(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) **1-0053267**

(51)[2020.01] **C12Q 1/6869**; B01L 3/00

(13) **B**

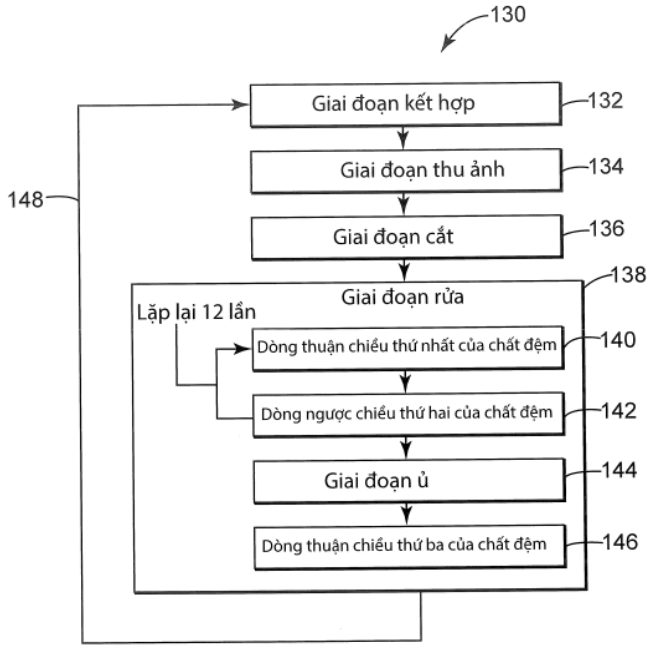
(21) 1-2020-07506
(22) 16/06/2020
(86) PCT/US2020/037864 16/06/2020
(87) WO2020/257151 24/12/2020
(30) 62/863,444 19/06/2019 US
(45) 25/11/2025 452
(43) 25/03/2022 408A
(73) ILLUMINA, INC. (US)
5200 Illumina Way, San Diego, California 92122, United States of America
(72) YEN, Tony (US); STAVA, Eric (US); PANCHAPAKESAN, Rajagopal (IN).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP VÀ THIẾT BỊ XÁC ĐỊNH THỨ TỰ CỦA CÁC NUCLEOTIT TRONG POLYNUCLEOTIT

(21) 1-2020-07506

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp và thiết bị xác định thứ tự của các nucleotit trong polynucleotit. Phương pháp bao gồm dẫn dòng chất phản ứng kết hợp đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy của thiết bị. Tiêu bản dòng chảy có polynucleotit thứ nhất nằm trong đó. Chất phản ứng kết hợp thêm bazơ thứ nhất vào trình tự bazơ. Trình tự bazơ này bao gồm polynucleotit thứ hai bổ sung vào polynucleotit thứ nhất. Hình ảnh của tín hiệu nhận biết phát ra từ bazơ thứ nhất được thu lại sau khi bazơ thứ nhất đã được thêm vào polynucleotit thứ hai. Chất phân cắt được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy để loại bỏ yếu tố kết thúc thứ nhất khỏi bazơ thứ nhất để cho phép bazơ tiếp theo trong trình tự bazơ được thêm vào polynucleotit thứ hai. Chất đệm được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy trong nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp.

FIG. 3



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phương pháp và thiết bị để xác định thứ tự của các nucleotit trong polynucleotit.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thiết bị được sử dụng để thực hiện các phương pháp xác định thứ tự của các nucleotit trong polynucleotit, có thể bao gồm hệ thống quản lý chất phản ứng (hệ thống quản lý chất phản ứng: RMS) nối thông với tiêu bản dòng chảy. RMS có khả năng lưu giữ, lựa chọn và dẫn chảy liên tục các chất phản ứng qua kênh dẫn dòng của tiêu bản dòng chảy.

Các phương pháp này có thể bao gồm nhiều chu trình của một chuỗi các chất phản ứng được lựa chọn mà dẫn truyền qua kênh dẫn dòng của tiêu bản dòng chảy để thực hiện các phản ứng hóa học được kiểm soát khác nhau trên các cụm của các polynucleotit thứ nhất được tách dòng nằm trong kênh dẫn dòng của tiêu bản dòng chảy. Các phản ứng hóa học cho phép các nucleotit được gắn nhãn để tạo ra cặp bazơ, một cặp bazơ tại một thời điểm, với trình tự các o bazơ của các polynucleotit thứ nhất. Ngay khi ghép đôi, các nhãn đánh dấu được kích thích để phát ra tín hiệu nhận dạng để xác định cặp bazơ. Mỗi polynucleotit được gắn nhãn thêm vào sợi polynucleotit thứ hai bổ trợ đang phát triển mà được bện xoắn kép với polynucleotit thứ nhất trong tiêu bản dòng chảy.

Theo đó, các sợi polynucleotit thứ hai bổ trợ có thể được dựng nên, một bazơ tại một thời điểm, để xác định trình tự của các bazơ trong cụm các polynucleotit thứ nhất. Số lượng các nucleotit đã biết trong các sợi polynucleotit thứ hai bổ trợ mà có thể được dựng nên càng lớn (tức là, độ dài sợi polynucleotit thứ hai trở nên càng dài), càng nhiều dữ liệu có thể được cung cấp liên quan đến thứ tự của các nucleotit trong cụm các polynucleotit thứ nhất và tốc độ phân tích tổng thể trở nên càng nhanh.

Tuy nhiên, nếu sự trao đổi chất phản ứng giữa các dòng chất phản ứng là không đủ, thì sự nhiễm bẩn chéo giữa các chất phản ứng có thể xảy ra. Theo đó, có nhu cầu về các thiết bị và phương pháp để xác định thứ tự các nucleotit trong các polynucleotit, mà có sự trao đổi chất phản ứng giữa các dòng chất phản ứng được cải thiện.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đưa ra các lợi thế bằng cách đề xuất thiết bị có chức năng thực hiện phương pháp xác định thứ tự các nucleotit trong polynucleotit theo một hoặc nhiều khía cạnh của sáng chế. Phương pháp bao gồm giai đoạn rửa, trong đó khi dẫn chảy chất đệm qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy của thiết bị, thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm là lớn hơn lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm. Ngoài ra, tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng có thể cao bằng 6, 10 hoặc cao hơn nữa. Phương pháp này làm tăng cường sự trao đổi chất phản ứng hơn các phương pháp khác, trong đó tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng là 1. Như vậy, việc gắn dính sớm pha được giảm xuống và độ dài của các polynucleotit mà có thể phát triển được tăng lên tương đối so với các phương pháp khác như thế.

Phương pháp theo một hoặc nhiều khía cạnh của sáng chế bao gồm dẫn chảy chất phản ứng kết hợp qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy của thiết bị. Tiêu bản dòng chảy có polynucleotit thứ nhất nằm trong đó. Chất phản ứng kết hợp thêm bazơ thứ nhất vào trình tự bazơ. Trình tự bazơ này bao gồm polynucleotit thứ hai bổ trợ vào polynucleotit thứ nhất. Hình ảnh của tín hiệu nhận biết phát ra từ bazơ thứ nhất được thu lại sau khi bazơ thứ nhất đã được thêm vào polynucleotit thứ hai. Chất phân cắt được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy để loại bỏ yếu tố kết thúc thứ nhất khỏi bazơ thứ nhất để cho phép bazơ tiếp theo trong trình tự bazơ được thêm vào polynucleotit thứ hai. Chất đệm được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy theo nhiều chu kỳ hướng dòng thuận chiều và ngược chiều để rửa chất phân cắt ra khỏi hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy.

Theo một số ví dụ về phương pháp, nhiều chu kỳ bao gồm 4 hoặc nhiều hơn 4 chu kỳ.

Theo một số ví dụ về phương pháp, nhiều chu kỳ bao gồm 12 hoặc nhiều hơn 12 chu kỳ.

Theo một số ví dụ về phương pháp, hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy được đặt trong hộp chứa của thiết bị, hộp chứa có thể lắp theo cách có thể tháo ra được vào trong thiết bị.

Theo một số ví dụ về phương pháp, chất phản ứng kết hợp, chất phân cắt và chất đệm được lưu trữ trong các bình chứa chất phản ứng của hệ thống quản lý chất phản ứng, bình chứa chất phản ứng được tạo kết cấu để lưu trữ tổng thể tích hữu hạn của mỗi chất phản ứng.

Theo một số ví dụ về phương pháp, việc dẫn chảy chất đệm bao gồm:

dẫn chảy thể tích dòng thuận chiều thứ nhất của chất đệm theo hướng dòng thuận chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ; và dẫn chảy thể tích dòng ngược chiều thứ hai của chất đệm theo hướng dòng ngược chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ, thể tích dòng thuận chiều thứ nhất lớn hơn thể tích dòng ngược chiều thứ hai.

Theo một số ví dụ về phương pháp, thể tích dòng thuận chiều lớn hơn thể tích dòng ngược chiều khoảng 3% hoặc nhiều hơn.

Theo một số ví dụ về phương pháp, việc dẫn dòng chất đệm bao gồm:

thời giai ủ mà hầu như không có dòng chất đệm đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy là trong khoảng 10 giây hoặc lâu hơn sau chu kỳ cuối cùng của các chu kỳ; và dẫn chảy thể tích dòng thuận chiều thứ ba của chất đệm theo hướng dòng thuận chiều sau giai đoạn ủ này.

Theo một số ví dụ về phương pháp, thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm, trong quá trình dẫn chảy chất đệm, về cơ bản được xác định bởi công thức ((1st FFV + 2nd RFV) * N) + 3rd FFV, trong đó:

1st FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ nhất,

2nd RFV là thể tích dòng ngược chiều thứ hai,

N là số lượng tổng cộng các chu kỳ trong số các chu kỳ, và

3rd FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ ba.

Theo một số ví dụ về phương pháp, lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm, trong quá trình dẫn chảy chất đệm, về cơ bản được xác định bởi công thức ((1st FFV – 2nd RFV) * N) + 3rd FFV.

Theo một số ví dụ về phương pháp, tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm là bằng hoặc lớn hơn khoảng 6.

Theo một số ví dụ về phương pháp, việc dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều và việc dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là khoảng 1 giây hoặc ngắn hơn cho mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều.

Theo một số ví dụ về phương pháp, việc dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều và việc dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là khoảng 200 milli giây hoặc ngắn hơn cho mỗi chu kỳ cho mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều.

Theo một số ví dụ về phương pháp, mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là khoảng 200 milli giây hoặc ngắn hơn.

Bất kỳ ví dụ nào về phương pháp đều có thể được thực hiện theo cách kết hợp phù hợp để đạt được các ưu điểm được mô tả ở đây.

Thiết bị theo một hoặc nhiều khía cạnh của sáng chế bao gồm hệ thống quản lý chất phản ứng được tạo kết cấu để được đặt trong thiết bị. Hệ thống quản lý chất phản ứng bao gồm nhiều bình chứa chất phản ứng. Các bình chứa chất phản ứng có ít nhất là bình chứa chất phản ứng thứ nhất, thứ hai và thứ ba được tạo kết cấu để chứa chất phản ứng kết hợp, chất phân cắt và chất đệm được chứa trong đó, hệ thống quản lý chất phản ứng có chức năng lựa chọn dòng chất phản ứng từ một trong số các bình chứa chất phản ứng. Tiêu bản dòng chảy được tạo kết cấu để được đặt trong thiết bị. Tiêu bản dòng chảy bao gồm kênh dẫn dòng nối thông với hệ thống quản lý chất phản ứng. Kênh dẫn dòng có chức năng định tuyến dòng chất phản ứng qua polynucleotit thứ nhất nằm trong kênh dẫn dòng. Thiết bị có chức năng:

dẫn dòng chất phản ứng kết hợp, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy, để thêm bazơ thứ nhất vào trình tự bazơ, trình tự bazơ bao gồm polynucleotit thứ hai bổ trợ cho polynucleotit thứ nhất;

thu hình ảnh, của tín hiệu nhận biết phát ra từ bazơ thứ nhất, sau khi bazơ thứ nhất đã được thêm vào polynucleotit thứ hai;

dẫn dòng chất phân cắt, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy, để loại bỏ yếu tố kết thúc thứ nhất ra khỏi bazơ thứ nhất để cho phép bazơ tiếp theo trong trình tự bazơ được thêm vào polynucleotit thứ hai; và

dẫn chảy chất đệm, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy trong nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tục để rửa chất phân cắt ra khỏi hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy.

Theo một số ví dụ, thiết bị thiết bị bao gồm hộp chứa được tạo kết cấu để chứa hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy, trong đó chất phản ứng kết hợp, chất phân cắt và thất đệm được lưu trữ trong các bình chứa chất phản ứng của hệ thống quản lý chất phản ứng, bình chứa chất phản ứng được tạo kết cấu để lưu trữ tổng thể tích hữu hạn của mỗi chất phản ứng.

Theo một số ví dụ, thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy trong nhiều chu kỳ trong số 4 hoặc nhiều hơn 4 chu kỳ theo các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp.

Theo một số ví dụ, thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm sao cho:

thể tích thứ nhất của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ;

thể tích thứ hai của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ, thể tích thứ nhất lớn hơn thể tích thứ hai;

giai đoạn ủ mà hầu như không có dòng chất đệm đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy được đặt là khoảng 10 giây hoặc dài hơn sau chu kỳ cuối cùng trong số các chu kỳ; và

thể tích dòng chảy thuận chiều thứ ba của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều sau giai đoạn ủ.

Theo một số ví dụ, thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm sao cho:

thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm về cơ bản được xác định bởi công thức ((1st FFV + 2nd RFV) * N) + 3rd FFV, trong đó:

1st FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ nhất,

2nd RFV là thể tích dòng ngược chiều thứ hai,

N là số lượng tổng cộng các chu kỳ trong số các chu kỳ, và

3^{rd} FFV is thể tích dòng thuận chiều thứ ba;

lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm về cơ bản được xác định bởi công thức $((1^{st}\ FFV - 2^{nd}\ RFV) * N) + 3^{rd}\ FFV$; và

trong đó tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm là bằng hoặc lớn hơn khoảng 6.

Theo một số ví dụ, thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm sao cho việc dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều và việc dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là khoảng 200 mili giây hoặc ngắn hơn cho mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều.

Bất kỳ ví dụ nào về thiết bị đều có thể được thực hiện theo cách kết hợp phù hợp để đạt được các ưu điểm được mô tả ở đây.

Cần xem xét rằng tất cả sự kết hợp của các khía cạnh nêu trên, bao gồm các phương pháp và các thiết bị, và các khái niệm bổ trợ được thảo luận chi tiết hơn dưới đây (miễn là các khái niệm đó không mâu thuẫn lẫn nhau) đều được coi là một phần của đối tượng theo sáng chế được trình bày ở đây.

Các đối tượng này và các đối tượng khác, các đặc điểm và các ưu điểm của sáng chế này sẽ trở nên rõ ràng nhờ phần mô tả chi tiết sau đây về các khía cạnh khác nhau của sáng chế được thực hiện cùng với các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ hơn từ phần mô tả chi tiết sau đâu kết hợp với các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1 thể hiện ví dụ đơn giản hóa của cấu trúc hóa học của nucleotit theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây;

Fig.2 thể hiện ví dụ đơn giản hóa của polynucleotit thứ nhất và polynucleotit thứ hai bổ trợ đang phát triển theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây;

Fig.3 thể hiện ví dụ về lưu đồ của phương pháp xác định thứ tự các nucleotit trong polynucleotit theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây;

Fig.4 thể hiện ví dụ về lưu đồ của phương pháp xác định thứ tự các nucleotit trong polynucleotit khác theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây;

Fig.5 thể hiện bảng thể hiện các tỷ lệ khác nhau của thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm thu được trong ví dụ thực hiện của giai đoạn rửa theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây;

Fig.6 thể hiện đồ thị của các tỷ lệ của thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng đối với độ dốc gắn dính sớm pha mà được dựng từ dữ liệu thu được theo ví dụ thực hiện trên Fig.5 theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây;

Fig.7 thể hiện ví dụ về sơ đồ tổng thể của thiết bị theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây; và

Fig.8 thể hiện ví dụ về sơ đồ khối tổng thể của thiết bị trên Fig.7 theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các ví dụ nhất định sẽ được mô tả dưới đây để cung cấp hiểu biết tổng quát về các nguyên lý của các kết cấu, chức năng, sản xuất và sử dụng các phương pháp, hệ thống, và thiết bị được bộc lộ ở đây. Một hoặc nhiều ví dụ được minh họa trên các hình vẽ kèm theo. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực sẽ hiểu rằng các phương pháp, hệ thống và thiết bị cụ thể được mô tả ở đây và được minh họa trên các hình vẽ kèm theo là các ví dụ không giới hạn và phạm vi của sáng chế được xác định chỉ bởi các điểm yêu cầu bảo hộ. Các đặc điểm kỹ thuật được minh họa hoặc được mô tả kết hợp với một ví dụ có thể được kết hợp với các đặc điểm kỹ thuật của các ví dụ khác. Các sửa đổi và thay đổi được dự kiến là đều thuộc phạm vi của sáng chế.

Các thuật ngữ "hầu như", "xấp xỉ", "khoảng", "tương đối" hoặc các thuật ngữ tương tự khác mà có thể được sử dụng trong bản mô tả, bao gồm cả các điểm yêu cầu bảo hộ, được sử dụng để mô tả và tính đến các biến động nhỏ, chẳng hạn như u do sự thay đổi quy trình xử lý, từ giá trị tham chiếu đến cả các tham số. Các biến động nhỏ như thế bao gồm các thăng giáng tại điểm 0 từ giá trị tham chiếu hoặc tham số. Ví dụ, chúng có thể là thấp hơn hoặc bằng ± 10%, chẳng hạn như thấp hơn hoặc bằng ± 5%, chẳng hạn như thấp hơn hoặc bằng ± 2%, chẳng hạn như thấp hơn hoặc bằng ± 1%, chẳng hạn như thấp

hơn hoặc bằng ± 0,5%, chẳng hạn như thấp hơn hoặc bằng ± 0.2%, chẳng hạn như thấp hơn hoặc bằng ± 0,1%, chẳng hạn như thấp hơn hoặc bằng ± 0,05%.

Tham chiếu trên Fig.1, ví dụ đơn giản hóa về cấu trúc hóa học của nucleotit 100 theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây được thể hiện. Nucleotit 100 có cấu tạo gồm có ba phân tử tiểu đơn vị: bazơ nitơ 102 (còn được biết đến là nucleobazơ hoặc bazơ), đường có 5 nguyên tử cacbon 104 (chẳng hạn như riboza hoặc deoxyriboza) và ít nhất một nhóm phosphat 106. Nhiều nucleotit mà được nối với nhau được biết đến là các polynucleotit. Các polynucleotit thứ nhất 108 và thứ hai 110, nhìn thấy rõ nhất trên Fig.2, là các ví dụ về các polynucleotit như thế.

Bazơ nitơ 102 của nucleotit 100 có thể là một trong số năm loại sau đây: adenin (A), guanin (G), cytosin (C), thymin (T) và uracil (U). Mỗi loại bazơ 102 sẽ ghép cặp (tức là, gắn hóa học) với chỉ một loại bazơ khác để tạo ra cặp bazơ bổ trợ trong hai xoắn kép bổ trợ của các polynucleotit, chẳng hạn như polynucleotit xoắn kép bổ trợ 112 được thể hiện trên Fig.2. 2.

Bổ sung, như được sử dụng ở đây, là chỉ việc ghép cặp của bazơ thứ nhất của nucleotit thứ nhất với bazơ thứ hai cụ thể của nucleotit thứ hai mà có thể gắn hóa học với nó. Bazơ thứ hai (và nucleotit liên quan của nó) được coi là bổ trợ cho bazơ thứ nhất (và nucleotit liên quan của nó). Ví dụ: adenin-thymin (A-T) và guanin-cytosin (G-C) là các cặp bazơ bổ trợ mà có thể liên kết các sợi polynucleotit kép bổ trợ của axit deoxyribonucleic (ADN). Đồng thời, adenin-uracil (A-U) và guanin-cytosin (G-C) là các cặp bazơ bổ trợ mà có thể liên kết các sợi polynucleotit kép bổ trợ của axit ribonucleic (ARN).

Tham chiếu trên Fig.2, ví dụ đơn giản hóa về polynucleotit thứ nhất 108 và polynucleotit thứ hai bổ trợ đang phát triển 110 theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây được thể hiện. Các polynucleotit thứ nhất 108 và thứ hai 110 được nối với nhau để tạo ra polynucleotit xoắn kép 112.

Polynucleotit thứ nhất 108 được neo hóa học 114 với sàn 116 của kênh dẫn dòng 224 của tiêu bản dòng chảy 202 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7). Polynucleotit thứ nhất 108 bao gồm các nucleotit từ 118-1 đến 118-N, trong đó N là tổng số lượng các nucleotit 118 trong polynucleotit thứ nhất 108 và cũng chỉ ra độ dài của polynucleotit thứ nhất 108. Loại cụ thể của bazơ nitơ kết hợp với mỗi nucleotit 118 được xác định bởi các chữ

cái A, G, C hoặc T được khoanh tròn, mà lần lượt đại diện cho các loại bazơ adenin, guanin, cytosin và thymin. Polynucleotit thứ nhất 108 có thể là một trong số nhiều cụm các polynucleotit thứ nhất 108 giống hệt nhau được tách dòng dược neo vào sàn 116 của kênh dẫn dòng 224.

Polynucleotit thứ hai 110 bao gồm ít nhất là các nucleotit từ 120-1 đến 120-6. Loại cụ thể của bazơ nitơ được kết hợp với mỗi nucleotit 120 được xác định bởi các chữ cái A, G, C hoặc T được khoanh tròn. Mỗi nucleotit 120 bao gồm nhãn đánh dấu hóa học (chẳng hạn như nhãn huỳnh quang) mà, khi được kích thích (ví dụ, bằng ánh sáng kích thích), sẽ phát ra tín hiệu nhận biết (chẳng hạn như ánh sáng huỳnh quang) mà sẽ xác định bazơ cụ thể của nucleotit 120.

Các bazơ của các nucleotit 120 chỉ có thể gắn với bazơ bổ trợ của các nucleotit 118 để tạo ra một loạt các cặp bazơ bổ trợ từ 122-1 đếm 122-6. Các cặp bazơ 122 và các nucleotit 118, 120 liên quan của chúng tạo ra polynucleotit xoắn kép 112.

Thiết bị, chẳng hạn như thiết bị 200, được sử dụng trong khi thực hiện các phương pháp để xác định thứ tự các nucleotit từ 118-1 đến 118-N trong polynucleotit thứ nhất 108, có thể bao gồm hệ thống quản lý chất phản ứng 204 nối thông với tiêu bản dòng chảy 202 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7). Hệ thống quản lý chất phản ứng có khả năng lưu trữ, lựa chọn và dẫn chảy liên tục nhiều chất phản ứng qua kênh dẫn dòng 224 của tiêu bản dòng chảy 202. Hệ thống quản lý chất phản ứng và/hoặc tiêu bản dòng chảy có thể có, hoặc có thể không, được định vị trong hộp chứa có thể lắp theo cách tháo ra được 230 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7) của thiết bị.

Như sẽ được giải thích chi tiết hơn ở đây, các phương pháp này có thể bao gồm nhiều chu kỳ trong số cuỗi các chất phản ứng được lựa chọn 208-218 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7) mà được định hướng qua kênh dẫn dòng 224 của tiêu bản dòng chảy 202 để thực hiện các phản ứng hóa học được kiểm soát khác nhau trên polynucleotit thứ nhất 108. Ít nhất một chất phản ứng, được biết đến là chất phản ứng kết hợp, mà chảy qua polynucleotit thứ nhất 108, bao gồm các nucleotit 120. Mỗi nucleotit 120 trong chất phản ứng kết hợp bao gồm nhãn đánh dấu hóa học (chẳng hạn như nhãn huỳnh quang) mà, khi được kích thích (ví dụ ánh sáng kích thích), sẽ phát ra tín hiệu nhận biết (chẳng hạn như ánh sáng huỳnh quang) mà sẽ xác định bazơ cụ thể của nucleotit 120. Đồng thời, bazơ của mỗi nucleotit 120 trong chất phản ứng kết hợp bao gồm yếu tố kết thúc

có thể phân tách, mà ngăn chặn để các bazơ khác không gắn vào nó. Các phản ứng hóa học cho phép các nucleotit 120 tạo ra các cặp bazơ 122, một cặp bazơ 122 tại một thời điểm, với trình tự bazơ 118 của polynucleotit thứ nhất 108.

Tuy nhiên, nếu sự trao đổi chất phản ứng giữa các dòng chất phản ứng là không đủ, thì sự nhiễm bẩn chéo giữa các chất phản ứng có thể xảy ra. Tức là, nếu chất phản ứng thứ nhất không được loại bỏ và được trao đổi với dòng chất phản ứng thứ hai sau đó của phương pháp, thì chất phản ứng thứ nhất có thể làm nhiễm bẩn chất phản ứng thứ hai. Điều này có thể dẫn đến hiện tượng được biết đến là gắn dính sớm pha, trong đó các bazơ được gắn nhiều nhãn vô tình được thêm vào sợi polynucleotit thứ hai bổ trợ đang phát triển với mỗi chu kỳ. Gắn dính sớm pha làm ảnh hưởng đến độ chính xác của phương pháp xác định trình tự các nucleotit . Gắn dính sớm pha cũng tích lũy, trong đó nó có thể lặp lại với mỗi chu kỳ của phuwong pháp và làm giảm hơn nữa độ chính xác với mỗi chu kỳ. Gắn dính sớm pha cũng sẽ làm giảm số lượng bazơ (tức là, giảm độ dài) mà có thể được dựng trong polynucleotit thứ hai bổ trợ, trong đó thứ tự của các bazơ đó có thể được xác định trong phạm vi độ chính xác có thể chấp nhận được. Sự trao đổi chất phản ứng có thể gây thách thức cụ thể trong các vùng của tiêu bản dòng chảy có kênh dẫn không đồng đều hoặc trong các vùng có điều kiện chảy lỏng kém chẳng hạn như các góc.

Bên cạnh việc tăng gắn dính sớm pha, sự trao đổi chất phản ứng không thích hợp cũng có thể góp phần gây ra các hiện tượng khác mà có thể làm giảm độ chính xác của các phương pháp xác định trình tự các nucleotit khác nhau. Ví dụ, sự trao đổi chất phản ứng không thích hợp có thể dẫn đến sự tăng gắn dính pha, trong đó không có các bazơ được đánh dấu được bổ sung vào nucleotit thứ hai bổ trợ đang phát triển. Đồng thời, sự trao đổi chất phản ứng không thích hợp có thể dẫn đến sự giảm phần trăm các lọc các cụm gắn dính, mà là chỉ báo về độ tinh khiết của tín hiệu từ mỗi cụm.

Ngoài ra, khi RMS được đặt trong hộp chứa của thiết bị, dung tích lưu trữ chất phản ứng của bình chứa chất phản ứng có thể bị giới hạn bởi các sự hạn chế về không gian của hộp chứa, như vậy sự trao đổi chất phản ứng hiệu quả là quan trọng hơn.

Theo ví dụ được minh họa trên Fig.2, phương pháp cho phép các nucleotit được gắn nhãn từ 120-1 đến 120-5 kết hợp tuần tự với các nucleotit từ 118-1 đến 118-5 để tạo ra các cặp bazơ bổ trợ từ 122-1 đến 122-5. Nucleotit 120-6 là nucleotit tiếp theo

trong trình tự, và được kết hợp (hoặc được ghép cặp) với nucleotit 118-6 để tạo ra cặp bazơ bổ trợ 122-6.

Ngay khi ghép cặp, nhãn đánh dấu hóa học của nucleotit 120-6 sẽ được kích thích để phát ra tín hiệu nhận biết mà sẽ định danh cặp bazơ 122-6. Ngay khi được định danh, yếu tố kết thúc được gắn vào bazơ của nucleotit 120-6 được loại bỏ sao cho bazơ tiếp theo có thể được gắn. Nucleotit được gắn nhãn 120-6 bổ sung vào sợi polynucleotit thứ hai bổ trợ đang phát triển 110 mà được xoắn kép với polynucleotit thứ nhất 108.

Theo đó, sợi polynucleotit thứ hai bổ trợ 110 có thể được dựng, một bazơ 120 tại một thời điểm, để xác định trình tự bazơ 118 trong cụm các polynucleotit thứ nhất 108. Số lượng các nucleotit 120 trong sợi polynucleotit thứ hai bổ trợ 110 mà có thể được dựng nên càng lớn (tức là, độ dài sợi polynucleotit thứ hai trở nên càng dài), càng có nhiều dữ liệu có thể được cung cấp liên quan đến thứ tự các nucleotit trong cụm của polynucleotit thứ nhất 108 và sự phân tích tổng thể trở nên càng nhanh.

Tham chiếu trên Fig.3, ví dụ về lưu đồ đơn giản hóa của phương pháp 130 để xác định thứ tự các nucleotit trong polynucleotit theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây được mô tả. Phương pháp 130 bao gồm bốn giai đoạn cơ bản, bao gồm: giai đoạn kết hợp 132, giai đoạn thu ảnh 134, giai đoạn cắt 136 và giai đoạn rửa 138.

Trong giai đoạn kết hợp 132, chất phản ứng kết hợp được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202 của thiết bị 200 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7). Tiêu bản dòng chảy 202 có polynucleotit thứ nhất 108 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.2) được chứa trong đó. Chất phản ứng kết hợp thêm bazơ thứ nhất (được kết hợp với nucleotit 120-6) vào trình tự bazơ (được kết hợp với các nucleotit từ 120-1 đến 120-5). Trình tự bazơ (và các nucleotit liên quan của chúng từ 120-1 đến 120-6) bao gồm polynucleotit thứ hai 110 mà là bổ trợ cho polynucleotit thứ nhất 108.

Cụ thể hơn, chất phản ứng kết hợp chảy qua các cụm các polynucleotit thứ nhất được tách dòng 108 mà được neo trước đó vào kênh dẫn dòng 224 của tiêu bản dòng chảy 202. Chất phản ứng kết hợp bao gồm các nucleotit 120 đã biết, trong đó các bazơ của các nucleotit 120 đó ghép cặp tuần tự với các bazơ của các polynucleotit thứ nhất 108 để tạo ra các polynucleotit thứ hai đang phát triển 110 mà bổ trợ cho polynucleotit thứ nhất 108. Các polynucleotit thứ nhất 108 và thứ hai 110 tạo ra các polynucleotit 112 xoắn kép, chẳng hạn như các đoạn ADN. Các loại bazơ của các polynucleotit thứ nhất

108 và thứ hai 110 có thể mà loại bất kỳ trong số adenin (A), guanin (G), cytosin (C), thymin (T) hoặc uracil (U).

Các nucleotit 120 trong chất phản ứng kết hợp cũng bao gồm nhãn đánh dấu (ở ví dụ này là nhãn huỳnh quang) mà cho phép nhận biết loại bazơ với tín hiệu kích thích (ở ví dụ này là với ánh sáng kích thích). Các nucleotit 120 cũng bao gồm yếu tố kết thúc có thể phân cắt (hoặc nhóm khóa) như đã biết đến trong lĩnh vực này, mà ngăn chặn nhiều hơn một bazơ của các polynucleotit thứ hai 110 tại một thời điểm không bị ghép cặp với các bazơ của các polynucleotit thứ nhất 108.

Trong giai đoạn thu ảnh 14, hình ảnh của tín hiệu nhận biết phát ra từ bazơ thứ nhất của nucleotit 120-6 được thu lại, sau khi bazơ thứ nhất của nucleotit 120-6 đã được thêm vào polynucleotit thứ hai 110.

Cụ thể hơn, các nhãn huỳnh quang của các nucleotit 120 được kết hợp với polynucleotit thứ hai 110 được kích thích với ánh sáng kích thích để phát ra ánh sáng huỳnh quang đặc trưng. Hình ảnh của ánh sáng huỳnh quang sau đó được thu lại để xác định loại bazơ của nucleotit 120-6 mới được thêm vào trong trình tự các nucleotit từ 120-1 đến 120-6 mà tạo ra polynucleotit thứ hai đang phát triển 110. Vì polynucleotit thứ hai 110 là bổ trợ cho polynucleotit thứ nhất 108, thứ tự các nucleotit 118 trong polynucleotit thứ nhất có thể được xác định. Polynucleotit thứ hai 110 có thể được phát triển càng dài, thứ tự các nucleotit 118 trong polynucleotit thứ nhất 108 có thể được xác định càng nhiều.

Trong giai đoạn cắt 136, chất phân cắt được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202 để loại bỏ yếu tố kết thúc ra khỏi nucleotit 120-6. Điều này cho phép nucleotit tiếp theo (không được thể hiện) trong trình tự các nucleotit từ 120-1 đến 120-6 được thêm vào polynucleotit thứ hai 110.

Trong giai đoạn rửa 138, chất đệm (hoặc chất rửa) được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202 trong nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp để rửa chất phân cắt ra khỏi hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy. Chất đệm có thể là hỗn hợp của các chất hóa học được sử dụng để loại bỏ các hóa chất ngoài dự kiến ra khỏi tiêu bản dòng chảy và hệ thống quản lý chất phản ứng. Các hóa chất ngoài dự kiến có thể là, ví dụ, các chất phản ứng hoạt động (chẳng hạn như các chất phân cắt dư thừa) còn dư từ bước trước đó hoặc

các tạp chất khác nhau mà được tạo ra như là các sản phẩm phụ từ bước trước đó. Chất đệm có thể, ví dụ, dung dịch muối đệm với axit lipoic được bổ sung.

Dòng thuận chiều, như được sử dụng ở đây, là hướng của dòng chất phản ứng từ các bình chứa chất phản ứng 232 của hệ thống quản lý chất phản ứng 204 đến tiêu bản dòng chảy 202 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7). Dòng ngược chiều, như được sử dụng ở đây, là hướng của dòng chất phản ứng từ tiêu bản dòng chảy 202 đến các bình chứa chất phản ứng 232.

Theo ví dụ trên Fig.3, nhiều chu kỳ được minh họa như là 12 chu kỳ lặp lại của hướng dòng chảy thuận chiều 140 và hướng dòng chảy ngược chiều liên tiếp 142 của chất đệm. Tuy nhiên, chất đệm có thể được tuần hoàn trong hướng dòng chảy thuận chiều 140 và sau đó trong hướng dòng ngược chiều liên tiếp 142 với số lần bất kỳ. Ví dụ, nhiều chu kỳ có thể là 2, 4, 6, 12 hoặc nhiều hơn 12 chu kỳ.

Nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều 140 và ngược chiều liên tiếp 142 trong giai đoạn rửa 138 cho phép loại bỏ triệt để (tức là, sự trao đổi chất phản ứng) chất phân cắt được đưa vào hệ thống trong giai đoạn cắt 136 hơn so với các phương pháp trước đó sử dụng cùng thể tích hạn chế của chất đệm. Điều này là vì, các phương pháp trước đó chỉ dẫn chất phản ứng theo hướng thuận chiều trong giai đoạn rửa. Như vậy, trong các phương pháp trước đó, cùng một loại chất đệm sẽ chỉ đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy một lần và có thể không loại bỏ đủ chất phân cắt trong giai đoạn rửa. Dưới các điều kiện đó, trong giai đoạn kết hợp tiếp theo, chất phản ứng kết hợp tiếp theo có thể bị nhiễm bẩn bởi chất phân cắt còn lại. Chất phân cắt còn lại sau đó có thể loại bỏ sớm các yếu tố kết thúc khỏi các nucleotit trong giai đoạn kết hợp tiếp theo. Điều này có thể cho phép lượng gắn dính sớm pha không mong muốn, trong đó nhiều hơn một bazơ được gắn vào polynucleotit thứ hai đang phát triển tại một thời điểm.

Nếu sự gắn dính sớm pha được cho phép tích lũy với mỗi chu kỳ mới, thì độ bất định đáng kể về thứ tự bazơ trong các polynucleotit có thể phát triển. Độ bất định có thể tăng lên qua mỗi chu kỳ, mà có thể làm giảm độ chính xác của dữ liệu mà co thể thu được như là sự phát triển sợi polynucleotit. Theo đó, độ dài tổng thể của sợi polynucleotit thứ hai có thể được phát triển, sao cho thứ tự các bazơ của nó có thể được xác định với độ chính xác hợp lý, có thể bị giới hạn bởi gắn dính sớm pha.

Để so sánh, nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều 140 và ngược chiều 142 theo sáng chế cho phép cùng một chất đệm đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy vài lần để rửa triệt để hơn. Theo một ví dụ, việc sử dụng nhiều chu kỳ của hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp như được mô tả ở đây có thể cung cấp việc sử dung hiệu quả hơn đối với thể tích hạn chế của chất đệm, đặc biệt là ví dụ khi việc tăng thể tích chất đệm là không mong muốn do các ràng buộc về không gian và/hoặc chi phí. Kết quả là, có thể cần ít chất đệm để đạt được mức độ trao đổi chất phản ứng đã cho.

Các hướng dòng chảy thuận chiều 140 và ngược chiều 142 liên tiếp, như được sử dụng ở đây, là các hướng dòng chảy thuận chiều và ngược chiều xảy ra liền kề nhau mà không có các bước xen giữa. Không có các bước xen giữa có nghĩa là hầu như không có giai đoạn ủ (hoặc thời gian trì hoãn) mà không có dòng chảy giữa các dòng chất phản ứng thuận chiều và ngược chiều.

Theo đó, việc dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều 140 và việc dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều 142 cần được phân biệt bởi thời gian trì hoãn khoảng 1 giây hoặc ngắn hơn, khoảng 200 milli giây hoặc ngắn hơn, hoặc about 100 milli giây hoặc ngắn hơn, cho mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều. Ngoài ra, mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều cần được phân tách bởi thời gian trì hoãn khoảng 1 giây hoặc ngắn hơn, khoảng 200 milli giây hoặc ngắn hơn, hoặc khoảng 100 mili giây hoặc ngắn hơn.

Theo một ví dụ, để ngăn chặn nhiễm bẩn bình chứa chất phản ứng 232 trong hệ thống quản lý chất phản ứng 204 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7), thể tích chất đệm mà chảy theo hướng thuận chiều 40 cần lớn hơn thể tích chất đệm mà chảy theo hướng ngược chiều. Nói cách khác, để ngăn chặn sự nhiễm bẩn bình chứa chất phản ứng trong giai đoạn rửa:

thể tích dòng thuận chiều thứ nhất (1^{st} FFV) của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ; và

thể tích dòng ngược chiều thứ hai (2^{nd} RFV) của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ, trong đó thể tích dòng thuận chiều thứ nhất là lớn hơn thể tích dòng ngược chiều thứ hai. Cụ thể hơn, thể tích

dòng thuận chiều thứ nhất (1st FFV) có thể lớn hơn thể tích dòng ngược chiều thứ hai (2nd RFV) khoảng 3% hoặc nhiều hơn.

Sau khi nhiều hướng dòng chảy thuận chiều và ngược chiều 140, 142 đã diễn ra, giai đoạn rửa 138 tiếp tục đến giai đoạn ủ 144. Giai đoạn ủ 144 là giai đoạn hầu như không có chất đệm chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202. Giai đoạn ủ 144 có thể có thời gian khoảng 10 giây hoặc dài hơn sau chu kỳ cuối cùng của các chu kỳ 140, 142 đã diễn ra.

Sau giai đoạn ủ 144, giai đoạn rửa 138 tiến hành đến bước dẫn chảy thuận chiều thứ ba 146. Tức là, thể tích dòng chảy thuận chiều thứ ba (3rd FFV) của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều sau giai đoạn ủ 144. Giai đoạn ủ 144 và bước dẫn chảy thuận chiều thứ ba 146 có thể giúp khuếch tán chất phân cắt khỏi các mạch đứt gãy mà có thể phát triển trong các mép của hệ thống quản lý chất phản ứng hoặc tiêu bản dòng chảy.

Sau khi hoàn tất giai đoạn rửa 138, phương pháp sau đó quay lại bước 148 vào giai đoạn kết hợp 132 để bắt đầu quy trình thêm nucleotit 120 tiếp theo trong trình tự các nucleotit vào polynucleotit thứ hai 110.

Trong một số phương pháp đang có, vì chất đệm chỉ được dẫn chảy theo hướng thuận chiều trong giai đoạn rửa, tổng lượng chất đệm tiêu hao (lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng) trong giai đoạn rửa về cơ bản bằng với tổng lượng thể tích chất đệm được cuối qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy (thể tích cuốn tổng cộng) trong giai đoạn rửa. Ngược lại, ở phương pháp theo sáng chế, thể tích cuốn tổng cộng có thể lớn hơn gấp nhiều lần lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng trong giai đoạn rửa.

Cụ thể hơn, thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm, trong quá trình dẫn chảy chất đệm (giai đoạn rửa), về cơ bản được xác định bởi công thức ((1st FFV + 2nd RFV) * N) + 3rd FFV, trong đó:

1st FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ nhất,

2nd RFV là thể tích dòng ngược chiều thứ hai,

N là số lượng tổng cộng các chu kỳ trong số các chu kỳ, và

3rd FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ ba.

Ngoài ra, lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm, trong quá trình dẫn chảy chất đệm (giai đoạn rửa), về cơ bản được xác định bởi công thức:

$((1^{st}\ FFV - 2^{nd}\ RFV) * N) + 3^{rd}\ FFV$.

Thuật ngữ "về cơ bản được xác định" như được sử dụng trong công thức ở trên được sử dụng để mô tả và xem xét đối với các dung sai đo mà có thể xảy ra khi xác định các tham số như là 1^{st} FFV, 2^{nd} RFV và 3^{rd} FFV.

Vì cùng một thể tích chất đệm có thể đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy vài lần, tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm về cơ bản có thể cao hơn một. Cụ thể hơn, tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm có thể bằng hoặc lớn hơn khoảng 6, khoảng 10, khoảng 12 hoặc cao hơn nữa.

Trong hệ thống thiết bị có hộp chứa, hệ thống quản lý chất phản ứng và/hoặc tiêu bản dòng chảy có thể được đặt trong hộp chứa. Hộp chứa có thể lắp theo cách có thể tháo ra được vào thiết bị, có nghĩa là hộp chứa có thể được lắp vào và được tháo ra khỏi thiết bị.

Như vậy, trong hệ thống thiết bị có hộp chứa, tỷ lệ lớn (2, 6, 10, 12 hoặc lớn hơn nữa) của thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng có thể là ưu điểm đặc biệt. Điều này là vì chất phản ứng kết hợp, chất phân cắt và chất đệm có thể được lưu trữ trong các bình chứa chất phản ứng của hệ thống quản lý chất phản ứng và hệ thống quản lý chất phản ứng có thể là một phần của hộp chứa. Theo đó, bình chứa chất phản ứng của hệ thống quản lý chất phản ứng có thể được tạo kết cấu để lưu trữ tổng thể tích hữu hạn của mỗi chất phản ứng để lắp vừa vào trong hộp chứa. Tỷ lệ lớn của thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng cho phép cùng một thể tích hạn chế của chất phản ứng được cuối qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy vào lần trước khi nó bị tiêu hao, do đó nâng cao sự trao đổi chất phản ứng.

Tham chiếu trên Fig.4, ví dụ về lưu đồ của phương pháp khác 150 để xác định thứ tự các nucleotit trong polynucleotit theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây được mô tả. Phương pháp 150 bao gồm giai đoạn kết hợp 152, giai đoạn thu ảnh 154, giai đoạn cắt 156 và giai đoạn rửa 158.

Trong giai đoạn kết hợp 152, chất phản ứng kết hợp 160 được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202 của thiết bị 200 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.7). Chất phản ứng kết hợp có thể là hỗn hợp của các hóa chất mà keetse hợp các nucleotit được gắn nhãn huỳnh quang vào các sợi ADN.

Tiêu bản dòng chảy 202 có polynucleotit thứ nhất 108 (nhìn thấy rõ nhất trên Fig.2) được đặt trong đó. Chất phản ứng kết hợp thêm bazơ thứ nhất (được kết hợp với nucleotit 120-6) vào trình tự bazơ (được kết hợp với các nucleotit từ 120-1 đến 120-5). Trình tự bazơ (và các nucleotit được kết hợp của chúng từ 120-1 đến 120-6) tạo ra polynucleotit thứ hai 110 mà bổ trợ cho polynucleotit thứ nhất 108.

Các nucleotit 120 trong chất phản ứng kết hợp cũng bao gồm nhãn (ở ví dụ này, nhãn huỳnh quang) mà cho phép nhận biết loại bazơ với tín hiệu kích thích (ở ví dụ này là với ánh sáng kích thích). Các nucleotit 120 cũng bao gồm yếu tố kết thúc có thể phân cắt (hoặc nhóm khóa) như đã được biết đến trong lĩnh vực này, mà ngăn chặn nhiều hơn một bazơ của các polynucleotit thứ hai110 tại một thời điểm khỏi được ghép cặp với các bazơ của các polynucleotit thứ nhất 108.

Tiếp theo trong giai đoạn kết hợp 152, chất rửa 162 được sử dụng để loại bỏ chất phản ứng kết hợp 160 dư thừa bất kỳ. Chất rửa có thể là hỗn hợp của các hóa chất được sử dụng để loại bỏ các chất phản ứng hoạt động khỏi tiêu bản dòng chảy.

Phương pháp tiếp tục đến giai đoạn thu ảnh 154, trong đó chất quét ảnh 164 được sử dụng để bảo vệ bề mặt tiêu bản dòng chảy khỏi bị hư hại ảnh trước khi hình ảnh được thu lại. Chất quét ảnh 164 có thể là hỗn hợp các hóa chất mà làm ổn định các sợi nucleotit trong quá trình phát hiện.

Tiếp theo, trong giai đoạn thu ảnh 154, hình ảnh của tín hiệu nhận biết phát ra từ bazơ thứ nhất của nucleotit 120-6 là ảnh chụp 166, sau khi bazơ thứ nhất của nucleotit 120-6 đã được thêm vào polynucleotit thứ hai 110.

Cụ thể hơn, các nhãn huỳnh quang của các nucleotit 120 được kết hợp với polynucleotit thứ hai 110 được kích thích với ánh sáng kích thích để phát ra ánh sáng huỳnh quang đặc trưng. Hình ảnh của ánh sáng huỳnh quang sau đó được thu lại để cung cấp thông tin nhận biết về loại bazơ của nucleotit 120-6 mới được thêm vào trong trình tự các nucleotit từ 120-1 đến 120-6 mà tạo ra polynucleotit thứ hai đang phát triển 110.

Tiếp theo trong giai đoạn thu ảnh 154, chất đánh dấu bổ sung 168 được sử dụng để gắn nhãn thứ hai với nucleotit 120-6 mới được thêm vào. Chất đánh dấu 168 có thể là hỗn hợp của các hóa chất được sử dụng để cấp nhãn huỳnh quang vào nucleotit.

Tiếp theo trong giai đoạn thu ảnh 154, chất rửa 170 được sử dụng để loại bỏ chất đánh dấu 168 dư thừa. Chất rửa 170 có thể là hỗn hợp của các hóa chất được sử dụng để loại bỏ các chất phản ứng hoạt động ra khỏi tiêu bản dòng chảy.

Tiếp theo trong giai đoạn thu ảnh 154, chất quét ảnh thứ hai 172 được áp dụng để bảo vệ bề mặt tiêu bản dòng chảy khỏi bị hư hại hình ảnh trước khi hình ảnh thứ hai được chụp. Chất quét ảnh thứ hai có thể là hỗn hợp của các hóa chất mà làm ổn định các sợi nucleotit trong quá trình phát hiện.

Tiếp theo trong giai đoạn thu ảnh 154, hình ảnh thứ hai của tín hiệu nhận biết thứ hai phát ra từ bazơ thứ nhất của nucleotit 120-6 được chụp lại 174. Cụ thể hơn, các nhãn thứ hai huỳnh quang của các nucleotit 120 được kết hợp với polynucleotit thứ hai 110 được kích thích với ánh sáng kích thích đế phát ra ánh sáng huỳnh quang thứ hai đặc trưng. Hình ảnh của ánh sáng huỳnh quang thứ hai sau đó được chụp để cung cấp thông tin nhận biết bổ sung về loại bazơ nucleotit 120-6 mới thêm vào.

Phương pháp tiếp tục đến giai đoạn cắt 156, trong đó chất rửa 176 được sử dụng để loại bỏ chất quét ảnh thứ hai 172 dư thừa bất kỳ. Chất rửa có thể là hỗn hợp của các hóa chất được sử dụng để loại bỏ các chất phản ứng hoạt động ra khỏi tiêu bản dòng chảy.

Tiếp theo trong giai đoạn cắt 156, chất phân cắt 178 được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202 để loại bỏ yếu tố kết thúc ra khỏi nucleotit 120-6. Điều này cho phép nucleotit tiếp theo (không được thể hiện trên hình vẽ) trong trình tự các nucleotit từ 120-1 đến 120-6 được thêm vào polynucleotit thứ hai 110.

Phương pháp tiếp tục đến giai đoạn rửa 158, trong đó chất đệm thứ nhất được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202 trong nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp để rửa chất phân cắt 178 từ hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy. Ví dụ, chất đệm thứ nhất có thể là dung dịch muối đệm có bổ sung axit lipoic.

Cụ thể hơn, thể tích dòng thuận chiều thứ nhất (1st FFV) là 22 microlit (µL) chất đệm thứ nhất được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều 180 để bắt đầu mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ. Thể tích dòng ngược chiều thứ hai (2nd RFV) là 19 microlit (µL) chất đệm thứ nhất sau đó được dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều 182 để kết thúc mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ. Theo ví dụ cụ thể trên Fig.4, có tổng cộng 12 chu kỳ của dòng thuận chiều và dòng ngược chiều.

Tiếp theo, trong giai đoạn rửa 158, giai đoạn ủ 184 về cơ bản không có dòng chất đệm thứ nhất chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng 204 và tiêu bản dòng chảy 202 được đặt vào hệ thống. Giai đoạn ủ 184 ở ví dụ cụ thể này có thời gian khoảng 30 giây, mặc dù các giai đoạn ủ khác có thể được sử dụng.

Sau giai đoạn ủ 184, giai đoạn rửa 158 tiếp tục đến dòng thuận chiều thứ ba186. Tức là, thể tích dòng chảy thuận chiều thứ ba (3rd FFV) là 12 microlit (µL) chất đệm thứ nhất được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều sau giai đoạn ủ 184.

Chất đệm thứ nhất được sử dụng trong giai đoạn rửa 158 để về cơ bản loại bỏ chất phân cắt 178 ra khỏi hệ thống. Tuy nhiên, các hóa chất cụ thể trong chất đệm thứ nhất mà có hiệu quả trong việc loại bỏ chất phân cắt 178, cũng có thể giao thoa với chất phản ứng kết hợp của chu kỳ tiếp theo. Một ví dụ như thế về hóa chất như thế có thể là axit lipoic.

Theo đó, trong giai đoạn rửa 158, dòng thuận chiều của chất đệm thứ hai 188 được dẫn chảy qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy để loại bỏ chất đệm thứ nhất. Chất đệm thứ hai có thể là dung dịch muối không có axit lipoic . Chất đệm thứ hai là không quan trọng trong việc loại bỏ tác nhân cắt, nhưng sẽ gây trở ngại cho chất phản ứng kết hợp 160 ở chu kỳ tiếp theo.

Sau khi hoàn tất giai đoạn rửa 158, phương pháp sau đó quay trở lại 190 vào giai đoạn kết hợp 152 để bắt đầu quy trình thêm nucleotit 120 tiếp theo trong trình tự các nucleotit vào polynucleotit thứ hai 110.

Như được chỉ ra trước đây, thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm thứ nhất, trong giai đoạn rửa, về cơ bản được xác định bởi công thức ((1st FFV + 2nd RFV) * N) + 3rd FFV, trong đó:

1st FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ nhất và bằng 22 µL,

2^{nd} RFV là thể tích dòng ngược chiều thứ hai và bằng 19 µL,

N là số lượng tổng cộng các chu kỳ trong số các chu kỳ và bằng 12, và

3^{rd} FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ ba và bằng 12 µL.

Theo đó, theo ví dụ trên Fig.4, thể tích cuốn tổng cộng bằng (22+19)*12+12=504 µL.

Ngoài ra, lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm thứ nhất, trong giai đoạn rửa, về cơ bản được xác định bởi công thức:

(1^{st} FFV – 2^{nd} RFV) * N + 3^{rd} FFV.

Theo đó, ở ví dụ trên Fig.4, lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng là bằng:

(22-19)*12+12=48 µL.

Ngoài ra, theo ví dụ trên Fig.4, tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng là bằng: 504/48=10,5. Để so sánh, tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng ở các hệ thống trước đây gần như là bằng 1. Điều này là bởi vì, các hệ thống trước đây chỉ sử dụng dòng thuận chiều của chất đệm mà có hiệu quả trong việc loại bỏ chất phân cắt.

Fig.5 và Fig.6 thể hiện các kết quả thu được từ ví dụ thực hiện không giới hạn.

Tham chiếu trên Fig.5, bảng 190 thể hiện ví dụ thực hiện các ví dụ khác nhau của thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm thứ nhất mà thu được trong về giai đoạn rửa ví dụ 158 của phương pháp 150 được thể hiện. Trong các hàng từ 190-1 đến 190-7, lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng được giữ nguyên không đổi ở 48 µL. Cũng trong các hàng từ 190-2 đến 190-7, thể tích dòng thuận chiều thứ nhất (1^{st} FFV), thể tích dòng ngược chiều thứ hai (2^{nd} RFV), số lượng các chu kỳ (N) và thể tích dòng chảy thuận chiều thứ ba (3^{rd} FFV) được thay đổi để tăng thể tích cuốn tổng cộng từ 100 µL đế 1200 µL, trong khi lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng được giữ không đổi ở 48 µL. Như có thể được nhìn thấy, tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng thay đổi từ 2,08 (ở hàng 190-2) thành 25 (ở hàng 190-7).

Hàng trên cùng 190-1 là ví dụ so sánh về phương pháp đã có, trong đó không có sự quyay vòng các dòng thuận chiều và ngược chiều của chất đệm. Hơn nữa, hàng 190-1

chỉ có dòng thuận chiều trong giai đoạn rửa và, do đó, thể tích cuốn tổng cộng của nó bằng lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của nó.

Tham chiếu trên Fig.6, các đồ thị 192, 194 về các tỷ lệ các thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng đối với độ dốc gắn dính sớm pha mà được dựng từ dữ liệu thu được trong ví dụ thực hiện trên Fig.5 theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây được mô tả. Đồ thị 194 được dựng ở nhiệt độ môi trường bên ngoài (ví dụ ở nhiệt độ môi trường bên ngoài trong phạm vi từ 25 đến 35 độ C). Đồ thị 192 được dựng ở nhiệt độ môi trường bên ngoài cộng thêm 8 độ C (ví dụ, ở nhiệt độ trong phạn vi từ 33 đến 3 độ C).

Độ dốc gắn dính sớm pha, như được chỉ ra trong các đồ thị 192 và 194, được biểu diễn dưới dạng phần trăm (%) của các phân tử trong các cụm các polynucleotit trong tiêu bản dòng chảy mà đang dẫn đầu bởi 1 cặp bazơ trên mỗi chu kỳ. Độ dốc gắn dính sớm pha là số đo của tỷ lệ gắn dính sớm pha trong mỗi chu kỳ.

Các trị số gắn dính sớm pha càng thấp, chất lượng dữ liệu được ở độ dài polynucleotit đã cho trong quá khi tiến hành các phương pháp ở đây càng tốt. Đồng thời, các trị số gắn dính sớm pha càng thấp, các polynucleotit có thể phát triển càng dài.

Như có thể được xác định từ các đồ thị 192 và 194, phạm vi tối ưu của tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng, trong đó phần trăm độ dốc gắn dính sớm pha thấp nhất có thể đạt được, là bằng hoặc lớn hơn 6. Phạm vi tối ưu khác, mà có thể được xác định từ các đồ thị 192, 194 của dữ liệu được dựng đồ thị theo ví dụ trên Fig.5, cũng có thể là từ khoảng 6 đến khoảng 12.

Các phạm vi tối ưu được kết hợp với các độ dốc gắn dính sớm pha. Trong hầu hết các trường hợp ở ví dụ thực hiện trên Fig.6, các phạm vi tối ưu được kết hợp với các phần trăm độ dốc gắn dính sớm pha là thấp hơn 2,0%. Các phần trăm độ dốc gắn dính sớm pha như thế đã đem lại các kết quả đáng kinh ngạc, thu được từ ví dụ thực hiện trên FIg.5 và Fig.6, cho phép polynucleotit thứ hai bổ trợ 110 được dựng lên đến độ dài các bazơ dài hơn so với độ dài các bazơ trước đó thu được vớ lượng chất phản ứng hạn chế, trong giới hạn độ chính xác chấp nhận được. Trong ví dụ thực hiện trên Fig.5 và Fig.6, các hệ thống thiết bị có hộp chứa có thể xây dựng một cách chính xác các polynucleotit bổ trợ thứ hai 110 lên đến độ dài là 200 bazơ hoặc cao hơn với phần trăm thời gian cao (ví dụ, trên 90% thời gian). Do đó, các cặp bazơ của các polynucleotit thứ nhất 108 và

thứ hai 110 cũng có thể được xây dựng một cách chính xác lên đến độ dài là 200 cặp bazơ hoặc cao hơn tại cùng một phần trăm thời gian cao.

Tham chiếu trên Fig.7, ví dụ về sơ đồ tổng thể của thiết bị 200 theo các khía cạnh của sáng chế được bộc lộ ở đây được mô tả. Thiết bị, ở ví dụ cụ thể này, bao gồm hộp chứa 230 được lắp trong đó. Hộp chứa 230 bao gồm tiêu bản dòng chảy 202 nối thông với hệ thống quản lý chất phản ứng (RMS) 204. Ở ví dụ cụ thể này, RMS 204 nối thông với tiêu bản dòng chảy 202 đường nối trung gian 206. Hộp chứa 230 có thể lắp theo cách có thể tháo ra được vào thiết bị 200, có nghĩa là hộp chứa có thể được lắp vào và dược tháo ra khỏi thiết bị.

Mặc dù ví dụ trên Fig.7 này minh họa thiết bị có hộp chứa 200 có RMS 204 và tiêu bản dòng chảy 202 được chứa trong hộp chứa 230, các thiết bị 200 khác có thể không bao gồm thiết bị có hộp chứa như thế. Hơn nữa, trong một số thiết bị 200, các thành phần của RMS 204 có thể được lắp liền khối và lắp cứng trong thiết bị 200, và chỉ có tiêu bản dòng chảy 202 có thể tháo ra được khỏi thiết bị 200. Hơn nữa, tiêu bản dòng chảy 202 có thể có, hoặc có thể không, có thể tháo ra được khỏi hộp chứa 230.

RMS bao gồm nhiều bình chứa chất phản ứng 232. Mỗi bình chứa chất phản ứng 232 có được tạo kết cấu để chứa chất phản ứng trong số nhiều chất phản ứng từ 208 đến 218 được chứa ở đây. RMS 204 có chức năng lựa chọn dòng chất phản ứng 234 từ một trong số các chất phản ứng từ 208 đến 218.

RMS cũng có chức năng định hướng dòng chất phản ứng 234 theo hướng thuận chiều và hướng ngược chiều. Dòng thuận chiều, như được sử dụng ở đây, là hướng của dòng chất phản ứng 234 từ bình chứa chất phản ứng 232 đến tiêu bản dòng chảy 202. Dòng ngược chiều, như được sử dụng ở đây, là hướng của dòng chất phản ứng 234 từ tiêu bản dòng chảy 202 đến các bình chứa chất phản ứng 232.

Các chất phản ứng 208-218 có thể là loại bất kỳ trong số các loại hoặc là sự kết hợp của các chất phản ứng phụ thuộc vào loại và trình tự của các phản ứng hóa học mà có thể được thực hiện ở tiêu bản dòng chảy. Ví dụ, các chất phản ứng 208-218 có thể là trong số các loại sau đây:

Chất phản ứng 208 và 209 có thể có công thức khác với chất phản ứng kết hợp.

Chất phản ứng 210 và 211 có thể có công thức khác với chất phản ứng quét ảnh.

Chất phản ứng 212 có thể là chất phân cắt.

Chất phản ứng 214 và 216 có thể có công thức khác với chất đệm.

Chất phản ứng 218 có thể là không khí.

Đường nối 206 bao gồm kênh thứ nhất 236 nối thông với RMS 204 qua cửa ra RMS 256. Kênh thứ nhất 236 có chức năng định tuyến dòng chất phản ứng 234 qua cửa vào 220 của tiêu bản dòng chảy 202 và vào kênh dẫn dòng 224 của tiêu bản dòng chảy 202. Đường nối 206 cũng bao gồm kênh thứ hai 238 nối thông với kênh dẫn dòng 224 qua cửa ra 222 của tiêu bản dòng chảy 202. Kênh thứ hai 238 có chức năng định tuyến dòng chất phản ứng 234 từ tiêu bản dòng chảy 202, qua cửa vào RMS 258 và trở lại vào RMS 204 sau khi dòng chất phản ứng 234 đã đi qua kênh dẫn dòng 224.

Tiêu bản dòng chảy 202 của thiết bị 200 bao gồm kênh dẫn dòng 224 nối thông với kênh thứ nhất 236 qua cửa vào 220, và nối thông với kênh thứ hai 238 qua cửa ra 222. Kênh dẫn dòng 224 có chức năng thực hiện các phản ứng hóa học khác nhau giữa các dòng chất phản ứng 234 khác nhau từ các chất phản ứng 208-218 và các polynucleotit, chẳng hạn như các polynucleotit 108 trên Fig.2, được định vị trong kênh dẫn dòng 224.

Thông qua ví dụ trên Fig.7 minh họa tiêu bản dòng chảy 202 với một cửa vào 220 và một cửa ra 222, các kết cấu khác của các tiêu bản dòng chảy có thể được sử dụng. Ví dụ, tiêu bản dòng chảy 202 có thể bao gồm nhiều cửa vào 220 để nhận các dòng chất phản ứng từ nhiều kênh của đường nối 206. Đồng thời, ví dụ, tiêu bản dòng chảy có thể bao gồm nhiều cửa ra 222 để định hướng dòng chất phản ứng đến nhiều kênh của đường dẫn 206.

Qua ví dụ trên Fig.7 minh họa tiêu bản dòng chảy 202 nối thông với RMS 204 thông qua đường nối trung gian 206, tiêu bản dòng chảy 202 có thể được nối trực tiếp với RMS 204 mà không có đường nối 206 giữa chúng. Tức là, cửa ra RMS 256 có thể được nối trực tiếp với cửa vào tiêu bản dòng chảy 220 và cửa vào RMS 258 có thể được nối trực tiếp với cửa ra tiêu bản dòng chảy 222.

RMS 204, ở ví dụ này, bao gồm van quay 242 để lựa chọn các chất phản ứng 208-218. Van quay 242 có thân van quay bên trong 244. Thân van 244 bao gồm cửa tâm 246 và cửa quay 248, mà được nối bởi kênh quay 250. Thân van 244 quay quanh cửa tâm 246 để di chuyển cửa quay 248.

Các bình chứa chất phản ứng 232, mà chứa các chất phản ứng 208-218, có thể được bố trí quanh chu vi của van quay 242 hoặc nếu không thì ở xa van quay 242. Mỗi bình chứa chất phản ứng 232 nối thông với kênh dẫn vào bình chứa 252 tương ứng. Mỗi kênh dẫn vào bình chứa 252 bao gồm cửa kênh dẫn vào bình chứa 254 mà cửa quay 248 của van quay 242 có thể thẳng hàng với nó để nhận dòng chất phản ứng 234 từ bình chứa chất phản ứng 232 đã cho bất kỳ.

Khi cửa quay 248 thẳng hàng với một trong số các cửa kênh dẫn vào bình chứa 254, đường dẫn dòng đối với dòng chất phản ứng 234 được thiết lập để cho phép dòng chất phản ứng 234 chảy từ bình chứa 232 được chọn, thông qua kênh dẫn vào bình chứa 252, qua van quay 242, thông qua đường chung 255 và ra khỏi cửa ra RMS 256. Dòng chất phản ứng 234 sau đó tiếp tục đi qua kênh thứ nhất 236, vào cửa vào 220 của tiêu bản dòng chảy 202 và qua kênh dẫn dòng 224, nơi mà chất phản ứng dược chọn trong số các chất phản ứng 208-218 có thể phản ứng với các polynucleotit 108.

Các chất phản ứng chưa phản ứng và/hoặc các sản phẩm phụ của phản ứng có thể chảy qa khỏi cửa ra 222 của tiêu bản dòng chảy 202 và qua kênh thứ hai 238. Dòng chất phản ứng 234 sau đó có thể đi vào lại RMS 204 qua cửa vào RMS 258.

Cửa vào RMS 258 của RMS 204 nối thông với van van ép thứ nhất 260. Van ép thứ nhất 260 nối thông với van ép thứ hai 262. Van ép thứ nhất 260 và thứ hai 262 bao gồm phần giữa đàn hồi mà có thể được kích thích cơ học hoặc khí nén để chặn hoặc giải phóng dòng chất phản ứng 234 qua các van ép 260, 262. Đồng thời, mặc dù các van ép 260, 262 được minh họa ở ví dụ này, các loại van khác có thể được sử dụng để thực hiện chức năng tương tự. Ví dụ, các van 260, 262 có thể là van quay.

Bơm tích hợp 264 (chẳng hạn như bơn xy lanh, hoặc tương tự) cũng được bố trí trên RMS 204. Mặc dù bơm tích hợp 264 có thể là loại bơm khác, loại bơm có thể được tham chiếu ở đây là bơm xy lanh 264. Bơm xy lanh 264 được nối với khớp nối hình chữ T giữa các van ép thứ nhất 260 và thứ hai 262. Cả hai van ép 260, 262 được mở và đóng bởi thiết bị 200 để ăn khớp hoặc nhả khớp bơm xy lanh 264 khỏi tiêu bản dòng chảy 202 và/hoặc bình chứa chất thải 270.

Bơm xy lanh 264 bao gồm pit-tông tịnh tiến 266 được bố trí trong xy lanh 268, mà có lỗ xy lanh 270. Pit-tông 266 được nhận trong lỗ xy lanh 270 để tạo ra kết cấu đóng kín lỗ xy lanh bằng pit-tông. Pit-tông 266 được dẫn động bằng thiết bị 200 để chuyển

động tịnh tiến trong lỗ xy lanh 270 và để bơm các chất phản ứng 208-218 theo hướng dòng thuận chiều từ bình chứa chất phản ứng 232 đến bình chứa chất thải 272.

Bên cạnh thiết bị 200 có chức năng bơm các dòng chất phản ứng 234 theo hướng thuận chiều từ các bình chứa chất phản ứng 232 đến tiêu bản dòng chảy 202 và đến bơm 264, thiết bị 200 có chức năng bơm các dòng chất phản ứng 234 theo hướng ngược chiều. Tức là, các chất phản ứng 208-218 có thể được bơm theo hướng dòng ngược chiều từ bơm 264 đến tiêu bản dòng chảy 202 và đến bình chứa chất phản ứng 232. Theo đó, thiết bị có chức năng, ví dụ, dẫn chảy các chất đệm 214, 216 đi qua RMS 204 và tiêu bản dòng chảy 202 trong nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp theo các phương pháp 130 trên Fig.3 và 150 trên Fig.4.

Thiết bị 200 cũng bao gồm mô-đun phát hiện 226, mà có chức năng phát hiện các photon ánh sáng, hoặc các dạng khác của các đặc điểm có thể phát hiện, khi phản ứng hóa học gây ra bởi các chất phản ứng 208-218 làm cho các polynucleotit 108 có các đặc điểm có thể phát hiện như thế.

Mặc dù phương án triển khai được minh họa trên Fig.7 là thiết bị 200 sử dụng van quay 242 mà định hướng các chất phản ứng khác nhau 208-218 qya đường dẫn chung 255 và vào tiêu bản dòng chảy 202, các thiết bị 200 khác có thể không sử dụng van quay 242. Ví dụ, các kênh dẫn vào bình chứa 252 từ mỗi bình chứa chất phản ứng 232 có thể kéo dài trực tiếp đến một trong số nhiều cửa ra RMS 256 riêng biệt.

Trong trường hợp đó, mỗi kênh dẫn vào bình chứa 252 có thể bao gồm van (không được thể hiện trên hình vẽ) để điều khiển dòng chất phản ứng 234 từ mỗi bình chứa chất phản ứng 232. Ngoài ra, kênh thứ nhất 236 có thể là nhiều kênh thứ nhất để mỗi kênh nhận dòng chất phản ứng 234 tương ứng từ cửa ra PMS 256 tương ứng. Hơn nữa, cửa vào 220 của tiêu bản dòng chảy 202 có thể là nhiều cửa vào 220 để mỗi cửa nhận các dòng chất phản ứng 234 khác nhau từ nhiều kênh thứ nhất 236.

Tham chiếu trên Fig.8, ví dụ về sơ đồ khối sơ lược của thiết bị 200 trên Fig.7 được mô tả. Thiết bị 200 bao gồm trạm nối 274 để nhận hộp chứa 230. Các bộ phận điện và cơ khí trong thiết bị 200 tương tác với hộp chứa 230 để vận hành hộp chứa trong hoạt động phân tích vi lưu của các phản ứng hóa học khác nhau mà dược thực hiện trong tiêu bản dòng chảy 202.

Thiết bị 200 có thể bao gồm, trong số các điều khác, một hoặc nhiều bộ xử lý 276 mà là để thực thi các chỉ lệnh được lưu trữ trong bộ nhớ 278 để thực hiện các hoạt động phân tích vi lưu. Các bộ xử lý nối thông điện học với bộ phận dẫn động van quay 280, bộ phận dẫn động bơm xy-lanh 282, bộ phận dẫn động van ép 284, mô-đun phát hiện 226 và bộ chi tiết điều chỉnh nhiệt độ 306.

Giao diện người dùng 286 được bố trí để người dùng điều khiển và giám sát hoạt động của thiết bị 200. Giai diện truyền thông 288 có thể truyền dữ liệu và thông tin khác giữa thiết bị 200 và mạng, máy tính từ xa và tương tự.

Bộ phận dẫn động van quay 280 bao gồm trục dẫn động 290, mà được ghép nối cơ học với khung ghép nối van quay 292. Khung ghép nối van quay 292 được ghép nối cơ học với van quay 242 của hộp chứa 230. Bộ phận dẫn động van quay 280 bao gồm động cơ quay 294 và, theo một số phương án thực hiện, động cơ dịch chuyển 296. Động cơ dịch chuyển 296 có thể di chuyển trục dẫn động 290 theo hướng dịch chuyển giữa trạng thái được ăn khớp và trạng thái tháo khớp với van quay 242. Động cơ quay 294 quản lý việc quay của thân van quay 244 của van quay 242.

Bộ phận dẫn động van quay 280 cũng bao gồm bộ mã hóa vị trí 298 mà theo dõi vị trí của trục dẫn động 290. Bộ mã hóa 298 cung cấp dữ liệu vị trí cho bộ xử lý 276.

Bộ phận dẫn động bơm xy lanh 282 bao gồm động cơ bơm xy lanh 300 được ghép nối với trục có thể kéo dài 302. Trục 302 được dẫn động bởi động cơ bơm xy lanh 300 giữa vị trí kéo dài và vị trí co ngắn để làm chuyển động tịnh tiến pit-tông 366 trong lỗ xy lanh 270 của xy lanh 268 trên bơm xy lanh 264.

Bộ phận dẫn động van ép 284 bao gồm bộ hai động cơ dẫn động van ép được dẫn động bằng khí nén 304. Hai động cơ dẫn động van ép 304 được ghép nối cơ học với một trong số các van ép thứ nhất 260 và thứ hai 262 tương ứng. Các động cơ dẫn động van ép 304 có thể sử dụng áp lực không khí để ép hoặc giải phóng phần giữa đàn hồi của van ép thứ nhất 260 và/hoặc van ép thứ hai 262 để mở và đóng các van ép thứ nhất và/hoặc thứ hai 262 nhờ khí nén. Ngoài ra, các động cơ dẫn động van ép 304 có thể được dẫn động bằng điện.

Mô-đun phát hiện 226 có thể chứa tất cả các camera và/hoặc các cảm biến phát hiện thích hợp và/hoặc cần thiết để cho phép phát hiện các photon ánh sáng phát ra,

hoặc các dạng khác của các đặc tính có thể phát hiện, liên quan đến các polynucleotit 108 trong tiêu bản dòng chảy 202. Hệ mạch thiết bị (không được thể hiện trên hình vẽ) trong thiết bị 200 sau đó có thể xử lý và truyền các tín hiệu dữ liệu xuất phát từ các tín hiệu phát ra được phát hiện như thế. Các tín hiệu dữ liệu sau đó được phân tích để phát hiện các đặc tính của các polynucleotit 108.

Bộ phận điều chỉnh nhiệt độ 306 (hoặc thiết bị kiểm soát môi trường khác) cũng có thể được bao gồm trong thiết bị 200. Bộ phận điều chỉnh nhiệt độ 306 có thể được sử dụng để cung cấp việc kiểm soát nhiệt độ của tiêu bản dòng chảy 202 trong các phản ứng hóa học khác nhau. Cụ thể hơn, bộ phận điều chỉnh nhiệt độ 306 có thể cung cấp cả việc làm nóng và làm nguội tiêu bản dòng chảy 202, nhờ đó cho phép thực hiện chu trình nhiệt của tiêu bản dòng chảy 202. Thiết bị kiểm soát môi trường có thể kiểm soát hoặc điều chỉnh các tham số khác ngoài việc chỉ áp dụng cho nhiệt độ (ví dụ, áp suất).

Cần xem xét rằng tất cả các sự kết hợp của các khái niệm ở trên và các khái niệm bổ sung được thảo luận chi tiết hơn ở đây (miễm là các khái niệm đó không mâu thuẫn với nhau) được coi là một phần của đối tượng sáng tạo được bộc lộ ở đây. Cụ thể, tất cả các sự kết hợp của đối tượng được yêu cầu bảo hộ nêu ở cuối bản mô tả này được coi là một phần của đối tượng sáng tạo được bộc lộ ở đây.

Mặc dù nội dung bộc lộ ở trên đã được mô tả tham chiếu đến các ví dụ cụ thể, cần hiểu rằng một số lượng lớn các thay đổi có thể được thực hiện thuộc phạm vi của sáng chế được mô tả. Theo đó, dự kiến rằng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ được mô tả, mà sáng chế có phạm vi đầy đủ như được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp xác định thứ tự các nucleotit trong polynucleotit, bao gồm:

dẫn chảy chất phản ứng kết hợp, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy của thiết bị, tiêu bản dòng chảy có polynucleotit thứ nhất được đặt bên trong, trong đó chất phản ứng kết hợp thêm bazơ thứ nhất vào trình tự bazơ, trình tự bazơ này bao gồm polynucleotit thứ hai bổ trợ cho polynucleotit thứ nhất;

thu hình ảnh, của tín hiệu nhận biết phát ra từ bazơ thứ nhất, sau khi bazơ thứ nhất đã được thêm vào polynucleotit thứ hai;

dẫn dòng chất phân cắt, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy, để loại bỏ yếu tố kết thúc thứ nhất ra khỏi bazơ thứ nhất để cho phép bazơ tiếp theo trong trình tự bazơ được thêm vào polynucleotit thứ hai; và

dẫn chảy chất đệm, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy trong nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp để loại bỏ chất phân cắt ra khỏi tiêu bản dòng chảy.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiều chu kỳ bao gồm 4 hoặc nhiều hơn 4 chu kỳ.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiều chu kỳ bao gồm 12 hoặc nhiều hơn 12 chu kỳ.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy được đặt trong hộp chứa của thiết bị, hộp chứa có thể lắp theo cách có thể tháo ra được vào trong thiết bị.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất phản ứng kết hợp, chất phân cắt và chất đệm được lưu trữ trong các bình chứa chất phản ứng của hệ thống quản lý chất phản ứng, các bình chứa chất phản ứng có thể vận hành để lưu trữ tổng thể tích hữu hạn của mỗi chất phản ứng.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc dẫn chảy chất đệm bao gồm:

dẫn chảy thể tích dòng thuận chiều thứ nhất của chất đệm theo hướng dòng thuận chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ; và

dẫn chảy thể tích dòng ngược chiều thứ hai của chất đệm theo hướng dòng ngược chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ, thể tích dòng thuận chiều thứ nhất lớn hơn thể tích dòng ngược chiều thứ hai.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó thể tích dòng thuận chiều lớn hơn thể tích dòng ngược chiều khoảng 3% hoặc nhiều hơn.

8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó việc dẫn chảy chất đệm bao gồm:

giai đoạn ủ mà hầu như không có dòng chất đệm đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy là khoảng 10 giây hoặc dài hơn sau chu kỳ cuối cùng trong số các chu kỳ; và

dẫn chảy thể tích dòng chảy thuận chiều thứ ba của chất đệm theo hướng dòng thuận chiều sau giai đoạn ủ.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm, trong quá trình dẫn chảy chất đệm, về cơ bản được xác định bởi công thức ((1st FFV + 2nd RFV) * N) + 3rd FFV, trong đó:

1st FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ nhất,

2nd RFV là thể tích dòng ngược chiều thứ hai,

N là số lượng tổng cộng các chu kỳ trong số các chu kỳ, và

3rd FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ ba.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm, trong quá trình dẫn chảy chất đệm, về cơ bản được xác định bởi công thức ((1st FFV – 2nd RFV) * N) + 3rd FFV.

11. Phương pháp theo điểm 10 trong đó tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm là bằng hoặc lớn hơn khoảng 6.

12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là khoảng 200 milli giây hoặc ngắn hơn.

13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều và việc dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là

khoảng 1 giây hoặc ngắn hơn cho mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều.

14. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều và việc dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là khoảng 200 milli giây hoặc ngắn hơn cho mỗi chu kỳ cho mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều.

15. Thiết bị xác định thứ tự của các nucleotit trong polynucleotit bao gồm:

hệ thống quản lý chất phản ứng, được đặt trong thiết bị, hệ thống quản lý chất phản ứng bao gồm nhiều bình chứa chất phản ứng, bình chứa chất phản ứng có ít nhất là bình chứa chất phản ứng thứ nhất, thứ hai và thứ ba được tạo kết cấu để chứa chất phản ứng kết hợp, chất phân cắt và chất đệm được bố trí lần lượt trong đó, hệ thống quản lý chất phản ứng lựa chọn dòng chất phản ứng từ một trong số các bình chứa chất phản ứng; và

tiêu bản dòng chảy, được đặt trong thiết bị, tiêu bản dòng chảy bao gồm kênh dẫn dòng nối thông với hệ thống quản lý chất phản ứng, kênh dẫn dòng để định tuyến dòng chất phản ứng qua polynucleotit thứ nhất được đặt trong kênh dẫn dòng;

trong đó thiết bị có chức năng:

dẫn dòng chất phản ứng kết hợp, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy, để thêm bazơ thứ nhất vào trình tự bazơ, trình tự bazơ này bao gồm polynucleotit thứ hai bổ sung cho polynucleotit thứ nhất;

thu hình ảnh, của tín hiệu nhận biết phát ra từ bazơ thứ nhất, sau khi bazơ thứ nhất đã được thêm vào polynucleotit thứ hai;

dẫn dòng chất phân cắt, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy, để loại bỏ yếu tố kết thúc thứ nhất ra khỏi bazơ thứ nhất để cho phép bazơ tiếp theo trong trình tự bazơ được thêm vào polynucleotit thứ hai; và

dẫn dòng chất đệm, đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy trong nhiều chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp để loại bỏ chất phân cắt ra khỏi tiêu bản dòng chảy.

16. Thiết bị theo điểm 15, bao gồm:

hộp chứa để chứa hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy;

trong đó chất phản ứng kết hợp, chất phân cắt và chất đệm được lưu trữ trong các bình chứa chất phản ứng của hệ thống quản lý chất phản ứng, trong đó các bình chứa chất phản ứng lưu trữ tổng thể tích hữu hạn của mỗi chất phản ứng.

17. Thiết bị theo điểm 15, trong đó thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy trong nhiều chu kỳ trong số 4 hoặc nhiều hơn 4 chu kỳ theo các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều liên tiếp.

18. Thiết bị theo điểm 15, trong đó thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm sao cho:

thể tích thứ nhất của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ;

thể tích thứ hai của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều của mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ, thể tích thứ nhất lớn hơn thể tích thứ hai;

giai đoạn ủ mà hầu như không có dòng chất đệm đi qua hệ thống quản lý chất phản ứng và tiêu bản dòng chảy được đặt là khoảng 10 giây hoặc dài hơn sau chu kỳ cuối cùng trong số các chu kỳ; và

thể tích dòng chảy thuận chiều thứ ba của chất đệm được dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều sau giai đoạn ủ.

19. Thiết bị theo điểm 18, trong đó thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm sao cho:

thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm về cơ bản được xác định bởi công thức ((1^{st} FFV + 2^{nd} RFV) * N) + 3^{rd} FFV, trong đó:

1^{st} FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ nhất,

2^{nd} RFV là thể tích dòng ngược chiều thứ hai,

N là số lượng tổng cộng các chu kỳ trong số các chu kỳ, và

3^{rd} FFV là thể tích dòng thuận chiều thứ ba.

lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm về cơ bản được xác định bởi công thức ((1^{st} FFV – 2^{nd} RFV) * N) + 3^{rd} FFV; và

trong đó tỷ lệ thể tích cuốn tổng cộng của chất đệm so với lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng của chất đệm là bằng hoặc lớn hơn khoảng 6.

20. Thiết bị theo điểm 18, trong đó thiết bị có chức năng dẫn chảy chất đệm sao cho việc dẫn chảy theo hướng dòng thuận chiều và việc dẫn chảy theo hướng dòng ngược chiều được tách biệt nhờ thời gian trì hoãn là khoảng 200 mili giây hoặc ngắn hơn cho mỗi chu kỳ trong số các chu kỳ của các hướng dòng thuận chiều và ngược chiều.

FIG. 1

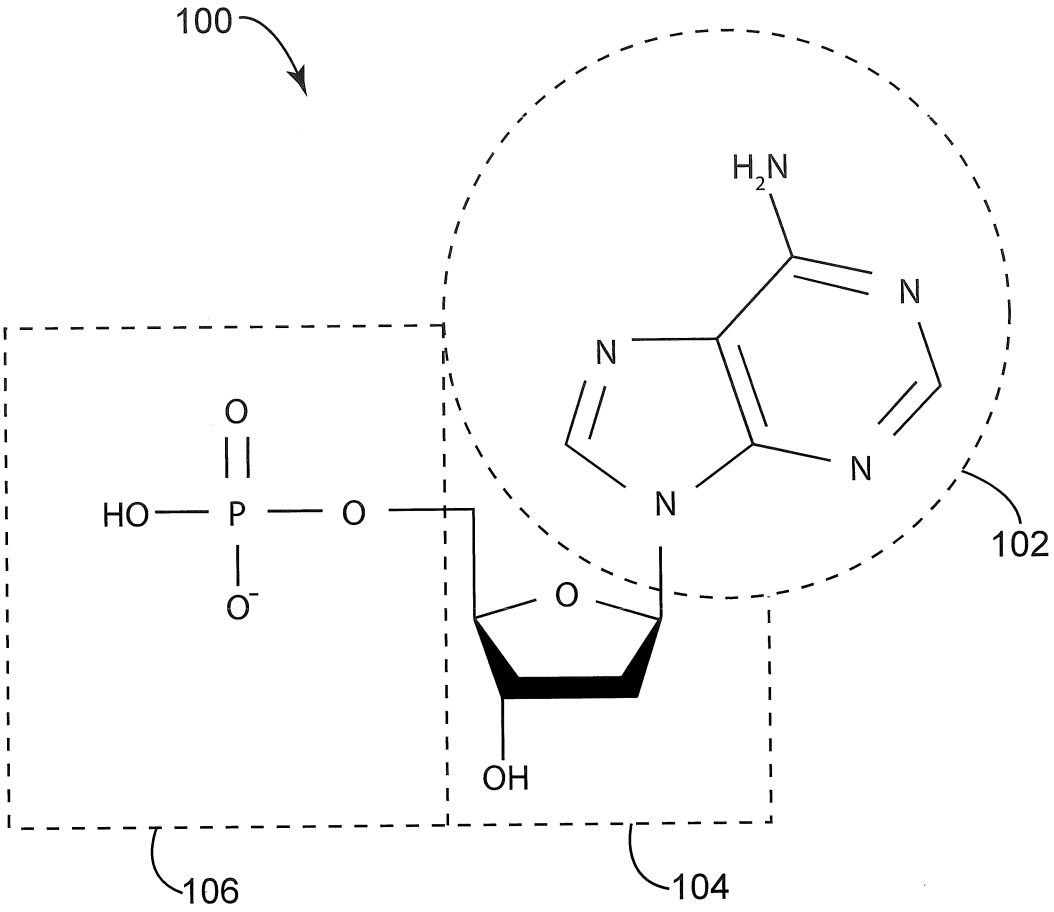


FIG. 2

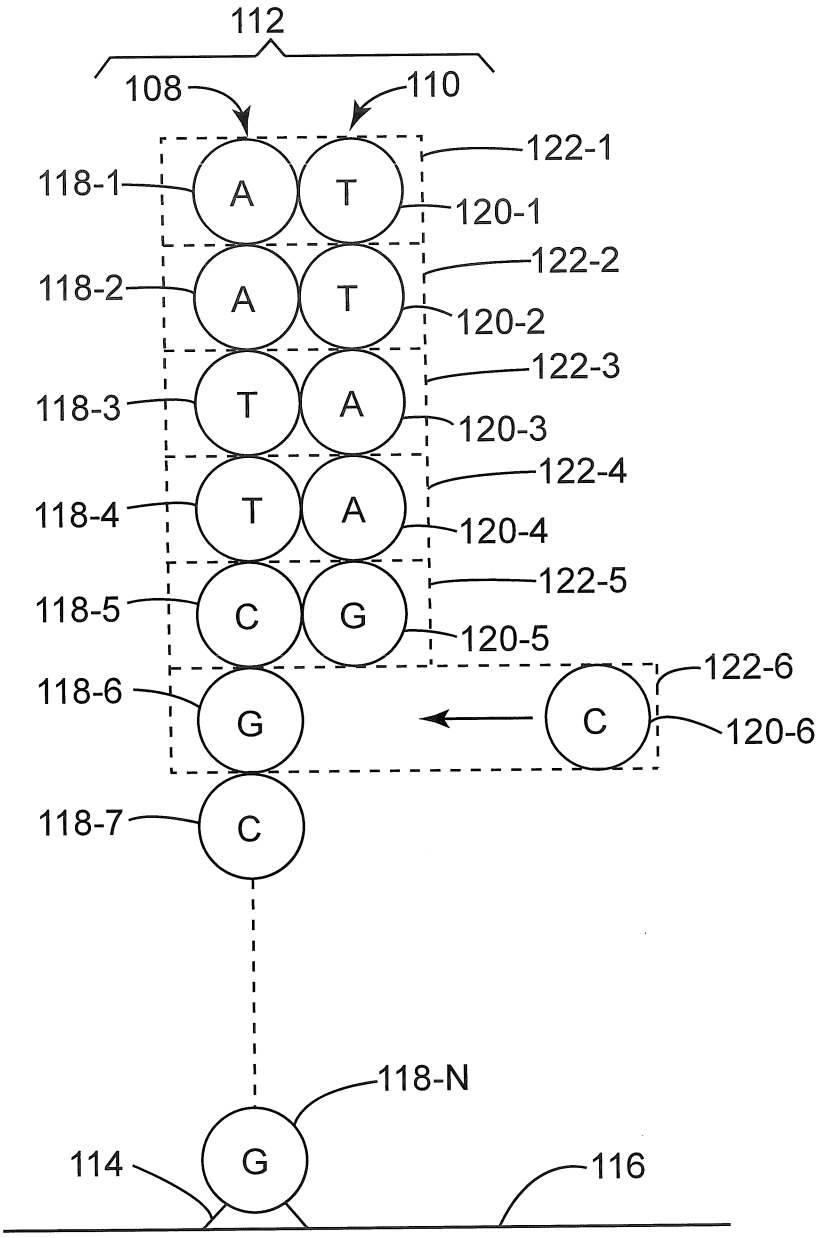
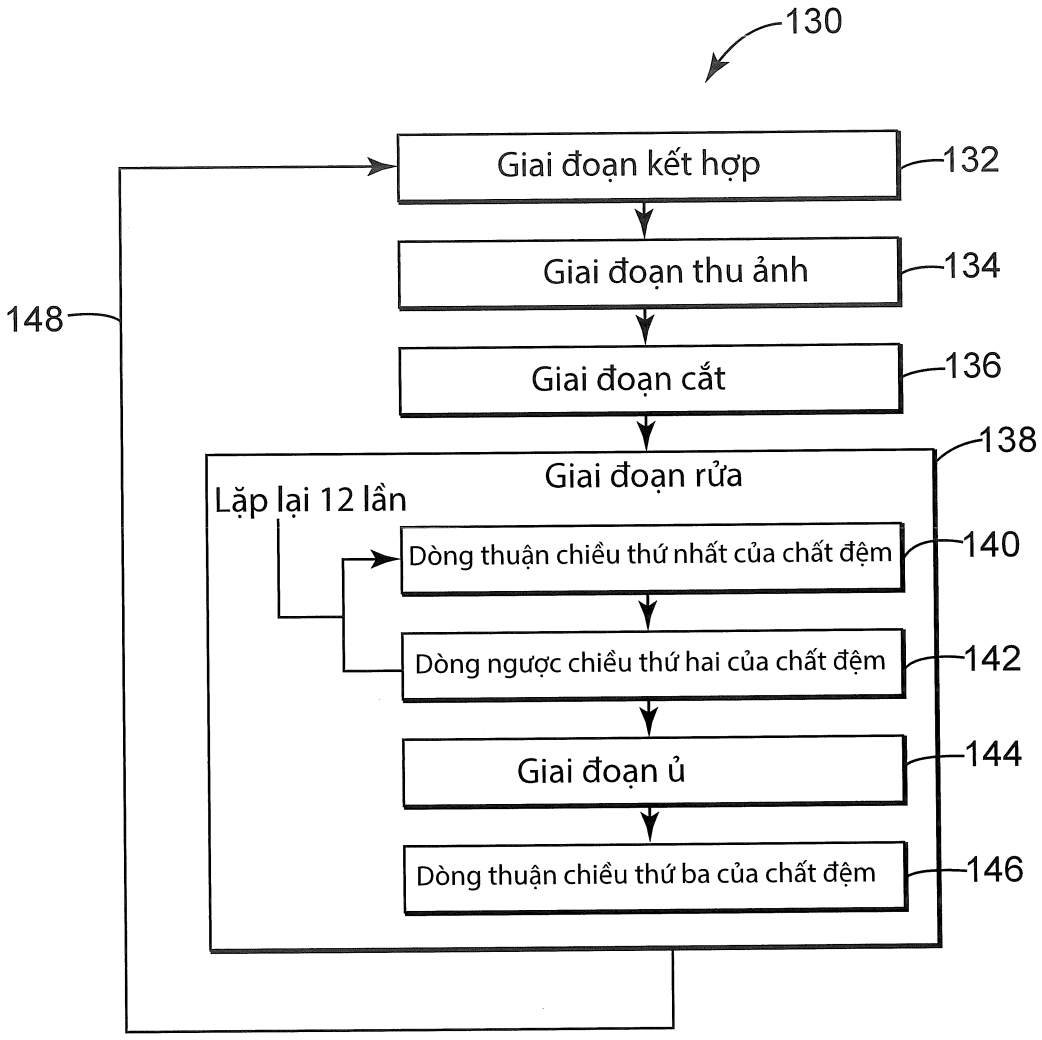

112
108
110
122-1
118-1
A
T
120-1
122-2
118-2
A
T
120-2
122-3
118-3
T
A
120-3
122-4
118-4
T
A
120-4
122-5
118-5
C
G
120-5
122-6
118-6
G
C
120-6
118-7
C
118-N
114
G
116

FIG. 3


130
Giai đoạn kết hợp
132
Giai đoạn thu ảnh
134
148
Giai đoạn cắt
136
138
Giai đoạn rửa
Lặp lại 12 lần
Dòng thuận chiều thứ nhất của chất đệm
140
Dòng ngược chiều thứ hai của chất đệm
142
Giai đoạn ủ
144
Dòng thuận chiều thứ ba của chất đệm
146

4/8

FIG. 4

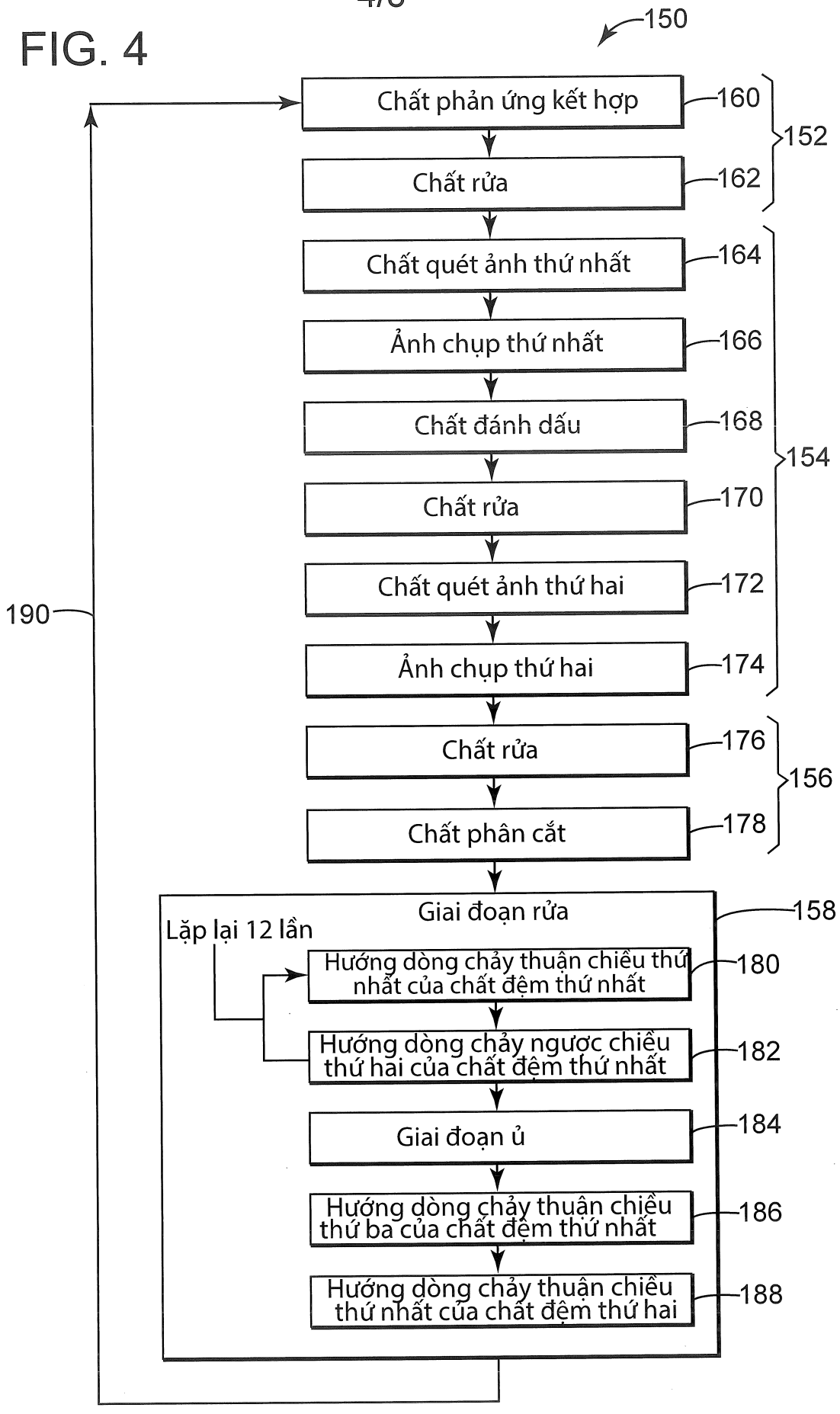

150
Chất phản ứng kết hợp
160
152
Chất rửa
162
Chất quét ảnh thứ nhất
164
Ảnh chụp thứ nhất
166
Chất đánh dấu
168
154
Chất rửa
170
Chất quét ảnh thứ hai
172
190
Ảnh chụp thứ hai
174
Chất rửa
176
156
Chất phân cắt
178
Giai đoạn rửa
158
Lặp lại 12 lần
Hướng dòng chảy thuận chiều thứ nhất của chất đệm thứ nhất
180
Hướng dòng chảy ngược chiều thứ hai của chất đệm thứ nhất
182
Giai đoạn ủ
184
Hướng dòng chảy thuận chiều thứ ba của chất đệm thứ nhất
186
Hướng dòng chảy thuận chiều thứ nhất của chất đệm thứ hai
188

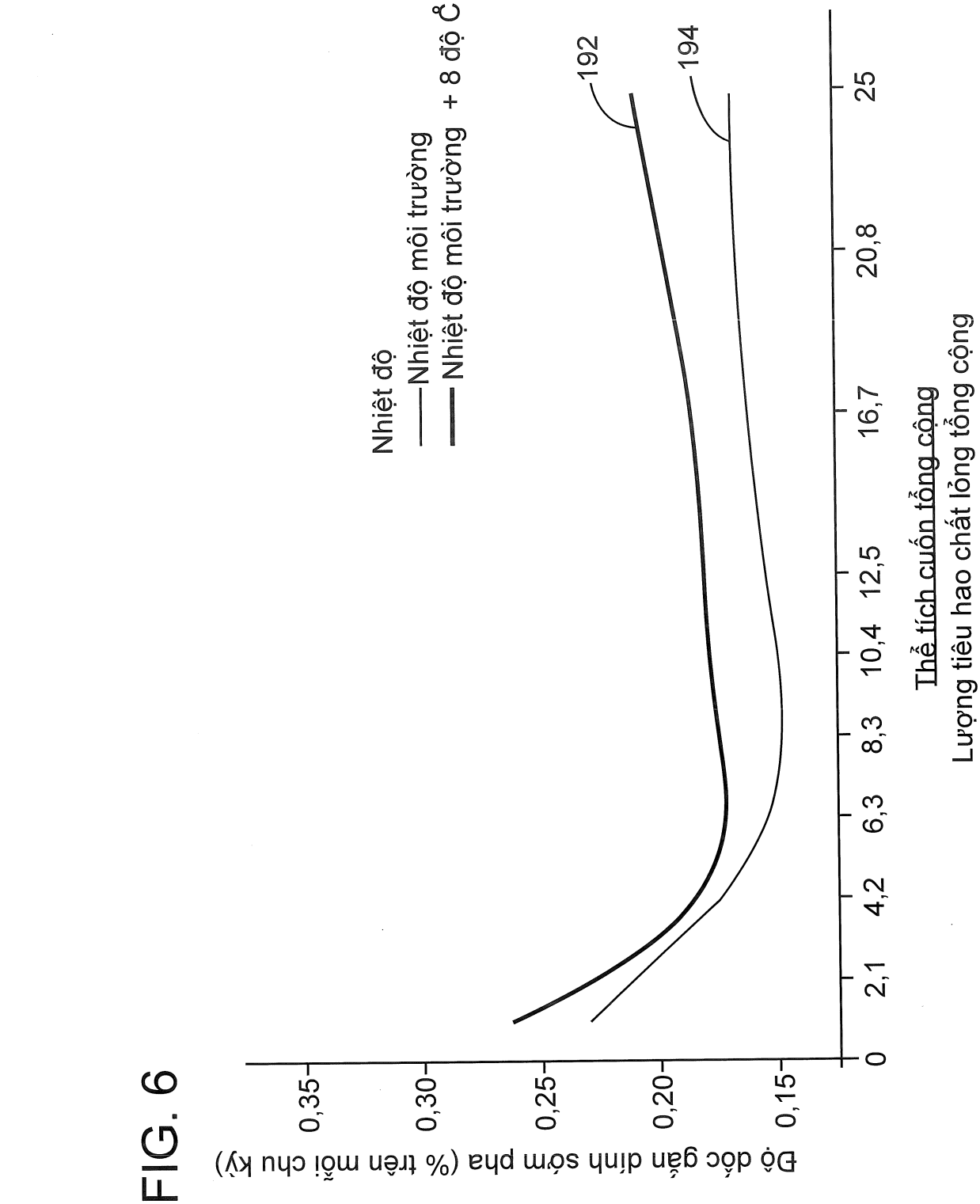
FIG. 5

Lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng lên đến 48 (μL)

190

Thể tích cuốn tổng cộng (μL) Lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng (μL)	Thể tích cuốn tổng cộng (μL)	Thể tích dòng thuận chiều thứ nhất (μL)	Thể tích dòng ngược chiều thứ hai (μL)	Số chu kỳ	thể tích dòng thuận chiều thứ ba (μL)	
48/48 = 1	48	0	0	0	48	190-1
100/48 = 2,08	100	25	13	2	24	190-2
200/48 = 4,16	200	25	19	4	24	190-3
300/48 = 6,25	300	25	21	6	24	190-4
444/48 = 9,25	444	25	22	9	21	190-5
600/48 = 12,5	600	25	23	12	24	190-6
1200/48 = 25	1200	25	24	24	24	190-7

FIG. 6


Độ dốc gần đỉnh sớm pha (% trên mỗi chu kỳ)
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
Nhiệt độ
Nhiệt độ môi trường
Nhiệt độ môi trường + 8 độ C
192
194
0
2,1
4,2
6,3
8,3
10,4
12,5
16,7
20,8
25
Thể tích cuốn tổng cộng
Lượng tiêu hao chất lỏng tổng cộng

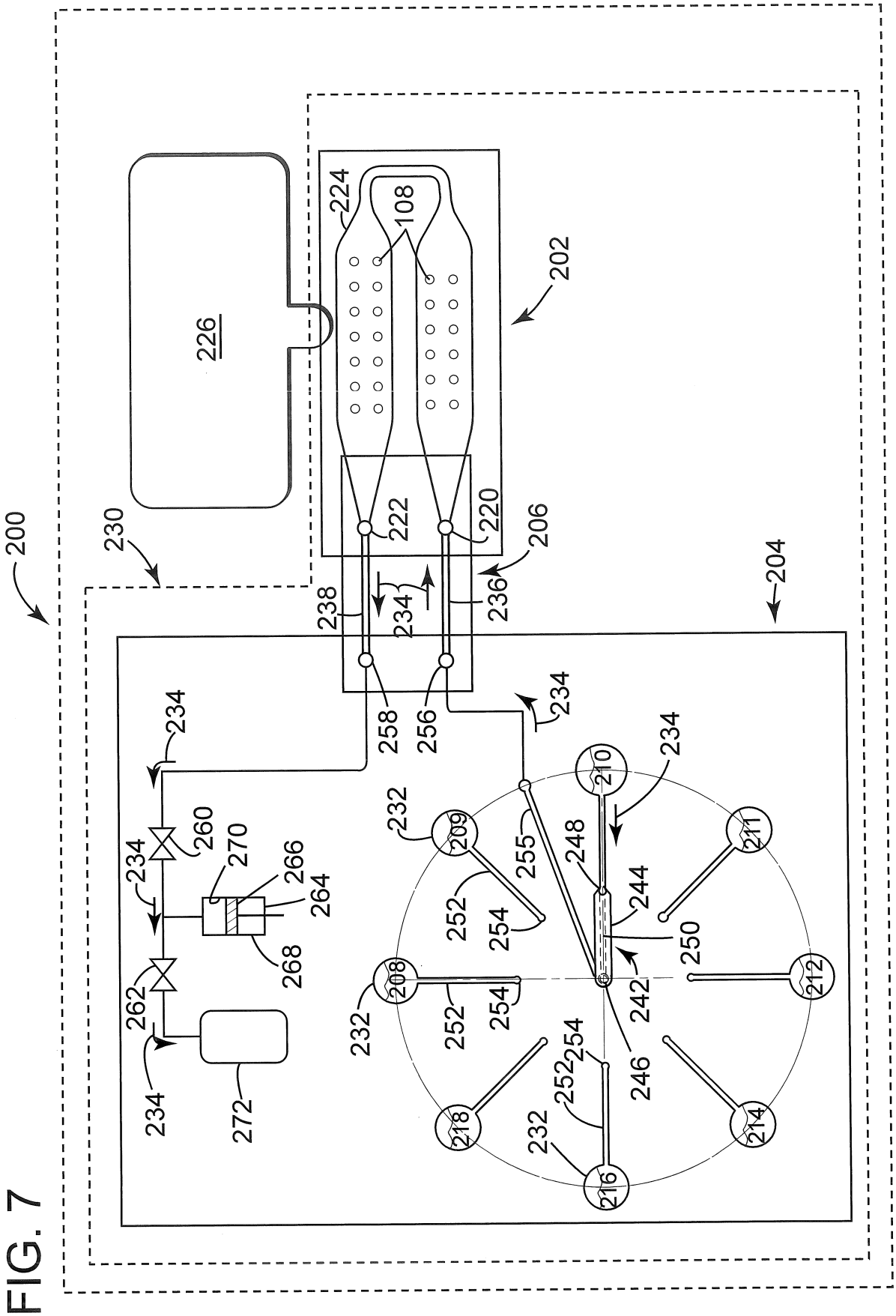
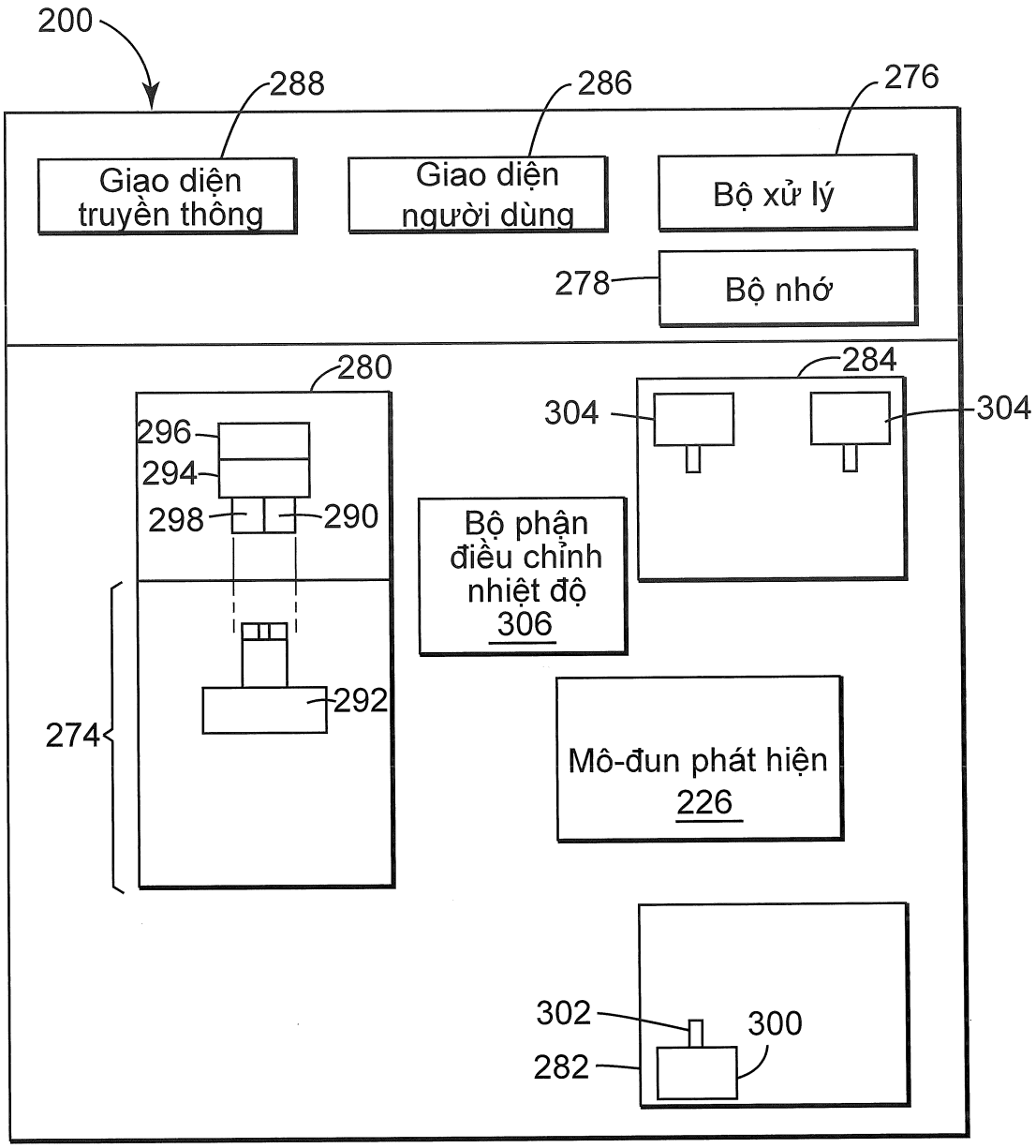

200
230
226
224
108
202
222
220
206
204
238
234
236
258
256
234
234
260
270
266
264
234
268
262
234
272
232
209
210
211
212
214
216
218
208
255
248
244
250
252
254
242
246

FIG. 7

FIG. 8


200
288
286
276
Giao diện truyền thông
Giao diện người dùng
Bộ xử lý
278
Bộ nhớ
280
284
296
294
298
290
304
304
Bộ phận điều chỉnh nhiệt độ 306
292
274
Mô-đun phát hiện 226
302
300
282