), hoặc đoạn môi kết thúc azit (ví dụ: có thể gắn vào phần bề mặt alkyn của hydrogel polyme xúc tác 16').

Ví dụ cụ thể về các đoạn môi phù hợp 30 bao gồm đoạn môi P5 và P7 được dùng trên bề mặt của 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.

Theo ví dụ, việc ghép nối có thể bao gồm dòng chảy thông qua phương pháp lắng đọng (ví dụ: sử dụng nắp liên kết tạm thời hoặc liên kết cố định), lớp phủ nhúng (dunk coating), lớp phủ phun, phân phối vũng (puddle dispensing) hoặc bằng phương pháp phù hợp khác mà sẽ liên kết đoạn môi 30 với hydrogel polyme xúc tác 16' trong kênh dòng chảy 26. Mỗi kỹ thuật ví dụ này có thể sử dụng dung dịch hoặc hỗn hợp đoạn môi, có thể bao gồm đoạn môi 30, nước, chất đệm và chất xúc tác. Với bất kỳ phương pháp ghép nào, đoạn môi 30 phản ứng với nhóm phản ứng của hydrogel polyme xúc tác 16' trong kênh dòng chảy 26 và không có ái lực với phần

nền 24 xung quanh. Như vậy, đoạn mỗi 30 sẽ ghép chọn lọc với hydrogel polyme xúc tác 16' trong kênh dòng chảy 26.

Theo ví dụ được minh họa trong Hình 3C, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 bao gồm phần nền nhiều lớp 24B, bao gồm chất mang 32 và vật liệu được tạo mẫu 34 đặt trên chất mang 32. Vật liệu được tạo mẫu 34 xác định các rãnh 36 được phân tách bằng các vùng kẽ 28. Các rãnh 36 nằm trong mỗi kênh dòng chảy 26.

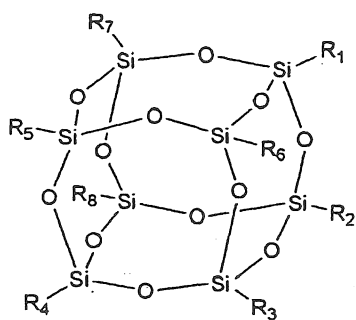
Theo ví dụ minh họa trong Hình 3C, vật liệu được tạo mẫu 34 được đặt trên chất mang 32. Cần hiểu rằng vật liệu bất kỳ có thể lắng đọng có chọn lọc, hoặc lắng đọng và được tạo mẫu để tạo thành rãnh 36 và vùng kẽ 28 đều có thể được sử dụng cho vật liệu được tạo mẫu 34.

Theo một ví dụ về vật liệu được tạo mẫu 34, oxit vô cơ có thể được sử dụng chọn lọc cho chất mang 32 thông qua quá trình phủ lắng đọng hơi, in sol khí hoặc in phun. Ví dụ về các oxit vô cơ phù hợp bao gồm oxit tantali (ví dụ,  $Ta_2O_5$ ), oxit nhôm (ví dụ,  $Al_2O_3$ ), oxit silic (ví dụ,  $SiO_2$ ), oxit hafni (ví dụ,  $HfO_2$ ), v.v.

Theo một ví dụ khác về vật liệu được tạo mẫu 34, có thể phủ nhựa lên chất mang 32 và sau đó tạo hình mẫu. Các kỹ thuật lắng đọng phù hợp bao gồm phương pháp lắng đọng hơi hóa chất, phủ nhúng, phủ lớp mạ, phủ xoay, phủ phun, phương pháp puddle dispensing, phủ phun siêu âm, phương pháp phủ doctor blade, in chất lỏng (aesol printing), in lụa, in vi điều khiển, v.v.. Các kỹ thuật tạo mẫu phù hợp bao gồm quang khắc, in thạch bản nanoimprint (NIL), kỹ thuật dập, kỹ thuật dập nổi, kỹ thuật đúc, kỹ thuật vi chạm, kỹ thuật in, v.v.. Một số ví dụ về các loại nhựa phù hợp bao gồm nhựa dựa trên nền tảng silsesquioxan đa diện (POSS), nhựa epoxy không POSS, nhựa poly (etylen glycol), nhựa polyete (ví dụ: epoxit vòng mở), nhựa acrylic, nhựa acrylat, nhựa metacrylat, nhựa fluoropolyme vô định hình (ví dụ: CYTOP® từ Bellex) và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Như được sử dụng trong tài liệu này, thuật ngữ “silsesquioxan oligome đa diện” (POSS) dùng để chỉ thành phần hóa học là chất trung gian kết hợp (ví dụ,  $RSiO_{1,5}$ ) giữa chất trung gian kết hợp của silica ( $SiO_2$ ) và silicon ( $R_2SiO$ ). Ví dụ về POSS có thể được mô tả trong Kehagias và cộng sự, *Microelectronic Engineering* 86 (2009), tr. 776-778, được kết hợp đầy đủ vào tài liệu này bằng viện dẫn. Theo ví dụ, chế phẩm

là hợp chất organosilicon có công thức hóa học  $[\text{RSiO}_{3/2}]_n$ , trong đó các nhóm R có thể giống nhau hoặc khác nhau. Ví dụ nhóm R cho POSS bao gồm epoxy, azit/azido, thiol, poly (etylen glycol), norbornen, tetrazin, acrylat và/hoặc metacrylat, hoặc hơn thế nữa, ví dụ, alkyl, aryl, alkoxy và/hoặc nhóm haloalkyl. Chế phẩm nhựa được đề xuất trong tài liệu này có thể bao gồm một hoặc nhiều cấu trúc lồng hoặc lõi khác nhau dưới dạng đơn vị monome. Cấu trúc đa diện có thể là cấu trúc  $T_8$ , như:



và được biểu thị bằng:



$T_8$

. Đơn vị monome này thường có tám nhánh của các nhóm chức từ  $R_1$  đến  $R_8$ .

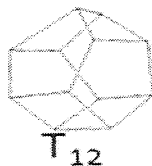
Đơn vị monome có thể có cấu trúc lồng với 10 nguyên tử silic và nhóm 10 R, được



$T_{10}$

gọi là  $T_{10}$ , như:

, hoặc có thể có cấu trúc lồng với 12 nguyên tử silic và



$T_{12}$

nhóm 12 R, được gọi là  $T_{12}$ , như:

. Ngoài ra, vật liệu gốc POSS có thể bao gồm cấu trúc lồng  $T_6$ ,  $T_{14}$  hoặc  $T_{16}$ . Hàm lượng lồng trung bình có thể được điều chỉnh trong quá trình tổng hợp và/hoặc được kiểm soát bằng các phương pháp tinh chế, và sự phân bố kích thước lồng của (các) đơn vị monome có thể được sử dụng theo các ví dụ được mô tả trong tài liệu này.

Trong một số ví dụ POSS được đề xuất trong tài liệu này, ít nhất một trong số  $R_1$  đến  $R_8$  hoặc  $R_{10}$  hoặc  $R_{12}$  chứa epoxy.  $R_1$  đến  $R_8$  hoặc  $R_{10}$  hoặc  $R_{12}$  có thể giống nhau hoặc có thể không giống nhau và theo một số ví dụ, ít nhất một trong số  $R_1$  đến  $R_8$  hoặc  $R_{10}$  hoặc  $R_{12}$  bao gồm epoxy và ít nhất một phần khác của  $R_1$  đến  $R_8$  hoặc  $R_{10}$  hoặc  $R_{12}$  là không phải epoxy nhóm chức. Nhóm chức không phải epoxy có thể là (a) nhóm phản ứng trực giao với nhóm epoxy (tức là phản ứng trong các

điều kiện khác với nhóm epoxy), đóng vai trò như một tay cầm để ghép nhựa với đoạn môi khuếch đại, polyme, hoặc chất trùng hợp; hoặc (b) nhóm điều chỉnh các đặc tính chức hoặc cơ học của nhựa, ví dụ, điều chỉnh năng lượng bề mặt. Theo một số ví dụ, nhóm chức không phải epoxy được chọn từ nhóm bao gồm azit/azido, thiol, poly(etylen glycol), norbornen, tetrazin, amino, hydroxyl, alkynyl, keton, andehyt, nhóm este, alkyl, aryl, alkoxy và haloalkyl.

Như được minh họa trong Hình 3C, vật liệu được tạo mẫu 34 bao gồm rãnh 36 được xác định trong đó và vùng kẽ 28 ngăn cách các rãnh liền kề 36. Có thể hình dung nhiều bố cục khác nhau của rãnh 36, bao gồm các khuôn mẫu đều, không đều và lặp lại. Theo ví dụ, rãnh 36 được bố trí trong lưới hình lục giác để đóng gói kín và cải thiện mật độ. Các bố cục khác có thể bao gồm, ví dụ, bố cục tuyến tính (hình chữ nhật), bố cục hình tam giác, v.v.. Theo một số ví dụ, bố cục hoặc mẫu có thể là định dạng x-y của các rãnh 36 ở trong dòng và cột. Theo một số ví dụ khác, bố cục hoặc mẫu có thể là sự sắp xếp lặp lại các rãnh 36 và/hoặc vùng kẽ 28. Vẫn theo các ví dụ khác, bố cục hoặc mẫu có thể là sự sắp xếp ngẫu nhiên các rãnh 36 và/hoặc vùng kẽ 28. Hoa văn có thể bao gồm đốm, đệm, lỗ, cột, sọc, xoáy, đường thẳng, hình tam giác, hình chữ nhật, hình tròn, vòng cung, ca rô, kẻ sọc, đường chéo, mũi tên, hình vuông và/hoặc khắc đường chéo song song (cross-hatch).

Bố cục hoặc mẫu của rãnh 36 có thể có đặc trưng theo mật độ của rãnh 36 (số rãnh 36) trong vùng xác định. Ví dụ: rãnh 36 có thể hiện diện với mật độ khoảng 2 triệu trên  $\text{mm}^2$ . Mật độ có thể được điều chỉnh theo các mật độ khác nhau, bao gồm, ví dụ, mật độ khoảng 100 mỗi  $\text{mm}^2$ , khoảng 1.000 mỗi  $\text{mm}^2$ , khoảng 0,1 triệu mỗi  $\text{mm}^2$ , khoảng 1 triệu mỗi  $\text{mm}^2$ , khoảng 2 triệu mỗi  $\text{mm}^2$ , khoảng 5 triệu mỗi  $\text{mm}^2$ , khoảng 10 triệu mỗi  $\text{mm}^2$ , khoảng 50 triệu mỗi  $\text{mm}^2$ , hoặc trở lên hoặc trở xuống. Cần hiểu rằng mật độ của rãnh 36 trong vật liệu được tạo mẫu 34 có thể nằm giữa một trong các giá trị nhỏ hơn và một trong các giá trị lớn được chọn từ các phạm vi ở trên. Ví dụ: mảng mật độ cao có thể có đặc trưng ở chỗ là có các rãnh 36 cách nhau dưới khoảng 100 nm, mảng mật độ trung bình có thể có đặc trưng là các rãnh 36 cách nhau khoảng 400 nm đến khoảng 1  $\mu\text{m}$ , và mảng mật độ thấp có thể có đặc trưng là các rãnh 36 cách nhau lớn hơn khoảng 1  $\mu\text{m}$ . Vì mật độ mẫu đã được đề xuất, cần phải hiểu rằng có thể sử dụng mọi mật độ phù hợp bất kỳ. Mật độ của các rãnh 36 một phần có thể phụ thuộc vào độ sâu của các

rãnh 36. Theo một số trường hợp, có thể mong muốn khoảng cách giữa các rãnh 36 thậm chí còn lớn hơn những ví dụ được liệt kê trong tài liệu này.

Cách bố trí hoặc mẫu của rãnh 36 cũng có thể hoặc có đặc trưng về cao độ trung bình, hoặc khoảng cách từ tâm của rãnh 36 đến tâm của một rãnh liền kề 36 (khoảng cách từ tâm đến tâm) hoặc từ cạnh của một rãnh 36 đến cạnh của một rãnh liền kề 36 (khoảng cách từ cạnh đến cạnh). Mẫu của các lỗ 32 có thể đều, sao cho hệ số biến thiên xung quanh cao độ trung bình là nhỏ, hoặc mẫu có thể không đều trong trường hợp đó hệ số biến thiên có thể tương đối lớn. Trong cả hai trường hợp, cao độ trung bình có thể là, ví dụ, khoảng 50 nm, khoảng 0,1  $\mu\text{m}$ , khoảng 0,5  $\mu\text{m}$ , khoảng 1  $\mu\text{m}$ , khoảng 5  $\mu\text{m}$ , khoảng 10  $\mu\text{m}$ , khoảng 100  $\mu\text{m}$  trở lên hoặc trở xuống. Cao độ trung bình cho một mẫu rãnh cụ thể 36 có thể nằm giữa một trong các giá trị nhỏ hơn và một trong các giá trị lớn được chọn từ các phạm vi ở trên. Theo ví dụ, rãnh 36 có khoảng dài (khoảng cách từ tâm đến tâm) khoảng 1,5  $\mu\text{m}$ . Trong khi các giá trị khoảng dài trung bình ví dụ được đề xuất, cần hiểu rằng các giá trị khoảng dài trung bình khác có thể được sử dụng.

Kích thước của mỗi rãnh 36 có thể có đặc trưng ở thể tích, vùng miệng, độ sâu và/hoặc đường kính của nó.

Mỗi rãnh 36 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), phép giải, nucleotit 10 hoặc khả năng phản ứng của chất đang được phân tích được mong đợi cho các mục đích sử dụng cuối của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22. Ví dụ: thể tích có thể ít nhất khoảng  $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$ , ít nhất khoảng  $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^3$ , ít nhất khoảng 0,1  $\mu\text{m}^3$ , ít nhất khoảng 1  $\mu\text{m}^3$ , ít nhất khoảng 10  $\mu\text{m}^3$ , ít nhất khoảng 100  $\mu\text{m}^3$  trở lên. Hoặc là hoặc ngoài ra, thể tích có thể nhiều nhất khoảng  $1 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ , nhiều nhất khoảng  $1 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ , nhiều nhất khoảng 100  $\mu\text{m}^3$ , nhiều nhất khoảng 1  $\mu\text{m}^3$ , nhiều nhất khoảng 10  $\mu\text{m}^3$ , nhiều nhất khoảng 0,1  $\mu\text{m}^3$  trở lên.

Có thể lựa chọn diện tích bị chiếm bởi mỗi miệng lỗ dựa trên các tiêu chí tương tự như các tiêu chí đã nêu ở trên cho thể tích. Ví dụ, diện tích của từng miệng lỗ có thể ít nhất là khoảng  $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2$ , ít nhất là khoảng  $1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2$ , ít nhất là khoảng  $1 \times 10^2 \mu\text{m}^2$ , ít nhất là khoảng 0,1  $\mu\text{m}^2$ , ít nhất là khoảng 1  $\mu\text{m}^2$ , ít nhất là khoảng 10

$\mu\text{m}^2$ , hoặc ít nhất là khoảng  $100 \mu\text{m}^2$  trở lên. Hoặc là hoặc ngoài ra, diện tích có thể nhiều nhất khoảng  $1 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ , nhiều nhất khoảng  $100 \mu\text{m}^2$ , nhiều nhất khoảng  $10 \mu\text{m}^2$ , nhiều nhất khoảng  $1 \mu\text{m}^2$ , nhiều nhất khoảng  $10 \mu\text{m}^2$  trở xuống. Diện tích bị chiếm bởi từng miệng lỗ có thể lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị được chỉ định ở trên.

Độ sâu của mỗi rãnh 36 có thể đủ lớn để chứa một số hydrogel polyme xúc tác 16'. Theo ví dụ, độ sâu có thể là ít nhất khoảng  $0,1 \mu\text{m}$ ,  $0,5 \mu\text{m}$ , ít nhất khoảng  $1 \mu\text{m}$ , ít nhất khoảng  $10 \mu\text{m}$ , ít nhất khoảng  $100 \mu\text{m}$  trở lên. Ngoài ra hoặc theo cách khác, độ sâu có thể nhiều nhất là khoảng  $1 \times 10^3 \mu\text{m}$ , nhiều nhất là khoảng  $100 \mu\text{m}$ , nhiều nhất là khoảng  $10 \mu\text{m}$  trở xuống. Theo một số ví dụ khác, độ sâu khoảng  $0,4 \mu\text{m}$ . Độ sâu của mỗi rãnh 36 có thể lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị quy định ở trên.

Trong một số trường hợp, đường kính hoặc chiều dài và chiều rộng của mỗi rãnh 36 có thể ít nhất là khoảng  $50 \text{ nm}$ , ít nhất khoảng  $0,1 \mu\text{m}$ , ít nhất khoảng  $0,5 \mu\text{m}$ , ít nhất khoảng  $1 \mu\text{m}$ , ít nhất khoảng  $10 \mu\text{m}$ , ít nhất khoảng  $100 \mu\text{m}$  hoặc hơn. Hoặc là hoặc ngoài ra, đường kính hoặc chiều dài và chiều rộng có thể nhiều nhất khoảng  $1 \times 10^3 \mu\text{m}$ , nhiều nhất khoảng  $100 \mu\text{m}$ , nhiều nhất khoảng  $10 \mu\text{m}$ , nhiều nhất khoảng  $1 \mu\text{m}$ , nhiều nhất khoảng  $0,5 \mu\text{m}$ , nhiều nhất khoảng  $0,1 \mu\text{m}$  trở xuống (ví dụ: khoảng  $50 \text{ nm}$ ). Theo một số ví dụ khác, đường kính hoặc chiều dài và chiều rộng khoảng  $0,4 \mu\text{m}$ . Đường kính hoặc chiều dài và chiều rộng của mỗi rãnh 36 có thể lớn hơn, nhỏ hơn hoặc nằm giữa các giá trị được chỉ định ở trên.

Theo ví dụ được minh họa trong Hình 3C, hydrogel polyme xúc tác 16' nằm trong từng rãnh 36. Có thể áp dụng hydrogel polyme xúc tác 16' như được mô tả trong tài liệu tham khảo Hình 3B, sao cho hydrogel polyme xúc tác 16' có mặt trong các chỗ lõm 36 và không hiện diện trên các vùng kề xung quanh 28.

Theo ví dụ minh họa ở Hình 3C, đoạn mồi 30 có thể được ghép với hydrogel polyme xúc tác 16' nằm trong từng rãnh 36. Đoạn mồi 30 có thể được sử dụng như mô tả trong hình 3B, và do đó sẽ ghép với hydrogel polyme xúc tác 16' chứ không phải với vùng kề xung quanh 28.

Mặc dù không được minh họa trong Hình 3A, Hình 3B hoặc Hình 3C, cần hiểu rằng tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 cũng có thể bao gồm nắp gắn vào phần nền 24. Theo ví dụ, nắp này có thể được liên kết với ít nhất một phần của phần nền 24, ví dụ như tại một số vùng kẽ 28. Liên kết được tạo thành giữa nắp và phần nền 24 có thể là liên kết hóa học hoặc liên kết cơ học (ví dụ: sử dụng thành phần giữ, v.v..)

Nắp này có thể là vật liệu bất kỳ trong suốt đối với ánh sáng kích thích chiếu hướng vào phần nền 24. Ví dụ, nắp có thể làm bằng thủy tinh (ví dụ: borosilicat, silic đioxit nóng chảy, v.v.., nhựa hoặc tương tự. Một ví dụ về thủy tinh borosilicat phù hợp được bán trên thị trường là D 263®, do Schott North America, Inc cung cấp. Ví dụ về vật liệu bằng plastic phù hợp được bán trên thị trường cụ thể là cyclo olefin polyme, là sản phẩm ZEONOR® được công ty Zeon Chemicals L.P cung cấp.

Nắp có thể được liên kết với phần nền 24 bằng mọi kỹ thuật phù hợp như liên kết laser, liên kết khuếch tán, liên kết anốt, liên kết eutectic, liên kết hoạt hóa plasma, liên kết nấu thủy tinh hoặc các phương pháp khác được biết đến trong ngành. Theo ví dụ, lớp vùng đệm có thể được sử dụng để gắn nắp vào phần nền 24. Lớp vùng đệm có thể làm bằng mọi loại vật liệu làm kín ít nhất một số phần của phần nền 24 và nắp lại với nhau. Theo một số ví dụ, lớp vùng đệm có thể là vật liệu hấp thụ bức xạ hỗ trợ liên kết giữa phần nền 24 và nắp.

Theo các ví dụ khác, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 cũng có thể bao gồm phần nền được tạo mẫu hoặc không được tạo mẫu bổ sung 24 được gắn vào phần nền 24.

### *Nucleotit*

Nucleotide được sử dụng với các ví dụ về tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 là nucleotit chặn 3' OH 10 (xem Hình 1). Như được mô tả trong tài liệu này, nucleotit chặn 3' OH 10 này bao gồm nucleotit và nhóm chặn 3' OH 12 được gắn vào đường của nucleotit. Nucleotit có thể là bất kỳ ví dụ nào được nêu trong tài liệu này.



Nhóm chặn 3' OH 12 có thể được liên kết với nguyên tử oxy của phân tử đường trong nucleotit. Nhóm chặn 3' OH 12 có thể là phần kết thúc thuận nghịch chỉ cho phép hợp nhất một bazơ trong mỗi chu kỳ giải trình tự. Phần kết thúc thuận nghịch ngăn không cho các bazơ khác hợp nhất vào sợi non bổ sung cho chuỗi polynucleotit khuôn mẫu. Điều này cho phép phát hiện và xác định một bazơ được hợp nhất. Sau đó, nhóm chặn 3' OH 12 có thể bị loại bỏ, cho phép các chu kỳ giải trình tự khác diễn ra ở mỗi chuỗi polynucleotit khuôn mẫu. Phản ứng phân cắt để loại bỏ nhóm chặn 3' OH 12 được xúc tác bởi chất xúc tác 18.

Ví dụ về các nhóm chặn 3' OH 12 khác nhau bao gồm phần kết thúc thuận nghịch 3'-ONH<sub>2</sub>, phần kết thúc thuận nghịch 3'-O-allyl ( $\text{—CH=CHCH}_2$ ) và phần kết thúc thuận nghịch 3'-O-azidomethyl ( $\text{—CH}_2\text{N}_3$ ). Các phần kết thúc thuận nghịch phù hợp khác bao gồm o-nitrobenzyl ete, alkyl o-nitrobenzyl cacbonat, phần este, các phần allyl khác, axetal (ví dụ: tert-butoxy-etoxy), phần MOM ( $\text{—CH}_2\text{OCH}_3$ ), 2,4-đinitrobenzen sulfenyl, tetrahydrofuranlyl ete, 3' phosphat, các ete, -F, -H<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -N<sub>3</sub>, -HCOCH<sub>3</sub> và 2-nitrobenzen cacbonat. Đối với phần kết thúc thuận nghịch allyl, phối tử trên bề mặt của hydrogel polyme 16' có thể liên kết chất xúc tác paladi (Pd(0)), chất xúc tác ruteni. Đối với este và axetal, có thể sử dụng chất xúc tác axit và/hoặc bazơ bất kỳ được mô tả trong tài liệu này.

Nucleotit chặn 3' OH 10 là nucleotit đầy đủ chức năng cũng có thể bao gồm nhãn có thể phát hiện được gắn vào bazơ B của nucleotit. Nhãn phát hiện được có thể là phần có thể phát hiện quang học bất kỳ, bao gồm các phần phát quang, phát quang hóa học, huỳnh quang, sinh huỳnh quang, mang màu và/hoặc sinh màu. Một số ví dụ về các phần có thể phát hiện quang học phù hợp bao gồm nhãn fluoretxein, nhãn rodamin, nhãn xyanin (ví dụ: Cy3, Cy5 và các loại tương tự) và họ Alexa của thuốc nhuộm huỳnh quang và các thuốc nhuộm huỳnh quang và sinh huỳnh quang khác).

Phân tử liên kết phù hợp bất kỳ cũng có thể được sử dụng để gắn nhãn có thể phát hiện vào bazơ B của nucleotit. Phân tử liên kết có thể phân cắt được và có thể trải qua nhiều phản ứng tương tự để loại bỏ nhóm giải khỏi 12. Theo một ví dụ, phân tử liên kết là nhóm vòng đẹm có công thức  $\text{—((CH}_2)_2\text{O)}_n\text{—}$ , trong đó n là số nguyên từ 2 đến 50.

Trong một số ứng dụng, có thể mong muốn sử dụng loại nhãn có thể phát hiện khác cho mỗi nucleotit 10 bao gồm một bazơ khác, ví dụ như A, T, G, C (cũng như U hoặc I). Ví dụ: nhãn huỳnh quang hoặc sinh huỳnh quang có thể được chọn sao cho mỗi nhãn hấp thụ bức xạ kích thích và/hoặc phát ra huỳnh quang, ở bước sóng có thể phân biệt được với các nhóm nhãn khác. Các chất tương tự có thể phân biệt này có khả năng giám sát đồng thời sự hiện diện của nhiều nhãn khác nhau trong cùng một hỗn hợp phản ứng. Theo một số ví dụ, một trong bốn nucleotit là trình tự có thể không có nhãn, còn ba nucleotit khác bao gồm các nhãn khác nhau.

#### *Phương pháp giải trình tự*

Ví dụ về tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 có thể được sử dụng trong kỹ thuật giải trình tự toàn bộ, chẳng hạn như giải trình tự tổng hợp (SBS). Trong quá trình giải trình tự toàn bộ, chuỗi polynucleotit khuôn mẫu (không được minh họa) mà sẽ được giải trình tự có thể được tạo thành trên tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 bằng cách sử dụng đoạn mồi khuếch đại 30. Khi bắt đầu tạo thành chuỗi polynucleotit mẫu, các mẫu thư viện có thể được điều chế từ mọi mẫu axit nucleic bất kỳ (ví dụ: mẫu ADN hoặc mẫu ARN). Mẫu axit nucleic có thể được phân mảnh thành các mảnh ADN hoặc ARN sợi đơn, có kích thước tương tự (ví dụ: < 1000 bp). Trong quá trình điều chế, chuỗi tiếp hợp có thể được thêm vào đầu của các phân đoạn này. Bằng cách giảm sự khuếch đại chu kỳ, các mô típ khác nhau có thể được đưa vào adapter, chẳng hạn như các vị trí liên kết giải trình tự, chỉ số và vùng bổ sung cho đoạn mồi 30 trong rãnh 36. Các khuôn mẫu thư viện cuối cùng bao gồm mảnh ADN hoặc ARN và adapter ở cả hai đầu. Theo một số ví dụ, các mảnh này từ một mẫu axit nucleic có các adapter giống nhau được thêm vào đó.

Nhiều khuôn mẫu thư viện có thể được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22. Nhiều khuôn mẫu thư viện được lai, ví dụ, ví dụ như với một trong hai loại đoạn mồi 30 được cố định trong kênh dòng chảy 26 hoặc trong rãnh 36 trong kênh dòng chảy 26.

Sau có thể thực hiện quá trình tạo cụm. Theo một ví dụ về việc tạo cụm, khuôn mẫu tập hợp được sao chép từ đoạn mồi được lai 18 bằng mở rộng 3' sử dụng polymerase

ADN có khả năng sao chép chính xác. Các khuôn mẫu thư viện gốc bị biến tính, để lại các bản sao cố định trong kênh dòng chảy 26 hoặc trong rãnh 36. Khuếch đại cầu đẳng nhiệt hoặc một số hình thức khuếch đại khác có thể được sử dụng để khuếch đại các bản sao cố định. Ví dụ: các khuôn mẫu được sao chép lặp lại để lại với đoạn nối bổ sung, liên kết 30 và polymeraza sao chép các khuôn mẫu đã sao chép để tạo thành cầu sợi kép, được biến tính để tạo thành hai sợi đơn. Hai sợi này lặp lại và lai với đoạn nối bổ sung, liên kết 30 và lại được kéo dài ra để tạo thành hai vòng sợi kép mới. Quy trình được lặp lại trên mỗi bản sao mẫu bằng các chu kỳ biến tính và khuếch đại đẳng nhiệt để tạo ra các cụm vô tính dày đặc. Từng cụm cầu sợi kép bị biến tính. Theo ví dụ, sợi nghịch được loại bỏ bởi sự phân cắt bazơ cụ thể, để lại các sợi polynucleotit khuôn mẫu thuận. Sự phân cụm dẫn đến sự tạo thành một số chuỗi polynucleotit khuôn mẫu trong kênh dòng chảy 26 hoặc trong mỗi rãnh 36. Ví dụ về phân cụm này là khuếch đại cầu và là ví dụ về khuếch đại có thể được thực hiện. Cần phải hiểu rằng các kỹ thuật khuếch đại khác có thể được sử dụng, như quy trình làm việc khuếch đại loại trừ (Examp) (Illumina Inc.).

Một đoạn nối giải trình tự có thể được đưa vào để lại với trình tự bổ sung trên chuỗi polynucleotit khuôn mẫu. Đoạn nối giải trình tự này làm cho chuỗi polynucleotit khuôn mẫu sẵn sàng để giải trình tự.

Để bắt đầu giải trình tự, hỗn hợp kết hợp có thể được thêm vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22. Theo một ví dụ, hỗn hợp kết hợp này bao gồm chất mang lỏng, polymeraza và các nucleotit chặn 3' OH 10. Theo một số ví dụ, cần hiểu rằng hỗn hợp kết hợp được chọn để không hoạt hóa chất xúc tác 18, vì không mong muốn bắt đầu sự phân cắt nhóm chặn 12 trước khi hợp nhất và tạo hình ảnh. Với ví dụ về khách-chủ, hỗn hợp kết hợp có thể bao gồm chất xúc tác khách (ví dụ: kim loại) ở trạng thái không hoạt hóa. Chất xúc tác khách có thể liên kết với hydrogel polyme ban đầu 16' (ví dụ: qua phối tử), và sau đó có thể được kích thích bằng phương tiện trực giao (ví dụ: tiếp xúc với bước sóng cụ thể) trong quá trình giải khối để chuyển chất xúc tác khách sang dạng đã hoạt hóa.

Khi hỗn hợp kết hợp được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22, chất lỏng đi vào kênh dòng chảy 26 và/hoặc rãnh 36 (nơi có các chuỗi polynucleotit khuôn mẫu).

Các nucleotit chặn 3' OH 10 được thêm vào đoạn mồi giải trình tự (do đó mở rộng đoạn mồi giải trình tự) trong kiểu theo khuôn mẫu sao cho việc phát hiện thứ tự và loại nucleotit được thêm vào đoạn mồi giải trình tự có thể được sử dụng để xác định trình tự của khuôn mẫu. Cụ thể hơn, một trong những nucleotit được kết hợp, bởi polymerase tương ứng, thành một sợi mới sinh kéo dài đoạn mồi trình tự và bổ sung cho chuỗi polynucleotit khuôn mẫu. Nói cách khác, trong ít nhất một số chuỗi polynucleotit khuôn mẫu trên tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22, các polymeraza tương ứng mở rộng đoạn mồi trình tự lại tạo bởi một trong các nucleotit trong hỗn hợp kết hợp.

Theo phương pháp ví dụ này, sau khi hợp nhất gốc nucleotit vào sợi non, hỗn hợp kết hợp bao gồm nucleotit chặn 3' OH 10 không hợp nhất bất kỳ có thể bị loại khỏi tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22. Việc này có thể được thực hiện bằng dung dịch rửa (ví dụ: chất đệm).

Như được đề cập trong tài liệu này, nucleotit chặn 3' OH 10 bao gồm đặc tính kết thúc thuận nghịch (ví dụ: nhóm chặn 3' OH 12) giúp kết thúc sự mở rộng đoạn mồi tiếp theo sau khi nucleotit đã được thêm vào đoạn mồi giải trình tự. Nếu không có thêm sự hợp nhất nào xảy ra, các nucleotit 10 được hợp nhất gần đây nhất có thể được phát hiện thông qua sự kiện tạo hình ảnh. Trong sự kiện tạo hình ảnh, hệ thống chiếu sáng (không được minh họa) có thể cung cấp ánh sáng kích thích cho kênh dòng chảy 26 và/hoặc rãnh 36.

Sau đó, hỗn hợp phân cắt có thể được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22. Theo các ví dụ được công bố trong tài liệu này, hỗn hợp phân cắt có khả năng i) loại bỏ nhóm chặn 3' OH 12 khỏi nucleotit đã hợp nhất và ii) phân cắt nhãn có thể phát hiện bất kỳ ra khỏi nucleotit đã hợp nhất. Chất xúc tác có trên hydrogel polyme 16' có thể đẩy nhanh phản ứng xảy ra trong quá trình loại bỏ nhóm chặn 3' OH. Việc loại bỏ nhóm chặn 3' OH 12 cho phép thực hiện chu kỳ giải trình tự tiếp theo, và việc đẩy nhanh phản ứng này với chất xúc tác 18 có thể làm cho toàn bộ quá trình giải trình tự hiệu quả hơn.

Một số ví dụ về chất xúc tác đẩy nhanh các bước trung gian trong quá trình phản ứng giải khối. Do đó, khi hợp nhất hỗn hợp phân cắt và bắt đầu phản ứng giải

khởi, chất xúc tác sẽ thực hiện chức năng của nó. Khi sử dụng bộ tạo axit quang làm chất xúc tác 18, có thể sử dụng thêm thời gian phơi sáng để khởi tạo hoạt tính xúc tác.

Ví dụ về nhóm chặn 3' OH và chất/thành phần giải khối phù hợp trong hỗn hợp phân cắt có thể bao gồm: phần este có thể được loại bỏ bằng cách thủy phân bazơ; phần allyl có thể được loại bỏ với NaI, clorotrimethylsilan và  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  hoặc với Hg(II) trong axeton/nước; azidomethyl có thể được phân cắt với phosphin, chẳng hạn như tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) hoặc tri(hydroxypropyl)phosphin (THP); axetal, chẳng hạn như tert-butoxy-etoxy có thể được phân cắt trong điều kiện axit; các phần MOM ( $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ ) có thể được phân cắt với  $\text{LiBF}_4$  và  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ; 2,4-đinitrobenzen sulfenyl có thể được phân cắt với nucleophile như thiophenol và thiosulfat; ete tetrahydrofuranyl có thể được phân cắt với Ag(I) hoặc Hg(II); và phosphat 3' có thể được phân cắt bằng enzym phosphatasa (ví dụ: polynucleotit kinaza).

Bước rửa có thể diễn ra giữa các bước cung cấp chất lỏng khác nhau. Sau đó, chu kỳ SBS có thể được lặp lại n lần để kéo dài đoạn mỗi giải trình tự thêm n nucleotit, do đó phát hiện ra trình tự có độ dài n. Theo một số ví dụ, sự giải trình tự kết thúc theo cặp có thể được sử dụng, trong đó sợi xuôi được giải trình tự và loại bỏ, sau đó sợi ngược được tạo dựng và giải trình tự.

Mặc dù SBS đã được mô tả chi tiết, nhưng cần hiểu rằng tế bào dòng 22 mô tả trong tài liệu này có thể được sử dụng với quy trình giải trình tự khác để định kiểu gen, hoặc trong các ứng dụng hóa học và/hoặc sinh học khác. Trong một số trường hợp, đoạn mỗi của tiêu bản dạng tế bào dòng chảy có thể được chọn để cho phép giải trình tự kết thúc theo cặp đồng thời, trong đó cả sợi xuôi và sợi ngược đều có trên hydrogel polyme xúc tác 16', cho phép gọi bazơ đồng thời trong mỗi lần đọc. Giải trình tự kết thúc theo cặp đồng thời và giải trình tự tuần tự tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện sự sắp xếp lại bộ gen và các yếu tố trình tự lặp lại, cũng như dung hợp gen và phiên mã mới. Theo một ví dụ khác, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 10 được công bố trong tài liệu này có thể được dùng để tạo thư viện trên tiêu bản dạng tế bào dòng chảy.

*Bộ kit*

Bất kỳ ví dụ nào về tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 được mô tả trong tài liệu này có thể là một phần của bộ kit. Do đó, bất kỳ ví dụ nào về hydrogel polyme 16' được công bố trong tài liệu này có thể là một phần của bộ kit. Một số ví dụ về bộ kit bao gồm tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22, bao gồm phần nền 24; hydrogel polyme xúc tác 16' trên phần nền 24, hydrogel polyme xúc tác 16' bao gồm chất xúc tác 18; và đoạn môi khuếch đại 30 gắn với hydrogel polyme xúc tác 16'; trong đó chất xúc tác 18 là để đẩy nhanh quá trình phân cắt nhóm chặn 12 của nucleotit chặn 3' OH 10 được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy 22 và được hợp nhất vào sợi khuôn mẫu gắn với đoạn môi khuếch đại 30; và hỗn hợp phân cắt bao gồm thành phần để bắt đầu phân cắt nhóm chặn 12.

*Ghi chú bổ sung*

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 dưới 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. Cũng nên đánh giá cao rằng thuật ngữ được sử dụng rõ ràng trong tài liệu này mà cũng có thể xuất hiện trong mọi sáng chế bất kỳ được đưa vào bằng cách viện dẫn phải được hiểu theo nghĩa phù hợp nhất với các khái niệm cụ thể được đề xuất trong tài liệu này.

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.

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 tiêu phạm vi bất kỳ trong phạm vi đã nêu, như thể các giá trị này hoặc các phạm vi phụ này đã được trình bày một cách rõ ràng. Ví dụ: phạm vi từ khoảng 2 mm đến khoảng 300 mm nên được diễn giải để không chỉ bao gồm các giới hạn được trình bày rõ ràng là từ khoảng 2 mm đến khoảng 300 mm, mà còn bao gồm các giá trị riêng lẻ như khoảng 40 mm, khoảng 250,5 mm, v.v. và các phạm vi phụ như từ khoảng 25 mm đến khoảng 175 mm, v.v... Ngoài ra, khi “khoảng” và/hoặc “về cơ bản” được sử dụng để mô tả giá trị, chúng có nghĩa là bao gồm các biến thể nhỏ (lên đến  $\pm 10\%$ ) so với giá trị đã nêu.

Trong khi một số ví dụ đã được mô tả chi tiết, cần hiểu rằng các ví dụ được đề xuất có thể được cải biến. Vì thế, sự mô tả trước đây được xem là không giới hạn.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

### 1. Bộ kit bao gồm:

tiêu bản dạng tế bào dòng chảy bao gồm:

phần nền;

hydrogel polyme xúc tác trên phần nền, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm axit phosphonic; amin dị vòng; enzym; peptit; ADNzym; phức chất kim loại-phối tử; chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en và các tổ hợp của chúng; và

đoạn mồi khuếch đại được gắn với hydrogel polyme xúc tác;

trong đó chất xúc tác đẩy nhanh sự phân cắt nhóm chặn của nucleotit chặn 3' OH được đưa vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy và được hợp nhất vào sợi khuôn mẫu gắn với đoạn mồi khuếch đại; và

hỗn hợp phân cắt bao gồm thành phần để bắt đầu phân cắt nhóm chặn.

2. Bộ kit như được xác định theo điểm 1, trong đó khi chất xúc tác giải khối là kim loại của phức chất kim loại-phối tử thì nó được gắn vào hydrogel polyme.

3. Phương pháp giải khối nucleotit chặn 3' OH, phương pháp này bao gồm bước:

đưa hỗn hợp kết hợp vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy bao gồm:

phần nền;

hydrogel polyme xúc tác trên phần nền, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm axit phosphonic; amin dị vòng; enzym; peptit; ADNzym; phức chất kim loại-phối tử; chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en và các tổ hợp của chúng; và

sợi khuôn mẫu được gắn vào hydrogel polyme xúc tác;



do đó hợp nhất từng nucleotit thành sợi non tương ứng dọc theo sợi khuôn mẫu, từng nucleotit này bao gồm:

nhãn thuốc nhuộm được gắn vào bazơ; và

nhóm chặn 3' OH được gắn vào đường;

loại bỏ hỗn hợp kết hợp;

tạo hình ảnh quang học sự hợp nhất từng nucleotit; và

đưa hỗn hợp phân cắt, bao gồm thành phần để bắt đầu phân cắt nhóm chặn 3' OH, vào tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, nhờ đó chất xúc tác giải khối sẽ đẩy nhanh sự phân cắt nhóm chặn 3' OH.

4. Phương pháp như được xác định theo điểm 3, trong đó chất xúc tác đẩy nhanh sự loại bỏ nhóm bảo vệ bên ngoài của nhóm chặn 3' OH, và trong đó thuốc thử trong hỗn hợp phân cắt loại bỏ nhóm bảo vệ bên trong của nhóm chặn 3' OH.

5. Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy bao gồm:

phần nền;

hydrogel polyme xúc tác trên phần nền, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm:

axit phosphonic;

amin dị vòng;

enzym;

peptit;

ADNzym;

kim loại của phức chất kim loại-phối tử;

chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en và các tổ hợp của chúng; và

bộ tạo axit quang; và

đoạn mỗi khuếch đại được gắn với hydrogel polyme xúc tác.

6. Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy như được xác định theo điểm 5, trong đó chất xúc tác được hợp nhất vào đơn vị monome của hydrogel polyme xúc tác.

7. Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy như được xác định theo điểm 5, trong đó chất xúc tác được ghép vào hydrogel polyme ban đầu.

8. Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy như được xác định theo điểm 5, trong đó hydrogel polyme xúc tác bao gồm hydrogel polyme ban đầu và trong đó, tiêu bản dạng tế bào dòng chảy còn bao gồm oligonucleotit được gắn vào hydrogel polyme ban đầu, và trong đó chất xúc tác giải khối được gắn vào liên kết oligonucleotit bổ sung mà được lại với oligonucleotit.

9. Tiêu bản dạng tế bào dòng chảy như được xác định theo điểm 5, trong đó:

hydrogel polyme bao gồm cạnh thứ nhất của cặp liên kết hydro;

chất xúc tác giải khối được gắn với hydrogel polyme thông qua cạnh thứ hai của cặp liên kết hydro; và

đoạn mỗi khuếch đại được gắn với hydrogel polyme xúc tác.

10. Phương pháp giải trình tự axit nucleic, phương pháp này bao gồm bước:

sử dụng hydrogel polyme xúc tác cho bề mặt của phần nền tiêu bản dạng tế bào dòng chảy, hydrogel polyme xúc tác này bao gồm chất xúc tác giải khối được chọn từ nhóm bao gồm:

axit phosphonic;

amin dị vòng;

enzym;

peptit;

ADNzym;

kim loại của phức chất kim loại-phối tử;

chất xúc tác hữu cơ được chọn từ nhóm bao gồm urê, thiourea, imidazol, guanidin, 1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-en và các tổ hợp của chúng; và

bộ tạo axit quang; và

gắn đoạn nối khuếch đại vào hydrogel polyme xúc tác.

11. Phương pháp như được xác định theo điểm 10, phương pháp còn bao gồm bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm chất xúc tác giải khối.

12. Phương pháp như được xác định theo điểm 11, trong đó bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm bước đồng trùng hợp monome thứ nhất gồm nhóm chức ghép đoạn nối với monome thứ hai bao gồm chất xúc tác giải khối.

13. Phương pháp như được xác định theo điểm 11, trong đó bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm bước:

tổng hợp hydrogel polyme ban đầu; và

ghép chất xúc tác vào hydrogel polyme ban đầu.

14. Phương pháp như được xác định theo điểm 11, trong đó bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm bước:

tổng hợp hydrogel polyme ban đầu;

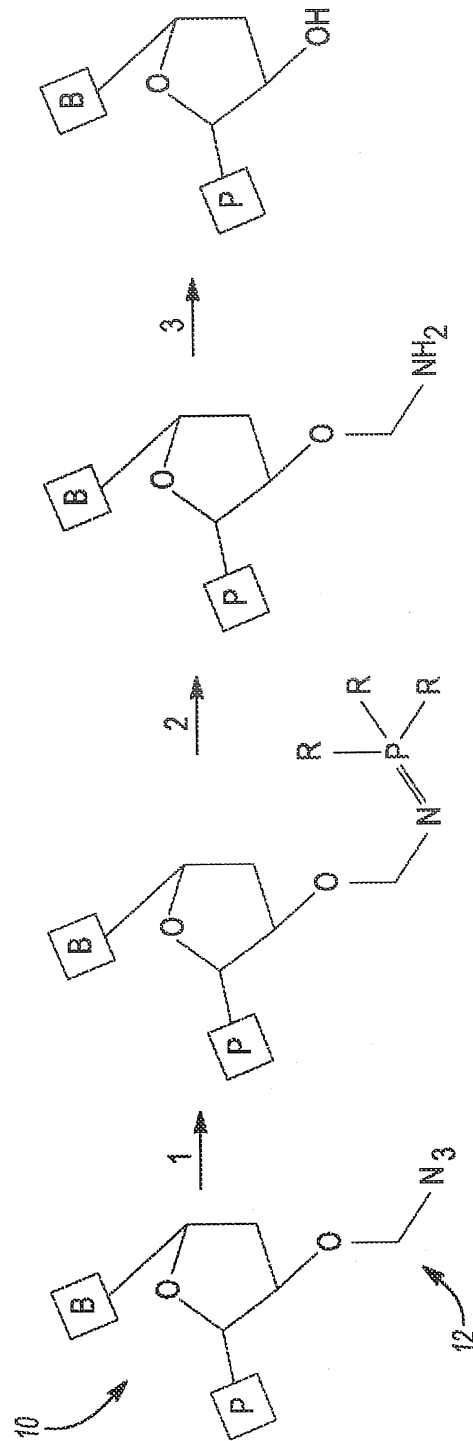
ghép oligonucleotit vào hydrogel polyme ban đầu; và

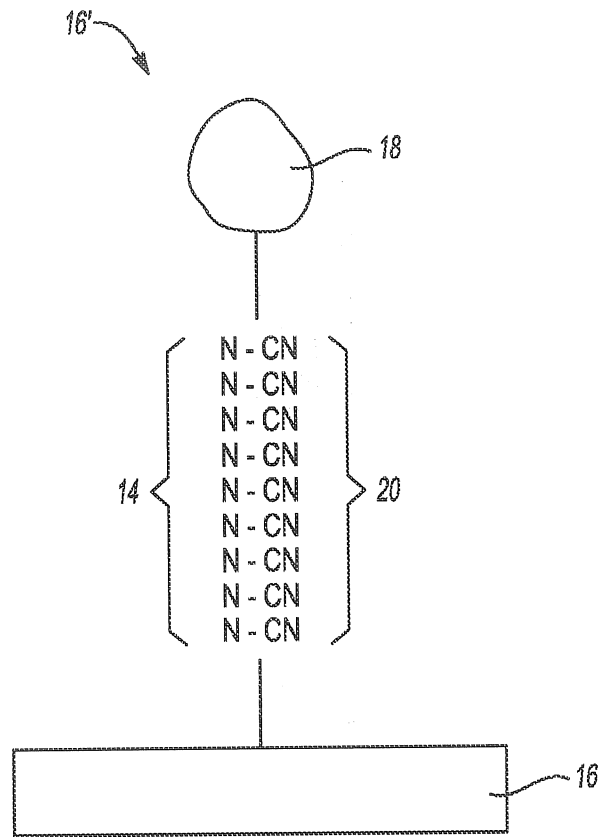
lai liên kết oligonucleotit bổ sung với oligonucleotit, trong đó chất xúc tác được gắn vào liên kết oligonucleotit bổ sung này.

15. Phương pháp như được xác định theo điểm 11, trong đó bước tạo thành hydrogel polyme xúc tác bao gồm bước:

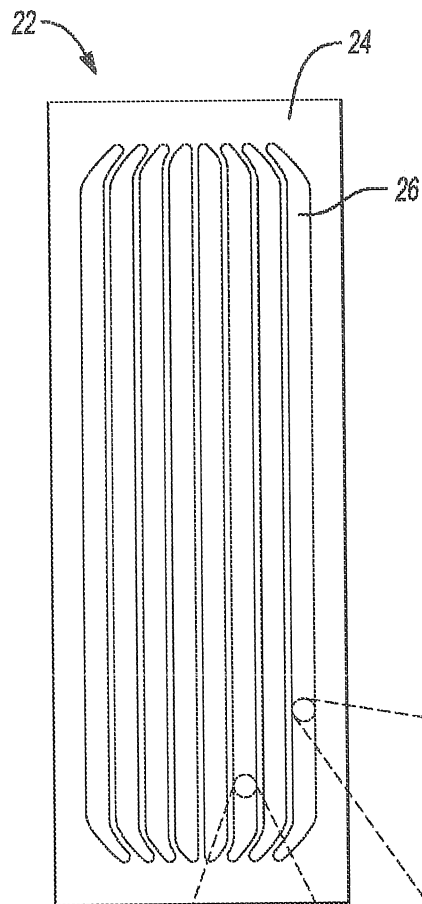
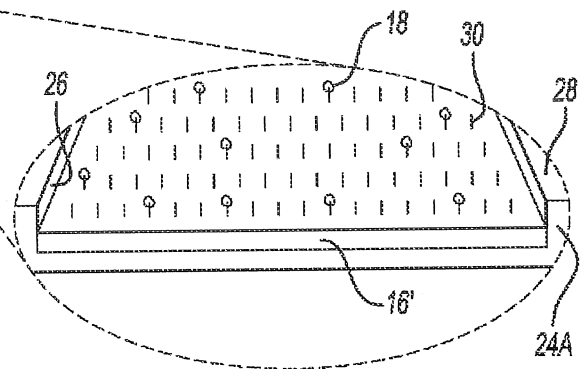
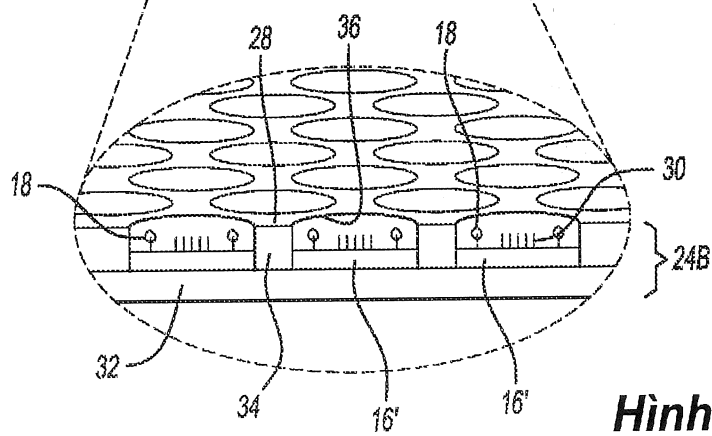
tổng hợp hydrogel polyme ban đầu; và

gắn phức chất kim loại-phối tử vào hydrogel polyme ban đầu, trong đó kim loại của phức chất kim loại-phối tử là chất xúc tác.

Hình 1



**Hình 2**

**Hình 3A****Hình 3B****Hình 3C**