(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992345 (13) A2

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
**2020.02.28**

(22) Дата подачи заявки
**2014.08.05**

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)

## (54) СИНТЕЗИРОВАННЫЕ DE NOVO БИБЛИОТЕКИ ГЕНОВ

(31) **61/862,445; 61/862,457**
(32) **2013.08.05**
(33) **US**
(62) **201690081; 2014.08.05**

(71) Заявитель:
**ТВИСТ БАЙОСАЙЕНС КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
**Баниайи Уильям, Пек Билл Джеймс, Фернандез Андрес, Чэнь Сыюань, Индермуле Пьер (US)**

(74) Представитель:
**Строкова О.В., Глухарёва А.О., Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина Е.М., Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В., Парамонова К.В. (RU)**

(57) В настоящем документе предлагаются синтезированные de novo большие библиотеки нуклеиновых кислот с низкой частотой ошибок. Кроме того, в настоящем документе описаны устройства для изготовления строительных блоков высокого качества, таких как олигонуклеотиды. Более длинные нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы параллельно с использованием микрожидкостных блоков. Кроме того, предложенные здесь способы обеспечивают быстрое конструирование больших библиотек длинных генов высокого качества. Также, в настоящем документе предлагаются устройства для изготовления больших библиотек длинных и высококачественных нуклеиновых кислот.

201992345 A2

201992345 A2

# Синтезированные de novo библиотеки генов

## Перекрестные ссылки на родственные заявки

По данной заявке испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США № 61/862445, поданной 5 августа 2013 года, и предварительной патентной заявке США № 61/862457, поданной 5 августа 2013 года, которые включены в настоящий документ путем отсылки.

## Предпосылки создания изобретения

Высокоэффективный химический синтез генов с высокой надежностью и низкими затратами играет важную роль в биотехнологии и медицине, а также в базовом биомедицинском исследовании.

Синтез генов de novo является мощным инструментом для базового биологического исследования и применения в биотехнологии. Несмотря на то, что известны различные способы синтеза сравнительно коротких фрагментов в малом масштабе, эти технологии имеют недостатки, связанные с масштабируемостью, автоматической обработкой, скоростью, точностью и затратами. Существует потребность в устройствах для простых, воспроизводимых, масштабируемых, демонстрирующих меньшее количество ошибок и экономичных способов, которые гарантируют успешный синтез желаемых генов и могут быть автоматизированы.

## Сущность изобретения

Как указано выше, существует острая потребность в способах, устройствах и системах, которые обеспечивают эффективный быстрый синтез больших библиотек генов или сравнительно длинных фрагментов олигонуклеотидов с меньшим количеством ошибок. Кроме того, существует также потребность в способах, которые обеспечивают параллельное разделение и смешивание в микрожидкостном масштабе жидких реагентов для большого числа проводимых отдельно реакций. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей и обеспечивает соответствующие преимущества.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает библиотеку генов, как описано здесь. Библиотека генов содержит коллекцию генов. В некоторых вариантах осуществления коллекция содержит по меньшей мере 100 различных предварительно отобранных синтетических генов, которые могут иметь длину по меньшей мере 0,5 kb (тысяча пар нуклеотидов) с частотой ошибок менее 1 в 3000 bp (пар оснований) по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также библиотеку генов, которая содержит коллекцию генов. Коллекция может содержать по меньшей мере 100 различных предварительно отобранных синтетических генов, каждый из которых может иметь длину по меньшей мере 0,5 kb. По меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов могут иметь частоту ошибок менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. Желательные предварительно определенные последовательности могут поставляться любым способом, как правило, пользователем, например, пользователем, вводящим данные с использованием компьютерной системы. В различных вариантах осуществления синтезированные нуклеиновые кислоты сравнивают с этими предварительно определенными последовательностями, в некоторых случаях путем секвенирования по меньшей мере части синтезированных нуклеиновых кислот, например, с использованием методов секвенирования следующего поколения. В некоторых вариантах осуществления, относящихся к любой из библиотек генов, описанных здесь, по меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов содержат частоту ошибок менее 1 в 5000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,05% предварительно отобранных синтетических генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,5% предварительно отобранных синтетических генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов содержат частоту ошибок менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов не содержат ошибок или по существу не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют частоту делеций менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют частоту вставок менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют частоту замен менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 10 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно

содержит по меньшей мере 100 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 1000 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 1000000 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления коллекция генов, описанная здесь, содержит по меньшей мере 500 генов. В некоторых вариантах осуществления коллекция содержит по меньшей мере 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления коллекция содержит по меньшей мере 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют длину по меньшей мере 1 kb. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют длину по меньшей мере 2 kb. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют длину по меньшей мере 3 kb. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенные последовательности дополнительно содержат менее чем 20 bp по сравнению с предварительно отобранными синтетическими генами. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенные последовательности дополнительно содержат менее чем 15 bp по сравнению с предварительно отобранными синтетическими генами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один синтетический ген отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 0,1%. В некоторых вариантах осуществления каждый из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 0,1%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 10%. В некоторых вариантах осуществления каждый из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 10%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 2 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления каждый из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 2 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит синтетические гены, имеющие длину менее чем 2 kb с частотой ошибок менее 1 в 20000 bp по сравнению с предварительно отобранными последовательностями генов. В некоторых вариантах осуществления поднабор подлежащих доставке генов является ковалентно связанным. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор коллекции генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами

метаболизма. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, кроме того, предусматривает отбор одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым коллекцию генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор коллекции генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов находится в пространстве, которое составляет менее 100 $м^3$. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов находится в пространстве, которое составляет менее 1 $м^3$. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов находится в пространстве, которое составляет менее 1 $м^3$.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ конструирования библиотеки генов. Способ включает следующие стадии: введение перед первой временной точкой в считываемый компьютером невременный носитель по меньшей мере первого списка генов и второго списка генов, при этом гены имеют длину по меньшей мере 500 bp и при объединении в общий список указанный список содержит по меньшей мере 100 генов; синтез более 90% из генов в общем списке перед второй временной точкой, конструируя тем самым библиотеку генов с подлежащими доставке генами. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через месяц после первой временной точки.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как обеспечено здесь, описанный здесь способ дополнительно включает доставку, по меньшей мере, одного гена во второй временной точке. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% подлежащих доставке генов не содержат ошибок.

В некоторых вариантах осуществления подлежащие доставке гены имеют частоту ошибок менее 1/3000, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в общем списке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% подлежащих доставке генов имеют частоту ошибок менее 1 в 3000 bp, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в общем списке генов. В некоторых вариантах осуществления гены в поднаборе подлежащих доставке генов являются ковалентно связанными. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор общего списка генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления любой из способов конструирования библиотеки генов, описанной здесь, дополнительно включает отбор одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым первый, второй или общий список генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор общего списка генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одни или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления общий список генов содержит, по меньшей мере, 500 генов. В некоторых вариантах осуществления общий список генов содержит, по меньшей мере, 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления общий список генов содержит, по меньшей мере, 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления гены могут иметь длину, по меньшей мере, 1 kb. В некоторых вариантах осуществления гены могут иметь длину, по меьшей мере, 2 kb. В некоторых вариантах осуществления гены могут иметь длину, по меньшей мере, 3 kb. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 25 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 5 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 2 дня после первой временной точки. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ конструирования библиотеки генов. Способ включает следующие стадии: введение в первой временной точке в считываемый компьютером невременный носитель списка генов; синтез более 90% из списка генов, конструируя тем самым библиотеку генов с подлежащими доставке генами; и доставку подлежащих доставке генов во второй временной точке. В некоторых

вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 100 генов, и гены могут иметь длину по меньшей мере 500 bp. В еще некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через месяц после первой временной точки.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления способ, как описано здесь, дополнительно включает доставку по меньшей мере одного гена во второй временной точке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% подлежащих доставке генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления подлежащие доставке гены имеют частоту ошибок менее 1/3000, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в списке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% подлежащих доставке генов имеют частоту ошибок менее 1 в 3000 bp, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности в гене в списке генов. В некоторых вариантах осуществления гены в поднаборе подлежащих доставке генов являются ковалентно связанными. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор списка генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления способ конструирования библиотеки генов дополнительно включает отбор одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым список генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор списка генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть

комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления список генов содержит, по меньшей мере, 500 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит, по меньшей мере, 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит, по меньшей мере, 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину 1 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину, по меньшей мере, 2 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину, по меньшей мере, 3 kb. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка, как описано в способах конструирования библиотеки генов, наступает менее чем через 25 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 5 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 2 дня после первой временной точки. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате. Способ включает a) обеспечение субстрата с выделенными локусами, которые функционализированы химическим фрагментом, подходящим для связывания нуклеотидов; и b) связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 12 нуклеотидов в час в соответствии с локус-специфической предварительно определенной последовательностью, синтезируя тем самым множество олигонуклеотидов длиной в n пар оснований. В настоящем документе описаны различные варианты осуществления, относящиеся к способу синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате.

В любом из способов синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 15 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере

20 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 25 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной последовательности с частотой ошибок менее 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной последовательности с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной последовательности с частотой ошибок менее 1/2000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/2000 bp.

При практическом осуществлении любого из способов синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат адениновую, гуаниновую, тиминовую, цитозиновую или уридиновую группу, или модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат динуклеотиды или тринуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат фосфорамидит. В некоторых вариантах осуществления n в n-mer олигонуклеотидах равно по меньшей мере 100. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 200. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 300. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 400. В некоторых вариантах осуществления поверхность содержит по меньшей мере 100000 выделенных локусов, и по

меньшей мере два из множества растущих олигонуклеотидов могут отличаться друг от друга.

В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, дополнительно включает вакуумную сушку субстрата перед связыванием. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат блокирующую группу. В некоторых вариантах осуществления блокирующая группа представляет собой неустойчивый к кислоте DMT. В некоторых вариантах осуществления неустойчивый к кислоте DMT представляет собой 4,4'-диметокситритил. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, дополнительно включает окисление или сульфирование. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, дополнительно включает химическое кэппирование несвязанных олигонуклеотидных цепей. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, включает удаление блокирующей группы, деблокируя тем самым растущую олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии вакуумной сушки. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии окисления. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии кэппирования. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии деблокирования. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит, по меньшей мере, 10000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит, по меньшей мере, 100000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит, по меньшей мере, 1000000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящего изобретения обеспечена система для выполнения серии параллельных реакций. Система содержит: первую поверхность со множеством выделенных локусов; прикрывающий элемент («capping element») со множеством выделенных колпачков реакторов («reactor caps»). В некоторых вариантах осуществления система выравнивает множество выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на первой поверхности, формируя временное уплотнение между первой поверхностью и прикрывающим элементом, тем самым физически разделяя локусы на первой поверхности на группы, состоящие по меньшей мере из двух локусов на реактор, соединенных с каждым колпачком реактора. В некоторых вариантах осуществления каждый реактор содержит первый набор реагентов.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к любой из систем для выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, при снятии с первой поверхности колпачки реакторов удерживают, по меньшей мере, часть первого набора реагентов. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 30%. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 90%. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов расположено на микроструктурах, встроенных в поверхность подложки. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит вторую поверхность со множеством выделенных локусов при плотности по меньшей мере 0,1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит вторую поверхность со множеством выделенных локусов при плотности по меньшей мере

1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит вторую поверхность со множеством выделенных локусов при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к любой из систем для выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, выделенные локусы первой поверхности содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы второй поверхности содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с первой или второй поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов имеют номинальную длину дуги периметра с плотностью по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов имеют номинальную длину дуги периметра с плотности по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов первой поверхности имеют высокоэнергетическую поверхность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая поверхности имеют различное поверхностное натяжение с заданной жидкостью. В некоторых вариантах осуществления высокая поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов расположено на твердом субстрате, изготовленном из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления прикрывающие элементы состоят из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также массив замкнутых полостей. Массив замкнутых полостей включает: множество выделенных

реакторов, содержащих первый субстрат и второй субстрат, содержащий колпачки реакторов; по меньшей мере 2 выделенных локуса в каждом реакторе. В некоторых случаях выделенные реакторы отделены съемным уплотнением. В некоторых случаях колпачки реакторов удерживают по меньшей мере часть содержимого реакторов при снятии второго субстрата с первого субстрата. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов на втором субстрате имеют плотность по меньшей мере 0,1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов на втором субстрате имеют плотность по меньшей мере 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов на втором субстрате имеют плотность по меньшей мере 10 на мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к массиву замкнутых полостей, как описано здесь, колпачки реакторов удерживают по меньшей мере 30% содержимого реакторов. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов удерживают, по меньшей мере, 90% содержимого реакторов. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы находятся при плотности по меньшей мере 2/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы находятся при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей дополнительно содержит по меньшей мере 5 выделенных локусов в каждом реакторе. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей, описанных здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 20 выделенных локусов в каждом реакторе. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей, описанных здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 50 выделенных локусов в каждом реакторе. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей, описанных здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 100 выделенных локусов в каждом реакторе.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к массиву замкнутых полостей, как описано здесь, выделенные локусы расположены на микроструктурах, встроенных в поверхность подложки. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в

диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры имеют номинальную длину дуги периметра по меньшей мере двух каналов, которая имеет плотность по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры имеют номинальную длину дуги периметра по меньшей мере двух каналов, которая имеет плотность по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные реакторы отделены обратимым уплотнением. В некоторых вариантах осуществления уплотнение представляет собой капиллярный клапан («capillary burst valve»).

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к массиву замкнутых полостей, как описано здесь, множество выделенных локусов первого субстрата содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов второго субстрата содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с первой или второй поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов первого субстрата содержит высокоэнергетическую поверхность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая поверхности имеют различное поверхностное натяжение с заданной жидкостью. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов или колпачков реакторов расположено на твердом субстрате, изготовленном из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ выполнения серии параллельных реакций. Способ включает: (a) обеспечение первой поверхности со множеством выделенных локусов; (b) обеспечение прикрывающего

элемента со множеством выделенных колпачков реакторов; (c) выравнивание множества выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на первой поверхности и формирование временного уплотнения между первой поверхностью и прикрывающим элементом, физически разделяя тем самым локусы на первой поверхности на группы, состоящие по меньшей мере из двух локусов; (d) выполнение первой реакции с образованием тем самым первого набора реагентов; и (e) снятие прикрывающего элемента с первой поверхности, при этом каждый колпачок реакторов удерживает по меньшей мере часть первого набора реагентов в первом реакционном объеме. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 30%. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 90%.

В некоторых вариантах осуществления способ выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включает следующие стадии: (f) обеспечение второй поверхности со множеством выделенных локусов; (g) выравнивание множества выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на второй поверхности, и формирование временного уплотнения между второй поверхностью и прикрывающим элементом, тем самым физически разделяя локусы на второй поверхности; (h) выполнение второй реакции с использованием части первого набора реагентов с образованием тем самым второго набора реагентов; и (i) снятие прикрывающего элемента со второй поверхности, при этом каждый колпачок реакторов может удерживать по меньшей мере часть второго набора реагентов во втором реакционном объеме. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 30%. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 90%.

При практическом осуществлении любого из способов выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, множество выделенных локусов может иметь плотность по меньшей мере 1 на мм$^2$ на первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов может иметь плотность по меньшей мере 10 на мм$^2$ на первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов может иметь плотность по меньшей мере 100 на мм$^2$ на первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов имеет плотность по меньшей мере 0,1 на мм$^2$ на прикрывающем элементе.

В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов имеет плотность по меньшей мере 1 на мм$^2$ на прикрывающем элементе. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов имеет плотность по меньшей мере 10 на мм$^2$ на прикрывающем элементе. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность более 0,1 на

мм$^2$ на второй поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность более 1 на мм$^2$ на второй поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность более 10 на мм$^2$ на второй поверхности.

При практическом осуществлении любого из способов выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, стадии снятия прикрывающих элементов с поверхности, такие как стадии снятия, описанные в пунктах (e) и (i), как описано здесь, могут быть выполнены с различной скоростью. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы первой поверхности содержат покрытие из реагентов для первой реакции. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы второй поверхности содержат покрытие из реагентов для второй реакции. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с первой или второй поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину по меньшей мере 25 bp. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину по меньшей мере 200 bp. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину по меньшей мере 300 bp. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы первой поверхности имеют высокоэнергетическую поверхность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая поверхности содержат различное поверхностное натяжение с заданной жидкостью. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 процентов.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способу выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, множество выделенных локусов или выделенных колпачков реакторов расположено на твердом субстрате, изготовленном из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления первый и второй реакционные объемы являются различными. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая реакция включает полимеразную циклическую сборку. В некоторых вариантах осуществления первая или

вторая реакция включает ферментативный синтез генов, отжиг и реакцию лигирования, одновременный синтез двух генов посредством гибридного гена, лигирование методом «дробовика» и колигирование, синтез генов путем вставки, синтез генов посредством одной цепи ДНК, матрично-направленное лигирование, лигазную цепную реакцию, синтез генов с помощью микрочипов, твердофазную сборку, технологию «Sloning building block technology» или синтез генов, опосредованный лигированием РНК. В некоторых вариантах осуществления способы выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включают охлаждение прикрывающего элемента. В некоторых вариантах осуществления способы выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включают охлаждение первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления способы выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включают охлаждение второй поверхности. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает субстрат, имеющий функционализированную поверхность. Субстрат, имеющий функционализированную поверхность, может включать твердую подложку, содержащую множество выделенных локусов. В одном варианте осуществления выделенные локусы функционализированы фрагментом, который повышает поверхностную энергию твердой подложки. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы расположены на микроканалах.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к субстрату, имеющему функционализированную поверхность, как описано здесь, фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления объем микроканала составляет менее 1 нл. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра 0,036 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с субстратом. В некоторых вариантах

осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка изготовлена из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность. Способ включает: (a) нанесение посредством по меньшей мере одного струйного насоса по меньшей мере одной капли первого реагента на первый локус из множества локусов; (b) приложение отрицательного давления к субстрату; и (c) нанесение посредством по меньшей мере одного струйного насоса по меньшей мере одной капли второго реагента на первый локус.

При практическом осуществлении любого из способов для синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, первый и второй реагенты могут быть различными. В некоторых вариантах осуществления первый локус функционализирован фрагментом, который повышает его поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления множество локусов расположено на микроструктурах, встроенных в поверхность субстрата. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала

представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления поверхность субстрата состоит из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способам синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, объем капли первого и/или второго реагентов составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности, по меньшей мере, 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления давление, окружающее субстрат, снижено до менее чем 1 mTorr. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает связывание по меньшей мере первого строительного блока, образовавшегося из первой капли, с растущей олигонуклеотидной цепью на первом локусе. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат блокирующую группу. В некоторых вариантах осуществления блокирующая группа

представляет собой неустойчивый к кислоте DMT. В некоторых вариантах осуществления неустойчивый к кислоте DMT представляет собой 4,4'-диметокситритил. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает окисление или сульфирование. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает химическое кэппирование несвязанных олигонуклеотидных цепей. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает удаление блокирующей группы, деблокируя тем самым растущую олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии связывания. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии окисления. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии кэппирования. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии деблокирования. В некоторых вариантах осуществления первый локус расположен на микроструктуре, встроенной в поверхность субстрата. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один реагент для стадии окисления обеспечен путем заполнения микроструктуры раствором, содержащим по меньшей мере один реагент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один реагент для стадии кэппирования обеспечен путем заполнения микроструктуры раствором, содержащим по меньшей мере один реагент. В некоторых вариантах осуществления первый локус расположен на микроструктуре, встроенной в поверхность субстрата, и по меньшей мере один реагент для стадии деблокирования может быть обеспечен путем заполнения микроструктуры раствором, содержащим по меньшей мере один реагент. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает заключение субстрата в пределах герметичной камеры. В некоторых вариантах осуществления герметичная камера обеспечивает удаление жидкостей из первого локуса. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность,

как описано здесь, дополнительно включает стекание жидкости через сливное отверстие, которое оперативно связано с первым локусом. В некоторых вариантах осуществления после приложения отрицательного давления к субстрату содержание влаги на субстрате составляет менее чем 1 ppm. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия повышается, соответствуя углу контакта с водой менее чем 20 градусов. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ осаждения реагентов на множество выделенных локусов. Способ включает нанесение посредством струйного насоса по меньшей мере одной капли первого реагента на первый локус из множества локусов; нанесение посредством струйного насоса по меньшей мере одной капли второго реагента на второй локус из множества выделенных локусов. В некоторых вариантах осуществления второй локус расположен рядом с первым локусом. В еще некоторых вариантах осуществления первый или второй реагенты являются различными. В еще других вариантах осуществления первый или второй локусы расположены на микроструктурах, встроенных в поверхность подложки. В еще некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере один канал, который имеет глубину более чем 100 мкм.

При практическом осуществлении любого из способов осаждения реагентов на множество выделенных локусов, как описано здесь, в некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления первый локус получает менее чем 0,1% второго реагента, и второй локус получает менее чем 0,1% первого реагента. В некоторых вариантах осуществления локусы имеют плотность номинальной длины арки периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления локусы имеют плотность номинальной длины арки периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления первый и второй локусы содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с субстратом. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В

некоторых вариантах осуществления один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления поверхность подложки состоит из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает микрожидкостную систему. Микрожидкостная система содержит первую поверхность со множеством микролунок при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$; и каплю внутри одной из множества микролунок. В некоторых вариантах осуществления капля внутри одной из множества микролунок имеет значение числа Рейнольдса в диапазоне около 1-1000. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок находится при плотности по меньшей мере 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок содержится при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к микрожидкостной системе, как описано здесь, микрожидкостная система дополнительно содержит струйный насос. В некоторых вариантах осуществления капля осаждается с помощью струйного насоса. В некоторых вариантах осуществления капля движется в нижнюю половину первой микролунки. В некоторых вариантах осуществления капля движется в среднюю треть первой микролунки. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок находится при плотности по меньшей мере 100 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления объем первой микролунки больше, чем капля. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В

некоторых вариантах осуществления объем капли составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества микролунок находится в жидкостном взаимодействии по меньшей мере с одним микроканалом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один микроканал покрыт фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления микролунки сформированы на твердой подложке, изготовленной из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления капля содержит реагент, который обеспечивает синтез олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой нуклеотид или аналог нуклеотида.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ осаждения капель на множество микролунок. Способ включает нанесение посредством струйного насоса по меньшей мере одной капли на первую микролунку из множества микролунок. В некоторых случаях капля внутри одной из множества микролунок имеет значение числа Рейнольдса в диапазоне около 1-1000. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок имеет плотность по меньшей мере 1/мм$^2$. В еще некоторых случаях множество микролунок имеет плотность по меньшей мере 10/мм$^2$.

При практическом осуществлении любого из способов осаждения капель на множество микролунок, как описано здесь, множество микролунок может иметь плотность по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления каплю наносят со скоростью по меньшей мере 2 м/сек. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества микролунок находится в жидкостном взаимодействии по меньшей мере с одним микроканалом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна микролунка покрыта фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой по меньшей мере 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления микролунки сформированы на твердой подложке, изготовленной из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади первой плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления капля внутри микролунки движется в среднюю треть микролунки. В некоторых вариантах осуществления капля внутри микролунки движется в нижнюю половину микролунки. В некоторых вариантах осуществления капля содержит реагент, который обеспечивает синтез олигонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой нуклеотид или аналог нуклеотида. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ разделения. Способ разделения включает приведение в контакт первой поверхности, содержащей жидкость в первом множестве выделенных локусов, со второй поверхностью, содержащей второе множество выделенных локусов; определение скорости высвобождения таким образом, чтобы желательная доля жидкости могла быть перенесена из первого множества выделенных локусов во второе множество выделенных локусов; и отделение второй поверхности от первой поверхности с указанной скоростью. В некоторых вариантах осуществления первая поверхность имеет первое поверхностное натяжение с жидкостью, и вторая поверхность может иметь второе поверхностное натяжение с жидкостью.

При практическом осуществлении любого из способов разделения, как обеспечено здесь, часть первой поверхности может быть покрыта фрагментом, который увеличивает поверхностное натяжение. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления поверхностное натяжение первой поверхности соответствует углу контакта с водой по меньшей мере 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления поверхностное натяжение второй поверхности соответствует углу контакта с водой больше, чем 90 градусов. В некоторых вариантах осуществления первая поверхность состоит из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных

локусов находится при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая поверхность содержит микроканалы, удерживающие по меньшей мере часть жидкости. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая поверхность содержит нанореакторы, удерживающие по меньшей мере часть жидкости. В некоторых вариантах осуществления способ разделения, как описано здесь, дополнительно включает приведение в контакт третьей поверхности с третьим множеством выделенных локусов. В некоторых вариантах осуществления жидкость содержит нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления желательная доля составляет более 30%. В некоторых вариантах осуществления желательная доля составляет более 90%. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ смешивания, как описано здесь. Способ включает: (a) обеспечение первого субстрата, содержащего множество встроенных в него микроструктур; (b) обеспечение второго субстрата, содержащего множество выделенных колпачков реакторов; (c) выравнивание первого и второго субстратов таким образом, чтобы колпачок первого реактора из множества мог получать жидкость из n микроструктур в первом субстрате; и (d) доставку жидкости из n микроструктур в колпачок первого реактора, смешивая тем самым жидкость из n микроструктур с формированием смеси.

При практическом осуществлении любого из способов смешивания, как описано здесь, множество выделенных колпачков реакторов может находиться при плотности по меньшей мере 0,1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов может находиться при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов может находиться при плотности по меньшей мере 10/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества микроструктур может содержать по меньшей мере два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах

осуществления по меньшей мере один из каналов покрыт фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой химически инертный агент. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры сформированы на твердой подложке, изготовленной из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая агентом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая агентом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая агентом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество микроструктур содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов коваленто связано с первой поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры находятся при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры находятся при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способам смешивания, как описано здесь, после стадии (c), которая представляет собой выравнивание первого и второго субстратов таким образом, чтобы колпачок первого реактора из множества мог получать жидкость из n микроструктур в первом субстрате, имеется зазор размером менее 100 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления после стадии (c) имеется зазор размером менее 50 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления после стадии (c) имеется зазор размером менее 20 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления после стадии (c) имеется зазор размером менее 10 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления смесь частично распространяется в зазор. В некоторых вариантах осуществления способ смешивания дополнительно включает герметичное закрытие зазора путем перемещения первого и второго субстратов на более близкое расстояние друг к другу. В некоторых вариантах

осуществления один из двух каналов покрыт фрагментом, который повышает поверхностную энергию, соответствующую углу контакта с водой менее 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный агент. В некоторых вариантах осуществления доставку осуществляют под давлением. В некоторых вариантах осуществления объем смеси больше, чем объем колпачка реактора. В некоторых вариантах осуществления жидкость содержит нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 10. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 25. В некоторых вариантах осуществления n, число микроструктур, из которых жидкость смешивается с образованием смеси, может составлять по меньшей мере 50. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 75. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 100. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь. Способ включает: обеспечение субстрата с выделенными локусами, которые функционализированы химическим фрагментом, подходящим для связывания нуклеотидов; и связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов в соответствии с локус-специфической предварительно определенной последовательностью без переноса субстрата между связываниями по меньшей мере двух строительных блоков, синтезируя тем самым множество олигонуклеотидов длиной n пар оснований.

При практическом осуществлении любого из способов синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, способ может дополнительно включать связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 12 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонулкотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 15 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонулкотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 20 нуклеотидов в час. В некоторых

вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонулкотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 25 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной последовательности, с частотой ошибок менее чем 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающихся от локус-специфической предварительно определенной последовательности, с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающихся от локус-специфической предварительно определенной последовательности, с частотой ошибок менее 1/2000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/2000 bp.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способу синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, строительные блоки содержат адениновую, гуаниновую, тиминовую, цитозиновую или уридиновую группу, или модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат динуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат фосфорамидит. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 100. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 200. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 300. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 400. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 100000 выделенных локусов, и по меньшей мере два из множества растущих олигонуклеотидов отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает вакуумную сушку субстрата перед связыванием. В некоторых вариантах осуществления

строительные блоки содержат блокирующую группу. В некоторых вариантах осуществления блокирующая группа представляет собой неустойчивый к кислоте DMT. В некоторых вариантах осуществления неустойчивый к кислоте DMT представляет собой 4,4'-диметокситритил. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает окисление или сульфирование. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает химическое кэппирование несвязанных олигонуклеотидных цепей. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление блокирующей группы, деблокируя тем самым растущую олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 10000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 100000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 1000000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ конструирования библиотеки генов, как описано здесь. Способ включает: введение в первой временной точке в считываемый компьютером невременный носитель списка генов, при этом список содержит по меньшей мере 100 генов и при этом гены имеют длину по меньшей мере 500 bp; синтез более 90% из списка генов, конструируя тем самым библиотеку генов с подлежащими доставке генами; приготовление библиотеки для секвенирования, которая представляет библиотеку генов; получение информации о последовательности; отбор по меньшей мере поднабора подлежащих доставке генов на основе информации от последовательности; и доставку отобранных подлежащих доставке генов во второй временной точке, при этом вторая временная точка наступает менее чем через месяц после первой временной точки.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как описано здесь, информация о последовательности может быть получена посредством секвенирования следующего поколения. Информация о последовательности может быть получена путем секвенирования по Сенгеру. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку по

меньшей мере одного гена во второй временной точке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% подлежащих доставке генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления подлежащие доставке гены содержат частоту ошибок менее 1/3000, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в списке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% подлежащих доставке генов содержат частоту ошибок менее 1 в 3000 bp, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в списке генов. В некоторых вариантах осуществления гены в поднаборе подлежащих доставке генов ковалентно связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор списка генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отбор одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым список генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор списка генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 500 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину по меньшей мере 1 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину по меньшей мере 2 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину по меньшей мере 3 kb. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 25 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах

осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 5 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 2 дня после первой временной точки. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается микрожидкостное устройство для синтеза нуклеиновой кислоты, содержащее субстрат с по существу плоской частью, содержащей n группировок m микрожидкостных соединений между противоположными поверхностями, при этом каждое из n*m микрожидкостных соединений содержит первый канал и второй канал, и при этом первый канал в пределах каждой из n группировок является общим для всех m микрожидкостных соединений, при этом множество микрожидкостных соединений охватывают по существу плоскую часть субстрата вдоль наименьшего размера субстрата, и при этом n и m равны по меньшей мере 2. В некоторых вариантах осуществления второй канал функционализирован покрытием, которое может содействовать прикреплению олигонуклеотида к устройству. В некоторых вариантах осуществления устройство дополнительно содержит первый олигонуклеотид, который прикреплен ко вторым каналам в k из n группировок. В некоторых вариантах осуществления k равно 1. В некоторых вариантах осуществления устройство дополнительно содержит второй олигонуклеотид, который прикреплен к l из n группировок. В некоторых вариантах осуществления l равно 1. В некоторых вариантах осуществления ни одна из группировок в l группировках не находится в k группировках.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину по меньшей мере 10 нуклеотидов, 25 нуклеотидов, 25 нуклеотидов, 50 нуклеотидов, 75 нуклеотидов, 100 нуклеотидов, 125 нуклеотидов, 150 нуклеотидов или 200 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй олигонуклеотиды различаются по меньшей мере на 2 нуклеотида, 3 нуклеотида, 4 нуклеотида, 5 нуклеотидов или 10 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления n*m микрожидкостных соединений имеют длину не более 5 мм, 1,5 мм, 1,0 мм или 0,5 мм. В некоторых вариантах осуществления первый канал в пределах каждой из n группировок имеет длину не более 5 мм, 1,5 мм, 1,0 мм или 0,5 мм. В некоторых вариантах осуществления первый канал в пределах каждой из n группировок имеет длину по меньшей мере 0,05 мм, 0,75 мм, 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм или 0,4 мм. В некоторых вариантах осуществления второй канал в каждом из n*m микрожидкостных соединений имеет длину не более 0,2 мм, 0,1 мм, 0,05 мм, 0,04 мм или

0,03 мм. В некоторых вариантах осуществления второй канал в каждом из n*m микрожидкостных соединений имеет длину по меньшей мере 0,001 мм, 0,005 мм, 0,01 мм, 0,02 мм или 0,03 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения первого канала в пределах каждой из n группировок составляет по меньшей мере 0,01 мм, 0,025 мм, 0,05 мм или 0,075 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения первого канала в пределах каждой из n группировок составляет не более 1 мм, 0,5 мм, 0,25 мм, 0,1 мм или 0,075 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения второго канала в каждом из n*m микрожидкостных соединений составляет по меньшей мере 0,001 мм, 0,05 мм, 0,01 мм, 0,015 мм или 0,02 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения второго канала в каждом из n*m микрожидкостных соединений составляет не более 0,25 мм, 0,125 мм, 0,050 мм, 0,025 мм, 0,02 мм. В некоторых вариантах осуществления стандартное отклонение размера поперечного сечения вторых каналов в каждом из n*m микрожидкостных соединений составляет менее 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% от среднего размера поперечного сечения. В некоторых вариантах осуществления отклонение размера поперечного сечения в пределах по меньшей мере 90% вторых каналов n*m микрожидкостных соединений составляет не более 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%.

В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 10, 25, 50, 100, 1000 или 10000. В некоторых вариантах осуществления m равно по меньшей мере 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 80%, 90%, 95% или 99% кремния.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% вторых каналов n*m микрожидкостных соединений функционализировано фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия увеличена до уровня, соответствующего углу контакта с водой менее 75, 50, 30 или 20 градусов.

В некоторых вариантах осуществления соотношение размеров по меньшей мере для 90% вторых каналов n*m микрожидкостных соединений равно менее чем 1, 0,5 или 0,3. В некоторых вариантах осуществления соотношение размеров по меньшей мере для 90% первых каналов в n группировках равно менее чем 0,5, 0,3 или 0,2.

В некоторых вариантах осуществления общая длина по меньшей мере 10%, 25%, 50%, 75%, 90% или 95% n*m микрожидкостных соединений находится в пределах 10%,

20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% или 1000% наименьшего размера по существу плоского субстрата.

В некоторых вариантах осуществления по существу плоская часть устройства изготовлена из пластины SOI.

В другом аспекте изобретение относится к способу амплификации нуклеиновой кислоты, включающему: (a) обеспечение образца, содержащего n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит различную целевую последовательность; (b) обеспечение первого адаптера, который поддается гибридизации по меньшей мере с одной последовательностью для гибридизации с адаптером, на m из n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения первого адаптера с использованием m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот в качестве матрицы, генерируя тем самым m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом каждый из m продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) содержит множество копий целевой последовательности из ее матрицы; (d) обеспечение первого вспомогательного олигонуклеотида, который поддается гибридизации с первым адаптером; и (e) обеспечение первого агента в условиях, подходящих для разрезания первым агентом m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) на множестве участков разрезания, генерируя тем самым множество одноцепочечных копий целевых последовательностей в m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления n или m равно по меньшей мере 2. В некоторых вариантах осуществления n или m равно по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 или 500. В некоторых вариантах осуществления m меньше, чем n. В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, образован путем обеспечения по меньшей мере n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит одну из различных целевых последовательностей, и замыкания в кольцо n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот, генерируя тем самым n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления первый адаптер поддается гибридизации одновременно с обоими концами n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления различные целевые последовательности в n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислотах фланкированы последовательностью для гибридизации с первым и вторым адаптером. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот генерированы путем синтеза олигонуклеотидов de novo. В некоторых

вариантах осуществления последовательность для гибридизации с первым адаптером в каждой из n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот отличается не более чем на два нуклеотидных основания. В некоторых вариантах осуществления последовательность для гибридизации с первым или вторым адаптером имеет длину по меньшей мере 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность для гибридизации с первым или вторым адаптером имеет длину не более 75, 50, 45, 40, 35, 30 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления концы n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот образуют пару с соседними основаниями на первом адаптере, когда первый адаптер одновременно гибридизирован с обоими концами линейной одноцепочечной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления множество сайтов разрезания расположено таким образом, что последовательность для гибридизации с адаптером отрезается по меньшей мере от 5% остальной части последовательности m копий кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% последовательности m копий кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, отличных по меньшей мере от одной последовательности для гибридизации с адаптером, остается неразрезанным. В некоторых вариантах осуществления множество сайтов разрезания расположено снаружи по меньшей мере одной последовательности для гибридизации с адаптером. В некоторых вариантах осуществления положение множества сайтов разрезания не зависит от целевых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления положение множества сайтов разрезания определяется по меньшей мере одним элементом последовательности в пределах последовательности первого адаптера или первого вспомогательного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления элемент последовательности содержит сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции. В некоторых вариантах осуществления первый вспомогательный олигонуклеотид или первый олигонуклеотидный адаптер содержит сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции IIS-типа. В некоторых вариантах осуществления сайты узнавания расположены на расстоянии по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов от сайтов разрезания. В некоторых вариантах осуществления множество сайтов разрезания расположено в точках соединения одноцепочечной и двухцепочечной нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечных нуклеиновые кислоты содержат первый адаптер и первый вспомогательный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные нуклеиновые кислоты состоят в основном из m различных целевых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 95% сходством между двумя

последовательностями. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 90% сходством между двумя последовательностями. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 80% сходством между двумя последовательностями. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 50% сходством между двумя последовательностями. В некоторых вариантах осуществления генерирование m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) включает амплификацию с замещением цепи. В некоторых вариантах осуществления первый вспомогательный олигонуклеотид содержит аффинную метку. В некоторых вариантах осуществления аффинная метка представляет собой биотин или производное биотина. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение двухцепочечных нуклеиновых кислот из образца. В некоторых вариантах осуществления выделение включает аффинную очистку, хроматографию или очистку из геля. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит эндонуклеазу рестрикции. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит по меньшей мере две эндонуклеазы рестрикции. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит эндонуклеазу рестрикции IIS-типа. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит никующую эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит, по меньшей мере, две никующих эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит по меньшей мере один фермент, выбранный из группы, состоящей из MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI и Nt.BspQI, и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления первый агент обладает по существу такой же функцией, узнает такие же или по существу такие же последовательности узнавания, или разрезает такие же или по существу такие же сайты разрезания, как любой из перечисленных первых агентов и вариантов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два фермента рестрикции представляют собой

MlyI и BciVI или BfuCI и MlyI. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает (a) разделение образца на множество фракций; (b) обеспечение по меньшей мере одной фракции вторым адаптером, который поддается гибридизации по меньшей мере с одной последовательностью для гибридизации с адаптером на k из n различных кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения второго адаптера с использованием k кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот в качестве мастрицы, генерируя тем самым k одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом второй одноцепочечный продукт амплификации нуклеиновых кислот (ампликон) содержит множество копий целевой последовательности из ее матрицы; (d) обеспечение второго вспомогательного олигонуклеотида, который поддается гибридизации со вторым адаптером; и (e) обеспечение второго агента в условиях, подходящих для разрезания агентом k одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) на втором множестве сайтов разрезания, генерируя тем самым множество одноцепочечных копий целевых последовательностей в k кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления первый и второй адаптеры являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый и второй вспомогательные олигонуклеотиды являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый и второй агенты являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления k + m равно меньше, чем n. В некоторых вариантах осуществления k равно по меньшей мере 2. В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, образован путем амплификации одноцепочечной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления амплификация одноцепочечной нуклеиновой кислоты включает: (a) обеспечение образца, содержащего по меньшей мере m предшественников кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (b) обеспечение предшественника первого адаптера, который поддается гибридизации с m предшественниками кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения предшественника первого адаптера с использованием m предшественников кольцевых одноцепопчечных нуклеиновых кислот в качестве матрицы, генерируя тем самым m предшественников одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом одноцепочечный продукт амплификации нуклеиновых кислот (ампликон) содержит множество копий m предшественников кольцевой одноцепочечной нуклеиновой кислоты; (d) обеспечение предшественника первого вспомогательного олигонуклеотида, который поддается гибридизации с предшественником первого

адаптера; и (e) обеспечение предшественника первого агента в условиях, подходящих для разрезания предшественником первого агента предшественника первого одноцепочечного продукта амплификации нуклеиновых кислот (ампликона) на множестве сайтов разрезания, генерируя тем самым m предшественников линейных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает замыкание в кольцо m предшественников линейных нуклеиновых кислот, формируя тем самым копии m предшественников кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления m предшественников кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот амплифицировано по меньшей мере в 10, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000 или более раз в одноцепочечных копиях. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот содержится при концентрации около или не более чем около 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 50 пМ, 1 пМ, 100 фМ, 10 фМ, 1 фМ или менее. В некоторых вариантах осуществления замыкание в кольцо включает лигирование. В некоторых вариантах осуществления лигирование включает использование лигазы, выбранной из группы, состоящей из T4 ДНК-лигазы, T3 ДНК-лигазы, T7 ДНК-лигазы, e.coli ДНК-лигазы, Taq ДНК-лигазы и 9N ДНК-лигазы.

В еще другом аспекте изобретение в различных вариантах осуществления относится к набору, содержащему: (a) первый адаптер; (b) первый вспомогательный олигонуклеотид, который поддается гибридизации с адаптером; (c) лигазу; и (d) первый расщепляющий агент, содержащий по меньшей мере один фермент, выбранный из группы, состоящей из MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI и Nt.BspQI, и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления первый агент обладает по существу такой же функцией, узнает такую же или по существу такую же последовательность узнавания, или разрезает в таком же или по существу в таком же сайте разрезания, как любой из перечисленных первых агентов и вариантов. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит второй расщепляющий агент. В

некоторых вариантах осуществления второй расщепляющий агент содержит фермент, выбранный из группы, состоящей из MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI и Nt.BspQI, и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления второй агент обладает по существу такой же функцией, узнает такую же или по существу такую же последовательность узнавания, или разрезает в таком же или по существу таком же сайте разрезания, как любой из перечисленных вторых агентов и вариантов. В некоторых вариантах осуществления первые расщепляющие агенты представляют собой MlyI. В некоторых вариантах осуществления второй расщепляющий агент представляет собой BciVI или BfuCI.

В еще другом аспекте изобретение относится к способу амплификации нуклеиновой кислоты, включающему: (a) обеспечение образца, содержащего n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит отличающуюся от других целевую последовательность; (b) обеспечение первого адаптера, который поддается гибридизации по меньшей мере с одной последовательностью для гибридизации с адаптером на m из n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения первого адаптера с использованием m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот в качестве матрицы, генерируя тем самым m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом каждый из m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) содержит множество копий целевой последовательности из ее матрицы; (d) генерирование двухцепочечных сайтов узнавания для первого агента на m одноцепочечных продуктах амплификации нуклеиновых кислот (ампликонах); и (e) обеспечение первого агента в условиях, подходящих для разрезания первым агентом m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) на множестве сайтов разрезания, генерируя тем самым множество одноцепочечных копий целевых последовательностей в m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные сайты узнавания содержат первую

часть первого адаптера на первой цепи двухцепочечных сайтов узнавания, и вторую цепь первого адаптера на второй цепи двухцепочечных сайтов узнавания. В некоторых вариантах осуществления адаптер содержит палиндромную последовательность. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные сайты узнавания генерированы путем гибридизации первой и второй частей первого адаптера друг с другом. В некоторых вариантах осуществления m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликоны) содержат множество двухцепочечных самогибридизирующихся областей.

В еще другом аспекте изобретение относится к способу генерирования длинной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом способ включает следующие стадии: (a) обеспечение множества иммобилизованных на поверхности нуклеиновых кислот, при этом указанное множество нуклеиновых кислот включает нуклеиновые кислоты, содержащие перекрывающиеся комплементарные последовательности; (b) высвобождение указанного множества нуклеиновых кислот в раствор; и (c) обеспечение условий, способствующих: i) гибридизации указанных перекрывающихся комплементарных последовательностей с формированием множества гибридизированных нуклеиновых кислот; и ii) удлинению или лигированию указанных гибридизированных нуклеиновых кислот для синтеза длинной молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к автоматизированной системе, способной обрабатывать один или несколько субстратов, включающей: струйную печатающую головку для распыления на субстрат микрокапли, содержащей химические вещества; сканирующий транспорт («scanning transport») для получения изображения субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для селективного осаждения микрокапли в определенные участки; проточную кювету для обработки субстрата, на который осаждена микрокапля, путем воздействия на субстрат одной или нескольких отобранных жидкостей; блок выравнивания для точного выравнивания субстрата относительно печатающей головки при каждом помещении субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для выполнения осаждения; и не включающей обрабатывающий транспорт («treating transport») для перемещения субстрата между печатающей головкой и проточной кюветой для обработки в проточной кювете, при этом указанный обрабатывающий транспорт и указанный сканирующий транспорт представляют собой разные элементы.

В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к автоматизированной системе для синтеза олигонуклеотидов на субстрате, которая способна обрабатывать один или несколько субстратов, при этом указанная система включает: струйную печатающую

головку для распыления на субстрат раствора, содержащего нуклеозид или активированный нуклеозид; сканирующий транспорт для получения изображения субстрата в непосредственной области от печатающей головки для селективного осаждения нуклеозида в определенных участках; проточную кювету для обработки субстрата, на который осажден мономер, путем воздействия на субстрат одной или нескольких отобранных жидкостей; блок выравнивания для точного выравнивания субстрата относительно печатающей головки при каждом помещении субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для осаждения; и не включает обрабатывающий транспорт для перемещения субстрата между печатающей головкой и проточной кюветой для обработки в проточной кювете, при этом указанный обрабатывающий транспорт и указанный сканирующий транспорт представляют собой разные элементы.

В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к автоматизированной системе, содержащей: струйную печатающую головку для распыления на субстрат микрокапли, содержащей химические вещества; сканирующий транспорт для получения изображения субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для селективного осаждения микрокапли в определенных участках; проточную кювету для обработки субстрата, на который осаждена микрокапля путем воздействия на субстрат одной или нескольких отобранных жидкостей; и блок выравнивания для точного выравнивания субстрата относительно печатающей головки при каждом помещении субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для осаждения; и при этом система НЕ содержит обрабатывающий транспорт для перемещения субстрата между печатающей головкой и проточной ячейкой для обработки проточной ячейки.

**Включение путем отсылки**

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в данном описании, включены здесь путем отсылки в том же самом объеме, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная путем отсылки.

**Краткое описание чертежей**

Новые признаки изобретения представлены более подробно в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к следующему подробному описанию с

иллюстративными вариантами, в которых использованы принципы изобретения, и сопровождающим чертежам, в которых:

На фигуре 1 показана иллюстративная схема, описывающая процесс синтеза генов и нанореакторные технологии. На фигуре 1A показана иллюстративная схема, описывающая процесс олигонуклетидного синтеза на субстрате с использованием струйного принтера; на фигуре 1B показана иллюстративная схема, описывающая процесс амплификации генов в выделенной замкнутой полости или нанореакторе. На фигуре 1C показано иллюстративное использование множества пластин, которые обеспечивают параллельное проведение микрожидкостных реакций для олигонуклеотидного синтеза и сборки генов.

На Фигурах 2 A-C показана блок-схема, описывающая технологический процесс. Клонирование синтезированных генов может быть пропущено (фигура 2B). На фигуре 2C синтезированные гены клонированы перед отгрузкой (фигура 2C).

На фигуре 3 показано схематическое изображение системы для олигонуклеотидного синтеза, которая включает принтер, например струйный принтер, для осаждения реагентов, субстрат (пластину), схематическое изображение выравнивания элементов системы во множестве направлений, и иллюстративные направления движения потоков реагентов.

На фигуре 4 показан иллюстративный дизайн микроструктур, встроенных в субстрат (пластинчатый реактор для синтеза олигонуклеотидов).

На фигуре 5 показано схематическое изображение иллюстративного процесса осаждения реагентов на микроструктуры, показанные на фигуре 4. Выбранная площадь для функционализирования поверхности обеспечивает затекание реагентов в малые функционализированные лунки во влажных условиях.

На фигуре 6A показаны схематические изображения, дополнительно иллюстрирующие микроструктуры, показанные на фигуре 4. На фигуре 6B показаны схематические изображения различных альтернативных дизайнов микроструктур. На фигуре 6C показана схема расположения микроструктур на субстрате (пластине).

На фигуре 7 показана иллюстративная схема расположения колпачков реакторов на прикрывающем элементе.

На Фигуре 8 показана схема иллюстративного технологического процесса синтеза генов до отгрузки.

На фигуре 9A показаны изображения иллюстративной проточной кюветы с открытой или закрытой крышкой. На фигуре 9B показан вид в поперечном разрезе иллюстративной проточной кюветы и блок сборника отходов. На фигуре 9C показан

увеличенный вид в поперечном разрезе иллюстративной проточной кюветы и блока сборника отходов.

На фигуре 10A показан пример вакуумного держателя, имеющего одну 1-5 мм канавку диаметром 198 мм. На фигуре 10B показана металлокерамическая вставка между субстратом (пластиной) и вакуумным держателем, и необязательный терморегулирующий элемент, встроенный в приемный элемент. На фигуре 10C показан вид в поперечном сечении вакуумного держателя с одной канавкой, представленного на фигуре 10A.

На фигуре 11 показано иллюстративное применение стандартной форсфорамидитной химии для олигонуклеотидного синтеза.

На фигуре 12 показано иллюстративное применение полимеразной цепной сборки (PCA).

На фигуре 13 показаны схемы, демонстрирующие преимущество использования более длинных олигонуклеотидов (например, около 300 bp) в сравнении с более короткими олигонуклеотидами (например, около 50 kb). Более длинные олигонуклеотиды можно использовать для сборки генных продуктов с меньшим количеством ошибок.

На фигуре 14 показаны схемы, демонстрирующие иллюстративное комбинированное применение методов PCA и Gibson для сборки олигонуклеотидов в генные продукты.

На фигуре 15 показана схема, демонстрирующая способ исправления ошибок, особенно подходящий для применения к продуктам синтеза генов с более высокой частотой ошибок.

На фигуре 16 показана схема, демонстрирующая способ исправления ошибок, особенно подходящий для применения к продуктам синтеза генов с более низкой частотой ошибок.

На фигуре 17 показана схема, демонстрирующая использование замыкающих кольцо зондов для процессов генерирования молекулярно баркодированных библиотек для секвенирования и контроля качества (QC), включая секвенирование следующего поколения (NGS).

На фигуре 18 показан пример блока струйного устройства с 10 струйными печатающими головками, которые содержат кремниевые пластины с 256 соплами на 254 мкм центрах и высотой струи 100 мкм.

На фигуре 19 показан пример компьютерной системы, которую можно использовать в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фигуре 20 показана блок-схема, иллюстрирующая первый пример архитектуры компьютерной системы 2000, которую можно использовать в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фигуре 21 показана схема, демонстрирующая сеть 2100, выполненную с возможностью подключения множества компьютерных систем, множества мобильных телефонов и карманных компьютеров, и сетевое устройство хранения данных (Network Attached Storage, NAS), которую можно использовать в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фигуре 22 показана блок-схема многопроцессорной вычислительной системы 2200, с совместно используемой памятью, которую можно использовать в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения.

На фигуре 23 показана схема, демонстрирующая иллюстративные стадии, составляющие предварительную обработку для изготовления микроструктур на субстрате (например, кремниевой пластине).

На фигуре 24 показана схема, демонстрирующая иллюстративные стадии, составляющие окончательную обработку для функционализирования поверхностей микроструктур на субстрате (например, кремниевой пластине).

На фигурах 25 A-C показаны различные виды кластера, содержащего высокую плотность группировок. На фигурах 25 D-E показаны различные схематические изображения микрожидкостного устройства, содержащего по существу плоскую часть субстрата. На фигуре 25F показан вид микрожидкостного устройства со стороны рабочего тонкого слоя, содержащего по существу плоскую часть субстрата, содержащую 108 реакционных лунок и указанную область для метки. На фигуре 25G показан вид со стороны рабочего тонкого слоя кластера, содержащего 109 группировок.

На фигуре 26A показан вид в поперечном разрезе нанореактора, при этом показан ряд, содержащий 11 лунок. На фигуре 26B показан вид нанореактора, содержащего 108 приподнятых лунок, со стороны рабочего тонкого слоя. Деталь F представляет детальное изображение одной лунки нанореактора. На фигуре 26C показано изображение нанореактора под углом со стороны рабочего тонкого слоя, показанного на фигуре 26B. На фигуре 26D показано изображение нанореактора со стороны несущего толстого слоя. Деталь H представляет детальное изображение отметки совмещения на стороне несущего толстого слоя нанореактора. На фигуре 26E показано изображение нанореактора, содержащего 108 лунок и метку, со стороны рабочего тонкого слоя,.

На фигуре 27 показаны подробно конструкционные элементы иллюстративного устройства олигонуклеотидного синтеза, которое является избирательно функционализированным.

На фигуре 28 показана схема технологического процесс предварительной обработки для иллюстративного устройства, показанного на фигуре 15.

На фигуре 29 показана иллюстративная базовая последовательность процесса окончательного изготовления иллюстративного устройства олигонуклеотидного синтеза, показанного на фигуре 15, для избирательного функционализирования.

На фигуре 30 показана функционализированная поверхность с контролируемой плотностью активных групп для синтеза нуклеиновой кислоты.

На фигуре 31 показано изображение устройства, изготовленного в соответствии со способами, описанными здесь.

На фигуре 32 показаны элементы конструкции иллюстративного нанореакторного устройства.

На фигуре 33 показана иллюстративная базовая последовательность процесса предварительного изготовления иллюстративного устройства, описанного на фигуре 20.

На фигуре 34 показана иллюстративная базовая последовательность процесса окончательного изготовления иллюстративного нанореакторного устройства, показанного на фигуре 20, для функционализирования.

На фигуре 35 показаны нанолунки в нанореакторном устройстве, изготовленном, как описано здесь. На фигуре 35B показано увеличенное изображение нанолунок, представленных на фигуре 35A.

На фигурах 36A-F показаны различные конфигурации для избирательного функционализирования. На каждой фигуре светлой штриховой линией обозначена активная поверхность, и темной линией обозначена пассивная поверхность.

На фигуре 36A показана однородно функционализированная поверхность. На фигуре 36B-F показаны избирательно функционализированные поверхности в различных конфигурациях.

На фигурах 37A-F показана последовательность процесса функционализирования устройства.

На фигуре 38 показан пример нанесения резиста, когда резист проникает в малые структуры и останавливается острыми краями.

На фигурах 39A-B показано использование подлежащих структур для остановки или капиллярного затекания резиста в иллюстративном варианте осуществления.

На фигурах 40A-C показаны рисунки резиста после процесса литографии в иллюстративной конфигурации избирательного функционализирования. На фигуре 40A показан вид рисунка резиста после процесса литографии в светлом поле. На фигуре 40B показан вид рисунка резиста после процесса литографии в темном поле. На фигуре 40C показано схематическое изображение в поперечном сечении рисунка резиста после процесса литографии.

На фигурах 41A-C показаны рисунки резиста после процесса литографии в другой иллюстративной конфигурации избирательного функционализирования. На фигуре 41A показан вид рисунка резиста после процесса литографии в светлом поле. На фигуре 41B показан вид рисунка резиста после процесса литографии в темном поле. На фигуре 41C показано схематическое изображение в поперечном разрезе рисунка резиста после процесса литографии.

На фигуре 42A-C показано снятие резиста после функционализирования фторсиланом. На фигуре 42A показан вид в светлом поле. На фигуре 42B показан вид в темном поле. На фигуре 42C показано схематическое изображение в поперечном сечении.

На фигуре 43A-C показано иллюстративное устройство олигонуклеотидного синтеза («Keratin chip»), полностью нагруженное DMSO. На фигуре 43A показан вид «Keratin chip» в светлом поле, полностью нагруженного DMSO. Указаны гидрофильные и гидрофобные области. На фигуре 43B показан вид «Keratin chip» в темном поле, полностью нагруженного DMSO. На фигуре 43C показано схематическое изображение в поперечном разрезе «Keratin chip», полностью нагруженного DMSO, с указанием спонтанного смачивания «револьверов».

На фигурах 44A-F показана иллюстративная последовательность процесса для конфигурации 6, показанной на фигуре 36.

На фигурах 45A-B показана конфигурация точечного отбора проб из устройства олигонуклеотидного синтеза (A) и соответствующие данные биоанализатора BioAnalyzer (B) для каждой из пяти проб на фигуре 45A.

На фигуре 46 показаны данные BioAnalyzer экстрагированных с поверхности 100-mer олигонуклеотидов, синтезированных на кремниевом устройстве олигонуклеотидного синтеза.

На фигуре 47 представлены данные BioAnalyzer экстрагированных с поверхности 100-mer олигонуклеотидов, синтезированных на кремниевом устройстве олигонуклеотидного синтеза после PCR-амплификации.

На фигуре 48 показано выравнивание последовательностей для образцов, взятых из пробы 8, где «x» обозначает делецию одного основания, «звездочка» обозначает мутацию одного основания и «+» обозначает пробы низкого качества в секвенировании по Сенгеру.

На фигуре 49 показано выравнивание последовательностей для образцов, взятых из пробы 7, где «x» обозначает делецию одного основания, «звездочка» обозначает мутацию одного основания и «+» обозначает пробы низкого качества в секвенировании по Сенгеру.

На фигуре 50A-B представлены результаты BioAnalzyer для 100-mer олигонуклеотида, синтезированного на трехмерном устройстве олигонуклеотидного синтеза после экстракции (A) и после PCR-амплификации (B).

На фигуре 51 представлена карта выравнивания для PCR-амплифицированного образца 100-mer олигонуклеотида, который был синтезирован на 3D олигонуклеотидном устройстве.

На фигуре 52 представлены результаты исправления ошибок посредством применения двух циклов исправления ошибок с использованием CorrectASE.

На фигуре 53A-C показан рисунок функционализирования поверхности в иллюстративной конфигурации избирательного функционализирования после функционализирования. На фигуре 53A показан вид в светлом поле. На фигуре 53B показан вид в темном поле. На фигуре 53C показано схематическое изображение в поперечном сечении рисунка функционализирования поверхности и растекание водной жидкости с избеганием гидрофобных областей.

На фигуре 54 показана иллюстративная схема функционализирования нанореакторного устройства. После очистки следует осаждение резиста, функционализирование и в заключение удаление резиста.

На фигуре 55 показаны результаты BioAnalyzer для ряда олигонуклеотидов, перенесенных в индивидуальные лунки нанореактора из устройства олигонуклеотидного синтеза согласно методу блоттинга. На фигурах 56A-B показаны альтернативные дизайны проточной кюветы.

На фигуре 56A показан дизайн линии подачи/линии стекания для проточной кюветы.

На фигуре 56B показан дизайн точки подачи/точки стекания для проточной кюветы.

На фигуре 57 показано устройство олигонуклеотидного синтеза и устройство нанореактора, установленные в конфигурации с зазором 50 мкм. В иллюстративном варианте осуществления устройства устанавливают в этой конфигурации в течение 10 минут.

На фигуре 58A-B показано перераспределение олигонуклеотидов во времени, без привязки к теории, путем диффузии из устройства олигонуклеотидного синтеза в устройство нанореактора.

На фигуре 58A показаны олигонуклеотиды, концентрированные в жидкости в каналах «револьверов», и незначительное количество или отсутствие олигонуклеотидов в камере нанореактора. На фигуре 58B схематически изображены олигонуклеотиды, равномерно распределенные в жидкости в камерах «револьверов» и в камере нанореактора в более поздний момент времени относительно фигуры 58A.

На фигуре 59 показаны виды массива лунок нанореакторов, используемых для сборки генов до и после PCA-реакции.

На фигуре 60A-C показаны результаты сборки гена в различных лунках устройства нанореактора. На фигуре 60A показано устройство, в котором были синтезированы олигонуклеотиды. Лунки 1-10 выделены. На фигуре 60B показан анализ генов, собранных в лунках, показанных на фигуре 60A. Пики, соответствующие гену в каждой лунке, отмечены номером лунки. На фигуре 60C показан электрофорез олигонуклеотидов, подвергнутых анализу, как показано на фигуре 60B.

На фигурах 61A-B показаны виды блоков высокопроизводительного устройства олигонуклеотидного синтеза, в соответствии с настоящим изобретением. На фигуре 61A представлен общий вид под углом блока, описанного здесь. На фигуре 61B представлен вид под углом поперечного среза блока, описанного здесь.

На фигуре 62 показан вид блока другого высокопроизводительного устройства олигонуклеотидного синтеза в соответствии с настоящим изобретением, имеющего массив приподнятых элементов на своей поверхности, которые увеличивают площаль поверхности.

На фигуре 63 показан электрофорез амплифицированных одноцепочечных нуклеиновых кислот с использованием амплификации по типу катящегося кольца, при этом продукт амплификации разрезается с помощью различных комбинаций расщепляющих агентов.

На фигурах 64A-F показан метод амплификации одноцепочечных нуклеиновых кислот.

На фигурах 65A-F показан метод амплификации одноцепочечных нуклеиновых кислот, который можно сочетать с методом, показанным на фигуре 64.

**Подробное описание изобретения**

По всему данному описанию различные аспекты настоящего изобретения могут быть представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона представлено просто для удобства и краткости и не должно рассматриваться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, описание в формате диапазона конкретно раскрывает все возможные поддиапазоны так же, как отдельные числовые обозначения в пределах этого диапазона до десятых долей единицы нижнего предела, если контекст ясно не указывает на иное. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, должно рассматриваться как определенное описание поддиапазонов, таких как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и т.д., а также как отдельные числовые значения в рамках заданного диапазона, например, 1,1, 2, 2,3, 5 и 5,9. Данное правило применимо вне зависимости от ширины диапазона. Верхние и нижние пределы этих более узких диапазонов могут быть независимо включены в более узкие диапазоны, и также являются охваченными изобретением, за исключением любого конкретного исключенного предела в установленном диапазоне. Если установленный диапазон включает один или оба предела, то диапазоны, исключающие какой-либо из этих включенных пределов или оба таких предела, также являются охваченными изобретением, если контекст ясно не указывает на иное.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает библиотеку генов, как описано здесь. Библиотека генов содержит коллекцию генов. В некоторых вариантах осуществления коллекция содержит по меньшей мере 100 различных предварительно отобранных синтетических генов, которые могут иметь длину по меньшей мере 0,5 kb (тысяча пар нуклеотидов) с частотой ошибок менее 1 в 3000 bp (пар оснований) по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также библиотеку генов, которая содержит коллекцию генов. Коллекция может содержать по меньшей мере 100 различных предварительно отобранных синтетических генов, каждый из которых может иметь длину по меньшей мере 0,5 kb. По меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов могут иметь частоту ошибок менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. Желательные предварительно определенные последовательности могут поставляться любым способом, как правило, пользователем, например, пользователем, вводящим данные с использованием компьютерной системы. В различных вариантах осуществления синтезированные нуклеиновые кислоты сравнивают с этими предварительно определенными последовательностями, в некоторых случаях путем секвенирования по

меньшей мере части синтезированных нуклеиновых кислот, например, с использованием методов секвенирования следующего поколения. В некоторых вариантах осуществления, относящихся к любой из библиотек генов, описанных здесь, по меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов содержат частоту ошибок менее 1 в 5000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,05% предварительно отобранных синтетических генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,5% предварительно отобранных синтетических генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов содержат частоту ошибок менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% предварительно отобранных синтетических генов не содержат ошибок или по существу не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют частоту делеций менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют частоту вставок менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют частоту замен менее 1 в 3000 bp по сравнению с предварительно определенными последовательностями, содержащими гены. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 10 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 100 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 1000 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 1000000 копий каждого синтетического гена. В некоторых вариантах осуществления коллекция генов, описанная здесь, содержит по меньшей мере 500 генов. В некоторых вариантах осуществления коллекция содержит по меньшей мере 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления коллекция содержит по меньшей мере 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют длину по меньшей мере 1 kb. В некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют длину по меньшей мере 2 kb. В

некоторых вариантах осуществления предварительно отобранные синтетические гены имеют длину по меньшей мере 3 kb. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенные последовательности дополнительно содержат менее чем 20 bp по сравнению с предварительно отобранными синтетическими генами. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенные последовательности дополнительно содержат менее чем 15 bp по сравнению с предварительно отобранными синтетическими генами. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один синтетический ген отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 0,1%. В некоторых вариантах осуществления каждый из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 0,1%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 10%. В некоторых вариантах осуществления каждый из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 10%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 2 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления каждый из синтетических генов отличается от любого другого синтетического гена по меньшей мере на 2 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, дополнительно содержит синтетические гены, имеющие длину менее чем 2 kb с частотой ошибок менее 1 в 20000 bp по сравнению с предварительно отобранными последовательностями генов. В некоторых вариантах осуществления поднабор подлежащих доставке генов является ковалентно связанным. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор коллекции генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов, описанная здесь, кроме того, предусматривает отбор одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым коллекцию генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор коллекции генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов находится в пространстве, которое составляет менее 100 $м^3$. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов находится в пространстве, которое составляет менее 1 $м^3$. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов находится в пространстве, которое составляет менее 1 $м^3$.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ конструирования библиотеки генов. Способ включает следующие стадии: введение перед первой временной точкой в считываемый компьютером невременный носитель по меньшей мере первого списка генов и второго списка генов, при этом гены имеют длину по меньшей мере 500 bp и при объединении в общий список указанный список содержит по меньшей мере 100 генов; синтез более 90% из генов в общем списке перед второй временной точкой, конструируя тем самым библиотеку генов с подлежащими доставке генами. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через месяц после первой временной точки.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как обеспечено здесь, описанный здесь способ дополнительно включает доставку, по меньшей мере, одного гена во второй временной точке. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере, на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена, по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% подлежащих доставке генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления подлежащие доставке гены имеют частоту ошибок менее 1/3000, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в общем списке генов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% подлежащих доставке генов имеют частоту ошибок менее 1 в 3000 bp, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в общем списке генов. В некоторых вариантах осуществления гены в поднаборе подлежащих доставке генов являются ковалентно связанными. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор общего списка генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления любой из способов конструирования библиотеки генов, описанной здесь, дополнительно включает отбор

одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым первый, второй или общий список генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор общего списка генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одни или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления общий список генов содержит, по меньшей мере, 500 генов. В некоторых вариантах осуществления общий список генов содержит, по меньшей мере, 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления общий список генов содержит, по меньшей мере, 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления гены могут иметь длину, по меньшей мере, 1 kb. В некоторых вариантах осуществления гены могут иметь длину, по меьшей мере, 2 kb. В некоторых вариантах осуществления гены могут иметь длину, по меньшей мере, 3 kb. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 25 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 5 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 2 дня после первой временной точки. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте в настоящем документе обеспечен способ конструирования библиотеки генов. Способ включает следующие стадии: введение в первой временной точке в считываемый компьютером невременный носитель списка генов; синтез более 90% из списка генов, конструируя тем самым библиотеку генов с подлежащими доставке генами; и доставку подлежащих доставке генов во второй временной точке. В некоторых вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 100 генов, и гены могут иметь длину по меньшей мере 500 bp. В еще некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через месяц после первой временной точки.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления способ, как описано здесь, дополнительно включает доставку по меньшей мере одного гена во второй временной точке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10%

в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% подлежащих доставке генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления подлежащие доставке гены имеют частоту ошибок менее 1/3000, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в списке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% подлежащих доставке генов имеют частоту ошибок менее 1 в 3000 bp, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности в гене в списке генов. В некоторых вариантах осуществления гены в поднаборе подлежащих доставке генов являются ковалентно связанными. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор списка генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления способ конструирования библиотеки генов дополнительно включает отбор одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым список генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор списка генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления список генов содержит, по меньшей мере, 500 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит, по меньшей мере, 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит, по меньшей мере, 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину 1 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину, по меньшей мере, 2 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину, по меньшей мере, 3 kb. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка, как описано в способах конструирования библиотеки генов, наступает менее чем через 25 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая

временная точка наступает менее чем через 5 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 2 дня после первой временной точки. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате. Способ включает a) обеспечение субстрата с выделенными локусами, которые функционализированы химическим фрагментом, подходящим для связывания нуклеотидов; и b) связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 12 нуклеотидов в час в соответствии с локус-специфической предварительно определенной последовательностью, синтезируя тем самым множество олигонуклеотидов длиной в n пар оснований. В настоящем документе описаны различные варианты осуществления, относящиеся к способу синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате.

В любом из способов синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 15 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 20 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 25 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной последовательности с частотой ошибок менее 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной последовательности с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной

последовательности с частотой ошибок менее 1/2000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/2000 bp.

При практическом осуществлении любого из способов синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как обеспечено здесь, в некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат адениновую, гуаниновую, тиминовую, цитозиновую или уридиновую группу, или модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат динуклеотиды или тринуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат фосфорамидит. В некоторых вариантах осуществления n в n-mer олигонуклеотидах равно по меньшей мере 100. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 200. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 300. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 400. В некоторых вариантах осуществления поверхность содержит по меньшей мере 100000 выделенных локусов, и по меньшей мере два из множества растущих олигонуклеотидов могут отличаться друг от друга.

В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, дополнительно включает вакуумную сушку субстрата перед связыванием. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат блокирующую группу. В некоторых вариантах осуществления блокирующая группа представляет собой неустойчивый к кислоте DMT. В некоторых вариантах осуществления неустойчивый к кислоте DMT представляет собой 4,4'-диметокситритил. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, дополнительно включает окисление или сульфирование. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, дополнительно включает химическое кэппирование несвязанных олигонуклеотидных цепей. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза n-mer

олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, включает удаление блокирующей группы, деблокируя тем самым растущую олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии вакуумной сушки. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии окисления. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии кэппирования. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время стадии связывания находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии деблокирования. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит, по меньшей мере, 10000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит, по меньшей мере, 100000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит, по меньшей мере, 1000000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящего изобретения обеспечена система для выполнения серии параллельных реакций. Система содержит: первую поверхность со множеством выделенных локусов; прикрывающий элемент («capping element») со множеством выделенных колпачков реакторов («reactor caps»). В некоторых вариантах осуществления система выравнивает множество выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на первой поверхности, формируя временное уплотнение между первой поверхностью и прикрывающим элементом, тем самым физически разделяя локусы на первой поверхности на группы, состоящие по меньшей мере из двух локусов на реактор, соединенных с каждым колпачком реактора. В некоторых вариантах осуществления каждый реактор содержит первый набор реагентов.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к любой из систем для выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, при снятии с первой поверхности колпачки реакторов удерживают, по меньшей мере, часть первого набора реагентов. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 30%.

В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 90%. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов расположено на микроструктурах, встроенных в поверхность подложки. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит вторую поверхность со множеством выделенных локусов при плотности по меньшей мере 0,1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит вторую поверхность со множеством выделенных локусов при плотности по меньшей мере 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит вторую поверхность со множеством выделенных локусов при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к любой из систем для выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, выделенные локусы первой поверхности содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы второй поверхности содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с первой или второй поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет

площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов имеют номинальную длину дуги периметра с плотностью по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов имеют номинальную длину дуги периметра с плотности по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов первой поверхности имеют высокоэнергетическую поверхность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая поверхности имеют различное поверхностное натяжение с заданной жидкостью. В некоторых вариантах осуществления высокая поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов расположено на твердом субстрате, изготовленном из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления прикрывающие элементы состоят из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также массив замкнутых полостей. Массив замкнутых полостей включает: множество выделенных реакторов, содержащих первый субстрат и второй субстрат, содержащий колпачки реакторов; по меньшей мере 2 выделенных локуса в каждом реакторе. В некоторых случаях выделенные реакторы отделены съемным уплотнением. В некоторых случаях колпачки реакторов удерживают по меньшей мере часть содержимого реакторов при снятии второго субстрата с первого субстрата. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов на втором субстрате имеют плотность по меньшей мере 0,1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов на втором субстрате имеют плотность по меньшей мере 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов на втором субстрате имеют плотность по меньшей мере 10 на мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к массиву полостей, как описано здесь, колпачки реакторов удерживают по меньшей мере 30% содержимого реакторов. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов удерживают, по меньшей мере, 90% содержимого реакторов. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы находятся при плотности по меньшей мере 2/мм$^2$. В некоторых

вариантах осуществления выделенные локусы находятся при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей дополнительно содержит по меньшей мере 5 выделенных локусов в каждом реакторе. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей, описанных здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 20 выделенных локусов в каждом реакторе. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей, описанных здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 50 выделенных локусов в каждом реакторе. В некоторых вариантах осуществления массив замкнутых полостей, описанных здесь, дополнительно содержит по меньшей мере 100 выделенных локусов в каждом реакторе.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к массиву замкнутых полостей, как описано здесь, выделенные локусы расположены на микроструктурах, встроенных в поверхность подложки. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры имеют номинальную длину дуги периметра по меньшей мере двух каналов, которая имеет плотность по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры имеют номинальную длину дуги периметра по меньшей мере двух каналов, которая имеет плотность по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные реакторы отделены обратимым уплотнением. В некоторых вариантах осуществления уплотнение представляет собой капиллярный клапан («capillary burst valve»).

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к массиву замкнутых полостей, как описано здесь, множество выделенных локусов первого субстрата содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов второго субстрата содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с первой или второй поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит

олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов первого субстрата содержит высокоэнергетическую поверхность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая поверхности имеют различное поверхностное натяжение с заданной жидкостью. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов или колпачков реакторов расположено на твердом субстрате, изготовленном из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ выполнения серии параллельных реакций. Способ включает: (a) обеспечение первой поверхности со множеством выделенных локусов; (b) обеспечение прикрывающего элемента со множеством выделенных колпачков реакторов; (c) выравнивание множества выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на первой поверхности и формирование временного уплотнения между первой поверхностью и прикрывающим элементом, физически разделяя тем самым локусы на первой поверхности на группы, состоящие по меньшей мере из двух локусов; (d) выполнение первой реакции с образованием тем самым первого набора реагентов; и (e) снятие прикрывающего элемента с первой поверхности, при этом каждый колпачок реакторов удерживает по меньшей мере часть первого набора реагентов в первом реакционном объеме. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 30%. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 90%.

В некоторых вариантах осуществления способ выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включает следующие стадии: (f) обеспечение второй поверхности со множеством выделенных локусов; (g) выравнивание множества выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на второй поверхности, и формирование временного уплотнения между второй поверхностью и

прикрывающим элементом, тем самым физически разделяя локусы на второй поверхности; (h) выполнение второй реакции с использованием части первого набора реагентов с образованием тем самым второго набора реагентов; и (i) снятие прикрывающего элемента со второй поверхности, при этом каждый колпачок реакторов может удерживать по меньшей мере часть второго набора реагентов во втором реакционном объеме. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 30%. В некоторых вариантах осуществления указанная часть составляет около 90%.

При практическом осуществлении любого из способов выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, множество выделенных локусов может иметь плотность по меньшей мере 1 на мм$^2$ на первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов может иметь плотность по меньшей мере 10 на мм$^2$ на первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов может иметь плотность по меньшей мере 100 на мм$^2$ на первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов имеет плотность по меньшей мере 0,1 на мм$^2$ на прикрывающем элементе.

В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов имеет плотность по меньшей мере 1 на мм$^2$ на прикрывающем элементе. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов имеет плотность по меньшей мере 10 на мм$^2$ на прикрывающем элементе. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность более 0,1 на мм$^2$ на второй поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность более 1 на мм$^2$ на второй поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность более 10 на мм$^2$ на второй поверхности.

При практическом осуществлении любого из способов выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, стадии снятия прикрывающих элементов с поверхности, такие как стадии снятия, описанные в пунктах (e) и (i), как описано здесь, могут быть выполнены с различной скоростью. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы первой поверхности содержат покрытие из реагентов для первой реакции. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы второй поверхности содержат покрытие из реагентов для второй реакции. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с первой или второй поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности.

В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов имеет площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину по меньшей мере 25 bp. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину по меньшей мере 200 bp. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину по меньшей мере 300 bp. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы первой поверхности имеют высокоэнергетическую поверхность. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая поверхности содержат различное поверхностное натяжение с заданной жидкостью. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 процентов.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способу выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, множество выделенных локусов или выделенных колпачков реакторов расположено на твердом субстрате, изготовленном из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления первый и второй реакционные объемы являются различными. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая реакция включает полимеразную циклическую сборку. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая реакция включает ферментативный синтез генов, отжиг и реакцию лигирования, одновременный синтез двух генов посредством гибридного гена, лигирование методом «дробовика» и колигирование, синтез генов путем вставки, синтез генов посредством одной цепи ДНК, матрично-направленное лигирование, лигазную цепную реакцию, синтез генов с помощью микрочипов, твердофазную сборку, технологию «Sloning building block technology» или синтез генов, опосредованный лигированием РНК. В некоторых вариантах осуществления способы выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включают охлаждение прикрывающего элемента. В некоторых вариантах осуществления способы выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включают охлаждение первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления способы выполнения серии параллельных реакций, как описано здесь, дополнительно включают охлаждение второй поверхности. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает субстрат, имеющий функционализированную поверхность. Субстрат, имеющий функционализированную поверхность, может включать твердую подложку, содержащую множество выделенных локусов. В одном варианте осуществления выделенные локусы функционализированы фрагментом, который повышает поверхностную энергию твердой подложки. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы расположены на микроканалах.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к субстрату, имеющему функционализированную поверхность, как описано здесь, фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления объем микроканала составляет менее 1 нл. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра 0,036 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы из множества выделенных локусов содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с субстратом. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из микроканалов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления твердая подложка изготовлена из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. Следует учесть, любой из

вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность. Способ включает: (a) нанесение посредством по меньшей мере одного струйного насоса по меньшей мере одной капли первого реагента на первый локус из множества локусов; (b) приложение отрицательного давления к субстрату; и (c) нанесение посредством по меньшей мере одного струйного насоса по меньшей мере одной капли второго реагента на первый локус.

При практическом осуществлении любого из способов для синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, первый и второй реагенты могут быть различными. В некоторых вариантах осуществления первый локус функционализирован фрагментом, который повышает его поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления множество локусов расположено на микроструктурах, встроенных в поверхность субстрата. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления поверхность субстрата состоит из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способам синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, объем капли первого и/или второго реагентов составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. В

некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности, по меньшей мере, 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления функционализированная поверхность имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления давление, окружающее субстрат, снижено до менее чем 1 mTorr. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает связывание по меньшей мере первого строительного блока, образовавшегося из первой капли, с растущей олигонуклеотидной цепью на первом локусе. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат блокирующую группу. В некоторых вариантах осуществления блокирующая группа представляет собой неустойчивый к кислоте DMT. В некоторых вариантах осуществления неустойчивый к кислоте DMT представляет собой 4,4'-диметокситритил. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает окисление или сульфирование. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает химическое кэппирование несвязанных олигонуклеотидных цепей. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает удаление блокирующей группы, деблокируя тем самым растущую олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии связывания. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного

давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии окисления. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии кэппирования. В некоторых вариантах осуществления положение субстрата во время приложения отрицательного давления находится на расстоянии 10 см от положения субстрата во время стадии деблокирования. В некоторых вариантах осуществления первый локус расположен на микроструктуре, встроенной в поверхность субстрата. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один реагент для стадии окисления обеспечен путем заполнения микроструктуры раствором, содержащим по меньшей мере один реагент. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один реагент для стадии кэппирования обеспечен путем заполнения микроструктуры раствором, содержащим по меньшей мере один реагент. В некоторых вариантах осуществления первый локус расположен на микроструктуре, встроенной в поверхность субстрата, и по меньшей мере один реагент для стадии деблокирования может быть обеспечен путем заполнения микроструктуры раствором, содержащим по меньшей мере один реагент. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает заключение субстрата в пределах герметичной камеры. В некоторых вариантах осуществления герметичная камера обеспечивает удаление жидкостей из первого локуса. В некоторых вариантах осуществления способ синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, как описано здесь, дополнительно включает стекание жидкости через сливное отверстие, которое оперативно связано с первым локусом. В некоторых вариантах осуществления после приложения отрицательного давления к субстрату содержание влаги на субстрате составляет менее чем 1 ppm. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия повышается, соответствуя углу контакта с водой менее чем 20 градусов. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ осаждения реагентов на множество выделенных локусов. Способ включает нанесение посредством струйного насоса по меньшей мере одной капли первого реагента на первый локус из множества локусов; нанесение посредством струйного насоса по меньшей мере одной капли второго реагента на второй локус из множества выделенных локусов. В некоторых вариантах осуществления второй локус расположен рядом с первым локусом. В еще

некоторых вариантах осуществления первый или второй реагенты являются различными. В еще других вариантах осуществления первый или второй локусы расположены на микроструктурах, встроенных в поверхность подложки. В еще некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере один канал, который имеет глубину более чем 100 мкм.

При практическом осуществлении любого из способов осаждения реагентов на множество выделенных локусов, как описано здесь, в некоторых вариантах осуществления микроструктуры содержат по меньшей мере два канала, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два канала представляют собой два канала различной длины. В некоторых вариантах осуществления первый локус получает менее чем 0,1% второго реагента, и второй локус получает менее чем 0,1% первого реагента. В некоторых вариантах осуществления локусы имеют плотность номинальной длины арки периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления локусы имеют плотность номинальной длины арки периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления первый и второй локусы содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов ковалентно связано с субстратом. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления поверхность подложки состоит из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть

комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает микрожидкостную систему. Микрожидкостная система содержит первую поверхность со множеством микролунок при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$; и каплю внутри одной из множества микролунок. В некоторых вариантах осуществления капля внутри одной из множества микролунок имеет значение числа Рейнольдса в диапазоне около 1-1000. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок находится при плотности по меньшей мере 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок содержится при плотности по меньшей мере 10 на мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к микрожидкостной системе, как описано здесь, микрожидкостная система дополнительно содержит струйный насос. В некоторых вариантах осуществления капля осаждается с помощью струйного насоса. В некоторых вариантах осуществления капля движется в нижнюю половину первой микролунки. В некоторых вариантах осуществления капля движется в среднюю треть первой микролунки. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок находится при плотности по меньшей мере 100 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления объем первой микролунки больше, чем капля. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества микролунок находится в жидкостном взаимодействии по меньшей мере с одним микроканалом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один микроканал покрыт фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой менее чем 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления микролунки сформированы на твердой подложке, изготовленной из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность

номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления капля содержит реагент, который обеспечивает синтез олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой нуклеотид или аналог нуклеотида.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ осаждения капель на множество микролунок. Способ включает нанесение посредством струйного насоса по меньшей мере одной капли на первую микролунку из множества микролунок. В некоторых случаях капля внутри одной из множества микролунок имеет значение числа Рейнольдса в диапазоне около 1-1000. В некоторых вариантах осуществления множество микролунок имеет плотность по меньшей мере 1/мм$^2$. В еще некоторых случаях множество микролунок имеет плотность по меньшей мере 10/мм$^2$.

При практическом осуществлении любого из способов осаждения капель на множество микролунок, как описано здесь, множество микролунок может иметь плотность по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления микролунка имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления каплю наносят со скоростью по меньшей мере 2 м/сек. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет по меньшей мере 2 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет около 40 пл. В некоторых вариантах осуществления объем капли составляет не более 100 пл. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества микролунок находится в жидкостном взаимодействии по меньшей мере с одним микроканалом. В некоторых вариантах

осуществления по меньшей мере одна микролунка покрыта фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия соответствует углу контакта с водой по меньшей мере 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления микролунки сформированы на твердой подложке, изготовленной из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади первой плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления капля внутри микролунки движется в среднюю треть микролунки. В некоторых вариантах осуществления капля внутри микролунки движется в нижнюю половину микролунки. В некоторых вариантах осуществления капля содержит реагент, который обеспечивает синтез олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления реагент представляет собой нуклеотид или аналог нуклеотида. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ разделения. Способ разделения включает приведение в контакт первой поверхности, содержащей жидкость в первом множестве выделенных локусов, со второй поверхностью, содержащей второе множество выделенных локусов; определение скорости высвобождения таким образом, чтобы желательная доля жидкости могла быть перенесена из первого множества выделенных локусов во второе множество выделенных локусов; и отделение второй поверхности от первой поверхности с указанной скоростью. В некоторых вариантах осуществления первая поверхность имеет первое поверхностное натяжение с жидкостью, и вторая поверхность может иметь второе поверхностное натяжение с жидкостью.

При практическом осуществлении любого из способов разделения, как обеспечено здесь, часть первой поверхности может быть покрыта фрагментом, который увеличивает поверхностное натяжение. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления поверхностное натяжение первой поверхности соответствует углу контакта с водой по меньшей мере 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления поверхностное натяжение второй поверхности соответствует углу контакта с водой больше, чем 90 градусов. В некоторых вариантах осуществления первая поверхность состоит из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов имеет плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая фрагментом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов находится при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая поверхность содержит микроканалы, удерживающие по меньшей мере часть жидкости. В некоторых вариантах осуществления первая или вторая поверхность содержит нанореакторы, удерживающие по меньшей мере часть жидкости. В некоторых вариантах осуществления способ разделения, как описано здесь, дополнительно включает приведение в контакт третьей поверхности с третьим множеством выделенных локусов. В некоторых вариантах осуществления жидкость содержит нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления желательная доля составляет более 30%. В некоторых вариантах осуществления желательная доля составляет более 90%. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из

способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ смешивания, как описано здесь. Способ включает: (a) обеспечение первого субстрата, содержащего множество встроенных в него микроструктур; (b) обеспечение второго субстрата, содержащего множество выделенных колпачков реакторов; (c) выравнивание первого и второго субстратов таким образом, чтобы колпачок первого реактора из множества мог получать жидкость из n микроструктур в первом субстрате; и (d) доставку жидкости из n микроструктур в колпачок первого реактора, смешивая тем самым жидкость из n микроструктур с формированием смеси.

При практическом осуществлении любого из способов смешивания, как описано здесь, множество выделенных колпачков реакторов может находиться при плотности по меньшей мере 0,1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов может находиться при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов может находиться при плотности по меньшей мере 10/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества микроструктур может содержать по меньшей мере два канала различной ширины. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину больше, чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет длину меньше, чем 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину больше, чем 50 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов имеет ширину меньше, чем 100 мкм в диаметре. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из каналов покрыт фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой химически инертный агент. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры сформированы на твердой подложке, изготовленной из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, PDMS и стекла. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроканалы имеют плотность номинальной длины дуги периметра по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая агентом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая агентом, имеет номинальную площадь

поверхности по меньшей мере 1,25 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления поверхность, покрытая агентом, имеет номинальную площадь поверхности по меньшей мере 1,45 мкм$^2$ на 1,0 мкм$^2$ площади плоской поверхности первой поверхности. В некоторых вариантах осуществления множество микроструктур содержат покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов коваленто связано с первой поверхностью. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов содержит олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры находятся при плотности по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры находятся при плотности по меньшей мере 100/мм$^2$.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способам смешивания, как описано здесь, после стадии (c), которая представляет собой выравнивание первого и второго субстратов таким образом, чтобы колпачок первого реактора из множества мог получать жидкость из n микроструктур в первом субстрате, имеется зазор размером менее 100 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления после стадии (c) имеется зазор размером менее 50 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления после стадии (c) имеется зазор размером менее 20 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления после стадии (c) имеется зазор размером менее 10 мкм между первым и вторым субстратами. В некоторых вариантах осуществления смесь частично распространяется в зазор. В некоторых вариантах осуществления способ смешивания дополнительно включает герметичное закрытие зазора путем перемещения первого и второго субстратов на более близкое расстояние друг к другу. В некоторых вариантах осуществления один из двух каналов покрыт фрагментом, который повышает поверхностную энергию, соответствующую углу контакта с водой менее 20 градусов. В некоторых вариантах осуществления фрагмент представляет собой химически инертный агент. В некоторых вариантах осуществления доставку осуществляют под давлением. В некоторых вариантах осуществления объем смеси больше, чем объем колпачка реактора. В некоторых вариантах осуществления жидкость содержит нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 10. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 25. В некоторых вариантах осуществления n, число микроструктур, из которых жидкость смешивается с образованием смеси, может составлять по меньшей мере 50. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 75. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 100. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть

комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь. Способ включает: обеспечение субстрата с выделенными локусами, которые функционализированы химическим фрагментом, подходящим для связывания нуклеотидов; и связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов в соответствии с локус-специфической предварительно определенной последовательностью без переноса субстрата между связываниями по меньшей мере двух строительных блоков, синтезируя тем самым множество олигонуклеотидов длиной n пар оснований.

При практическом осуществлении любого из способов синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, способ может дополнительно включать связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 12 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонулкотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 15 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонулкотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 20 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает связывание по меньшей мере двух строительных блоков со множеством растущих олигонулкотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, со скоростью по меньшей мере 25 нуклеотидов в час. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающиеся от локус-специфической предварительно определенной последовательности, с частотой ошибок менее чем 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающихся от локус-специфической предварительно определенной последовательности, с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один выделенный локус содержит n-mer олигонуклеотиды, отличающихся от локус-специфической предварительно определенной последовательности, с частотой ошибок

менее 1/2000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/500 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/1000 bp. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов на субстрате отличается от соответствующих локус-специфических предварительно определенных последовательностей с частотой ошибок менее 1/2000 bp.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способу синтеза n-mer олигонуклеотидов на субстрате, как описано здесь, строительные блоки содержат адениновую, гуаниновую, тиминовую, цитозиновую или уридиновую группу, или модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат динуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат фосфорамидит. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 100. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 200. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 300. В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 400. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 100000 выделенных локусов, и по меньшей мере два из множества растущих олигонуклеотидов отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает вакуумную сушку субстрата перед связыванием. В некоторых вариантах осуществления строительные блоки содержат блокирующую группу. В некоторых вариантах осуществления блокирующая группа представляет собой неустойчивый к кислоте DMT. В некоторых вариантах осуществления неустойчивый к кислоте DMT представляет собой 4,4'-диметокситритил. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает окисление или сульфирование. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает химическое кэппирование несвязанных олигонуклеотидных цепей. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление блокирующей группы, деблокируя тем самым растущую олигонуклеотидную цепь. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 10000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 100000 сквозных межсоединений,

обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 1000000 сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. Следует учесть, любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств, наборов, субстратов или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В еще другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает также способ конструирования библиотеки генов, как описано здесь. Способ включает: введение в первой временной точке в считываемый компьютером невременный носитель списка генов, при этом список содержит по меньшей мере 100 генов и при этом гены имеют длину по меньшей мере 500 bp; синтез более 90% из списка генов, конструируя тем самым библиотеку генов с подлежащими доставке генами; приготовление библиотеки для секвенирования, которая представляет библиотеку генов; получение информации о последовательности; отбор по меньшей мере поднабора подлежащих доставке генов на основе информации от последовательности; и доставку отобранных подлежащих доставке генов во второй временной точке, при этом вторая временная точка наступает менее чем через месяц после первой временной точки.

При практическом осуществлении любого из способов конструирования библиотеки генов, как описано здесь, информация о последовательности может быть получена посредством секвенирования следующего поколения. Информация о последовательности может быть получена путем секвенирования по Сенгеру. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку по меньшей мере одного гена во второй временной точке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 0,1% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 10% в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления каждый из генов отличается от любого другого гена по меньшей мере на 2 пары оснований в библиотеке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90%

подлежащих доставке генов не содержат ошибок. В некоторых вариантах осуществления подлежащие доставке гены содержат частоту ошибок менее 1/3000, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в списке генов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% подлежащих доставке генов содержат частоту ошибок менее 1 в 3000 bp, что приводит к генерированию последовательности, которая отличается от последовательности гена в списке генов. В некоторых вариантах осуществления гены в поднаборе подлежащих доставке генов ковалентно связаны друг с другом. В некоторых вариантах осуществления первый поднабор списка генов кодирует компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает отбор одного или нескольких конечных продуктов метаболизма, конструируя тем самым список генов. В некоторых вариантах осуществления один или несколько конечных продуктов метаболизма содержат биотопливо. В некоторых вариантах осуществления второй поднабор списка генов кодирует компоненты второго метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В некоторых вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 500 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 5000 генов. В некоторых вариантах осуществления список содержит по меньшей мере 10000 генов. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину по меньшей мере 1 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину по меньшей мере 2 kb. В некоторых вариантах осуществления гены имеют длину по меньшей мере 3 kb. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 25 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 5 дней после первой временной точки. В некоторых вариантах осуществления вторая временная точка наступает менее чем через 2 дня после первой временной точки. Следует учесть, что любой из вариантов осуществления, описанных здесь, может быть комбинирован с любым из способов, устройств или систем, обеспеченных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предлагается микрожидкостное устройство для синтеза нуклеиновой кислоты, содержащее субстрат с по существу плоской частью, содержащей n группировок m микрожидкостных соединений между противоположными поверхностями, при этом каждое из n*m микрожидкостных соединений содержит первый канал и второй канал, и при этом первый канал в пределах каждой из n группировок является общим для всех m микрожидкостных соединений, при этом множество микрожидкостных соединений охватывают по существу

плоскую часть субстрата вдоль наименьшего размера субстрата, и при этом n и m равны по меньшей мере 2. В некоторых вариантах осуществления второй канал функционализирован покрытием, которое может содействовать прикреплению олигонуклеотида к устройству. В некоторых вариантах осуществления устройство дополнительно содержит первый олигонуклеотид, который прикреплен ко вторым каналам в k из n группировок. В некоторых вариантах осуществления k равно 1. В некоторых вариантах осуществления устройство дополнительно содержит второй олигонуклеотид, который прикреплен к l из n группировок. В некоторых вариантах осуществления l равно 1. В некоторых вариантах осуществления ни одна из группировок в l группировках не находится в k группировках.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид имеет длину по меньшей мере 10 нуклеотидов, 25 нуклеотидов, 25 нуклеотидов, 50 нуклеотидов, 75 нуклеотидов, 100 нуклеотидов, 125 нуклеотидов, 150 нуклеотидов или 200 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления первый и второй олигонуклеотиды различаются по меньшей мере на 2 нуклеотида, 3 нуклеотида, 4 нуклеотида, 5 нуклеотидов или 10 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления n*m микрожидкостных соединений имеют длину не более 5 мм, 1,5 мм, 1,0 мм или 0,5 мм. В некоторых вариантах осуществления первый канал в пределах каждой из n группировок имеет длину не более 5 мм, 1,5 мм, 1,0 мм или 0,5 мм. В некоторых вариантах осуществления первый канал в пределах каждой из n группировок имеет длину по меньшей мере 0,05 мм, 0,75 мм, 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм или 0,4 мм. В некоторых вариантах осуществления второй канал в каждом из n*m микрожидкостных соединений имеет длину не более 0,2 мм, 0,1 мм, 0,05 мм, 0,04 мм или 0,03 мм. В некоторых вариантах осуществления второй канал в каждом из n*m микрожидкостных соединений имеет длину по меньшей мере 0,001 мм, 0,005 мм, 0,01 мм, 0,02 мм или 0,03 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения первого канала в пределах каждой из n группировок составляет по меньшей мере 0,01 мм, 0,025 мм, 0,05 мм или 0,075 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения первого канала в пределах каждой из n группировок составляет не более 1 мм, 0,5 мм, 0,25 мм, 0,1 мм или 0,075 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения второго канала в каждом из n*m микрожидкостных соединений составляет по меньшей мере 0,001 мм, 0,05 мм, 0,01 мм, 0,015 мм или 0,02 мм. В некоторых вариантах осуществления размер поперечного сечения второго канала в каждом из n*m микрожидкостных соединений составляет не более 0,25 мм, 0,125 мм, 0,050 мм, 0,025 мм, 0,02 мм. В некоторых вариантах осуществления стандартное

отклонение размера поперечного сечения вторых каналов в каждом из n*m микрожидкостных соединений составляет менее 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1% от среднего размера поперечного сечения. В некоторых вариантах осуществления отклонение размера поперечного сечения в пределах по меньшей мере 90% вторых каналов n*m микрожидкостных соединений составляет не более 25%, 20%, 15%, 10%, 5% или 1%.

В некоторых вариантах осуществления n равно по меньшей мере 10, 25, 50, 100, 1000 или 10000. В некоторых вариантах осуществления m равно по меньшей мере 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления субстрат содержит по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 80%, 90%, 95% или 99% кремния.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% вторых каналов n*m микрожидкостных соединений функционализировано фрагментом, который повышает поверхностную энергию. В некоторых вариантах осуществления поверхностная энергия увеличена до уровня, соответствующего углу контакта с водой менее 75, 50, 30 или 20 градусов.

В некоторых вариантах осуществления соотношение размеров по меньшей мере для 90% вторых каналов n*m микрожидкостных соединений равно менее чем 1, 0,5 или 0,3. В некоторых вариантах осуществления соотношение размеров по меньшей мере для 90% первых каналов в n группировках равно менее чем 0,5, 0,3 или 0,2.

В некоторых вариантах осуществления общая длина по меньшей мере 10%, 25%, 50%, 75%, 90% или 95% n*m микрожидкостных соединений находится в пределах 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% или 1000% наименьшего размера по существу плоского субстрата.

В некоторых вариантах осуществления по существу плоская часть устройства изготовлена из пластины SOI.

В другом аспекте изобретение относится к способу амплификации нуклеиновой кислоты, включающему: (a) обеспечение образца, содержащего n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит различную целевую последовательность; (b) обеспечение первого адаптера, который поддается гибридизации по меньшей мере с одной последовательностью для гибридизации с адаптером, на m из n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения первого адаптера с использованием m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот в качестве матрицы, генерируя тем самым m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом каждый из m

продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) содержит множество копий целевой последовательности из ее матрицы; (d) обеспечение первого вспомогательного олигонуклеотида, который поддается гибридизации с первым адаптером; и (e) обеспечение первого агента в условиях, подходящих для разрезания первым агентом m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) на множестве участков разрезания, генерируя тем самым множество одноцепочечных копий целевых последовательностей в m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления n или m равно по меньшей мере 2. В некоторых вариантах осуществления n или m равно по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 или 500. В некоторых вариантах осуществления m меньше, чем n. В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, образован путем обеспечения по меньшей мере n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит одну из различных целевых последовательностей, и замыкания в кольцо n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот, генерируя тем самым n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления первый адаптер поддается гибридизации одновременно с обоими концами n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления различные целевые последовательности в n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислотах фланкированы последовательностью для гибридизации с первым и вторым адаптером. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот генерированы путем синтеза олигонуклеотидов de novo. В некоторых вариантах осуществления последовательность для гибридизации с первым адаптером в каждой из n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот отличается не более чем на два нуклеотидных основания. В некоторых вариантах осуществления последовательность для гибридизации с первым или вторым адаптером имеет длину по меньшей мере 5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность для гибридизации с первым или вторым адаптером имеет длину не более 75, 50, 45, 40, 35, 30 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления концы n линейных одноцепочечных нуклеиновых кислот образуют пару с соседними основаниями на первом адаптере, когда первый адаптер одновременно гибридизирован с обоими концами линейной одноцепочечной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления множество сайтов разрезания расположено таким образом, что последовательность для гибридизации с адаптером отрезается по меньшей мере от 5% остальной части последовательности m копий кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот. В

некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% последовательности m копий кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, отличных по меньшей мере от одной последовательности для гибридизации с адаптером, остается неразрезанным. В некоторых вариантах осуществления множество сайтов разрезания расположено снаружи по меньшей мере одной последовательности для гибридизации с адаптером. В некоторых вариантах осуществления положение множества сайтов разрезания не зависит от целевых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления положение множества сайтов разрезания определяется по меньшей мере одним элементом последовательности в пределах последовательности первого адаптера или первого вспомогательного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления элемент последовательности содержит сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции. В некоторых вариантах осуществления первый вспомогательный олигонуклеотид или первый олигонуклеотидный адаптер содержит сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции IIS-типа. В некоторых вариантах осуществления сайты узнавания расположены на расстоянии по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов от сайтов разрезания. В некоторых вариантах осуществления множество сайтов разрезания расположено в точках соединения одноцепочечной и двухцепочечной нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечных нуклеиновые кислоты содержат первый адаптер и первый вспомогательный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные нуклеиновые кислоты состоят в основном из m различных целевых последовательностей. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 95% сходством между двумя последовательностями. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 90% сходством между двумя последовательностями. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 80% сходством между двумя последовательностями. В некоторых вариантах осуществления m различных целевых последовательностей обладают не более 50% сходством между двумя последовательностями. В некоторых вариантах осуществления генерирование m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) включает амплификацию с замещением цепи. В некоторых вариантах осуществления первый вспомогательный олигонуклеотид содержит аффинную метку. В некоторых вариантах осуществления аффинная метка представляет собой биотин или производное биотина. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение двухцепочечных нуклеиновых кислот из образца. В некоторых вариантах осуществления

выделение включает аффинную очистку, хроматографию или очистку из геля. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит эндонуклеазу рестрикции. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит по меньшей мере две эндонуклеазы рестрикции. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит эндонуклеазу рестрикции IIS-типа. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит никующую эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит, по меньшей мере, две никующих эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления первый агент содержит по меньшей мере один фермент, выбранный из группы, состоящей из MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI и Nt.BspQI, и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления первый агент обладает по существу такой же функцией, узнает такие же или по существу такие же последовательности узнавания, или разрезает такие же или по существу такие же сайты разрезания, как любой из перечисленных первых агентов и вариантов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два фермента рестрикции представляют собой MlyI и BciVI или BfuCI и MlyI. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает (a) разделение образца на множество фракций; (b) обеспечение по меньшей мере одной фракции вторым адаптером, который поддается гибридизации по меньшей мере с одной последовательностью для гибридизации с адаптером на k из n различных кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения второго адаптера с использованием k кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот в качестве мастрицы, генерируя тем самым k одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом второй одноцепочечный продукт амплификации нуклеиновых кислот (ампликон) содержит множество копий целевой последовательности из ее матрицы; (d) обеспечение второго вспомогательного олигонуклеотида, который поддается гибридизации со вторым адаптером; и (e) обеспечение второго агента в условиях, подходящих для разрезания агентом k одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов)

на втором множестве сайтов разрезания, генерируя тем самым множество одноцепочечных копий целевых последовательностей в k кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления первый и второй адаптеры являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый и второй вспомогательные олигонуклеотиды являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления первый и второй агенты являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления k + m равно меньше, чем n. В некоторых вариантах осуществления k равно по меньшей мере 2. В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, образован путем амплификации одноцепочечной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления амплификация одноцепочечной нуклеиновой кислоты включает: (a) обеспечение образца, содержащего по меньшей мере m предшественников кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (b) обеспечение предшественника первого адаптера, который поддается гибридизации с m предшественниками кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения предшественника первого адаптера с использованием m предшественников кольцевых одноцепопчечных нуклеиновых кислот в качестве матрицы, генерируя тем самым m предшественников одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом одноцепочечный продукт амплификации нуклеиновых кислот (ампликон) содержит множество копий m предшественников кольцевой одноцепочечной нуклеиновой кислоты; (d) обеспечение предшественника первого вспомогательного олигонуклеотида, который поддается гибридизации с предшественником первого адаптера; и (e) обеспечение предшественника первого агента в условиях, подходящих для разрезания предшественником первого агента предшественника первого одноцепочечного продукта амплификации нуклеиновых кислот (ампликона) на множестве сайтов разрезания, генерируя тем самым m предшественников линейных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает замыкание в кольцо m предшественников линейных нуклеиновых кислот, формируя тем самым копии m предшественников кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления m предшественников кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот амплифицировано по меньшей мере в 10, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 10000 или более раз в одноцепочечных копиях. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот содержится при концентрации около или не более чем около 100 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 50 пМ, 1 пМ, 100 фМ, 10 фМ, 1 фМ или менее. В некоторых вариантах осуществления

замыкание в кольцо включает лигирование. В некоторых вариантах осуществления лигирование включает использование лигазы, выбранной из группы, состоящей из T4 ДНК-лигазы, T3 ДНК-лигазы, T7 ДНК-лигазы, e.coli ДНК-лигазы, Taq ДНК-лигазы и 9N ДНК-лигазы.

В еще другом аспекте изобретение в различных вариантах осуществления относится к набору, содержащему: (a) первый адаптер; (b) первый вспомогательный олигонуклеотид, который поддается гибридизации с адаптером; (c) лигазу; и (d) первый расщепляющий агент, содержащий по меньшей мере один фермент, выбранный из группы, состоящей из MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI и Nt.BspQI, и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления первый агент обладает по существу такой же функцией, узнает такую же или по существу такую же последовательность узнавания, или разрезает в таком же или по существу в таком же сайте разрезания, как любой из перечисленных первых агентов и вариантов. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит второй расщепляющий агент. В некоторых вариантах осуществления второй расщепляющий агент содержит фермент, выбранный из группы, состоящей из MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI и Nt.BspQI, и их вариантов. В некоторых вариантах осуществления второй агент обладает по существу такой же функцией, узнает такую же или по существу такую же последовательность узнавания, или разрезает в таком же или по существу таком

же сайте разрезания, как любой из перечисленных вторых агентов и вариантов. В некоторых вариантах осуществления первые расщепляющие агенты представляют собой MlyI. В некоторых вариантах осуществления второй расщепляющий агент представляет собой BciVI или BfuCI.

В еще другом аспекте изобретение относится к способу амплификации нуклеиновой кислоты, включающему: (a) обеспечение образца, содержащего n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит отличающуюся от других целевую последовательность; (b) обеспечение первого адаптера, который поддается гибридизации по меньшей мере с одной последовательностью для гибридизации с адаптером на m из n кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот; (c) обеспечение условий, подходящих для удлинения первого адаптера с использованием m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислот в качестве матрицы, генерируя тем самым m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), при этом каждый из m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) содержит множество копий целевой последовательности из ее матрицы; (d) генерирование двухцепочечных сайтов узнавания для первого агента на m одноцепочечных продуктах амплификации нуклеиновых кислот (ампликонах); и (e) обеспечение первого агента в условиях, подходящих для разрезания первым агентом m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов) на множестве сайтов разрезания, генерируя тем самым множество одноцепочечных копий целевых последовательностей в m кольцевых одноцепочечных нуклеиновых кислотах. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные сайты узнавания содержат первую часть первого адаптера на первой цепи двухцепочечных сайтов узнавания, и вторую цепь первого адаптера на второй цепи двухцепочечных сайтов узнавания. В некоторых вариантах осуществления адаптер содержит палиндромную последовательность. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные сайты узнавания генерированы путем гибридизации первой и второй частей первого адаптера друг с другом. В некоторых вариантах осуществления m одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликоны) содержат множество двухцепочечных самогибридизирующихся областей.

В еще другом аспекте изобретение относится к способу генерирования длинной молекулы нуклеиновой кислоты, при этом способ включает следующие стадии: (a) обеспечение множества иммобилизованных на поверхности нуклеиновых кислот, при этом указанное множество нуклеиновых кислот включает нуклеиновые кислоты, содержащие перекрывающиеся комплементарные последовательности; (b) высвобождение

указанного множества нуклеиновых кислот в раствор; и (c) обеспечение условий, способствующих: i) гибридизации указанных перекрывающихся комплементарных последовательностей с формированием множества гибридизированных нуклеиновых кислот; и ii) удлинению или лигированию указанных гибридизированных нуклеиновых кислот для синтеза длинной молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к автоматизированной системе, способной обрабатывать один или несколько субстратов, включающей: струйную печатающую головку для распыления на субстрат микрокапли, содержащей химические вещества; сканирующий транспорт («scanning transport») для получения изображения субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для селективного осаждения микрокапли в определенные участки; проточную кювету для обработки субстрата, на который осаждена микрокапля, путем воздействия на субстрат одной или нескольких отобранных жидкостей; блок выравнивания для точного выравнивания субстрата относительно печатающей головки при каждом помещении субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для выполнения осаждения; и не включающей обрабатывающий транспорт («treating transport») для перемещения субстрата между печатающей головкой и проточной кюветой для обработки в проточной кювете, при этом указанный обрабатывающий транспорт и указанный сканирующий транспорт представляют собой разные элементы.

В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к автоматизированной системе для синтеза олигонуклеотидов на субстрате, которая способна обрабатывать один или несколько субстратов, при этом указанная система включает: струйную печатающую головку для распыления на субстрат раствора, содержащего нуклеозид или активированный нуклеозид; сканирующий транспорт для получения изображения субстрата в непосредственной области от печатающей головки для селективного осаждения нуклеозида в определенных участках; проточную кювету для обработки субстрата, на который осажден мономер, путем воздействия на субстрат одной или нескольких отобранных жидкостей; блок выравнивания для точного выравнивания субстрата относительно печатающей головки при каждом помещении субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для осаждения; и не включает обрабатывающий транспорт для перемещения субстрата между печатающей головкой и проточной кюветой для обработки в проточной кювете, при этом указанный обрабатывающий транспорт и указанный сканирующий транспорт представляют собой разные элементы.

В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к автоматизированной системе, содержащей: струйную печатающую головку для распыления на субстрат микрокапли, содержащей химические вещества; сканирующий транспорт для получения изображения субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для селективного осаждения микрокапли в определенных участках; проточную кювету для обработки субстрата, на который осаждена микрокапля путем воздействия на субстрат одной или нескольких отобранных жидкостей; и блок выравнивания для точного выравнивания субстрата относительно печатающей головки при каждом помещении субстрата в непосредственной близости от печатающей головки для осаждения; и при этом система НЕ содержит обрабатывающий транспорт для перемещения субстрата между печатающей головкой и проточной ячейкой для обработки проточной ячейки.

С учетом представленного выше описания делается более конкретное обращение к чертежам, которые в иллюстративных целях демонстрируют настоящее изобретение, воплощенное в композициях, системах и способах на фигурах 1-2. Следует учесть, что способы, системы и композиции могут различаться по конфигурации и деталям отдельных частей в различных вариантах осуществления изобретения. Кроме того, способы могут различаться по деталям и порядку событий или действий. В различных вариантах осуществления изобретение описано в первую очередь с точки зрения использования нуклеиновых кислот, в частности, олигомеров и полинуклеотидов ДНК. Однако следует понимать, что изобретение может быть использовано с различными типами молекул, включая РНК или другие нуклеиновые кислоты, пептиды, белки или другие представляющие интерес молекулы. Подходящие строительные блоки для каждой из этих представляющих интерес более крупных молекул известны в данной области.

Настоящее изобретение обеспечивает композиции, системы и способы, полезные для приготовления и синтеза библиотек представляющих интерес молекул, включая нуклеиновые кислоты, полипептиды, белки и их комбинации. В различных вариантах осуществления в изобретении рассматривается использование статических и динамических пластин, например таких, которые изготовлены из кремниевых субстратов, для параллельного проведения реакций в микро-, нано- или пиколитровом масштабе. Кроме того, то же самое применимо к параллельной манипуляции с жидкостями в микро-, нано- или пиколитровом масштабе для обеспечения проведения множества реакций в выделенных объемах. Манипуляция с жидкостями может включать проникание, комбинирование, смешивание, фракционирование, генерирование капель, нагрев, конденсацию, выпаривание, герметичное уплотнение, стратификацию, сжатие под давлением, сушку или любую другую подходящую манипуляцию, известную в данной

области. В различных вариантах осуществления пластины обеспечивают архитектуры для манипуляции с жидкостью, которые встроены в поверхность. Элементы различной формы и размера могут быть сконструированы внутри субстрата или сквозь субстрат пластины. В способах и композициях согласно изобретению в различных вариантах осуществления используются специально сконструированные устройства, описанные здесь более подробно, для синтеза биологических молекул. В частности, изобретение обеспечивает синтез de novo крупных высокоплотных библиотек, содержащих длинные олигонуклеотиды и полинуклеотиды высокого качества, например, с использованием стандартной химии фосфорамидитов и подходящих технологий сборки генов, путем высокого контроля условий реакции, таких как время, величина дозирования и температура.

Со ссылкой на фигуру 1С в различных вариантах осуществления изобретения рассматривается использование одной или нескольких статических или динамических пластин для манипуляций с жидкостью. Пластины могут быть изготовлены из различных подходящих материалов, как описано здесь далее, например, из кремния. Пластины нанореактора могут быть выполнены с возможностью получения и удерживания жидкостей во множестве элементов. Дополнительные пластины, например такие, которые используются в реакциях синтеза in situ, можно приводить в контакт с пластинами нанореактора для сбора и/или смешивания жидкостей. Нанореакторы могут собирать жидкости из множества дополнительных пластин. Как правило, нанореакторы выравнивают с одним или несколькими выделенными локусами на дополнительных пластинах при приведении в контакт с платиной нанореактора. Перед приведением в контакт реагенты и растворители могут быть обеспечены в ределах нанореактора. Альтернативно, нанореакторы могут быть пустыми перед приведением в контакт с дополнительной пластиной. В некоторых вариантах осуществления нанореакторы собирают олигонуклеотиды, синтезированные в одном или нескольких выделенных локусах платины синтеза ДНК. Эти олигонуклеотиды могут быть собраны в более длинный ген в пределах нанореактора. Нанореакторы могут быть герметично закрыты при выравнивании и приведении в контакт с дополнительной пластиной любым подходящим способом, например, посредством капиллярных клапанов («capillary burst valves»), давления, адгезивов или любых других способов герметичного закрытия, известных в данной области. Уплотнение может быть съемным. Реакции в пределах нанореактора могут протекать в герметично закрытых объемах и могут включать циклическое воздействие температуры, применяющееся, например, в PCR или PCA. Изотермические реакции, такие как изотермическая амплификация, также находятся в рамках изобретения.

Пластины для синтеза ДНК могут быть выполнены с возможностью осуществления синтеза in situ олигонуклеотидов в выделенных локусах на поверхности или внутри поверхности с точным контролем. Струйную печатающую головку можно использовать для доставки капель реагентов для синтеза, например стандартного фосфорамидитного синтеза, на выделенные локусы пластины синтеза. Другие реагенты, которые являются общими для множества выделенных локусов, могут пропускаться через них в общем объеме. В некоторых вариантах осуществления пластины синтеза ДНК заменены на пластины для синтеза in situ молекул, отличных от ДНК-олигонуклеотидов, как описано далее в других местах в настоящем документе. Таким образом, в изобретении рассматривается быстрый синтез больших библиотек олигонуклеотидов и длинных генов с высоким качеством посредством точного контроля условий реакции во множестве малых объемов. Дополнительным преимуществом изобретения является уменьшенное использование реагентов по сравнению с общепринятыми способами синтеза, известными в данной области.

Различные способы предусматриваются для синтеза de novo библиотек генов с низкой частотой ошибок. На фигуре 2 показаны иллюстративные области применения способов и композиций согласно изобретению для параллельного синтеза больших высококачественных библиотек генов с длинными последовательностями. В различных вариантах осуществления статические и динамические пластины обеспечивают проведение множества реакций в ходе технологического процесса. Например, после олигонуклеотидного синтеза, обычно in situ на пластине синтеза ДНК, может следовать реакция сборки гена, такая как полимеразная циклическая сборка (PCA) синтезированных олигонуклеотидов, в более длинные последовательности. Собранные последовательности могут быть амплифицированы, например, посредством PCR. Для сведения к минимуму количества собранных последовательностей, которые отличаются от целевой последовательности, можно использовать подходящие реакции для исправления ошибок, описанные здесь или известные в данной области. Можно подготовить библиотеки для секвенирования и отобрать аликвоту из фракции продукта для секвенирования, такого как секвенирование следующего поколения (NGS).

Процессы синтеза генов, как показано в качестве примера на фигуре 2, могут быть скорректированы в соответствии с потребностями заказчика. В соответствии с результатами, полученными после начальной стадии секвенирования, например NGS, собранные гены с допустимой частотой ошибок могут быть отгружены, например, на планшете заказчику (фигура 2B). Способы и композиции согласно изобретению обеспечивают легкое достижение частоты ошибок менее чем около 1/10 kb, хотя могут

быть установлены альтернативные пороговые значения ошибок, как описано более подробно в других местах в настоящем документе. Для достижения более высоких степеней чистоты синтезированные/собранные de novo последовательности могут быть клонированы очищенными от единичных колоний. Идентичность правильной сконструированной последовательности может быть проверена посредством секвенирования, например, NGS. Информация секвенирования с более высокой достоверностью необязательно может быть получена, например, с помощью другого метода секвенирования, такого как секвенирование по Сенгеру. Верифицированные последовательности могут быть отправлены, например, на планшете заказчику (фигура 2C). Способы создания библиотек для секвенирования описаны далее более подробно в других местах в настоящем документе.

**Субстраты/пластины**

В одном аспекте субстрат, имеющий функционализированную поверхность, изготовлен с помощью любого из способов, описанных здесь, и в настоящем документе описаны способы синтеза олигонуклеотидов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность. Субстрат может представлять собой твердую подложку, содержащую множество выделенных локусов. Множество выделенных локусов может иметь любую геометрию, ориентацию или организацию. Выделенные локусы могут быть изготовлены в любом масштабе (например, микромасштабе или наномасштабе) или содержать микроструктуры, встроенные в поверхность субстрата. Выделенные локусы могут локализоваться на микроканалах по меньшей мере одного размера. Индивидуальные выделенные локусы субстрата могут не находиться в жидкостном взаимодействии друг с другом, например, первый выделенный локус для синтеза первого олигонуклеотида может локализоваться на первом сквозном межсоединении между двумя поверхностями субстрата, и второй выделенный локус для синтеза второго олигонуклеотида может локализоваться на втором сквозном межсоединении между двумя поверхностями субстрата, при этом первое и второе сквозные межсоединения не находятся в жидкостном взаимодействии в пределах субстрата, но начинаются и заканчиваются на одних и тех же двух поверхностях субстрата. В некоторых случаях микроструктура выделенных локусов может представлять собой микроканалы или микролунки в 2-D или 3-D. Микроканал «3-D» означает, что полость микроканала может быть взаимосвязанной с твердой подложкой или распространяться в пределах твердой подложки. В пределах микроканалов или микролунок могут присутствовать вторичные микроструктуры или элементы любой геометрии, ориентации или организации. Поверхность вторичных элементов может быть функционализирована фрагментом,

который может понижать поверхностную энергию поверхности вторичных элементов. Капли реагентов для синтеза олигонуклеотидов можно осаждать на микроканалы или микролунки. Используемая здесь микролунка относится к структуре микрожидкостного масштаба, которая может удерживать жидкость. В различных вариантах осуществления микролунки обеспечивают течение жидкости между верхним и нижним концом через жидкостное отверстие на каждом конце, действую, таким образом, подобно микроканалу. В этом контексте термины микролунка и микроканал используются взаимозаменяемо по всему тексту настоящего описания.

На фигуре 3 показан пример системы для олигонулеотидного синтеза, включающей первый субстрат и необязательно второй субстрат, как описано здесь. Печатающие головки струйного принтера могут перемещаться в X-Y-направлении к месту расположения первого субстрата. Второй субстрат может перемещаться в Z-направлении для герметичного соединения с первым субстратом, формируя выделенный реактор. Синтезированные олигонуклеотиды могут быть доставлены из первого субстрата во второй субстрат. В другом аспекте настоящее изобретение относится также к системе сборки олигонуклеотидов. Система сборки олигонуклеотидов может включать систему перемещения пластин. На фигуре 4 показан пример проектирования топологии субстрата в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения. Субстрат может содержать множество микролунок, и микролунки могут располагаться с постоянным шагом, например с шагом, равным 1,5 мм. Альтернативно, множество шагов может быть выбрано в различных направлениях топологической схемы, например, ряды микроструктур могут быть расположены с первым шагом, и микроструктуры в пределах каждого ряда могут быть расположены со вторым шагом. Шаг может включать любой подходящий размер, например, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,75, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мм. Может быть разработана микролунка, имеющая любые подходящие размеры, например, диаметр 80 мкм, как показано в качестве примера на фигуре 4, или любой подходящий диаметр, включая 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 или 500 мкм, и микролунки могут быть соединены со множеством микролунок меньшего размера. Поверхность микролунок меньшего размера может быть функционализирована в выбранных областях для содействия затеканию внутрь жидких реагентов, например, посредством функционализирования высокоэнергетической поверхности. Как показано на фигуре 4, диаметр микролунок меньшего размера может составлять около 20 мкм или любой подходящий диаметр, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55,

60, 65, 70, 75 или 80 мкм. На фигуре 5 показан случай, когда с помощью струйного принтера в микролунку осаждают каплю реагента. Капля жидкости может распространяться за пределы микролунки и заполнять микролунки меньшего размера, чему в некоторых случаях способствует модификация высокоэнергетической поверхности микролунок по сравнению с соседними поверхностями.

Наличие высокой плотности выделенных локусов на субстрате, имеющем функционализированную поверхность, может быть желательным для малого устройства и/или синтеза большого числа молекул с помощью малого устройства, и/или синтеза большого числа различных молекул. Функционализированная поверхность субстрата может иметь любую подходящую плотность выделенных локусов (например плотность, подходящую для синтеза олигонуклеотидов с заданным количеством общих различных олигонуклеотидов, подлежащих синтезу, в течение заданного количества времени для процесса синтеза или с заданными затратами на олигонуклеотид, ген или библиотеку). В некоторых вариантах осуществления поверхность имеет плотность выделенных локусов около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 75, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700, около 800, около 900, около 1000, около 1500, около 2000, около 3000, около 4000, около 5000, около 6000, около 7000, около 8000, около 9000, около 10000, около 20000, около 40000, около 60000, около 80000, около 100000 или около 500000 сайтов на 1 мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления поверхность имеет плотность выделенных локусов по меньшей мере около 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 900, по меньшей мере около 1000, по меньшей мере около 1500, по меньшей мере около 2000, по меньшей мере около 3000, по меньшей мере около 4000, по меньшей мере около 5000, по меньшей мере около 6000, по меньшей мере около 7000, по меньшей мере около 8000, по меньшей мере около 9000, по меньшей мере около 10000, по меньшей мере около 20000, по меньшей мере около 40000, по меньшей мере около 60000, по меньшей мере около 80000, по меньшей мере около 100000 или по меньшей мере около 500000 сайтов на 1 мм$^2$. Выделенные локусы на субстрате могут иметь любую различную организацию. Например, без ограничения, выделенные локусы могут быть организованы в кластеры на близком расстоянии с формированием одной или нескольких круглых областей, прямоугольных областей, овальных областей, областей неправильной формы и тому подобное. В одном аспекте выделенные локусы плотно упакованы и имеют низкий

уровень или не имеют взаимного загрязнения (например, капли реагентов, которые осаждены внутрь одного выделенного локуса, не будут значительно смешиваться с каплями реагентов, которые осаждены в другом ближайшем выделенном локусе). Выделенные локусы могут быть расположены на субстрате таким образом, чтобы обеспечить покрытие каждой подобласти или одновременно всей области с образованием герметичной полости с контролируемыми показателями влажности, давления или содержания газа, при этом каждая подобласть или вся область может иметь одинаковые показатели влажности, давления или содержания газа, или по существу одинаковые показатели влажности, давления или содержания газа, допустимые в условиях жидкостного соединения. Некоторые примеры различных дизайнов выделенных локусов на субстрате показаны на фигуре 6. Например, на фигуре 6Bb показана топология, называемая «Array of Holes»; на фигуре 6Bc показана топология, называемая «Flowers»; на фигуре 6Bd показана топология, называемая «Gunsight»; на фигуре 6Bd показана топология, называемая «Radial Flower». На фигуре 6C показана топология субстрата, покрытого сериями микролунок на трафарете 97,765 мкм. Микролунки, показанные в качестве примера на фигуре 6C, кластеризованы в островки. Микролунки могут быть заполнены реагентами из струйной печатающей головки.

Каждый из выделенных локусов на субстрате может иметь любую форму, которая известна в данной области, или формы, которые могут быть изготовлены с помощью известных в данной области способов. Например, каждый из выделенных локусов может иметь участок, который имеет круглую форму, прямоугольную форму, овальную форму или неправильную форму. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы могут иметь форму, которая позволяет жидкости легко протекать без образования пузырьков воздуха. В некоторых вариантах осуществления выделенные локусы могут иметь круглую форму с диаметром, который может состалять около, по меньшей мере около или менее чем около 1 микрометра (мкм), 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм, 16 мкм, 17 мкм, 18 мкм, 19 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 300 мкм, 350 мкм, 400 мкм, 450 мкм, 500 мкм, 550 мкм, 600 мкм, 650 мкм, 700 мкм или 750 мкм. Выделенные локусы могут иметь монодисперсное распределение по размеру, то есть все микроструктуры могут иметь приблизительно одинаковую ширину, высоту и/или длину. Альтернативно, выделенные локусы могут иметь ограниченное число форм и/или размеров, например, выделенные локусы могут быть представлены в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 12, 15, 20 или более различных формах, каждая из которых имеет монодисперсный размер. В некоторых вариантах осуществления одинаковая форма может повторяться во множестве монодисперсных распределений по размеру, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 или более монодисперсных распределений по размеру. Монодисперсное распределение может отражаться на унимодулярном распределении со стандартным отклонением менее чем 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,001% от режима или меньше.

Субстрат, имеющий высокую плотность выделенных локусов, обычно содержит выделенные локусы в пределах малой площади. Соответственно, может быть получен микроканал малого размера. Микроканалы могут содержать осажденные капли реагентов в различных объемах. Микроканалы могут иметь любые подходящие размеры, которые обеспечивают достаточно большие площади поверхности и/или объемы для различных вариантов осуществления. В одном аспекте объем микроканала является достаточно крупным, так что реагент в капле, осажденной в микроканале, полностью не расходуется во время олигонуклеотидного синтеза. В этих аспектах, помимо прочего, объем структуры лунки может определять период времени или плотность, при которой могут быть синтезированы олигонуклеотиды.

Каждый из выделенных локусов может иметь подходящую площадь для проведения реакций в соответствии с различными описанным здесь вариантами осуществления изобретения. В некоторых случаях процент занимаемой множеством выделенных локусов площади может составлять любой подходящий процент от общей площади поверхности субстрата. В некоторых случаях площадь выделенных локусов может представлять собой площадь поперечного сечения микроканалов или микролунок, встроенных в субстрат. В некоторых вариантах осуществления множество микроструктур или выделенных локусов может занимать около, по меньшей мере около или менее чем около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов может занимать около, по меньшей мере около или менее чем около 10 мм$^2$, 11 мм$^2$, 12 мм$^2$, 13 мм$^2$, 14 мм$^2$, 15 мм$^2$, 16 мм$^2$, 17 мм$^2$, 18 мм$^2$, 19 мм$^2$, 20 мм$^2$, 25 мм$^2$, 30 мм$^2$, 35 мм$^2$, 40 мм$^2$, 50 мм$^2$, 75 мм$^2$, 100 мм$^2$, 200 мм$^2$, 300 мм$^2$, 400 мм$^2$, 500 мм$^2$, 600 мм$^2$, 700 мм$^2$, 800 мм$^2$, 900 мм$^2$, 1000 мм$^2$, 1500 мм$^2$, 2000 мм$^2$, 3000 мм$^2$, 4000 мм$^2$, 5000 мм$^2$, 7500 мм$^2$, 10000 мм$^2$, 15000 мм$^2$, 20000 мм$^2$, 25000 мм$^2$, 30000 мм$^2$, 35000 мм$^2$, 40000 мм$^2$, 50000 мм$^2$, 60000 мм$^2$, 70000 мм$^2$, 80000 мм$^2$, 90000 мм$^2$, 100000 мм$^2$, 200000 мм$^2$, 300000 мм$^2$ общей площади или более.

Микроструктуры, встроенные в субстрат, могут включать микроканалы или микролунки, при этом микроструктуры начинаются от верхней или нижней поверхности субстрата и в некоторых случаях находятся в жидкостном взаимодействии с обычно противоположной поверхностью (например, нижней или верхней). Термины «верхняя» и «нижняя» не обязательно относятся к положению субстрата в отношении силы тяжести в любое заданное время, а обычно используются для удобства и ясности. Микроканалы или микролунки могут иметь любую подходящую глубину или длину. В некоторых случаях глубина или длина микроканала или микролунки измеряется от поверхности субстрата (и/или нижней части твердой подложки) до верхней части твердой подложки. В некоторых случаях глубина или длина микроканала или микролунки приблизительно равна толщине твердой подложки. В некоторых вариантах осуществления микроканалы или микролунки имеют глубину или длину около, менее чем около или более чем около 1 микрометра (мкм), 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 15 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм, 125 мкм, 150 мкм, 175 мкм, 200 мкм, 300 мкм, 400 мкм или 500 мкм. Микроканалы или микролунки могут имет любую длину периметра, которая является подходящей для описанных здесь вариантов осуществления изобретения. В некоторых случаях периметр микроканала или микролунки измеряется как периметр площади поперечного сечения, например площади поперечного сечения, перпендикулярной направлению течения жидкости через указанный микроканал или микролунку. В некоторых вариантах осуществления микроканалы или микролунки имеют около, менее чем около или по меньшей мере около 1 микрометра (мкм), 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 15 мкм , 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 31 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм, 125 мкм, 150 мкм, 175 мкм, 200 мкм, 300 мкм, 400 мкм или 500 мкм в периметре. В некоторых вариантах осуществления номинальная плотность длины дуги микроканалов или микролунок может иметь любую подходящую длину дуги на мкм$^2$ площади плоского субстрата. Как описано здесь, плотность длины дуги относится к длине периметров поперечных сечений микроканалов или микролунок на площадь поверхности плоского субстрата. Например, без ограничения, номинальная плотность длины дуги микроканалов или микролунок может составлять по меньшей мере 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,015, 0,02, 0,025, 0,03, 0,035, 0,04, 0,045, 0,05, 0,055, 0,06, 0,065, 0,07, 0,075, 0,08, 0,085, 0,09, 0,095, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1 мкм/мкм$^2$ или более. В некоторых вариантах осуществления номинальная плотность длины дуги микроканалов или микролунок может составлять

0,036 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления номинальная плотность длины дуги микроканалов или микролунок может составлять по меньшей мере 0,001 мкм/мкм$^2$. В некоторых вариантах осуществления номинальная плотность длины дуги микроканалов или микролунок может составлять по меньшей мере 0,01 мкм/мкм$^2$. Кроме того, номинальная площадь поверхности микроканалов или микролунок, которая является подходящей для проведения описанных здесь реакций, может быть максимально увеличена, например, посредством покрытия поверхности подходящим фрагментом. Площадь поверхности микроканалов или микролунок, которая покрыта подходящими фрагментами, как описано здесь, может содействовать прикреплению к поверхности олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления номинальная площадь поверхности микроканалов или микролунок, подходящая для проведения описанных здесь реакций, таких как синтез олигонуклеотидов, составляет по меньшей мере 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 1,8, 1,85, 1,9, 1,95, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мкм$^2$ площади плоского субстрата.

Микроканалы или микролунки могут иметь любой объем, который является подходящим для описанных здесь способов и композиций. В некоторых вариантах осуществления микроканалы или микролунки имеют объем, который составляет менее чем около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 или 950 пиколитров (пл), менее чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 990 нанолитров (нл), менее чем около 0,5 микролитров (мкл), менее чем около 1 мкл, менее чем около 1,5 мкл, менее чем около 2 мкл, менее чем около 2,5 мкл, менее чем около 3 мкл, менее чем около 3,5 мкл, менее чем около 4 мкл, менее чем около 4,5 мкл, менее чем около 5 мкл, менее чем около 5,5 мкл, менее чем около 6 мкл, менее чем около 6,5 мкл, менее чем около 7 мкл, менее чем около 7,5 мкл, менее чем около 8 мкл, менее чем около 8,5 мкл, менее чем около 9 мкл, менее чем около 9,5 мкл, менее чем около 10 мкл, менее чем около 11 мкл, менее чем около 12 мкл, менее чем около 13 мкл, менее чем около 14 мкл, менее чем около 15 мкл, менее чем около 16 мкл, менее чем около 17 мкл, менее чем около 18 мкл, менее чем около 19 мкл, менее чем около 20 мкл, менее чем около 25 мкл, менее чем около 30 мкл, менее чем около 35 мкл, менее чем около 40 мкл, менее чем около 45 мкл, менее чем около 50 мкл, менее чем около 55 мкл, менее чем около 60 мкл, менее чем около 65 мкл, менее чем около 70 мкл, менее чем около 75 мкл, менее чем около 80 мкл, менее чем около 85 мкл, менее чем около 90 мкл, менее чем около 95 мкл

или менее чем около 100 мкл. В некоторых вариантах осуществления микроканалы или микролунки имеют объем, который равен или больше, чем около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 или 950 пиколитров (пл), равен или больше, чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 990 нанолитров (нл), равен или больше, чем около 0,5 микролитров (мкл), около 1 мкл, около 1,5 мкл, около 2 мкл, около 2,5 мкл, около 3 мкл, около 3,5 мкл, около 4 мкл, около 4,5 мкл, около 5 мкл, около 5,5 мкл, около 6 мкл, около 6,5 мкл, около 7 мкл, около 7,5 мкл, около 8 мкл, около 8,5 мкл, около 9 мкл, около 9,5 мкл, около 10 мкл, около 11 мкл, около 12 мкл, около 13 мкл, около 14 мкл, около 15 мкл, около 16 мкл, около 17 мкл, около 18 мкл, около 19 мкл, около 20 мкл, около 25 мкл, около 30 мкл, около 35 мкл, около 40 мкл, около 45 мкл, около 50 мкл, около 55 мкл, около 60 мкл, около 65 мкл, около 70 мкл, около 75 мкл, около 80 мкл, около 85 мкл, около 90 мкл, около 95 мкл или около 100 мкл.

Микроканалы или микролунки могут иметь отношение сторон меньше 1. Используемый здесь термин «отношение сторон» относится к отношению ширины канала к глубине этого канала. Таким образом, канал, имеющий отношение сторон меньше 1, имеет глубину больше, чем ширину, тогда как канал, имеющий отношение сторон больше 1, имеет ширину больше, чем глубину. В некоторых аспектах отношение сторон микроканалов или микролунок может составлять меньше или быть равным около 0,5, около 0,2, около 0,1, около 0,05 или меньше. В некоторых вариантах осуществления отношение сторон микроканалов или микролунок может составлять около 0,1. В некоторых вариантах осуществления отношение сторон микроканалов или микролунок может составлять около 0,05. Описанные здесь микроструктуры, например, микроканалы или микролунки, имеющие отношение стороне меньше, чем 1, 0,1 или 0,05, могут включать каналы, содержащие один, два, три, четыре, пять, шесть или более углов, и тому подобное. Описанные здесь микроструктуры могут иметь описанные здесь отношения сторон, например, менее 1, 0,1 или 0,05 применительно ко всем микроканалам или микролункам, содержащимся в пределах конкретного выделенного локуса, например, одного или нескольких пересекающихся каналов, некоторых из этих каналов, единичного канала и даже части или частей одного или нескольких микроканалов или микролунок. Другие дизайны и способы изготовления микроканалов с низкими отношениями сторон описаны в патенте США № 5842787, который включен здесь путем отсылки.

Микроструктуры, такие как микроканалы или микролунки на субстрате, имеющие множество выделенных локусов, могут быть изготовлены любым способом, который

описан здесь или известен из других источников в данной области (например, процессы микропроизводства). Процессы микропроизводства, которые можно использовать для изготовления раскрытого здесь субстрата, без ограничения включают литографию; технологии травления, такие как жидкостное химическое травление, сухое травление и удаление фоторезиста; технологии микроэлектромеханических систем (Microelectromechanical systems, MEMS), включая микрофлюидные системы/ лабораторию на чипе, оптические MEMS (также называемые MOEMS), радиочастотные MEMS-системы (RF MEMS), PowerMEMS и BioMEMS, и глубокое реактивное ионное травление (Deep reactive ion etching, DRIE); технологии наноэлектромеханических систем (NEMS); термическое окисление кремния; нанесение покрытий методом электроосаждения и химического осаждения; диффузионные процессы, такие как диффузия бора, фосфора, мышьяка и сурьмы; ионная имплантация; осаждение пленок, такое как осаждение из паровой фазы (волокно, электронный пучок, световой импульс и затемнение, и ступенчатое нанесение пленок), катодное распыление, химическое осаждение из газовой фазы (CVD), эпитаксия (газофазная, жидкофазная и молекулярно-пучковая), электроосаждение, трафаретная печать и наслоение. Смотри, в целом, Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988); Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998; Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997).

В одном аспекте субстрат, имеющий множество выделенных локусов, может быть изготовлен с использованием любого способа, известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления материал субстрата, имеющего множество выделенных локусов, может представлять собой полупроводниковый материал, такой как диоксид кремния. Материалы субстрата могут также представлять собой другие материалы на основе соединений элементов III-V или II-VI групп, таких как полупроводник арсенид галлия (GaAs), полученный методом Чохральского (Grovenor, C. (1989). *Microelectronic Materials.* CRC Press. pp. 113–123). Материал может иметь твердую плоскую поверхность, которая равномерно покрыта реакционноспособными группами (-OH) оксида к раствору, находящемуся в контакте с поверхностью. Эти оксидные группы могут служить точками прикрепления для последующих процессов силанирования. Альтернативно, может быть осажден материал с гидрофильной и гидрофобной поверхностью, который имитирует оксид кремния по характеристикам травления. Поверхности с нанесенным нитридом

кремния и карбидом кремния также можно использовать для изготовления подходящих субстратов в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления на субстрат может быть осажден пассивирующий слой, который может содержать или может не содержать группы реакционноспособного оксида. Пассивирующий слой может содержать нитрид кремния ($Si_3N_4$) или полимид. В некоторых случаях стадию фотолитографии можно использовать для определения областей, в которых выделенные локусы формируются на пассивирующем слое.

Способ получения субстрата, имеющего множество выделенных локусов, может начинаться с субстрата. Субстрат (например, кремний) может содержать любое число осажденных на него слоев, включая, но без ограничения, проводящий слой, такой как металл. В некоторых случаях проводящий слой может представлять собой алюминий. В некоторых случаях субстрат может содержать защитный слой (например, нитрид титана). В некоторых случаях субстрат может содержать химический слой с высокой поверхностной энергией. Слои могут быть осаждены с использованием различных методов осаждения, таких как, например, химическое осаждение из газовой фазы (CVD), осаждение атомных слоев (ALD), плазмостимулированное CVD (PECVD), плазмостимулированное ALD (PEALD), химическое осаждение металлоорганических соединений из газовой фазы CVD (MOCVD), химическое осаждение из газовой фазы с помощью нагреваемой проволоки CVD (HWCVD), инициированное CVD (iCVD), модифицированное CVD (MCVD), аксиальное осаждение из газовой фазы (VAD), внешнее осаждение из газовой фазы (OVD) и физическое осаждение из газовой фазы (например, осаждение распылением, осаждение из газовой фазы).

В некоторых случаях на субстрат осаждают оксидный слой. В некоторых случаях оксидный слой может содержать диоксид кремния. Диоксид кремния может быть осажден с использованием тетраэтилортосиликата (TEOS), плазмы высокой плотности (HDP) или любой их комбинации.

В некоторых случаях диоксид кремния может быть осажден с использованием низкотемпературных процессов. В некоторых случаях процесс представляет собой низкотемпературное химическое осаждение из газовой фазы оксида кремния. Как правило, температура является достаточно низкой, чтобы изначально присутствующий металл на чипе не был поврежден. Температура осаждения может составлять около 50 °C, около 100 °C, около 150 °C, около 200 °C, около 250 °C, около 300 °C, около 350 °C и т.п. В некоторых вариантах осуществления температура осаждения составляет ниже около 50 °C, ниже около 100 °C, ниже около 150 °C, ниже около 200 °C, ниже около 250 °C, ниже

около 300 °С, ниже около 350 °С и т.п. Осаждение может быть выполнено при любом подходящем давлении. В некоторых случаях в процессе осаждения используют RF-энергию плазмы.

В некоторых случаях оксид осаждают с помощью процедуры выращивания слоя оксида путем сухого термического окисления (например, процедур, в которых можно использовать температуру, близкую или превышающую 1000 °С). В некоторых случаях оксид кремния получают с помощью процесса влажного окисления с использованием пара.

Диоксид кремния может быть осажден до толщины, подходящей для изготовления надлежащих микроструктур, описанных более подробно в других местах в настоящем документе.

Диоксид кремния может быть осажден до любой подходящей толщины. В некоторых вариантах осуществления слой диоксида кремния может иметь толщину по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1 нм, 2 нм, 3 нм, 4 нм, 5 нм, 6 нм, 7 нм, 8 нм, 9 нм, 10 нм, 15 нм , 20 нм, 25 нм, 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 125 нм, 150 нм, 175 нм, 200 нм, 300 нм, 400 нм или 500 нм, 1 мкм, 1,1 мкм, 1,2 мкм, 1,3 мкм, 1,4 мкм, 1,5 мкм, 1,6 мкм, 1,7 мкм, 1,8 мкм, 1,9 мкм, 2,0 мкм или более. Слой диоксида кремния может иметь толщину не более или не более чем примерно 2,0 мкм, 1,9 мкм, 1,8 мкм, 1,7 мкм, 1,6 мкм, 1,5 мкм, 1,4 мкм, 1,3 мкм, 1,2 мкм, 1,1 мкм, 1,0 мкм, 500 нм, 400 нм, 300 нм, 200 нм, 175 нм, 150 нм, 125 нм, 100 нм, 95 нм, 90 нм, 85 нм, 80 нм, 75 нм, 70 нм, 65 нм, 60 нм, 55 нм, 50 нм, 45 нм, 40 нм, 35 нм, 30 нм, 25 нм, 20 нм, 15 нм, 10 нм, 9 нм, 8 нм, 7 нм, 6 нм, 5 нм, 4 нм, 3 нм, 2 нм, 1 нм или меньше. Слой диоксида кремния может иметь толщину, которая находится в диапазоне 1,0 нм-2,0 мкм, 1,1-1,9 мкм, 1,2-1,8 нм, 1,3-1,7 мкм, 1,4-1,6 мкм. Специалистам в данной области следует учесть, что слой диоксида кремния может иметь толщину, которая находится в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например 1,5-1,9 мкм. Слой диоксида кремния может иметь толщину, которая находится в пределах любого диапазона, ограниченного любыми значениями, служащими предельными значениями указанного диапазона. Выделенные локусы (например, микроканалы или микролунки) могут быть созданы в субстрате на основе диоксида кремния с использованием различных технологий изготовления, которые известны в данной области. Такие технологии могут включать технологии изготовления полупроводниковых приборов. В некоторых случаях выделенные локусы могут быть созданы с использованием фотолитографических технологий, например таких, которые применяют в полупроводниковой промышленности. Например, на диоксид кремния

может быть нанесен слой фоторезиста (например, материала, который изменяет свойства при воздействии электромагнитного излучения) (например, нанесение на пластину покрытия методом центрифугирования) до любой подходящей толщины. Субстрат, содержащий слой фоторезист, может быть подвергнут воздействию электромагнитного излучения. Маску можно использовать для защиты от экспонирования отдельных участков слоя фоторезиста для определения участка выделенных локусов. Фоторезист может представлять собой негативный резист или позитивный резист (например, воздействию электромагнитного излучения может быть подвергнут участок выделенных локусов, или воздействию электромагнитного излучения могут быть подвергнуты заданные маской участки, отличные от выделенных локусов). Участок, расположенный выше места, в котором должны быть созданы выделенные локусы, подвергают воздействию электромагнитного излучения с получением рисунка, который соответствует локализации и распределению выделенных локусов в слое диоксида кремния. Фоторезист может быть подвергнут воздействию электромагнитного излучения через маску, определяющую рисунок, который соответствует выделенным локусам. Затем экспонированная часть фоторезиста может быть удалена, например, с помощью операций промывки (например, деионизированной водой). Затем удаленная часть маски может быть подвергнута химическому травлению для травления субстрата и переноса рисунка разделенных локусов на слой диоксида кремния. Травитель может включать кислоту, такую как, например, серная кислота ($H_2SO_4$). Слой диоксида кремния может быть подвергнут анизотропному травлению. С использованием описанных здесь способов можно применять высокоанизотропные методы изготовления, такие как DRIE, для изготовления микроструктур, таких как микролунки или микроканалы, содержащие локусы синтеза, на поверхности или внутри субстрата с боковыми стенками, которые отклоняются менее чем примерно на ± 3°, 2°, 1°, 0,5°, 0,1° или меньше по вертикали относительно поверхности субстрата. Могут быть достигнуты величины подтравливания менее чем около 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 мкм или меньше, что приводит к образованию высокооднородных микроструктур.

Для травления диокида кремния в участке, в котором должны быть сформированы выделенные локусы, можно использовать различные процедуры травления. Травление может представлять собой изотропное травление (то есть скорость травления в одном направлении по существу равна или равна скорости травления в ортогональном направлении) или анизотропное травление (то есть скорость травления в одном направлении меньше, чем скорость травления в ортогональном направлении), или их варианты. Технологии травления могут включать использование травителей для

жидкостного травления кремния, таких как KOH, TMAH, EDP и тому подобное, и травителей для сухого плазменного травления (например, DRIE). Обе технологии можно использовать для травления сквозных межсоединений микроструктур пластины.

В некоторых случаях при анизотропном травлении удаляется большая часть объема выделенных локусов. Может быть удален любой подходящий объем выделенных локусов, включая около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или около 95%. В некоторых случаях при анизотропном травлении удаляется по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% материала. В некоторых случаях при анизотропном травлении удаляется не более чем около 60%, не более чем около 70%, не более чем около 80%, не более чем около 90% или не более чем около 95% материала. В некоторых вариантах осуществления при анизотропном травлении не удаляется материал на основе диоксида кремния по всей толщине субстрата. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изотропное травление используют для удаления материала по всей толщине субстрата с образованием отверстия.

В некоторых случаях лунки подвергают травлению с использованием стадии фотолитографии для определения выделенных локусов с последующим гибридным сухим-влажным травлением. Стадия фотолитографии может включать нанесение на диоксид кремния фоторезиста и подвергание фоторезиста воздействию электромагнитного излучения через маску (или фотошаблон), имеющую рисунок, который определяет выделенные локусы. В некоторых случаях гибридное сухое-влажное травление включает: (a) сухое травление для удаления массы диоксида кремния в областях выделенных локусов, заданных в фоторезисте с помощью стадии фотолитографии; (b) очистку субстрата; и (c) влажное травление для удаления оставшегося диоксида кремния из субстрата в областях выделенных локусов.

Субстрат может быть очищен с помощью плазмохимического травления или подвергания воздействию окисляющего агента, такого как, например, $H_2O_2$, $O_2$, $O_3$, $H_2SO_4$ или их комбинации, такой как комбинация $H_2O_2$ и $H_2SO_4$. Очистка может включать удаление остаточного полимера, удаление материала, который может блокировать влажное травление, или их комбинацию. В некоторых случаях очистка представляет собой плазменную очистку. Стадия очистки может продолжаться в течение любого подходящего периода времени (например, от 15 до 20 секунд). В одном примере очистка может быть выполнена за 20 секунд с помощью машины eMAx-CT фирмы Applied Materials в условиях 100 mT, 200 W, 20 G, 20 $O_2$.

Сухое травление может представлять собой анизотропное травление, при котором травление происходит по существу вертикально (например, в направлении субстрата), но не латерально или по существу латерально (например, параллельно субстрату). В некоторых случаях сухое травление включает травление с помощью травителя на основе фтора, такого как $CF_4$, $CHF_3$, $C_2F_6$, $C_3F_6$, или любой их комбинации. В одном случае травление выполняют в течение 400 секунд с помощью машины eMax-CT фирмы Applied Materials при условиях 100 mT, 1000 W, 20 G и 50 CF4. Описанные здесь субстраты могут быть подвергнуты травлению путем глубокого реактивного ионного травления (DRIE). Глубокое реактивное ионное травление (DRIE) представляет собой высокоанизотропный процесс травления, используемый для создания глубокого проникновения, отверстий с вертикальными сторонами и канавок в пластинах/субстратах обычно с высокими отношениями сторон. Субстраты могут быть подвергнуты травлению с использованием двух главных технологий для высокого показателя DRIE: криогенный и Bosch. Способы применения DRIE описаны в патенте США № 5501893, полное содержание которого включено здесь путем отсылки.

Влажное травление может представлять собой изотропное травление, при котором происходит удаление материала во всех направлениях. В некоторых случаях при влажном травлении происходит подтравливание фоторезиста. Подтравливание фоторезиста может способствовать более легкому удалению фоторезиста на последующей стадии (например, «отрыв» фоторезиста). В одном варианте осуществления влажное травление представляет собой травление буферным оксидом (BOE). В некоторых случаях жидкие травители для оксида используют при комнатной температуре с раствором на основе фтористоводородной кислоты, который может быть забуферен (например, фторидом аммония) для замедления скорости травления. Скорость травления может зависеть от подвергаемой травлению пленки и конкретных концентраций HF и/или $NH_4F$. Время травления, необходимое для полного удаления оксидного слоя, обычно определяют эмпирически. В одном примере травление выполняют при 22 °C с 15:1 BOE (травление буферным оксидом).

Слой диоксида кремния может быть протравлен до нижележащего слоя материала. Например, слой диоксида кремния может быть протравлен до слоя нитрида титана.

В одном аспекте способ изготовления субстрата, имеющего множество выделенных локусов, включает травление выделенных локусов, таких как микролунки или микроканалы, сквозь толщину субстрата, такого как субстрат на основе кремния, содержащий слой диоксида кремния, нанесенный с использованием (a) стадии фотолитографии для определения областей выделенных локусов; (b) сухого травления для

удаления массы диоксида кремния в областях выделенных локусов, определенных на стадии фотолитографии; и (c) влажного травления для удаления оставшегося диоксида кремния из субстрата в областях выделенных локусов. В некоторых случаях способ дополнительно включает удаление остаточного полимера, удаление материала, который может блокировать влажное травление, или их комбинацию. Способ может включать стадию плазменной очистки.

В некоторых вариантах осуществления в некоторых случаях фоторезист не снимают с диоксида кремния после стадии фотолитографии или гибридного влажного-сухого травления. Оставление фоторезиста может быть использовано для селективного направления металла в выделенные локусы, а не на верхнюю поверхность слоя диоксида кремния на более поздних стадиях. В некоторых случаях субстрат покрывают металлом (например, алюминием) и при влажном травлении не происходит удаления некоторых компонентов на металле, например таких, которые защищают металл от коррозии (например, нитрид титана (TiN)). В некоторых случаях, однако, слой фоторезиста может быть удален, например, с помощью химико-механической планаризации поверхности (CMP).

**Избирательное функционализирование субстратов**

Как описано здесь, функционализирование поверхности, например, поверхности кремниевой пластины, может относиться к любому процессу, посредством которого свойства поверхности материала изменяются путем осаждения на поверхность химических соединений. Типичным способом достижения функционализирования является осаждение молекулы органосилана путем химического осаждения из газовой фазы. Это также может быть выполнено в процессе влажного силанирования («wet silanization process»).

Избирательное функционализирование, также обычно называемое как «селективное осаждение» или «селективное функционализирование», может относиться к любому процессу, в результате которого образуются два или более различных участков на монолитной структуре, при этом по меньшей мере один участок имеет поверхность или химические свойства, отличающиеся от других участков на этой же самой структуре. Свойства включают, но без ограничения, поверхностную энергию, химическую терминацию, концентрацию химического фрагмента на поверхности и т.п. Различные участки могут быть смежными.

Активное функционализирование может относиться к функционализированию поверхностей, которые будут принимать участие в некоторых последующих стадиях получения, таких как синтез ДНК, или связывание с ДНК или белком. Таким образом,

подходящий способ функционализирования, как описано в других местах в настоящем документе или известно из других источников в данной области, выбран для проведения конкретной нижеследующей стадии изготовления на поверхности.

Пассивное функционализирование может относиться к функционализированию поверхностей, при котором активные участки, выполняющие основную функцию, становятся неэффективными. Например, если активное функционализирование предназначено для связывания с ДНК, то пассивно функционализированные участки не будут связываться с ДНК.

Фоторезист обычно относится к светочувствительному материалу, широко используемому в стандартных производственных процессах, таких как фотолитография, для формирования узорчатых покрытий. Он наносится в виде жидкости, но отверждается на субстрате по мере испарения летучих растворителей, содержащихся в смеси. Фоторезист можно наносить в процессах нанесения покрытия методом центрифугирования в виде тонкой пленки (от 1 мкм до 100 мкм) на плоский субстрат. Фоторезист может быть структурирован при подвергании воздействию света через маску или фотошаблон, изменяя скорость его растворения в проявителе. Фоторезист может быть «позитивным» (воздействие света повышает растворение) или «негативным» (воздействие света уменьшает растворение). Фоторезист можно использовать в качестве защитного слоя, который служит в качестве блокирующего слоя для последующих стадий, которые модифицируют подлежащий субстрат (таких как травление). После завершения этого модифицирования резист удаляют.

Фотолитография может относиться к процессу структурирования субстратов. Типичный основной процесс включает: 1) нанесение фоторезиста на субстрат, 2) подвергание резиста воздействию света через бинарную маску, которая является светонепроницаемой в некоторых областях и прозрачной в других областях, и затем 3) проявление резиста, что приводит к структурированию резиста исходя из того, какие участки были экспонированы. После проявления структурированный резист служит в качестве маски для последующих стадий обработки, таких как травление, ионная имплантация или осаждение. После стадий обработки резист обычно удаляют, например, посредством плазменного удаления или влажного химического удаления.

В различных вариантах осуществления применяют способы с использованием фоторезиста, при этом фоторезист содействует изготовлению субстратов с избирательным функционализированием.

Серии стадий изготовления могут составлять основу процесса избирательного функционализирования, при этом отдельные стадии могут быть модифицированы,

удалены или дополнены дополнительными стадиями для достижения желаемого рисунка функционализирования на поверхности в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения. Во-первых, начальная подготовка целевой поверхности может быть достигнута, например, путем химической очистки и может включать начальное активное или пассивное функционализирование поверхности.

Во-вторых, нанесение фоторезиста может быть достигнуто с помощью различных методов. В различных вариантах осуществления проникновение резиста в различные части структуры контролируется дизайном структуры, например, использованием присущих жидкостям свойств торможения в различных точках структуры, таких как острые края. После испарения растворителей фоторезиста остается твердая пленка.

В третьих, фотолитографию можно необязательно использовать для удаления резиста в определенных специфических областях субстрата для того, чтобы эти области могли быть в дальнейшем модифицированы.

В четвертых, плазменная очистка непроявленного фоторезиста, обычно короткая стадия плазменной очистки с использованием, например, кислородной плазмы, может быть использована для содействия удалению любых остаточных органических загрязнений в очищенных от резиста областях.

В пятых, поверхность может быть функционализирована, при этом участки, покрытые резистом, защищены от любого активного или пассивного функционализирования. Любой подходящий процесс, который изменяет химические свойства поверхности, описанный здесь или известный в данной области, может быть использован для функционализирования поверхности, например, химическое осаждение из газовой фазы органосилана. Как правило, это приводит к осаждению самоорганизующегося монослоя (SAM) компонентов функционализирования.

В шестых, резист может быть снят и удален, например, путем растворения в подходящих органических растворителях, путем плазменного травления, экспонирования и проявления, и т.п., проявляя тем самым участки субстрата, которые не были покрыты резистом. В некоторых вариантах осуществления для снятия резиста выбран способ, который не будет удалять функциональные группы или иным образом повреждать функционализированные поверхности.

В седьмых, необязательно может быть выполнена стадия второго функционализирования, включающая активное или пассивное функционализирование. В некоторых вариантах осуществления участки, функционализированные на первой стадии функционализирования, блокируют осаждение функциональных групп, используемых на второй стадии функционализировования.

В различных вариантах осуществления избирательное функционализирование содействует пространственному контролю областей на чипе, где происходит синтез ДНК. В некоторых вариантах осуществления избирательное функционализирование обеспечивает улучшенную гибкость в отношении контроля жидкостных свойств чипа. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления процесс, в ходе которого олигонуклеотиды переносятся из устройства олигонуклеотидного синтеза в устройство, содержащее нанолунки, является улучшенным путем избирательного функционализирования. В некоторых вариантах осуществления избирательное функционализирование обеспечивает изготовление устройств, например, нанореакторов или устройств олигонуклеотидного синтеза, в которых стенки лунок или каналов являются относительно гидрофильными, как описано в других местах в настоящем документе, и внешние поверхности являются относительно гидрофобными, как описано в других местах в настоящем документе.

На фигуре 36 показаны иллюстративные применения избирательного функционализирования на микрожидкостных устройствах в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения. Участки активного и пассивного функционализирования заштрихованы по-разному, как указано. В частности, первые каналы (сквозные межсоединения) и вторые каналы, которые соединяются с ними, образуя так называемый рисунок «револьвер», используются в этих примерах для иллюстрации избирательного функционализирования в трех измерениях. Конкретная топология трехмерных элементов в пределах этих иллюстративных субстратов является не столь важной для процесса функционализирования, за исключением нескольких правил, которые помогают контролировать нанесение резиста.

На фигуре 37 показан иллюстративный технологичекий процесс создания рисунков избирательного функционализирования, показанных на фигурах 37 B-D. Таким образом, сначала субстрат может быть очищен, например, с использованием раствора «пиранья» с последующим воздействием плазмы кислорода (фигура 37A). Фоторезист может быть нанесен на слой устройства, заполняя вторые каналы (также называемые «револьверы»; фигура 37B). Фотолитографию и/или стадию плазменного удаления остатков проявителя можно использовать для создания желаемого рисунка фоторезиста на субстрате с использованием подходящей маски для рисунка (фигура 37C). Рисунок маски может изменяться для контроля, в каких местах остается резист и в каких он очищен. Для определения пассивно функционализированных участков на устройстве может быть выполнена стадия функционализирования, например, фторсиланом, органосилоксаном или любой группой, образующей органический слой, который может пассивировать

поверхность (фигура 37D). Резист может быть снят с использованием подходящего способа, описанного в других местах в настоящем документе или в других источниках, известных в данной области (фигура 37E). После удаления резиста экспонированные области могут быть подвергнуты активному функционализированию, оставляя желаемый рисунок дифференцированного функционализирования (фигура 37F).

В различных вариантах осуществления способы и композиции, описанные здесь, относятся к нанесению фоторезиста для создания поверхности с модифицированными свойствами в выборочных участках, при этом нанесение фоторезиста основано на жидкостных свойствах субстратов, определяющих пространственное распределение фоторезиста. Без привязки к какой-либо теории полагают, что эффекты поверхностного натяжения, относящиеся к наносимой жидкости, могут определять течение фоторезиста. Например, эффекты поверхностного натяжения и/или капиллярного действия могут способствовать контролируемому затеканию фоторезиста в малые структуры до испарения содержащихся в резисте растворителей (фигура 38). В одном варианте осуществления возникает торможение при движении резиста через острые края, контролируя тем самым продвижение жидкости. Подлежащие структуры могут быть выполнены исходя из желаемых рисунков течения, которые используются для нанесения фоторезиста во время процессов изготовления и функционализирования. Твердый органический слой, который остается после испарения растворителей, может быть использован для выполнения последующих стадий процесса изготовления.

Субстраты могут быть выполнены с возможностью контроля течения жидкостей, стимулируя или ингибируя эффекты затекания в соседние пути протекания жидкости. Например, на фигуре 39A показан дизайн, в котором не происходит перекрывания между верхними и нижними краями, что способствует удерживанию жидкости в верхних структурах, обеспечивая конкретное расположение резиста. Напротив, на фигуре 39B показан альтернативный дизайн, когда верхние и нижние края пересекаются, что приводит к затеканию наносимой жидкости в нижние структуры. Подходящие дизайны могут быть выбраны соответствующим образом в зависимости от желаемого применения резиста.

На фигуре 40 показаны изображения светлого поля (A) и темного поля (B) устройства, на которое наносят резист в соответствии с представленным на фигуре 40C рисунком фоторезиста в виде малого диска после фотолитографии.

На фигуре 41 показаны изображения светлого поля (A) и темного поля (B) устройства, на которое наносят резист в соответствии с представленным на фигуре 41C рисунком фоторезиста в виде полного диска после фотолитографии.

На фигуре 42 показаны изображения светлого поля (A) и темного поля (B) устройства, которое функционализировано в соответствии с рисунком на фигуре 42C после пассивного функционализирования и снятия резиста.

На фигуре 43 показаны различающиеся жидкостные свойства избирательно функционализированных поверхностей на изображениях светлого поля (A) и темного поля (B) в соответствии с рисунком на фигуре 43C с использованием в качестве жидкости диметилсульфоксида (DMSO). Спонтанное смачивание «револьверов» достигается с использованием гидрофильных поверхностей в пределах «револьверов», окруженных гидрофобными участками.

На фигуре 44 показана еще одна иллюстративная схема генерирования рисунков избирательного функционализирования, показанных на фигуре 36F. Соответственно, сначала субстрат может быть очищен, например, с использованием раствора «пиранья» с последующим воздействием кислорода плазмы (фигура 44A). Для определения пассивно функционализированных областей на устройстве может быть выполнена стадия функционализирования, например, фторсиланом, органосилоксаном или любой группой, которая может формировать органический слой, который может пассивировать поверхность (фигура 44B). Фоторезист может быть нанесен на слой устройства, заполняя вторые каналы (также называемые «револьверами»; фигура 44C). Фотолитографию и/или стадию травления можно использовать для генерирования желаемого рисунка фоторезиста на субстрате с использованием подходящей маски для рисунка (фигура 44D). Рисунок маски можно изменять для контроля, где фоторезист остается и где он очищен. Резист может быть снят с использованием подходящего способа, описанного в других местах в настоящем документе или известного из других источников в данной области (фигура 44E). После удаления резиста экспонированные участки могут быть подвергнуты активному функционализированию, оставляя желаемый рисунок избирательного функционализирования (фигура 44F).

В другом варианте осуществления схема функционализирования выполнена таким образом, что резист наносится со стороны (нижней) сквозного межсоединения и затекает в сквозные межсоединения и «револьверы». Экспонированные участки на наружных поверхностях могут быть подвергнуты функционализированию. Резист может быть удален, например, с задней (нижней) стороны устройства с использованием литографии или травления, обеспечивая активное функционализирование в экспонированных участках, что приводит к получению рисунка, описанного на фигуре 36E.

В еще одном варианте осуществления перекрывающийся дизайн может быть выбран между сквозными межсоединениями и краями канала «револьвера», как показано

на фигуре 39B. Резист может быть нанесен с передней (верхней) стороны с затеканием жидкости в сквозные межсоединения. Пассивное функционализирование, снятие резиста с последующим активным функционализированием будет приводить к изготовлению рисунка, показанного на фигуре 36E.

Иллюстративное микрожидкостное устройство, содержащее по существу плоскую часть субстрата, показано в виде диаграммы на фигуре 25D. Поперечное сечение диаграммы показано на фигуре 25E. Субстрат содержит множество кластеров, при этом каждый кластер содержит множество группировок жидкостных соединений. Каждая группировка содержит множество вторых каналов, проходящих из первого канала. На фигуре 25A представлен вид устройства с кластерами, имеющими высокую плотность группировок. На фигуре 25C представлен вид кластера фигуры 25A. На фигуре 25B представлен вид в разрезе фигуры 25A.

Кластер из группировок может быть скомпонован в любое число конформаций. На фигуре 25A группировки организованы в смещенные ряды, формируя кластер в рисунок типа круга. На фигуре 25C показано расположение множества таких кластеров на иллюстративном микрожидкостном устройстве. В некоторых вариантах осуществления индивидуальные кластеры содержатся в пределах областей индивидуальных кластеров, внутренняя область которых формирует выпуклое множество. В некоторых вариантах осуществления области индивидуальных кластеров не пересекаются друг с другом. Области индивидуальных кластеров могут представлять собой круг или любой другой подходящий полигон, например, треугольник, квадрат, прямоугольник, параллелограмм, шестиугольник и т.п. Как представлено поз. 2503, иллюстративное расстояние между тремя рядами группировок может составлять от около 0,05 мм до около 1,25 мм, измеренное от центра каждой группировки. Расстояние между 2, 3, 4, 5 или более рядами группировок может составлять около или по меньшей мере около 0,05 мм, 0,1 мм, 0,15 мм, 0,2 мм, 0,25 мм, 0,3 мм, 0,35 мм, 0,4 мм, 0,45 мм, 0,5 мм, 0,55 мм, 0,6 мм, 0,65 мм, 0,7 мм, 0,75 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,1 мм, 1,2 мм, 1,2 мм или 1,3 мм. Расстояние между 2, 3, 4, 5 или более рядами группировок может составлять около или не более чем около 1,3 мм, 1,2 мм, 1,1 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,75 мм, 0,65 мм, 0,6 мм, 0,55 мм, 0,5 мм, 0,45 мм, 0,4 мм, 0,35 мм, 0,3 мм, 0,25 мм, 0,2 мм, 0,15 мм, 0,1 мм, 0,05 мм или меньше. Расстояние между 2, 3, 4, 5 или более рядами группировок может изменяться в диапазоне 0,05-1,3 мм, 0,1-1,2 мм, 0,15-1,1 мм, 0,2-1 мм, 0,25-0,9 мм, 0,3-0,8 мм, 0,35-0,8 мм, 0,4-0,7 мм, 0,45-0,75 мм, 0,5-0,6 мм, 0,55-0,65 мм или 0,6-0,65 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 0,05 мм – 0,8 мм. Как показано поз. 2506,

иллюстративное расстояние между двумя группировками в ряду группировок может составлять от около 0,02 мм до около 0,5 мм, измеренное от центра каждой группировки. Расстояние между двумя группировками в ряду группировок может составлять около или по меньшей мере около 0,02 мм, 0,04 мм, 0,06 мм, 0,08 мм, 0,1 мм, 0,12 мм, 0,14 мм, 0,16 мм, 0,18 мм, 0,2 мм, 0,22 мм, 0,24 мм, 0,26 мм, 0,28 мм, 0,3 мм, 0,32 мм, 0,34 мм, 0,36 мм, 0,38 мм, 0,4 мм, 0,42 мм, 0,44 мм, 0,46 мм, 0,48 мм или 0,5 мм. Расстояние между двумя группировками в ряду группировок может составлять около или не более чем около 0,5 мм, 0,48 мм, 0,46 мм, 0,44 мм, 0,42 мм, 0,4 мм, 0,38 мм, 0,36 мм, 0,34 мм, 0,32 мм, 0,3 мм, 0,28 мм, 0,26 мм, 0,24 мм, 0,22 мм, 0,2 мм, 0,18 мм, 0,16 мм, 0,14 мм, 0,12 мм, 0,1 мм, 0,08 мм, 0,06 мм, 0,04 мм или 0,2 мм, или меньше. Расстояние между двумя группировками может изменяться в диапазоне 0,02-0,5 мм, 0,04-0,4 мм, 0,06-0,3 мм или 0,08-0,2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 0,04 мм – 0,2 мм.

Длина и ширина первого и второго каналов каждой группировки может быть оптимизирована в соответствии с экспериментальными условиями. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение первого канала в группировке, представленной поз. 2504, составляет около или по меньшей мере около 0,01 мм, 0,015 мм, 0,02 мм, 0,025 мм, 0,03 мм, 0,035 мм, 0,04 мм, 0,045 мм, 0,05 мм, 0,055 мм, 0,06 мм, 0,065 мм, 0,07 мм, 0,075 мм, 0,08 мм, 0,085 мм, 0,09 мм, 0,1 мм, 0,15 мм, 0,2 мм, 0,25 мм, 0,3 мм, 0,35 мм, 0,4 мм, 0,45 мм или 0,5 мм. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение первого канала в группировке составляет около или не более чем около 0,5 мм, 0,45 мм, 0,4 мм, 0,35 мм, 0,3 мм, 0,25 мм, 0,2 мм, 0,15 мм, 0,1 мм, 0,09 мм, 0,085 мм, 0,08 мм, 0,075 мм, 0,07 мм, 0,065 мм, 0,06 мм, 0,055 мм, 0,05 мм, 0,045 мм, 0,04 мм, 0,035 мм, 0,03 мм, 0,025 мм, 0,02 мм, 0,015 мм или 0,01 мм или меньше. Поперечное сечение первого канала в группировке может изменяться в диапазоне 0,01-0,5 мм, 0,02-0,45 мм, 0,03-0,4 мм, 0,04-0,35 мм, 0,05-0,3 мм, 0,06-0,25 мм или 0,07-0,2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 0,04 мм – 0,2 мм. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение второго канала в группировке, представленной поз. 2505, составляет около или по меньшей мере около 0,001 мм, 0,002 мм, 0,004 мм, 0,006 мм, 0,008 мм, 0,01 мм, 0,012 мм, 0,014 мм, 0,016 мм, 0,018 мм, 0,02 мм, 0,025 мм, 0,03 мм, 0,035 мм, 0,04 мм, 0,045 мм, 0,05 мм, 0,055 мм, 0,06 мм, 0,065 мм, 0,07 мм, 0,075 мм или 0,08 мм. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение второго канала в группировке составляет около или не более чем около 0,08 мм, 0,075 мм,

0,07 мм, 0,065 мм, 0,06 мм, 0,055 мм, 0,05 мм, 0,045 мм, 0,04 мм, 0,035 мм, 0,03 мм, 0,025 мм, 0,02 мм, 0,018 мм, 0,016 мм, 0,014 мм, 0,012 мм, 0,01 мм, 0,008 мм, 0,006 мм, 0,004 мм, 0,002 мм, 0,001 мм или меньше. Поперечное сечение второго канала в группировке может изменяться в диапазоне 0,001-0,08 мм, 0,004-0,07 мм, 0,008-0,06 мм, 0,01-0,05 мм, 0,015-0,04 мм, 0,018-0,03 мм или 0,02-0,025 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 0,008 мм – 0,04 мм. На фигуре 25B показано иллюстративное поперечное сечение кластера, содержащего ряд из 11 группировок. В некоторых вариантах осуществления высота второго канала в каждой группировке составляет около или по меньшей мере около 0,005 мм, 0,008 мм, 0,01 мм, 0,015 мм, 0,02 мм, 0,025 мм, 0,03 мм, 0,04 мм, 0,05 мм, 0,06 мм, 0,07 мм, 0,08 мм, 0,1 мм, 0,12 мм, 0,14 мм, 0,16 мм, 0,18 мм или 0,2 мм. В некоторых вариантах осуществления высота второго канала, показанного поз. 2501, в каждой группировке составляет около или не более чем около 0,2 мм, 0,18 мм, 0,16 мм, 0,14 мм, 0,12 мм, 0,1 мм, 0,08 мм, 0,07 мм, 0,06 мм, 0,05 мм, 0,04 мм, 0,03 мм, 0,025 мм, 0,02 мм, 0,015 мм, 0,01 мм, 0,008 мм или 0,005 мм. Высота второго канала в каждой группировке может изменяться в диапазоне 0,005-0,2 мм, 0,008-0,018 мм, 0,01-0,16 мм, 0,015-0,1 мм, 0,02-0,08 мм или 0,025-0,04 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 0,01 мм – 0,04 мм. В некоторых вариантах осуществления высота первого канала в пределах каждой группировки, показанной поз. 2502, составляет около или не более чем около 5 мм, 4,5 мм, 4 мм, 3,5 мм, 3 мм, 2,5 мм, 2 мм, 1,5 мм, 1,0 мм, 0,8 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,375 мм, 0,35 мм, 0,3 мм, 0,275 мм, 0,25 мм, 0,225 мм, 0,2 мм, 0,175 мм, 0,15 мм, 0,125 мм, 0,1 мм, 0,075 мм или 0,05 мм. В некоторых вариантах осуществления высота первого канала в пределах каждой группировки, показанной поз. 2502, составляет около или по меньшей мере около 0,05 мм, 0,075 мм, 0,1 мм, 0,125 мм, 0,15 мм, 0,175 мм, 0,2 мм, 0,225 мм, 0,25 мм, 0,275 мм, 0,3 мм, 0,325 мм, 0,35 мм, 0,375 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,8 мм, 1,0 мм, 1,5 мм, 2 мм, 2,5 мм, 3 мм, 3,5 мм, 4 мм, 4,5 мм или 5 мм. Высота первого канала в пределах каждой группировки может изменяться в диапазоне 0,05-5 мм, 0,075-4 мм, 0,1-3 мм, 0,15-2 мм, 0,2-1 мм или 0,3-0,8 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любым из этих значений, например, 0,1 мм – 1 мм.

Кластер группировок может быть организован в конформацию, подходящую для размещения в одной реакционной лунке по существу плоской части субстрата микрожидкостного устройства, как показано на фигуре 25D. Фигура 25D представляет

собой диаграмму по существу плоской части субстрата микрожидкостного устройства, содержащего 108 реакционных лунок, при этом каждая реакционная лунка содержит множество группировок. Субстрат может содержать любое количество лунок, включая, но без ограничения, любое количество от около 2 до около 250. В некоторых вариантах осуществления количество лунок составляет от около 2 до около 225 лунок, от около 2 до около 200 лунок, от около 2 до около 175 лунок, от около 2 до около 150 лунок, от около 2 до около 125 лунок, от около 2 до около 100 лунок, от около 2 до около 75 лунок, от около 2 до около 50 лунок, от около 2 до около 25 лунок, от около 25 лунок до около 250 лунок, от около 50 лунок до около 250 лунок, от около 75 до около 250 лунок, от около 100 до около 250 лунок, от около 125 до около 250 лунок, от около 150 до около 250 лунок, от около 175 до около 250 лунок, от около 200 до около 250 лунок, от около 225 до около 250 лунок. Специалисту в данной области будет понятно, что количество лунок может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 25 – 125. Кроме того, каждая лунка может содержать кластер из любого числа группировок, включая, но без ограничения, любое количество от около 2 до около 250 группировок. В некоторых вариантах осуществления кластер содержит от около 2 до около 225 группировок, от около 2 до около 200 группировок, от около 2 до около 175 группировок, от около 2 до около 150 группировок, от около 2 до около 125 группировок, от около 2 до около 100 группировок, от около 2 до около 75 группировок, от около 2 до около 50 группировок, от около 2 до около 25 группировок, от около 25 до около 250 группировок, от около 50 до около 250 группировок, от около 75 до около 250 группировок, от около 150 до около 250 группировок, от около 175 до около 250 группировок, от около 200 до около 250 группировок, или от около 225 до около 250 группировок. Специалисту в данной области будет понятно, что количество группировок может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 25 – 125. В качестве примера, каждая из 108 лунок субстрата, показанного на фигуре 25D, может содержать кластер из 109 группировок, показанный на фигуре 25A, с получением 11772 группировок по существу в плоской части субстрата микрожидкостного устройства.

Фигура 25D включает начальную точку, обозначенную 0,0, которая является пересечением осей X и Y, при этом графически представлен нижний левый угол иллюстративной по существу плоской части субстрата микрожидкостного устройства. В некоторых вариантах осуществления ширина по существу плоского субстрата, представленного поз. 2508, составляет от около 5 мм до около 150 мм вдоль одного направления, измеренная от начальной точки. В некоторых вариантах осуществления

ширина по существу плоского субстрата, представленного поз. 2519, составляет от около 5 мм до около 150 мм вдоль другого направления, измеренная от начальной точки. В некоторых вариантах осуществления ширина субстрата в любом направлении составляет от около 5 мм до около 125 мм, от около 5 мм до около 100 мм, от около 5 мм до около 75 мм, от около 5 мм до около 50 мм, от около 5 мм до около 25 мм, от около 25 мм до около 150 мм, от около 50 мм до около 150 мм, от около 75 мм до около 150 мм, от около 100 мм до около 150 мм, от около 125 мм до около 150 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что ширина может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 25 – 100 мм. По существу плоская часть субстрата, показанного на фигуре 25D, содержаит 108 кластеров группировок. Кластеры могут быть организованы в любую конформацию. На фигуре 25D кластеры организованы в ряды с формированием квадратной формы. Независимо от компоновки кластеры могут начинаться на расстоянии от примерно 0,1 мм до примерно 149 мм от нулевой точки, измеренном по оси X или Y. Длины, указанные поз. 2518 и поз. 2509, представляют самые дальние расстояния центра кластера по оси X и Y, соответственно. Длины, указанные поз. 2517 и поз. 2512, представляют самые близкие расстояния центра кластера по оси X и Y, соответственно. В некоторых вариантах осуществления кластеры организованы таким образом, что имеется повторяющееся расстояние между двумя кластерами. Как показано поз. 2507 и поз. 2522, расстояние между двумя кластерами может составлять от около 0,3 мм до около 9 мм. В некоторых вариантах осуществления расстояние между двумя кластерами может составлять около или по меньшей мере около 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм. 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм или 9 мм. В некоторых вариантах осуществления расстояние между двумя кластерами может составлять около или не более чем около 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм или 0,3 мм. Расстояние между двумя кластерами может изменяться в диапазоне 0,3-9 мм, 0,4-8 мм, 0,5-7 мм, 0,6-6 мм, 0,7-5 мм, 0,7-4 мм, 0,8-3 мм или 0,9-2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,8 мм – 2 мм.

Отметки совмещения могут быть созданы на микрожидкостных устройствах, описанных здесь, для содействия выравниванию таких устройств с другими компонентами системы. Микрожидкостные устройства согласно изобретению могут содержать одну или несколько отметок совмещения, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более отметок совмещения. По существу плоская часть субстрата иллюстративного микрожидкостного устройства, показанного на фигуре 25D, содержит три отметки совмещения, полезные для выравнивания устройства с другими компонентами системы. Отметка совмещения может быть расположена в любом положении в пределах по существу плоской части субстрата микрожидкостного устройства. Как показано поз. 2513 и поз. 2516, отметки совмещения могут быть расположены вблизи начальной точки, при этом отметка совмещения находится ближе к начальной точке, чем любой кластер. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена около края части субстрата, как показано поз. 2511 и поз. 2521, где расстояние от края указано поз. 2510 и поз. 2520, соответственно. Отметка совмещения может быть расположена на расстоянии от около 0,1 мм до около 10 мм от края части субстрата. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена на расстоянии около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм. 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2.6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм, 9 мм или 10 мм от края части субстрата. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена на расстоянии около или не более чем около 10 мм, 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм от части субстрата. Отметка совмещения может быть расположена на расстоянии в диапазоне 0,1-10 мм, 0,2-9 мм, 0,3-8 мм, 0,4-7 мм, 0,5-6 мм, 0,1-6 мм, 0,2-5 мм, 0,3-4 мм, 0,4-3 мм или 0.5-2 мм от края субстрата. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 мм – 5 мм. Отметка совмещения может быть расположена на близком расстоянии от кластера, где приведенные в качестве примера расстояния по осям X и Y указаны поз. 2515 и 2514, соответственно. В некоторых вариантах осуществления расстояние между кластером и отметкой совмещения составляет около или по меньшей мере около 0,001 мм, 0,005 мм,

0,01 мм, 0,02 мм, 0,03 мм, 0,04 мм, 0,05 мм, 0,06 мм, 0,07 мм, 0,08 мм, 0,09 мм, 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,5 мм, 1,7 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,5 мм, 2,7 мм, 3 мм, 3,5 мм, 4 мм, 4,5 мм, 5 мм, 5,5 мм, 6 мм, 6,5 мм или 8 мм. В некоторых вариантах осуществления расстояние между кластером и отметкой совмещения составляет около или не более чем около 8 мм, 6,5 мм, 6 мм, 5,5 мм, 5 мм, 4,5 мм, 4 мм, 3,5 мм, 3 мм, 2,7 мм, 2,5 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,7 мм, 1,5 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм, 0,1 мм, 0,09 мм, 0,08 мм, 0,07 мм, 0,06 мм, 0,05 мм, 0,04 мм, 0,03 мм, 0,02 мм, 0,01 мм, 0,005 мм или 0,001 мм. Расстояние между кластером и отметкой совмещения может находиться в диапазоне 0,001-8 мм, 0,01-7 мм, 0,05-6 мм, 0,1-5 мм, 0,5-4 мм, 0,6-3 мм, 0,7-2 мм или 0,8-1,7 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,5 мм – 2 мм.

На фигуре 25E показано поперечное сечение по существу плоской части субстрата иллюстративного микрожидкостного устройства, показанного на фигуре 25D. В поперечном разрезе показан ряд из 11 группировок, каждая из которых содержит кластер группировок, при этом каждая группировка содержит множество вторых каналов, проходящих из первого канала. Как показано поз. 2523, общая длина группировки может составлять от около 0,05 мм до около 5 мм. В некоторых вариантах осуществления общая длина группировки составляет около или по меньшей мере около 0,05 мм, 0,06 мм, 0,07 мм, 0,08 мм, 0,09 мм, 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,5 мм, 1,7 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,5 мм, 2,7 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,5 мм, 3,7 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,5 мм, 4,7 мм или 5 мм. В некоторых вариантах осуществления общая длина группировки составляет около или не более чем около 5 мм, 4,7 мм, 4,5 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,7 мм, 3,5 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,7 мм, 2,5 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,7 мм, 1,5 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм, 0,1 мм, 0,09 мм, 0,08 мм, 0,07 мм, 0,06 мм или 0,05 мм, или меньше. Общая длина группировки может находиться в диапазоне 0,05-5 мм, 0,06-4 мм, 0,07-3 мм, 0,08-2 мм, 0,09-1 мм, 0,1-0,9 мм, 0,2-0,8 мм или 0,3-0,7 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 мм – 0,7 мм. В некоторых вариантах осуществления микрожидкостное устройство может содержать место для метки или серийной метки, как проиллюстрировано на фигуре 25F, показывающей типовую схему расположения кластеров в микрожидкостном устройстве. Метка может быть расположена около края субстрата, как показано расстоянием, указанным поз. 2603. В некоторых вариантах осуществления метка расположена на расстоянии от около 0,1 мм до около 10 мм от края

субстрата. В некоторых вариантах осуществления метка расположена на расстоянии около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм, 9 мм или 10 мм от края субстрата. В некоторых вариантах осуществления метка расположена на расстоянии около или не более чем около 10 мм, 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм от края.субстрата. Расстояние может находиться в диапазоне 0,1-10 мм, 0,2-9 мм, 0,3-8 мм, 0,4-7 мм, 0,5-6 мм, 0,6-5 мм, 0,7-4 мм, 0,8-3 мм, 0,9-2 мм или 1,5 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,5 мм – 2 мм. Метка может начинаться на расстоянии от около 0,1 мм до около 20 мм от начальной точки, как показано поз. 2602. Метка может иметь длину от около 1 мм до около 32 мм, как показано поз. 2601.

**Пластины со сквозными межсоединениями большого размера для синтеза олигонуклеотидов высокой массы**

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает способы и системы для путей контролируемого течения и переноса масс для синтеза олигонуклеотидов на поверхности. Преимущества систем и способов, представленных здесь, обеспечивают улучшение в отношении структуры для контролируемого и равномерного распределения путей переноса масс, времени химического воздействия и эффективности промывки во время синтеза олигонуклеотидов. Кроме того, описанные здесь способы и системы обеспечивают увеличенную эффективность вытеснения, например, путем обеспечения достаточного объема для растущего олигонуклеотида, при этом исключенный объем растущего олигонуклеотида занимает не более чем 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее первоначально доступного объема, который является доступным или подходящим для растущих олигонулеотидов. Кроме того, описанные здесь способы и системы обеспечивают эффективную структуру для роста олигомеров длиной от 80-mer до 100-, 120-, 150-, 175-, 200-, 225-, 250-, 275-, 300-, 325-, 350-, 375-, 400-, 425-, 450-, 475-, 500-mer или более.

Таким образом, описанные здесь способы и системы обеспечивают растворы для достижения этих преимуществ, например, серий малых параллельных каналов. Структуры, такие как малые сквозные межсоединения, могут быть использованы для заполнения структур меньшего размера, таких как структуры, обнаруживаемые в «револьверном рисунке» (фигура 56B). Структуры, имеющие с внутренней стороны поверхность с низкой поверхностной энергией, могут вызывать задержку газа на стенках. Пузырьки газа могут нарушать скорость и равномерность течения во время циклов синтеза олигонулеотидов или последующих водных стадий, используемых для сборки генов. Таким образом, структуры, которые адаптированы для синтеза олигонуклеотидов, могут содержать поверхность с увеличенной поверхностной энергией, как описано в других местах в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления в способах и системах согласно изобретению используют обработку кремниевой пластины для изготовления субстратов для синтеза олигонуклеотидов. Такие субстраты могут содержать серии участков, доступных для осаждения материала с помощью устройства для осаждения, такого как струйное устройство Inkjet. Субстраты, изготовленные в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения, могут способствовать стадиям заполнения химическими реагентами, которые распределяются во множество таких участков черех их поверхность. В различных вариантах осуществления устройства обеспечивают инжекцию реагентов на водной основе и их объединение в пул в большом рельефном объеме (фигура 61).

В различных вариантах осуществления такие устройства для синтеза олигонуклеотидов со сквозными межсоединениями большого размера созданы на стандартной кремниевой пластине «Silicon on Insulator» (SOI) (кремний на изоляторе). Устройство для синтеза олигонуклеотидов может иметь общую ширину по меньшей мере или по меньшей мере около 10 микрометров (мкм), 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм, 16 мкм, 17 мкм, 18 мкм, 19 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 300 мкм, 350 мкм, 400 мкм, 450 мкм, 500 мкм, 550 мкм, 600 мкм, 650 мкм, 700 мкм,750 мкм, 800 мкм, 850 мкм, 900 мкм, 950 мкм, 1000 мкм или больше. Устройство для синтеза олигонуклеотидов может иметь общую ширину не более или не более чем около 1000 мкм, 900 мкм, 850 мкм, 750 мкм, 700 мкм, 650 мкм, 600 мкм, 550 мкм, 500 мкм, 450 мкм, 400 мкм, 350 мкм, 300 мкм, 250 мкм, 200 мкм, 190 мкм, 180 мкм, 170 мкм, 160 мкм, 150 мкм, 140 мкм, 130 мкм, 120 мкм, 110 мкм, 100 мкм, 95 мкм, 90 мкм, 85 мкм,

80 мкм, 75 мкм, 70 мкм, 65 мкм, 60 мкм, 55 мкм, 50 мкм, 45 мкм, 40 мкм, 35 мкм, 30 мкм, 25 мкм, 20 мкм, 19 мкм, 18 мкм, 17 мкм, 16 мкм, 15 мкм, 14 мкм, 13 мкм, 12 мкм, 11 мкм, 10 мкм или меньше. Устройство для синтеза олигонуклеотидов может иметь общую ширину в диапазоне 10-1000 мкм, 11-950 мкм, 12-900 мкм, 13-850 мкм, 14-800 мкм, 15-750 мкм, 16-700 мкм, 17-650 мкм, 18-600 мкм, 19- 550 мкм, 20-500 мкм, 25-450 мкм, 30-400 мкм, 35-350 мкм, 40-300 мкм, 45-250 мкм, 50-200 мкм, 55-150 мкм, 60-140 мкм, 65-130 мкм, 70-120 мкм, 75- 110 мкм, 70-100 мкм, 75- 80 мкм, 85-90 мкм или 90-95 мкм. Специалисту в данной области будет понятно, что общая ширина устройства для синтеза олигонуклеотидов может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 20-80 мкм. Общая ширина устройства для синтеза олигонуклеотидов может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного значениями, служащими в качестве предельных значений диапазона. Общая ширина может подразделяться на несущий толстый слой кремния «handle layer» и рабочий тонкий слой «device layer». Все устройство или его части могут быть покрыты слоем диоксида кремния. Слой диоксида кремния может иметь толщину по меньшей мере или по меньшей мере около 1 нм, 2 нм, 3 нм, 4 нм, 5 нм, 6 нм, 7 нм, 8 нм, 9 нм, 10 нм, 15 нм, 20 нм, 25 нм, 30 нм, 35 нм, 40 нм, 45 нм, 50 нм, 55 нм, 60 нм, 65 нм, 70 нм, 75 нм, 80 нм, 85 нм, 90 нм, 95 нм, 100 нм, 125 нм, 150 нм, 175 нм, 200 нм, 300 нм, 400 нм, 500 нм, 1 мкм, 1,1 мкм, 1,2 мкм, 1,3 мкм, 1,4 мкм, 1,5 мкм, 1,6 мкм, 1,7 мкм, 1,8 мкм, 1,9 мкм, 2,0 мкм или больше. Слой диоксида кремния может иметь толщину не более или не более чем около 2,0 мкм, 1,9 мкм, 1,8 мкм, 1,7 мкм, 1,6 мкм, 1,5 мкм, 1,4 мкм, 1,3 мкм, 1,2 мкм, 1,1 мкм, 1,0 мкм, 500 нм, 400 нм, 300 нм, 200 нм, 175 нм, 150 нм, 125 нм, 100 нм, 95 нм, 90 нм, 85 нм, 80 нм, 75 нм, 70 нм, 65 нм, 60 нм, 55 нм, 50 нм, 45 нм, 40 нм, 35 нм, 30 нм, 25 нм, 20 нм, 15 нм, 10 нм, 9 нм, 8, нм, 7 нм, 6 нм, 5 нм, 4 нм, 3 нм, 2 нм, 1 нм или меньше. Слой диоксида кремния может иметь толщину в диапазоне 1,0 нм -2,0 мкм, 1,1-1,9 мкм, 1,2-1,8 нм, 1,3-1,7 мкм, 1,4-1,6 мкм. Специалисту в данной области будет понятно, что слой диоксида кремния может иметь толщину, которая находится в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 1,5-1,9 мкм. Слой диоксида кремния может иметь толщину, которая находится в пределах любого диапазона, определенного любыми из значений, служащих в качестве предельных значений указанного диапазона.

Рабочий тонкий слой может содержать множество структур, подходящих для роста олигонуклеотидов, как описано в других местах в настоящем документе, например, множество малых отверстий (фигура 61). Рабочий тонкий слой может иметь толщину, которая составляет по меньшей мере или по меньшей мере около 1 микрометра (мкм), 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14

мкм, 15 мкм, 16 мкм, 17 мкм, 18 мкм, 19 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм, 200 мкм, 300 мкм, 400 мкм, 500 мкм. Рабочий тонкий слой может иметь толщину диапазоне 1- 100 мкм, 2- 95 мкм, 3- 90 мкм, 4- 85 мкм, 5-80 мкм, 6-75 мкм, 7-70 мкм, 8-65 мкм, 9-60 мкм, 10-55 мкм, 11-50 мкм, 12-45 мкм, 13-40 мкм, 14-35 мкм, 15-30 мкм, 16-25 мкм, 17- 20 мкм, 18-19 мкм. Специалисту в данной области будет понятно, что толщина тонкого рабочего слоя может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например 20-60 мкм. Толщина тонкого рабочего слоя может находиться в любом диапазоне, определенном любыми из значений, служащих в качестве предельных значений диапазона. Несущий толстый слой и/или тонкий рабочий слой могут содержать глубоко расположенные элементы. Такие глубоко расположенные элементы могут быть изготовлены с использованием подходящих MEMS-технологий, таких как глубокое реактивное ионное травление. Серии травителей можно использовать для конструирования устройства с желаемой геометрией. Один из таких травителей может воздействовать дольше и проникать в изоляционный слой. Таким образом, могут быть сконтруированы каналы, которые проходят по всей ширине устройства. Такие каналы могут быть использованы для прохождения жидкости от одной до другой поверхности субстрата, такого как по существу плоский субстрат.

В некоторых вариантах осуществления тонкий рабочий слой содержит от не менее двух до 500 участков, от не менее 2 до около 250 участков, от не менее 2 до около 200 участков, от не менее 2 до около 175 участков, от не менее 2 до около 150 участков, от не менее 2 до около 125 участков, от не менее 2 до около 100 участков, от не менее 2 до около 75 участков, от не менее 2 до около 50 участков, от не менее 2 до около 25 участков, от не менее 2 до около 250 участков, которые проникают через рабочий тонкий слой. В некоторых вариантах осуществления рабочий тонкий слой содержит по меньшей мере или по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500 или более участков. Специалисту в данной области будет понятно, что количество участков, которые проникают через рабочий тонкий слой, может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 75-150 участков. Рабочий тонкий слой может иметь толщину по меньшей мере или по меньшей мере около 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм, 16 мкм, 17 мкм, 18 мкм, 19 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм или больше. Рабочий тонкий слой может иметь толщину не более или не более чем около 100 мкм, 95 мкм, 90 мкм, 85 мкм,

80 мкм, 75 мкм, 70 мкм, 65 мкм, 60 мкм, 55 мкм, 50 мкм, 45 мкм, 40 мкм, 35 мкм, 30 мкм, 25 мкм, 20 мкм, 19 мкм, 18 мкм, 17 мкм, 16 мкм, 15 мкм, 14 мкм, 13 мкм, 12 мкм, 11 мкм, 10 мкм, 9 мкм, 8 мкм, 7 мкм, 6 мкм, 5 мкм, 4 мкм, 3 мкм, 2 мкм, 1 мкм или меньше. Рабочий тонкий слой может иметь любую толщину, которая находится в диапазоне 1-100 мкм, 2-95 мкм, 3-90 мкм, 4-85 мкм, 5-80 мкм, 6-75 мкм, 7-70 мкм, 8-65 мкм, 9-60 мкм, 10-55 мкм, 11-50 мкм, 12-45 мкм, 13-40 мкм, 14-35 мкм, 15-30 мкм, 16-25 мкм, 17-20 мкм, 18-19 мкм. Специалисту в данной области будет понятно, что рабочий тонкий слой может иметь любую толщину, которая находится в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 4-100 мкм.

Толщина рабочего тонкого слоя может находиться в любом диапазоне, определенном любыми значениями, служащими в качестве предельных значений указанного диапазона. Несущий толстый слой может площадь большего размера, протравленную в пластине, которая граничит с элементами в рабочем тонком слое. Несущий толстый слой может иметь толщину по меньшей мере или по меньшей мере около 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм, 16 мкм, 17 мкм, 18 мкм, 19 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 300 мкм, 350 мкм, 400 мкм, 450 мкм, 500 мкм, 550 мкм, 600 мкм, 650 мкм, 700 мкм,750 мкм, 800 мкм, 850 мкм, 900 мкм, 950 мкм, 1000 мкм или больше. Несущий толстый слой может иметь толщину не более или не более чем около 1000 мкм, 950 мкм, 900 мкм, 850 мкм, 800 мкм, 750 мкм, 700 мкм, 650 мкм, 600 мкм, 550 мкм, 500 мкм, 450 мкм, 400 мкм, 350 мкм, 300 мкм, 250 мкм, 200 мкм, 150 мкм, 100 мкм, 95 мкм, 90 мкм, 85 мкм, 80 мкм, 75 мкм, 70 мкм, 65 мкм, 60 мкм, 55 мкм, 50 мкм, 45 мкм, 40 мкм, 30 мкм, 25 мкм, 20 мкм, 19 мкм, 18 мкм, 17 мкм, 16 мкм, 15 мкм, 14 мкм, 13 мкм, 12 мкм, 11 мкм, 10 мкм, 9 мкм, 8 мкм, 7 мкм, 6 мкм, 5 мкм, 4 мкм, 3 мкм, 2 мкм, 1 мкм или меньше. Несущий толстый слой может иметь любую толщину в диапазоне 10-1000 мкм,11-950 мкм, 12-900 мкм, 13-850 мкм, 14-800 мкм, 15-750 мкм, 16-700 мкм, 17-650 мкм, 18-600 мкм, 19- 550 мкм, 20-500 мкм, 25-450 мкм, 30-400 мкм, 35-350 мкм, 40-300 мкм, 45-250 мкм, 50-200 мкм, 55-150 мкм,6 0-140 мкм, 65-130 мкм, 70-120 мкм, 75- 110 мкм, 70-100 мкм, 75- 80 мкм, 85-90 мкм или 90-95 мкм. Специалисту в данной области будет понятно, что Несущий толстый слой может иметь толщину, которая находится в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 20-350 мкм. Толщина несущего толстого слоя может находиться в любом диапазоне, определенном любыми из значений, служащих в качестве предельных значений указанного диапазона.

Протравленные области в несущем толстом слое могут формировать подобные лункам структуры, углубленные в субстрат. В некоторых вариантах осуществления протравленные области в пределах несущего толстого слоя могут иметь толщину по меньшей мере или по меньшей мере около 100 мкм, 101 мкм, 102 мкм, 103 мкм, 104 мкм, 105 мкм, 106 мкм, 107 мкм, 108 мкм, 109 мкм,110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 300 мкм, 350 мкм, 400 мкм, 450 мкм, 500 мкм, 550 мкм, 600 мкм, 650 мкм, 700 мкм,750 мкм, 800 мкм, 850 мкм, 900 мкм, 950 мкм или 1000 мкм или больше. Протравленные области в пределах несущего толстого слоя могут иметь любую толщину, составляющую не более или не более чем около 1000 мкм, 950 мкм, 900 мкм, 850 мкм, 800 мкм, 750 мкм, 700 мкм, 650 мкм, 600 мкм, 550 мкм, 500 мкм, 450 мкм, 400 мкм, 350 мкм, 300 мкм, 250 мкм, 200 мкм, 190 мкм, 180 мкм, 170 мкм, 160 мкм,150 мкм, 140 мкм, 130 мкм, 120 мкм, 110 мкм, 109 мкм, 108 мкм, 107 мкм, 106 мкм, 105 мкм, 104 мкм, 103 мкм, 102 мкм, 101 мкм, 100 мкм или меньше. Протравленные области в пределах несущего толстого слоя могут иметь любую толщину в диапазоне 100-1000 мкм, 101-950 мкм, 102- 900 мкм, 103-850 мкм, 104-800 мкм, 105-750 мкм, 106-700 мкм, 105-650 мкм, 106-600 мкм, 107-550 мкм, 108-500 мкм, 109-450 мкм, 110-400 мкм, 120-350 мкм, 130-300 мкм, 140-250 мкм, 150-200 мкм, 160-190 мкм, 170-180 мкм. Специалисту в данной области будет понятно, что несущий толстый слой может иметь толщину, которая находится в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 200-300 мкм.

Форма протравленных областей в пределах несущего слоя слоя может представлять собой прямоугольную или криволинейную.

В некоторых вариантах осуществления протравленные области большого размера в пределах несущего толстого слоя обеспечивают легкий переход из газовой фазы в жидкую фазу во время цикла синтеза олигонуклеотидов и/или во время высвобождения олигонуклеотидов, а именно высвобождения олигонуклеотидов в газовую фазу.

**Субстраты с участками синтеза с высокой удельной поверхностью**

В различных вариантах осуществления описанные здесь способы и системы относятся к устройствам олигонуклеотидного синтеза, предназначенным для синтеза высоких масс олигонуклеотидов. Синтез может осуществляться в параллельном режиме. Например, параллельно может быть синтезировано по меньшей мере или по меньшей мере около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 1000, 10000, 50000, 100000 или более олигонуклеотидов. Общее количество олигонуклеотидов, которое может быть синтезировано параллельно, может находиться в

диапазоне 2-100000, 3-50000, 4-10000, 5-1000, 6-900, 7-850, 8-800, 9-750, 10-700, 11-650, 12-600, 13-550, 14-500, 15-450, 16-400, 17-350, 18-300, 19-250, 20-200, 21-150,22-100, 23-50, 24-45, 25-40, 30-35. Специалистам в данной области будет понятно, что общее количество олигонуклеотидов, синтезированных параллельно, может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 25-100. Общее количество олигонуклеотидов, синтезированных параллельно, может находиться в пределах любого диапазона, определенного любыми из значений, служащих в качестве предельных значений диапазона. Общая молекулярная масса олигонуклеотидов, синтезированных в пределах устройства, или молекулярная масса каждого из олигонуклеотидов может составлять по меньшей мере или по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000 пикомолей или более. Длина каждого олигонуклеотида или средняя длина олигонуклеотидов в пределах устройства может составлять по меньшей мере или по меньшей мере примерно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 пикомолей или более. Длина каждого из олигонуклеотидов или средняя длина олигонуклеотидов в пределах устройства может составлять не более или более чем примерно 500, 400, 300, 200, 150, 100, 50, 45, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 нуклеотидов или меньше. Длина каждого из олигонуклеотидов или средняя длина олигонуклеотидов в пределах устройства может находиться в диапазоне 10-500, 9-400, 11-300, 12-200, 13-150, 14-100, 15-50, 16-45, 17-40, 18-35, 19-25. Специалисту в данной области будет понятно, что длина каждого из олигонуклеотидов или средняя длина олигонуклеотидов в пределах устройства может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 100-300. Длина каждого из олигонуклеотидов или средняя длина олигонуклеотидов в пределах устройства может находиться в пределах любого диапазона, определенного любыми из значений, служащих в качестве предельных значений диапазона.

В различных вариантах осуществления высокие удельные поверхности достигаются путем структурирования поверхности субстрата с приподнятыми и/или пониженными элементами, как проиллюстрировано на фигуре 62. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь острые или закругленные края, и могут иметь поперечное сечение (ширину) любой желаемой геометрической формы, такой как прямоугольная, круглая и т.п. Они могут формировать каналы по всей поверхности субстрата или его части. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь отношение сторон по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1:20, 2:20, 3:20, 4:20, 5:20, 6:20, 10:20, 15:20, 20:20, 20:10, 20:5, 20:1 или более. Приподнятые или пониженные элементы

могут иметь отношение сторон не более или не более чем примерно 20:1, 20:5, 20:10, 20:20, 20:15, 20:10, 20:10, 6:20, 5:20, 4:20, 3:20, 2:20, 1:20 или меньше. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь отношение сторон, которое находится в диапазоне 1:20-20:1, 2:20-20:5, 3:20-20:10, 4-20:20:15, 5:20-20:20, 6:20-20:20. Специалисту в данной области будет понятно, что приподнятые или пониженные элементы могут иметь отношение сторон, которое может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 3:20-4:20. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь отношение сторон, которое находится в пределах любого диапазоне, определенного любыми из значений, служащих в качестве предельных значений указанного диапазона.

Приподнятые или пониженные элементы могут иметь поперечное сечение по меньшей мере или по меньшей мере примерно 10 нанометров (нм), 11 нм, 12 нм, 20 нм, 30 нм, 100 нм, 500 нм, 1000 нм, 10000 нм, 100000 нм, 1000000 нм или более. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь поперечное сечение по меньшей мере или не более или не более чем примерно 1000000 нм, 100000 нм, 10000 нм, 1000 нм, 500 нм, 100 нм, 30 нм, 20 нм, 12 нм, 11 нм, 10 нм или меньше. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь поперечное сечение, которое находится в диапазоне 10 нм-1000000 нм, 11 нм- 100000 нм, 12 нм- 10000 нм, 20 нм- 1000 нм, 30 нм- 500 нм. Специалисту в данной области будет понятно, что приподнятые или пониженные элементы могут иметь поперечное сечение, которое может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 10 нм-100 нм. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь поперечное сечение, которое находится в пределах любого диапазоне, определенного любыми значениями, служащими в качестве предельных значений диапазона.

Приподнятые или пониженные элементы могут иметь высоту по меньшей мере или по меньшей мере примерно 10 нанометров (нм), 11 нм, 12 нм, 20 нм, 30 нм, 100 нм, 500 нм, 1000 нм, 10000 нм, 100000 нм, 1000000 нм или более. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь высоту не более или не более чем примерно 1000000 нанометров (нм), 100000 нм, 10000 нм, 1000 нм, 500 нм, 100 нм, 30 нм, 20 нм, 12 нм, 11 нм, 10 нм или менее. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь высоту, которая находится в диапазоне 10 нм-1000000 нм, 11 нм- 100000 нм, 12 нм- 10000 нм, 20 нм- 1000 нм, 30 нм-500 нм. Специалисту в данной области будет понятно, что приподнятые или пониженные элементы могут иметь высоту, которая может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 100 нм – 1000 нм. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь высоту, которая может находиться в пределах любого

диапазона, определенного любыми значениями, служащими в качестве предельных значений указанного диапазона. Индивидуальные приподнятые или пониженные элементы могут быть отделены от соседнего приподнятого или пониженного элемента расстоянием, которое составляет по меньшей мере или по меньшей мере примерно 5 нанометров (нм), 10 нм, 11 нм, 12 нм, 20 нм, 30 нм, 100 нм, 500 нм, 1000 нм, 10000 нм, 100000 нм, 1000000 нм или больше. Индивидуальные приподнятые или пониженные элементы могут быть отделены от соседнего приподнятого или пониженного элемента расстоянием, которое составляет не более или не более чем примерно 1000000 нанометров (нм), 100000 нм, 10000 нм, 1000 нм, 500 нм, 100 нм, 30 нм, 20 нм, 12 нм, 11 нм, 10 нм, 5 нм или меньше. Приподнятые или пониженные элементы могут иметь высоту, которая находится в диапазоне 5 -1000000 нм, 10 - 100000 нм, 11 - 10000 нм, 12 - 1000 нм, 20 - 500 нм, 30 -100 нм. Специалисту в данной области будет понятно, что приподнятые или пониженные элементы могут быть отделены от соседнего приподнятого или пониженного элемента расстоянием, которое может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 100-1000 нм. Индивидуальные приподнятые или пониженные элементы могут быть отделены от соседнего приподнятого или пониженного элемента расстоянием, которое может находиться в пределах любого диапазона, определенного любыми из значений, служащих в качестве предельных значений диапазона. В некоторых вариантах осуществления расстояние между двумя приподнятыми или пониженными элементами по меньшей мере или по меньшей мере примерно в 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 раз или более превышает поперечное сечение (ширину) или среднее поперечное сечение приподнятых или пониженных элементов. Расстояние между двумя приподнятыми или пониженными элементами не более или не более чем примерно в 10,0, 5,0, 3,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,2, 0,1 раз или менее превышает поперечное сечение (ширину) или среднее поперечное сечение приподнятых или пониженных элементов. Расстояние между двумя приподнятыми или пониженными элементами может превышать в 0,1-10, 0,2-5,0, 1,0-3,0 раз поперечное сечение (ширину) или среднее поперечное сечение приподнятых или пониженных элементов. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние между двумя приподнятыми или пониженными элементами может превышать в любое число раз поперечное сечение (ширину) или среднее поперечное сечение приподнятых или пониженных элементов в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, в 5-10 раз. Расстояние между двумя приподнятыми или пониженными элементами может находиться в любом диапазоне, определенном любыми их этих значений, служащих в качестве пределов диапазона.

В некоторых вариантах осуществления группы приподнятых или пониженных элементов отделены друг от друга. Периметры групп приподнятых или пониженных элементов могут характеризоваться различным типом структурного элемента или избирательным функционализированием. Группа приподнятых или пониженных элементов может быть предназначена для синтеза единичного олигонуклеотида. Группа приподнятых или пониженных элементов может занимать площадь, которая составляет в поперечном сечении по меньшей мере или по меньшей мере примерно 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм, 20 мкм, 50 мкм, 70 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 150 мкм, 200 мкм или больше. Группа приподнятых или пониженных элементов может занимать площадь, которая составляет в поперечном сечении не более или не более чем примерно 200 мкм, 150 мкм, 100 мкм, 90 мкм, 70 мкм, 50 мкм, 20 мкм, 15 мкм, 14 мкм, 13 мкм, 12 мкм, 11 мкм, 10 мкм или меньше. Группа приподнятых или пониженных элементов может занимать площадь, которая в поперечном сечении находится в диапазоне 10 - 200 мкм, 11 -150 мкм, 12 - 100 мкм, 13 - 90 мкм, 14 - 70 мкм, 15 - 50 мкм, 13 - 20 мкм. Специалисту в данной области будет понятно, что группа приподнятых или пониженных элементов может занимать площадь, которая находится в пределах любого диапазона, ограниченном любыми из этих значений, например, 12 – 200 мкм. Группа приподнятых или пониженных элементов может занимать площадь, которая находится в пределах любого диапазона, определенного любыми из значений, служащих в качестве предельных значений диапазона.

В различных вариантах осуществления приподнятые или пониженные элементы на субстрате увеличивают общую доступную площадь для синтеза олигонуклеотидов по меньшей мере или по меньшей мере примерно в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500, 1000 раз или более. Приподнятые или пониженные элементы на субстрате увеличивают общую доступную площадь для синтеза олигонуклеотидов в 1,1-1000, 1,2-500, 1,3-200, 1,4-100, 2-50, 5-10 раз. Специалисту в данной области будет понятно, что приподнятые или пониженные элементы на субстрате могут увеличивать общую доступную площадь для синтеза олигонулеотидов в разы в диапазоне, ограниченном любыми из этих значений, например, в 20-80 раз. Приподнятые или пониженные элементы на субстрате увеличивают общую доступную площадь для синтеза олигонуклеотидов в количество раз, которое может находиться в пределах любого диапазона, определенного любыми из этих значений, служащих в качестве предельных значений указанного диапазона.

Способы и системы согласно изобретению, в которых используются большие поверхности для олигонуклеотидного синтеза, обеспечивают параллельный синтез большого числа олигонуклеотидов с длительностью циклов добавления нуклеотидов не

более или не более чем около 20 мин, 15 мин, 14 мин, 13 мин, 12 мин, 11 мин, 10 мин, 1 мин, 40 сек, 30 сек или меньше. Способы и системы согласно изобретению, в которых используются большие поверхности для олигонуклеотидного синтеза, обеспечивают параллельный синтез большого числа олигонуклеотидов с длительностью циклов добавления нуклеотидов в интервале 30 сек – 20 мин, 40 сек – 10 мин, 1 мин – 10 мин. Специалисту в данной области будет понятно, что способы и системы согласно изобретению, в которых используются большие поверхности для олигонуклеотидного синтеза, обеспечивают параллельный синтез большого числа олигонуклеотидов с длительностью циклов добавления нуклеотидов в интервале любых из этих значений, например, 30 сек – 10 мин. Способы и системы согласно изобретению, в которых используются большие поверхности для олигонуклеотидного синтеза, обеспечивают параллельный синтез большого числа олигонуклеотидов с длительностью циклов добавления нуклеотидов в пределах любого интервала, определенного любыми из значений, служащих в качестве предельных значений.

Общая частота ошибок или количество ошибок в отношении отдельных типов ошибок, таких как делеции, вставки или замены, для каждого синтезированного на субстрате олигонуклеотида, по меньшей мере для 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% или более синтезированных на субстрате олигонуклеотидов, или среднего числа на субстрат может составлять не более или не более чем примерно 1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000, 1:60000, 1:70000, 1:80000, 1:90000, 1:1000000 или меньше. Общая частота ошибок или количество ошибок в отношении отдельных типов ошибок, таких как делеции, вставки или замены, для каждого синтезированного на субстрате олигонуклеотида, по меньшей мере для 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% или более синтезированных на субстрате олигонуклеотидов, или среднего числа на субстрат может находиться в диапазоне между 1:100 и 1:10000, 1:500 и 1:30000. Специалисту в данной области будет понятно, что общая частота ошибок или общее количество ошибок в отношении отдельных типов ошибок, таких как делеции, вставки или замены, для каждого синтезированного на субстрате олигонуклеотида, по меньшей мере для 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% или более синтезированных на субстрате олигонуклеотидов, или среднего числа на субстрат может находиться в пределах любых из этих значений, например, между 1:500 и 1:10000. Общая частота ошибок или общее количество ошибок в отношении отдельных типов ошибок, таких как делеции, вставки или замены, для каждого синтезированного на субстрате олигонуклеотида, по меньшей мере для 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%,

95%, 98%, 99%, 99,5% или более синтезированных на субстрате олигонуклеотидов, или среднее число на субстрат может находиться в пределах любого диапазона, определенного любыми из этих значений, служащих в качестве предельных значений указанного диапазона.

Стандартные процессы обработки кремниевой пластины могут быть использованы для создания субстрата, который будет иметь высокую удельную поверхность, как описано выше, и регулируемое течение, обеспечивая быструю смену химического воздействия. Может быть создан субстрат для олигонуклеотидного синтеза, содержащий серии структур, отделенных друг от друга расстоянием, достаточным для обеспечения синтеза олигомерных цепей, больше или равных по меньшей мере, или равных по меньшей мере около 20 mer, 25 mer, 30 mer, 50 mer, 100 mer, 200 mer, 250 mer, 300 mer, 400 mer, 500 mer или более, без значительного влияния на общий размер канала или пор, например, за счет эффектов исключенного объема по мере роста олигонуклеотидов. Может быть создан субстрат для олигонуклеотидного синтеза, содержащий серии структур, отделенных друг от друга расстоянием, достаточным для обеспечения синтеза олигомерных цепей больше, не более или не более чем около 500 mer, 200 mer, 100 mer, 50 mer, 30 mer, 25 mer, 20 mer или меньше, без значительного влияния на общий размер канала или пор, например, за счет эффектов исключенного объема по мере роста олигонуклеотидов. Может быть создан субстрат для олигонуклеотидного синтеза, содержащий серии структур, отделенных друг от друга расстоянием, достаточным для обеспечения синтеза олигомерных цепей по меньшей мере или по меньшей мере около 20 mer, 50 mer, 75 mer, 100 mer, 125 mer, 150 mer, 175 mer , 200 mer, 250 mer, 300 mer, 350 mer, 400 mer, 500 mer или более, без значительного влияния на общий размер канала или пор, например, за счет эффектов исключенного объема по мере роста олигонуклеотидов. Специалисту в данной области будет понятно, что может быть создан субстрат для олигонуклеотидного синтеза, содержащий серии структур, отделенных друг от друга расстоянием, достаточным для обеспечения синтеза олигомерных цепей длиной больше чем между любыми из этих значений, например, 20-300 mer 200 mer, без значительного влияния на общий размер канала или пор, например, за счет эффектов исключенного объема по мере роста олигонуклеотидов.

На фигуре 62 показан иллюстративный субстрат в соответствии с вариантами осуществления изобретения с массивом структур. Расстояние между элементами может составлять больше чем, по меньшей мере или по меньшей мере около 5 нм, 10 нм, 20 нм, 100 нм, 1000 нм, 10000 нм, 100000 нм, 1000000 нм или более. Расстояние между элементами может быть больше чем, не более или не более чем около 1000000 нм, 100000

нм, 10000 нм, 1000 нм, 100 нм, 20 нм, 10 нм, 5 нм или меньше. Расстояние между элементами может находиться в диапазоне 5-1000000 нм, 10-100000 нм, 20-10000 нм, 100-1000 нм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние между элементами может находиться в диапазоне любых из этих значений, например, 20-1000 нм. Расстояние между элементами может находиться в любом диапазоне, определенном любыми из этих значений, служащих в качестве предельных значений указанного диапазона. В одном варианте осуществления расстояние между элементами составляет больше, чем 200 нм. Элементы могут быть созданы с помощью любых подходящих MEMS-процессов, описанных в других местах в настоящем документе или известных из других источников в данной области, таких как процесс, в котором используется регулируемый по времени процесс реактивного ионного травления. С помощью таких технологических процессов изготовления полупроводников можно получать элементы с размерами меньше, чем 200 нм, 100 нм, 50 нм, 40 нм, 30 нм, 25 нм, 20 нм, 10 нм, 5 нм или менее. Специалистам в данной области будет понятно, что размер элемента меньше, чем 200 нм может находиться в пределах любых из этих значений, например, 20-100 нм. Размер элемента может находиться в диапазоне, определенном любыми из этих значений, служащих в качестве предельных значений указанного диапазона. В одном варианте осуществления массив, состоящий из элементов шириной 40 мкм, подвергали травлению на глубину 30 мкм, что примерно в два раза увеличивает площадь поверхности, доступную для синтеза.

Массивы приподнятых или пониженных элементов могут быть сегрегированы для обеспечения осаждения материала, используемого в фосфорамидитном методе синтеза, для создания высокосложной и плотной библиотеки. Сегрегация может быть достигнута с помощью более крупных структур или избирательного функционализирования поверхности с образованием активных или пассивных областей для олигонуклеотидного синтеза. Альтернативно, места для синтеза индивидуальных олигонуклеотидов могут быть отделены друг от друга путем создания областей отщепляемого и неотщепляемого присоединения олигонуклеотидов к поверхности в определенных условиях. Устройство, такое как струйный принтер, может быть использовано для осаждения реагентов на индивидуальные места синтеза олигонуклеотидов. Избирательное функционализирование также может обеспечить попеременное изменение гидрофобности по поверхности субстрата, вызывая тем самым эффекты, характеризующиеся углом контакта с водой, которые могут вызвать каплеобразование или растекание осажденных реагентов. Использование более крупных структур может снизить выплескивание или перекрестное загрязнение индивидуальных участков синтеза олигонуклеотидов реагентами из соседних элементов.

**Реакторы**

В другом аспекте в настоящем документе описан массив замкнутых полостей. Массив замкнутых полостей может включать множество выделенных реакторов, содержащих первый субстрат и второй субстрат, содержащий колпачки реакторов. В некоторых случаях в каждом реакторе содержится по меньшей мере два выделенных локуса. Выделенные реакторы могут быть отделены друг от друга удаляемым уплотнением. Колпачки реакторов могут удерживать содержимое реакторов при отделении второго субстрата от первого субстрата. Множество выделенных реакторов может быть расположено с любой подходящей плотностью, например, по меньшей мере 1 на мм$^2$. Множество колпачков реакторов может быть покрыто фрагментом. Фрагмент может представлять собой химически инертный фрагмент или химически активный фрагмент. Фрагмент, который нанесен на колпачки реакторов, может представлять собой фрагмент, который сводит к минимуму присоединение олигонуклеотидов. Типы химических фрагментов описаны более подробно в других местах в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов, описанные здесь, могут относиться к замкнутым полостям с открытым верхом, расположенным на поверхности субстрата прикрывающего элемента. Например, колпачки реакторов могут напоминать цилиндры, выступающие на поверхности субстрата. Внутренний диаметр колпачков реакторов может составлять около, по меньшей мере около или менее чем около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 или 500 мкм. Наружный диаметр колпачков реакторов может составлять около, по меньшей мере около или менее чем около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или 600 мкм. Ободок цилиндра может иметь ширину около, по меньшей мере около или менее чем около 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 или 400 мкм. Высота колпачка реактора, измеренная с внутренней стороны, может составлять около, по меньшей мере около или менее чем около 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мкм. На фигуре 7 в качестве примера показан вариант осуществления колпачков реакторов на прикрывающем элементе.

Все поверхности или часть поверхностей колпачка реактора, такая как поверхность ободка, может быть модифицирована с использованием подходящих способов модифицирования поверхности, описанных более подробно в других местах в настоящем

документе и известных из других источников в данной области. В некоторых случаях на поверхности создают неровности. Химическое модифицирование поверхности и неровности могут служить для регулирования угла контакта кольца с водой. Аналогичные способы также можно применять для обработки поверхности субстрата, который сближают на близкое расстояние с колпачками реакторов с формированием уплотнения, например, обратимого уплотнения. Между двумя поверхностями может быть использован капиллярный клапан «capillary burst valve», как описано более подробно в других местах в настоящем документе. Обработка поверхности может быть полезной для точного контроля таких уплотнений, включая капиллярные клапана «capillary burst valve».

Колпачки реакторов, заключенные в субстрат, могут иметь любую форму или дизайн, известный в данной области. Колпачок реактора может содержать объем полости, который способен вмещать содержамое реакторов. Содержимое реакторов может поступать из множества выделенных локусов на соседнем субстрате. Колпачок реактора может иметь круглую, овальную, прямоугольную или неправильную форму. Колпачок реактора может иметь острые углы. В некоторых случаях колпачок реактора могут иметь круглые углы для сведения к минимуму удерживания любых пузырьков воздуха и для содействия лучшему смешиванию содержамого реакторов. Колпачок реактора может быть изготовлен в любой форме, организации или любого дизайна, который обеспечивает контролируемый перенос или смешивание содержимого реакторов. Колпачок реактора может иметь дизайн, сходный с дизайном выделенных локусов на субстрате, как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов могут иметь форму, которая обеспечивает легкое течение жидкости без образования пузырьков воздуха. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов могут иметь круглую форму с диаметром, который может составлять примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 1 микрометр (мкм), 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 11 мкм, 12 мкм, 13 мкм, 14 мкм, 15 мкм, 16 мкм, 17 мкм, 18 мкм, 19 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 35 мкм, 40 мкм, 45 мкм, 50 мкм, 55 мкм, 60 мкм, 65 мкм, 70 мкм, 75 мкм, 80 мкм, 85 мкм, 90 мкм, 95 мкм, 100 мкм, 110 мкм, 120 мкм, 130 мкм, 140 мкм, 150 мкм, 160 мкм, 170 мкм, 180 мкм, 190 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 300 мкм, 350 мкм, 400 мкм, 450 мкм, 500 мкм, 550 мкм, 600 мкм, 650 мкм, 700 мкм или 750 мкм. Колпачки реакторов могут иметь монодисперсное распределение размеров, то есть все микроструктуры могут иметь приблизительно одинаковую ширину, высоту и/или длину. Альтернативно, колпачки реакторов могут иметь предельное число форм и/или размеров, например, колпачки реакторов могут быть представлены в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 или более различных формах, каждая из которых имеет монодисперсный размер. В

некоторых вариантах осуществления одинаковая форма может повторяться во множестве монодисперсных распределений размеров, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 или более монодисперсных распределений размеров. Монодисперсное распределение может отражаться на унимодулярном распределении со стандартным отклонением менее чем 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2%, 1%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,001% колебания или меньше.

Каждый из колпачков реакторов может иметь любую подходящую площадь для проведения реакций в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения, описанными здесь. В некоторых случаях множество колпачков реакторов может занимать любой подходящий процент от общей площади поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления множество колпачков реакторов может занимать примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% поверхности субстрата. В некоторых вариантах осуществления колпачки реакторов могут занимать примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 0,1 мм$^2$, 0,15 мм$^2$, 0,2 мм$^2$, 0,25 мм$^2$, 0,3 мм$^2$, 0,35 мм$^2$, 0,4 мм$^2$, 0,45 мм$^2$, 0,5 мм$^2$, 0,55 мм$^2$, 0,6 мм$^2$, 0,65 мм$^2$, 0.7 мм$^2$, 0.75 мм$^2$, 0.8 мм$^2$, 0.85 мм$^2$, 0.9 мм$^2$, 0.95 мм$^2$, 1 мм$^2$, 2 мм$^2$, 3 мм$^2$, 4 мм$^2$, 5 мм$^2$, 6 мм$^2$, 7 мм$^2$, 8 мм$^2$, 9 мм$^2$, 10 мм$^2$, 11 мм$^2$, 12 мм$^2$, 13 мм$^2$, 14 мм$^2$, 15 мм$^2$, 16 мм$^2$, 17 мм$^2$, 18 мм$^2$, 19 мм$^2$, 20 мм$^2$, 25 мм$^2$, 30 мм$^2$, 35 мм$^2$, 40 мм$^2$, 50 мм$^2$, 75 мм$^2$, 100 мм$^2$, 200 мм$^2$, 300 мм$^2$, 400 мм$^2$, 500 мм$^2$, 600 мм$^2$, 700 мм$^2$, 800 мм$^2$, 900 мм$^2$, 1000 мм$^2$, 1500 мм$^2$, 2000 мм$^2$, 3000 мм$^2$, 4000 мм$^2$, 5000 мм$^2$, 7500 мм$^2$, 10000 мм$^2$, 15000 мм$^2$, 20000 мм$^2$, 25000 мм$^2$, 30000 мм$^2$, 35000 мм$^2$, 40000 мм$^2$, 50000 мм$^2$, 60000 мм$^2$, 70000 мм$^2$, 80000 мм$^2$, 90000 мм$^2$, 100000 мм$^2$, 200000 мм$^2$, 300000 мм$^2$ общей площади или более. Выделенные реакторы, выделенные локусы и колпачки реакторов могут располагаться с любой плотностью. В некоторых вариантах осуществления выделенные реакторы, выделенные локусы или колпачки реакторов располагаются на поверхности с плотностью около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 75, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700, около 800, около 900, около 1000, около 1500, около 2000, около 3000, около 4000, около 5000, около 6000, около 7000, около 8000, около 9000, около 10000, около 20000, около 40000, около 60000, около 80000, около 100000 или около 500000 участков на 1 мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления выделенные реакторы, выделенные локусы или колпачков реакторов располагаются на поверхности с плотностью по меньшей мере около 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 300, по меньшей

мере около 400, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 900, по меньшей мере около 1000, по меньшей мере около 1500, по меньшей мере около 2000, по меньшей мере около 3000, по меньшей мере около 4000, по меньшей мере около 5000, по меньшей мере около 6000, по меньшей мере около 7000, по меньшей мере около 8000, по меньшей мере около 9000, по меньшей мере около 10000, по меньшей мере около 20000, по меньшей мере около 40000, по меньшей мере около 60000, по меньшей мере около 80000, по меньшей мере около 100000 или по меньшей мере около 500000 участков на 1 $мм^2$.

Учитывая плотность выделенных локусов на поверхности соседнего субстрата, плотность, распределение и форма колпачков реакторов могут быть разработаны соответствующим образом для выравнивания с предпочтительным количеством выделенных локусов в каждом реакторе. Каждый из множества выделенных реакторов может содержать некоторое количество выделенных локусов. Например, без ограничения, каждый реактор может содержать примерно, по меньшей мере примерно, менее чем примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 выделенных локусов. В некоторых случаях каждый реактор может содержать по меньшей мере 100 выделенных локусов.

Выделенные локусы или колпачки реакторов, содержащиеся в пределах массива из множества замкнутых полостей, могут располагаться на микроструктурах, которые встроены в поверхность подложки. Микроструктуры могут быть изготовлены любым известным в данной области способом, как описано в других парагафах в настоящем документе. Микроструктуры могут представлять собой микроканалы или микролунки, которые имеют любую форму и дизайн в 2D или 3D. Микроструктуры (например, микроканалы или микролунки) могут содержать, по меньшей мере, два канала, находящиеся в жидкостном взаимодействии друг с другом. Например, микроканалы могут быть взаимно соединены друг с другом, обеспечивая протекание жидкости при заданных условиях, таких как вакуум-отсос. Индивидуальные микроструктуры могут быть индивидуально доступными и выделенными, таким образом, что содержимое двух выделенных локусов не смешивается. Микроканалы могут включать по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 каналов, находящихся в жидкостных взаимодействиях в любых комбинациях, обеспечивая контролируемое смешивание, сообщение или распределение жидкости. Возможность взаимодействия микроканалов можно контролировать с помощью клапанных систем, которые известны в области микрожидкостного дизайна. Например, слой субстрата для контроля жидкости может быть изготовлен

непосредственно поверх слоя субстрата, находящегося в жидкостном взаимодействии. Различные микрожидкостные клапанные системы описаны в Marc A. Unger et al, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography," Science, vol. 288, no. 7, pp. 113-116, April 2000, and David C. Duffy et al., "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," Analytical Chemistry, vol. 70, no. 23, pp. 4974-4984, December 1998.

Выделенные локусы или колпачки реакторов, содержащиеся в пределах массива из множества замкнутых полостей, могут располагаться на микроструктурах, таких как микроканалы или каналы. Размеры и дизайн микроканалов выделенных локусов на поверхности соседнего субстрата описаны в других местах в настоящем документе. Микроструктуры могут содержать по меньшей мере два канала, которые находятся в жидкостном взаимодействии друг с другом, при этом по меньшей мере два канала могут содержать по меньшей мере два канала различной ширины. В некоторых случаях по меньшей мере два канала могут иметь одинаковую ширину, или комбинацию одинаковой или различной ширины. Например, без ограничения, ширина каналов или микроканалов может составлять около, по меньшей мере около или менее чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкм. Каналы или микроканалы могут иметь любую длину, которая обеспечивает жидкостное взаимодействие выделенных локусов. По меньшей мере один канал может иметь отношение площади поверхности к длине или периметр примерно, по меньшей мере примерно, менее чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкм. По меньшей мере один канал может иметь площадь поперечного сечения, которая находится в круглой форме и может содержать радиус площади поперечного сечение примерно. По меньшей мере примерно, менее чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкм. По меньшей мере один канал может иметь площадь поперечного сечения, которая имеет круглую форму и может иметь радиус площади поперечного сечения, который составляет около, по меньшей мере около, менее чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкм.

Как описано здесь, массив из замкнутых полостей может включать множество выделенных реакторов, содержащих первый субстрат и второй субстрат, содержащий колпачки реакторов. Выделенные реакторы могут быть образованы путем объединения

или прикрывания второго субстрата на первый субстрат и герментичного соединения их друг с другом. Уплотнение может быть обратимым или необратимым. В предпочтительных вариантах осуществления уплотнение является обратимым или удаляемым. При уплотнении выделенных реакторов содержимое реакторов, такое как олигонуклеотиды или реагенты, необходимые для амплификации или других последующих реакций, может высвобождаться и смешиваться в пределах выделенных реакторов. Выделенные реакторы могут быть отделены друг от друга удаляемым уплотнением и при этом колпачки реакторов могут удерживать все или часть содержимого реакторов при снятии второго субстрата с первого субстрата. В зависимости от материалов первого субстрата и второго субстрата, уплотнение может быть выполнено по разному для обеспечения обратимого уплотнения между первым субстратом и вторым субстратом, и формирования выделенных реакторов. При формировании уплотнения первый субстрат и второй субстрат могут вступать в прямой физический контакт. В некоторых случаях первый субстрат и второй субстрат могут располагаться близко друг к другу без их соответствующих поверхностей непосредственно вокруг нанореактора или между двумя нанореакторами, создавая прямой физический контакт. Уплотнение может представлять собой капиллярный клапан «capillary burst valve». Расстояние между первым субстратом и вторым субстратом при формировании уплотнения может составлять около, по меньшей мере около, менее чем около 0,1 мкм, 0,2 мкм, 0,3 мкм, 0,4 мкм, 0,5 мкм, 0,6 мкм, 0,7 мкм, 0,8 мкм, 0,9 мкм, 1 мкм, 1,1 мкм, 1,2 мкм, 1,3 мкм, 1,4 мкм, 1,5 мкм, 1,6 мкм, 1,7 мкм, 1,8 мкм, 1,9 мкм, 2 мкм, 2,5 мкм, 3 мкм, 3,5 мкм, 4 мкм, 4,5 мкм, 5 мкм, 5,5 мкм, 6 мкм, 6,5 мкм, 7 мкм, 7,5 мкм, 8 мкм, 8,5 мкм, 9 мкм, 9,5 мкм или 10 мкм. Уплотнение может представлять собой капиллярный клапан «capillary burst valve».

В некоторых случаях выделенные замкнутые полости могут содержать отверстия для сброса давления. Отверстия для сброса давления могут обеспечить разделение первого субстрата и второго субстрата. Дизайн микрожидкостных систем с системами сброса давления описаны в европейском патенте EP 1987275 A1, который включен здесь полностью в виде отсылки.

Множество выделенных колпачков реакторов на субстрате может быть изготовлено любым способом, который описан здесь или известен из другого источника в данной области (например, процессы микропроизводства). Процессы микропроизводства, которые можно использовать для изготовления раскрытого здесь субстрата, без ограничения включают литографию; технологии травления, такие как жидкостное химическое травление, сухое травление и удаление фоторезиста; технологии микроэлектромеханических систем (Microelectromechanical systems, MEMS), включая

микрофлюидные системы/лабораторию на чипе, оптические MEMS (также называемые MOEMS), радиочастотные MEMS-системы (RF MEMS), PowerMEMS и BioMEMS, и глубокое реактивное ионное травление (Deep reactive ion etching, DRIE); технологии наноэлектромеханических систем (NEMS); термическое окисление кремния; нанесение покрытий методом электроосаждения и химического осаждения; диффузионные процессы, такие как диффузия бора, фосфора, мышьяка и сурьмы; ионная имплантация; осаждение пленок, такое как осаждение из паровой фазы (волокно, электронный пучок, световой импульс и затемнение, и ступенчатое нанесение пленок), катодное распыление, химическое осаждение из газовой фазы (CVD), эпитаксия (газофазная, жидкофазная и молекулярно-пучковая), электроосаждение, трафаретная печать и наслоение. Смотри, в целом, Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988); Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998; Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997).

В одном аспекте субстрат, содержащий множество выделенных колпачков реакторов, может быть изготовлен с использованием любого способа, известного в данной области. В некоторых вариантах осуществления материал субстрата, содержащего множество выделенных колпачков реакторов, может представлять собой полупроводниковый материал, такой как диоксид кремния. Материалы субстрата могут также представлять собой другие материалы на основе соединений элементов III-V или II-VI групп, таких как полупроводник арсенид галлия (GaAs), полученный методом Чохральского (Grovenor, C. (1989). *Microelectronic Materials.* CRC Press. pp. 113–123). Материал может иметь твердую плоскую поверхность, которая равномерно покрыта реакционноспособными группами (-OH) оксида к раствору, находящемуся в контакте с поверхностью. Эти оксидные группы могут служить точками прикрепления для последующих процессов силанирования. Альтернативно, может быть осажден материал с гидрофильной и гидрофобной поверхностью, который имитирует оксид кремния по характеристикам травления. Поверхности с нанесенным нитридом кремния и карбидом кремния также можно использовать для изготовления подходящих субстратов в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения.

В некоторых вариантах осуществления на субстрат может быть осажден пассивирующий слой, который может содержать или может не содержать группы реакционноспособного оксида. Пассивирующий слой может содержать нитрид кремния

($Si_3N_4$) или полимид. В некоторых случаях стадию фотолитографии можно использовать для определения областей, в которых выделенные локусы формируются на пассивирующем слое.

Способ получения субстрата, содержащего множество колпачков реакторов, может начинаться с субстрата. Субстрат (например, кремний) может содержать любое число осажденных на него слоев, включая, но без ограничения, проводящий слой, такой как металл. В некоторых случаях проводящий слой может представлять собой алюминий. В некоторых случаях субстрат может содержать защитный слой (например, нитрид титана). В некоторых случаях субстрат может содержать химический слой с высокой поверхностной энергией. Слои могут быть осаждены с использованием различных методов осаждения, таких как, например, химическое осаждение из газовой фазы (CVD), осаждение атомных слоев (ALD), плазмостимулированное CVD (PECVD), плазмостимулированное ALD (PEALD), химическое осаждение металлоорганических соединений из газовой фазы CVD (MOCVD), химическое осаждение из газовой фазы с помощью нагреваемой проволоки CVD (HWCVD), инициированное CVD (iCVD), модифицированное CVD (MCVD), аксиальное осаждение из газовой фазы (VAD), внешнее осаждение из газовой фазы (OVD) и физическое осаждение из газовой фазы (например, осаждение распылением, осаждение из газовой фазы).

В некоторых случаях на субстрат осаждают оксидный слой. В некоторых случаях оксидный слой может содержать диоксид кремния. Диоксид кремния может быть осажден с использованием тетраэтилортосиликата (TEOS), плазмы высокой плотности (HDP) или любой их комбинации.

В некоторых случаях диоксид кремния может быть осажден с использованием низкотемпературных процессов. В некоторых случаях процесс представляет собой низкотемпературное химическое осаждение из газовой фазы оксида кремния. Как правило, температура является достаточно низкой, чтобы изначально присутствующий металл на чипе не был поврежден. Температура осаждения может составлять около 50 °C, около 100 °C, около 150 °C, около 200 °C, около 250 °C, около 300 °C, около 350 °C и т.п. В некоторых вариантах осуществления температура осаждения составляет ниже около 50 °C, ниже около 100 °C, ниже около 150 °C, ниже около 200 °C, ниже около 250 °C, ниже около 300 °C, ниже около 350 °C и т.п. Осаждение может быть выполнено при любом подходящем давлении. В некоторых случаях в процессе осаждения используют RF-энергию плазмы.

В некоторых случаях оксид осаждают с помощью процедуры выращивания слоя оксида путем сухого термического окисления (например, процедур, в которых можно

использовать температуру, близкую или превышающую 1000 °C). В некоторых случаях оксид кремния получают с помощью процесса влажного окисления с использованием пара.

Диоксид кремния может быть осажден до толщины, подходящей для формирования колпачков нанореакторов, которые могут формировать множество выделенных реакторов, содержащих объем для реагентов, подлежащих осаждению и смешиванию, которые могут быть подходящими для амплификации любого желательного объема олигонуклеотида или других последующих реакций, как описано более в других параграфах настоящего изобретения.

Диоксид кремния может быть осажден до любой подходящей толщины. В некоторых вариантах осуществления слой диоксида кремния имеет толщину примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 1 нанометр (нм), примерно 2 нм, примерно 3 нм, примерно 4 нм, примерно 5 нм, примерно 6 нм, примерно 7 нм, примерно 8 нм, примерно 9 нм, примерно 10 нм, примерно 15 нм, примерно 20 нм, примерно 25 нм, примерно 30 нм, примерно 35 нм, примерно 40 нм, примерно 45 нм, примерно 50 нм, примерно 55 нм, примерно 60 нм, примерно 65 нм, примерно 70 нм, примерно 75 нм, примерно 80 нм, примерно 85 нм, примерно 90 нм, примерно 95 нм, примерно 100 нм, примерно 125 нм, примерно 150 нм, примерно 175 нм, примерно 200 нм, примерно 300 нм, примерно 400 нм или примерно 500 нм.

Колпачки реакторов могут быть созданы в субстрате на основе диоксида кремния с использованием различных технологий изготовления, которые известны в данной области. Такие технологии могут включать технологии изготовления полупроводниковых приборов. В некоторых случаях колпачки реакторов могут быть созданы с использованием фотолитографических технологий, например таких, которые применяют в полупроводниковой промышленности. Например, на диоксид кремния может быть нанесен слой фоторезиста (например, материала, который изменяет свойства при воздействии электромагнитного излучения) (например, нанесение на пластину покрытия методом центрифугирования) до любой подходящей толщины. Субстрат, содержащий слой фоторезист, может быть подвергнут воздействию электромагнитного излучения. Маску можно использовать для защиты от экспонирования отдельных участков слоя фоторезиста для определения участка выделенных локусов. Фоторезист может представлять собой негативный резист или позитивный резист (например, воздействию электромагнитного излучения может быть подвергнут участок колпачков реакторов, или воздействию электромагнитного излучения могут быть подвергнуты заданные маской участки, отличные от колпачков реакторов). Участок, расположенный выше места, в

котором должны быть созданы колпачки реакторов, подвергают воздействию электромагнитного излучения с получением рисунка, который соответствует локализации и распределению колпачков реакторов в слое диоксида кремния. Фоторезист может быть подвергнут воздействию электромагнитного излучения через маску, определяющую рисунок, который соответствует колпачкам реакторов. Затем экспонированная часть фоторезиста может быть удалена, например, с помощью операций промывки (например, деионизированной водой). Затем удаленная часть маски может быть подвергнута химическому травлению для травления субстрата и переноса рисунка колпачков реактора на слой диоксида кремния. Травитель может включать кислоту, такую как, например, серная кислота ($H_2SO_4$). Слой диоксида кремния может быть подвергнут анизотропному травлению. С использованием описанных здесь способов можно применять высокоанизотропные методы изготовления, такие как DRIE, для изготовления микроструктур, таких как колпачки реакторов, на поверхности или внутри субстрата с боковыми стенками, которые отклоняются менее чем примерно на ± 3°, 2°, 1°, 0,5°, 0,1° или меньше по вертикали относительно поверхности субстрата. Могут быть достигнуты величины подтравливания менее чем около 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 мкм или меньше, что приводит к образованию высокооднородных микроструктур.

Для травления диокида кремния в участке, в котором должны быть сформированы колпачки реакторов, можно использовать различные процедуры травления. Травление может представлять собой изотропное травление (то есть скорость травления в одном направлении по существу равна или равна скорости травления в ортогональном направлении) или анизотропное травление (то есть скорость травления в одном направлении меньше, чем скорость травления в ортогональном направлении), или их варианты. Технологии травления могут включать использование травителей для жидкостного травления кремния, таких как KOH, TMAH, EDP и тому подобное, и травителей для сухого плазменного травления (например, DRIE). Обе технологии можно использовать для травления сквозных межсоединений микроструктур пластины.

В некоторых случаях при анизотропном травлении удаляется большая часть объема колпачков реакторов. Может быть удален любой подходящий объем колпачков реакторов, включая около 60%, около 70%, около 80%, около 90% или около 95%. В некоторых случаях при анизотропном травлении удаляется по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 95% материала. В некоторых случаях при анизотропном травлении удаляется не более чем около 60%, не более чем около 70%, не более чем около 80%, не более чем около 90% или не более чем около 95% материала. В некоторых

вариантах осуществления при анизотропном травлении не удаляется материал на основе диоксида кремния по всей толщине субстрата. В некоторых случаях при изотропном травлении удаляется материал на основе диоксида кремния по всей толщине субстрата с образованием отверстий.

В некоторых случаях колпачки реакторов протравливают с использованием стадии фотолитографии для определения колпачков реакторов с последующим гибридным сухим-влажным травлением. Стадия фотолитографии может включать нанесение на диоксид кремния фоторезиста и подвергание фоторезиста воздействию электромагнитного излучения через маску (или фотошаблон), имеющую рисунок, который определяет колпачки реакторов. В некоторых случаях гибридное сухое-влажное травление включает: (a) сухое травление для удаления массы диоксида кремния в областях колпачков реакторов, заданных в фоторезисте с помощью стадии фотолитографии; (b) очистку субстрата; и (c) влажное травление для удаления оставшегося диоксида кремния из субстрата в областях колпачков реакторов.

Субстрат может быть очищен с помощью плазмохимического травления или подвергания воздействию окисляющего агента, такого как, например, $H_2O_2$, $O_2$, $O_3$, $H_2SO_4$ или их комбинации, такой как комбинация $H_2O_2$ и $H_2SO_4$. Очистка может включать удаление остаточного полимера, удаление материала, который может блокировать влажное травление, или их комбинацию. В некоторых случаях очистка представляет собой плазменную очистку. Стадия очистки может продолжаться в течение любого подходящего периода времени (например, от 15 до 20 секунд). В одном примере очистка может быть выполнена за 20 секунд с помощью машины eMAx-CT фирмы Applied Materials в условиях 100 mT, 200 W, 20 G, 20 $O_2$.

Сухое травление может представлять собой анизотропное травление, при котором травление происходит по существу вертикально (например, в направлении субстрата), но не латерально или по существу латерально (например, параллельно субстрату). В некоторых случаях сухое травление включает травление с помощью травителя на основе фтора, такого как $CF_4$, $CHF_3$, $C_2F_6$, $C_3F_6$ или любой их комбинации. В одном случае травление выполняют в течение 400 секунд с помощью машины eMax-CT фирмы Applied Materials при условиях 100 mT, 1000 W, 20 G и 50 CF4. Описанные здесь субстраты могут быть подвергнуты травлению путем глубокого реактивного ионного травления (DRIE). Глубокое реактивное ионное травление (DRIE) представляет собой высокоанизотропный процесс травления, используемый для создания глубокого проникновения, отверстий с вертикальными сторонами и канавок в пластинах/субстратах обычно с высокими отношениями сторон. Субстраты могут быть подвергнуты травлению с использованием

двух главных технологий для высокого показателя DRIE: криогенный и Bosch. Способы применения DRIE описаны в патенте США № 5501893, полное содержание которого включено здесь путем отсылки.

Влажное травление может представлять собой изотропное травление, при котором происходит удаление материала во всех направлениях. В некоторых случаях при влажном травлении происходит подтравливание фоторезиста. Подтравливание фоторезиста может способствовать более легкому удалению фоторезиста на последующей стадии (например, «отрыв» фоторезиста). В одном варианте осуществления влажное травление представляет собой травление буферным оксидом (BOE). В некоторых случаях жидкие травители для оксида используют при комнатной температуре с раствором на основе фтористоводородной кислоты, который может быть забуферен (например, фторидом аммония) для замедления скорости травления. Скорость травления может зависеть от подвергаемой травлению пленки и конкретных концентраций HF и/или $NH_4F$. Время травления, необходимое для полного удаления оксидного слоя, обычно определяют эмпирически. В одном примере травление выполняют при 22 °C с 15:1 BOE (травление буферным оксидом).

Слой диоксида кремния может быть протравлен до подлежащего слоя материала. Например, слой диоксида кремния может быть протравлен до слоя нитрида титана.

В одном аспекте способ изготовления субстрата, содержащего множество колпачков реакторов, включает протравливание полости колпачков реакторов сквозь толщину субстрата, такого как субстрат на основе кремния, содержащий слой диоксида кремния, нанесенный с использованием (a) стадии фотолитографии для определения областей выделенных локусов; (b) сухого травления для удаления массы диоксида кремния в областях колпачков реакторов, определенных на стадии фотолитографии; и (c) влажного травления для удаления оставшегося диоксида кремния из субстрата в областях колпачков реакторов. В некоторых случаях способ дополнительно включает удаление остаточного полимера, удаление материала, который может блокировать влажное травление, или их комбинацию. Способ может включать стадию плазменной очистки.

В некоторых вариантах осуществления в некоторых случаях фоторезист не снимают с диоксида кремния после стадии фотолитографии или гибридного влажного-сухого травления. Оставление фоторезиста может быть использовано для селективного направления металла в колпачки реакторов, а не на верхнюю поверхность слоя диоксида кремния на более поздних стадиях. В некоторых случаях субстрат покрывают металлом (например, алюминием) и при влажном травлении не происходит удаления некоторых компонентов на металле, например таких, которые защищают металл от коррозии

(например, нитрид титана (TiN)). В некоторых случаях, однако, слой фоторезиста может быть удален, например, с помощью химико-механической планаризации поверхности (CMP).

Иллюстративный нанореактор показан в разных видах на фигурах 26 A-D. Данный нанореактор содержит 108 лунок, которые индивидуально приподнимаются из основания нанореактора. Поперечное сечение нанореактора показано на фигуре 26A. Вид нанореактора со стороны рабочего тонкого слоя показан на фигурах 26B и 26C. Вид нанореактора со стороны несущего толстого слоя показан на фигуре 26D. Нанореактор может быть конфигурирован на получение и удерживание жидкостей во множестве элементов. Нанореактор на фигуре 26 выполнен с возможностью удерживания жидкостей в любом количестве из 108 лунок. Нанореактор может находиться в контакте и/или быть выровненным с субстратом, как показано в качестве примера на фигуре 25. Лунки нанореактора не ограничиваются конфигурацией, показанной на фигуре 26, так как любое количество лунок в любой конфигурации может быть расположено в пределах нанореактора. В некоторых вариантах осуществления лунки нанореактора расположены в конфигурации, которая совпадает с конфигурацией субстрата. Как показано поз. **2701**, высота нанореактора может составлять около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,5 мм, 2 мм, 2,5 мм, 3 мм, 3,5 мм, 4 мм, 4,5 мм, 5 мм, 5,5 мм, 6 мм, 6,5 мм, 7 мм, 7,5 мм, 8 мм, 8,5 мм, 9 мм, 9,5 мм или 10 мм. В некоторых вариантах осуществления высота нанореактора может составлять около или не более чем около 10 мм, 9,5 мм, 9 мм, 8,5 мм, 8 мм, 7,5 мм, 7 мм, 6,5 мм, 6 мм, 5,5 мм, 5 мм, 4,5 мм, 4 мм, 3,5 мм, 3 мм, 2,5 мм, 2 мм, 1,5 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм, или меньше. В некоторых вариантах осуществления высота нанореактора может находиться в диапазоне 0,1 – 10 мм, 0,2 – 9 мм, 0,3 – 8 мм, 0,4 – 7 мм, 0,5 – 6 мм, 0,6 – 5 мм, 0,7 – 4 мм, 0,8 – 3 мм или 0,9- 2 мм. Специалистам в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,2 мм – 0,8 мм. Как показано поз. **2702**, высота лунки нанореактора может составлять около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,5 мм, 2 мм, 2,5 мм, 3 мм, 3,5 мм, 4 мм, 4,5 мм, 5 мм, 5,5 мм, 6 мм, 6,5 мм, 7 мм, 7,5 мм, 8 мм, 8,5 мм, 9 мм, 9,5 мм или 10 мм. В некоторых вариантах осуществления высота лунки нанореактора может составлять около или не более чем около 10 мм, 9,5 мм, 9 мм, 8,5 мм, 8 мм, 7,5 мм, 7 мм, 6,5 мм, 6 мм, 5,5 мм, 5 мм, 4,5 мм, 4 мм, 3,5 мм, 3 мм, 2,5 мм, 2 мм, 1,5 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм, или меньше. В некоторых вариантах осуществления высота лунки нанореактора

может находиться в диапазоне 0,1 – 10 мм, 0,2 – 9 мм, 0,3 – 8 мм, 0,4 – 7 мм, 0,5 – 6 мм, 0,6 – 5 мм, 0,7 – 4 мм, 0,8 – 3 мм или 0,9- 2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 мм – 0,6 мм.

Фигура 26В включает начальную точку, обозначенную 0,0, которая является пересечением осей X и Y, при этом графически представлен верхний левый угол иллюстративного нанореактора. В некоторых вариантах осуществления ширина нанореактора, представленная поз. **2703**, составляет от около 5 мм до около 150 мм вдоль одного направления, измеренная от начальной точки. В некоторых вариантах осуществления ширина нанореактора, представленная поз. **2704**, составляет от около 5 мм до около 150 мм вдоль другого направления, измеренная от начальной точки. В некоторых вариантах осуществления ширина нанореактора в любом направлении составляет от около 5 мм до около 125 мм, от около 5 мм до около 100 мм, от около 5 мм до около 75 мм, от около 5 мм до около 50 мм, от около 5 мм до около 25 мм, от около 25 мм до около 150 мм, от около 50 мм до около 150 мм, от около 75 мм до около 150 мм, от около 100 мм до около 150 мм или от около 125 мм до около 150 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что ширина может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 5 мм – 25 мм. В некоторых вариантах осуществления ширина нанореактора в любом направлении составляет около или по меньшей мере около 5 мм, 10 мм, 15 мм, 20 мм, 25 мм, 30 мм, 40 мм, 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм или 150 мм. В некоторых вариантах осуществления ширина нанореактора в любом направлении составляет около или не более чем около 150 мм, 140 мм, 130 мм, 120 мм, 110 мм, 100 мм, 90 мм, 80 мм, 70 мм, 60 мм, 50 мм, 50 мм, 40 мм, 30 мм, 25 мм, 20 мм, 15 мм, 10 мм или 5 мм, или меньше.

Нанореактор, представленный на фигуре 26В, содержит 108 лунок. Лунки могут быть расположены в любой конфигурации. На фигуре 26В лунки располагаются рядами, образуя квадратную форму. Независимо от расположения, лунки могут начинаться на расстоянии от около 0,1 мм до около 149 мм от начальной точки, измеренном по оси X или Y, и заканчиваться на расстоянии от около 1 мм до около 150 мм от начальной точки. Длины, показанные поз. **2706** и поз. **2705**, представляют самые дальние расстояния до центра лунки по оси X и Y от начальной точки, соответственно. Длины, показанные поз. **2710** и поз. **2709**, представляют самые близкие расстояния до центра лунки по оси X и Y от начальной точки, соответственно. В некоторых вариантах осуществления самое дальнее расстояние до центра лунки в любом направлении от начальной точки составляет около или по меньшей мере около 1 мм, 5 мм, 10 мм, 15 мм, 20 мм, 25 мм, 30 мм, 40 мм,

50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм или 150 мм. В некоторых вариантах осуществления самое дальнее расстояние до центра лунки в любом направлении составляет около или не более чем около 150 мм, 140 мм, 130 мм, 120 мм, 110 мм, 100 мм, 90 мм, 80 мм, 70 мм, 60 мм, 50 мм, 50 мм, 40 мм, 30 мм, 25 мм, 20 мм, 15 мм, 10 мм, 5 мм, 1 мм или меньше. В некоторых вариантах осуществления самое дальнее расстояние до центра лунки в любом направлении составляет от около 5 мм до около 125 мм, от около 5 мм до около 100 мм, от около 5 мм до около 75 мм, от около 5 мм до около 50 мм, от около 5 мм до около 25 мм, от около 25 мм до около 150 мм, от около 50 мм до около 150 мм, от около 75 мм до около 150 мм, от около 100 мм до около 150 мм или от около 125 мм до около 150 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 5 – 25 мм. В некоторых вариантах осуществления самое близкое расстояние до центра лунки в любом направлении от начальной точки составляет около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм, 5 мм, 10 мм, 15 мм, 20 мм, 25 мм, 30 мм, 40 мм, 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм или 149 мм. В некоторых вариантах осуществления самое близкое расстояние до центра лунки в любом направлении составляет около или не более чем около 149 мм, 140 мм, 130 мм, 120 мм, 110 мм, 100 мм, 90 мм, 80 мм, 70 мм, 60 мм, 50 мм, 50 мм, 40 мм, 30 мм, 25 мм, 20 мм, 15 мм, 10 мм, 5 мм, 4 мм, 3 мм, 2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм, 0,1 мм или меньше. В некоторых вариантах осуществления самое близкое расстояние до центра лунки в любом направлении составляет от около 0,1 мм до около 125 мм, от около 0,5 мм до около 100 мм, от около 0,5 мм до около 75 мм, от около 0,5 мм до около 50 мм, от около 0,5 мм до около 25 мм, от около 1 мм до около 50 мм, от около 1 мм до около 40 мм, от около 1 мм до около 30 мм, от около 1 мм до около 20 мм или от около 1 мм до около 5 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 – 5 мм.

Лунки нанореактора могут быть расположены на любом расстоянии от края нанореактора. Иллюстративные расстояния между лункой и краем нанореактора показаны поз. **2707** и **2708**. В некоторых вариантах осуществления расстояние между центром лунки и краем нанореактора в любом направлении составляет около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм, 5 мм, 10 мм, 15 мм, 20 мм, 25 мм, 30 мм, 40 мм, 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм или 149 мм. В некоторых вариантах осуществления

расстояние между центром лунки и краем нанореактора в любом направлении составляет около или не более чем около 149 мм, 140 мм, 130 мм, 120 мм, 110 мм, 100 мм, 90 мм, 80 мм, 70 мм, 60 мм, 50 мм, 50 мм, 40 мм, 30 мм, 25 мм, 20 мм, 15 мм, 10 мм, 5 мм, 4 мм, 3 мм, 2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм, 0,1 мм или меньше. В некоторых вариантах осуществления расстояние между центром лунки и краем нанореактора в любом направлении составляет от около 0,1 мм до около 125 мм, около от 0,5 мм до около 100 мм, около от 0,5 мм до около 75 мм, около от 0,5 мм до около 50 мм, около от 0,5 мм до около 25 мм, около от 1 мм до около 50 мм, около от 1 мм до около 40 мм, около от 1 мм до около 30 мм, около от 1 мм до около 20 мм или около от 1 мм до около 5 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 – 5 мм.

В некоторых вариантах осуществления лунки расположены таким образом, что присутствует повторяющееся расстояние между двумя лунками. Как показано поз. **2711** и **2712**, две лунки могут отстоять друг от друга на расстоянии от около 0,3 мм до около 9 мм. В некоторых вариантах осуществления расстояние между двумя лунками составляет около или по меньшей мере около 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм. 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм или 9 мм. В некоторых вариантах осуществления расстояние между двумя лунками составляет около или не более чем около 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 mm, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм или 0,3 мм. Расстояние между двумя лунками может находиться в диапазоне 0,3-9 мм, 0,4-8 мм, 0,5-7 мм, 0,6-6 мм, 0,7-5 мм, 0,7-4 мм, 0,8-3 мм или 0,9-2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,8 – 2 мм.

В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение внутренней части лунки, как показано поз. **2721**, составляет около или по меньшей мере около 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм,

7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм или 9 мм. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение внутренней части лунки составляет около или не более чем около 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм или 0,3 мм. Поперечное сечение внутренней части лунки может находиться в диапазоне 0,3-9 мм, 0,4-8 мм, 0,5-7 мм, 0,6-6 мм, 0,7-5 мм, 0,7-4 мм, 0,8-3 мм или 0,9-2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что поперечное сечение может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,8 – 2 мм. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение лунки, включая ободок лунки, как показано поз. **2720**, составляет около или по меньшей мере около 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм или 9 мм. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение лунки, включая ободок лунки, составляет около или не более чем около 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм или 0,3 мм. Попереченое сечение лунки, включая ободок лунки, может находиться в диапазоне 0,3-9 мм, 0,4-8 мм, 0,5-7 мм, 0,6-6 мм, 0,7-5 мм, 0,7-4 мм, 0,8-3 мм или 0,9-2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что поперечное сечение может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,8 – 2 мм.

Нанореактор может содержать любое количество лунок, включая, но без ограничения, любое количество в диапазоне от около 2 до около 250. В некоторых вариантах осуществления количество лунок составляет от около 2 до около 225 лунок, от около 2 до около 200 лунок, от около 2 до около 175 лунок, от около 2 до около 150 лунок, от около 2 до около 125 лунок, от около 2 до около 100 лунок, от около 2 до около 75 лунок, от около 2 до около 50 лунок, от около 2 до около 25 лунок, от около 25 до около 250 лунок, от около 75 до около 250 лунок, от около 100 до около 250 лунок, от около 125 до около 250 лунок, от около 150 до около 250 лунок, от около 175 до около 250 лунок, от около 200 до около 250 лунок или от около 225 до около 250 лунок. Специалисту в данной

области будет понятно, что количество лунок может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 25 – 125.

Отметки совмещения могут быть размещены на нанореакторе, описанном здесь, для содействия выравниванию нанореактора с другими компонентами системы, например, микрожидкостным устройством или компонентом микрожидкостного устройства. Нанореакторы согласно изобретению могут иметь одну или несколько отметок совмещения, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более отметок совмещения. Вид нанореактора со стороны рабочего тонкого слоя, показанный на фигуре 25B, содержит три отметки совмещения, полезные для выравнивания устройства с другими компонентами системы. Отметка совмещения может быть расположена в любом положении в пределах нанореактора. Как показано поз. **2716** и **2717**, отметка совмещения может быть расположена вблизи начальной точки, при этом отметка совмещения располагается ближе к начальной точке, чем любая лунка. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена около края нанореактора, как показано поз. **2713**, при этом расстояние от края проиллюстрировано поз. **2714** и **2715**. Отметка совмещения может быть расположена на расстоянии от около 0,1 мм до около 10 мм от края нанореактора. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена на расстоянии около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм. 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм. 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм. 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 9 мм или 10 мм от края нанореактора. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена на расстоянии около или не более чем около 10 мм, 9 мм, 8,8 мм. 8,6 мм, 8,4 мм. 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5.4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм. 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм от края нанореактора. Отметка совмещения может быть расположена на расстоянии в диапазоне 0,1-10 мм, 0,2-9 мм, 0,3-8 мм, 0,4-7 мм, 0,5-6 мм, 0,1-6 мм, 0,2-5 мм, 0,3-4 мм, 0,4-3 мм или 0,5-2 мм от края нанореактора. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 мм – 5 мм. Отметка совмещения может быть расположена на близком расстоянии от лунки, при этом иллюстративные расстояния по оси X и Y указаны поз. **2719** и **2718**, соответственно. В некоторых вариантах осуществления расстояние между лункой и отметкой совмещения

составляет около или по меньшей мере около 0,001 мм, 0,005 мм, 0,01 мм, 0,02 мм, 0,03 мм, 0,04 мм, 0,05 мм, 0,06 мм, 0,07 мм, 0,08 мм, 0,09 мм, 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм, 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,5 мм, 1,7 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,5 мм, 2,7 мм, 3 мм, 3,5 мм, 4 мм, 4,5 мм, 5 мм, 5,5 мм, 6 мм, 6,5 мм или 8 мм. В некоторых вариантах осуществления расстояние между лункой и отметкой совмещения составляет около или не более чем около 8 мм, 6,5 мм, 6 мм, 5,5 мм, 5 мм, 4,5 мм, 4 мм, 3,5 мм, 3 мм, 2,7 мм, 2,5 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,7 мм, 1,5 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм, 0,1 мм, 0,09 мм, 0,08 мм, 0,07 мм, 0,06 мм, 0,05 мм, 0,04 мм, 0,03 мм, 0,02 мм, 0,01 мм, 0,005 мм или 0,001 мм. Расстояние между лункой и отметкой совмещения может находиться в диапазоне 0,001-8 мм, 0,01-7 мм, 0,05-6 мм, 0,1-5 мм, 0,5-4 мм, 0,6-3 мм, 0,7-2 мм или 0,8-1,7 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,5 – 2 мм.

Вид нанореактора со стороны несущего толстого слоя, показанный на фигуре 26D, содержит четыре отметки совмещения, полезные для выравнивания устройства с другими компонентами системы. Отметка совмещения может быть расположена в любом положении в пределах нанореактора. Как показано поз. **2722** и **2723** на подробном изображении отметки совмещения **H**, отметка совмещения может быть расположена вблизи угла нанореактора на стороне несущего толстого слоя. Отметка совмещения может быть расположена на расстоянии от около 0,1 мм до около 10 мм от угла нанореактора. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена на расстоянии около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм. 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм, 9 мм или 10 мм от угла нанореактора. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения расположена на расстоянии около или не более чем около 10 мм, 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм от угла нанореактора. Отметка совмещения может быть расположена на расстоянии в диапазоне 0,1-10 мм, 0,2-9 мм, 0,3-8 мм, 0,4-7 мм, 0,5-6 мм, 0,1-6 мм, 0,2-5 мм, 0,3-4 мм, 0,4-3 мм или 0,5-2 мм от угла нанореактора. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в

пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 – 5 мм. Отметка совмещения может иметь любую ширину, подходящую для выполнения функции. В некоторых вариантах осуществления, как показано поз. **2724** и **2725**, ширина отметки совмещения составляет около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм. 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм, 9 мм или 10 мм. В некоторых вариантах осуществления ширина отметки совмещения составляет около или не более чем около 10 мм, 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм. Ширина отметки совмещения может находиться в диапазоне 0,1-10 мм, 0,2-9 мм, 0,3-8 мм, 0,4-7 мм, 0,5-6 мм, 0,1-6 мм, 0,2-5 мм, 0,3-4 мм, 0,4-3 мм или 0,5-2 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что ширина может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,1 – 5 мм. Поперечное сечение отметки совмещения может иметь любой подходящий размер, как показано поз. **2726**. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение отметки совмещения составляет около или по меньшей мере около 0,001 мм, 0,002 мм, 0,004 мм, 0,006 мм, 0,008 мм, 0,01 мм, 0,012 мм, 0,014 мм, 0,016 мм, 0,018 мм, 0,02 мм, 0,025 мм, 0,03 мм, 0,035 мм, 0,04 мм, 0,045 мм, 0,05 мм, 0,055 мм, 0,06 мм, 0,065 мм, 0,07 мм, 0,075 мм, 0,08 мм, 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм или 0,5 мм. В некоторых вариантах осуществления поперечное сечение отметки совмещения составляет около или не более чем около 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм, 0,1 мм, 0,08 мм, 0,075 мм, 0,07 мм, 0,065 мм, 0,06 мм, 0,055 мм, 0,05 мм, 0,045 мм, 0,04 мм, 0,035 мм, 0,03 мм, 0,025 мм, 0,02 мм, 0,018 мм, 0,016 мм, 0,014 мм, 0,012 мм, 0,01 мм, 0,008 мм, 0,006 мм, 0,004 мм, 0,002 мм, 0,001 мм или меньше. Поперечное сечение отметки совмещения может находиться в диапазоне 0,001-0,5 мм, 0,004-0,4 мм, 0,008-0,3 мм, 0,01-0,2 мм, 0,015-0,1 мм, 0,018-0,1 мм или 0,02-0,05 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что поперечное сечение может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,02 – 0,1 мм.

В некоторых вариантах осуществления нанореактор может иметь участок для метки или серийной метки, как показано на фигуре 26E, на которой представлена иллюстративная схема расположения лунок в нанореакторе. В некоторых вариантах

осуществления метка представляет собой серийный номер. Метка может быть расположена около края нанореактора, как показано расстояниями поз. **2728** и **2727**. В некоторых вариантах осуществления любая часть метки может быть расположена на расстоянии от около 0,1 мм до около 10 мм от края нанореактора. В некоторых вариантах осуществления любая часть метки может быть расположена на расстоянии около или по меньшей мере около 0,1 мм, 0,2 мм, 0,3 мм, 0,4 мм, 0,5 мм, 0,6 мм, 0,7 мм, 0,8 мм. 0,9 мм, 1 мм, 1,2 мм, 1,4 мм, 1,6 мм, 1,8 мм, 2 мм, 2,2 мм, 2,4 мм, 2,6 мм, 2,8 мм, 3 мм, 3,2 мм, 3,4 мм, 3,6 мм, 3,8 мм, 4 мм, 4,2 мм, 4,4 мм, 4,6 мм, 4,8 мм, 5 мм, 5,2 мм, 5,4 мм, 5,6 мм, 5,8 мм, 6 мм, 6,2 мм, 6,4 мм, 6,6 мм, 6,8 мм, 7 мм, 7,2 мм, 7,4 мм, 7,6 мм, 7,8 мм, 8 мм, 8,2 мм, 8,4 мм, 8,6 мм, 8,8 мм, 9 мм или 10 мм от края нанореактора. В некоторых вариантах осуществления любая часть метки может быть расположена на расстоянии около или не более чем около 10 мм, 9 мм, 8,8 мм, 8,6 мм, 8,4 мм, 8,2 мм, 8 мм, 7,8 мм, 7,6 мм, 7,4 мм, 7,2 мм, 7 мм, 6,8 мм, 6,6 мм, 6,4 мм, 6,2 мм, 6 мм, 5,8 мм, 5,6 мм, 5,4 мм, 5,2 мм, 5 мм, 4,8 мм, 4,6 мм, 4,4 мм, 4,2 мм, 4 мм, 3,8 мм, 3,6 мм, 3,4 мм, 3,2 мм, 3 мм, 2,8 мм, 2,6 мм, 2,4 мм, 2,2 мм, 2 мм, 1,8 мм, 1,6 мм, 1,4 мм, 1,2 мм, 1 мм, 0,9 мм, 0,8 мм, 0,7 мм, 0,6 мм, 0,5 мм, 0,4 мм, 0,3 мм, 0,2 мм или 0,1 мм от края нанореактора. Расстояние может находиться в диапазоне 0,1-10 мм, 0,2-9 мм, 0,3-8 мм, 0,4-7 мм, 0,5-6 мм, 0,6-5 мм, 0,7-4 мм, 0,8-3 мм, 0,9-2 мм или 1,5 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что расстояние может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 0,5 – 2 мм. Метка может иметь любую длину, включая от около 1 мм до около 25 мм, как показано поз. **2726**. В некоторых вариантах осуществления длина метки составляет около или по меньшей мере около 1 мм, 5 мм, 10 мм, 15 мм, 20 мм, 25 мм, 30 мм, 40 мм, 50 мм, 60 мм, 70 мм, 80 мм, 90 мм, 100 мм, 110 мм, 120 мм, 130 мм, 140 мм или 150 мм. В некоторых вариантах осуществления длина метки составляет около или не более чем около 150 мм, 140 мм, 130 мм, 120 мм, 110 мм, 100 мм, 90 мм, 80 мм, 70 мм, 60 мм, 50 мм, 50 мм, 40 мм, 30 мм, 25 мм, 20 мм, 15 мм, 10 мм, 5 мм, 1 мм или меньше. В некоторых вариантах осуществления длина метки составляет от около 5 мм до около 125 мм, от около 5 мм до около 100 мм, от около 5 мм до около 75 мм, от около 5 мм до около 50 мм, от около 5 мм до около 25 мм, от около 25 мм до около 150 мм, от около 50 мм до около 150 мм, от около 75 мм до около 150 мм, от около 100 мм до около 150 мм или от около 125 мм до около 150 мм. Специалисту в данной области будет понятно, что длина может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений, например, 5 – 25 мм.

**Материалы**

Субстраты, твердая подложка или расположенные в ней микроструктуры или реакторы могут быть изготовлены из различных материалов, подходящих для способов и композиций согласно описанному здесь изобретению. В определенных вариантах осуществления материалы, из которых изготовлены субстраты/твердые подложки согласно изобретению, проявляют низкий уровень связывания с олигонуклеотидами. В некоторых ситуациях может быть использован материал, который является прозрачным для видимого и/или УФ-света. Могут быть использованы материалы, которые обладают достаточной проводимостью, например такие, которые могут формировать однородное электрическое поле по всей или части поверхности описанных здесь субстратов/твердых подложек. В некоторых вариантах осуществления такие материалы могут быть электрически соединены с заземлением. В некоторых случаях субстрат или твердая подложка может быть теплопроводящей или изолирующей. Материалы могут быть химически устойчивыми и теплостойкими для содействия химическим или биохимическим реакциям, таким как серии реакций олигонуклеотидного синтеза. В отношении эластичных материалов, представляющие интерес материалы могут включать: нейлон, как модифицированный, так и немодифицированный, нитроцеллюлозу, полипропилен и тому подобное. В отношении твердых материалов, конкретные представляющие интерес материалы включают: стекло; кварцевое стекло; кремний, пластики (например, политетрафторэтилен, полипропилен, полистирол, поликарбонат и их смеси, и тому подобное); металлы (например, золото, платина и тому подобное). Субстрат, твердая подложка или реакторы могут быть изготовлены из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, полидиметилсилоксана (PDMS) и стекла. Субстраты/твердые подложки или содержащиеся в них микроструктуры и реакторы могут быть изготовлены с использованием комбинации указанных здесь материалов или любого другого подходящего материала, известного в данной области.

**Модификации поверхности**

В различных вариантах осуществления модификации поверхности используются для химического и/или физического изменения поверхности путем процессов добавления или замещения для изменения одного или более химических и/или физических свойств поверхности субстрата, или выбранного участка или области на поверхности субстрата. Например, модификация поверхности может включать: (1) изменение свойств смачиваемости поверхности; (2) функционализирование поверхности, то есть обеспечение, модифицирование или замену поверхностных функциональных групп; (3)

дефункционализирование поверхности, то есть удаление поверхностных функциональных групп; (4) иное изменение химического состава поверхности, например, посредством травления; (5) увеличение или уменьшение шероховатости поверхности; (6) обеспечение на поверхности покрытия, например покрытия, демонстрирующего свойства смачиваемости, которые отличаются от свойств смачиваемости поверхности; и/или (7) осаждение на поверхность твердых частиц.

Поверхность субстрата или выделенных локусов, на которые осаждают олигонуклеотиды или другие фрагменты, может быть гладкой или по существу плоской, или иметь неровности, такие как вдавливания или приподнятости. Поверхность может быть модифицирована одним или несколькими различными слоями соединений, которые предназначены для модифицирования свойств поверхности желательным образом. Такие представляющие интерес модифицирующие слои включают: неорганические и органические слои, такие как металлы, оксиды металлов, полимеры, малые органические молекулы и тому подобное. Представляющие интерес полимерные слои включают слои: пептидов, белков, нуклеиновых кислот или их миметиков (например, нуклеиновых кислот, кодирующих пептид, и тому подобное); полисахаридов, фосфолипидов, полиуретанов, сложных полиэфиров, поликарбонатов, полимочевины, полиамидов, полиэтиленаминов, полиариленсульфидов, полисилоксанов, полиимидов, полиацетатов и тому подобное, или любых других подходящих соединений, описанных здесь или известных из других источников в данной области, при этом полимеры могут быть гетеро- или гомополимерными, и могут содержать или могут не содержать разные присоединенные функциональные группы (например, конъюгированные). Другие материалы и способы модифицирования поверхности субстрата или покрытия твердой подложки описаны в патенте США No. 6773888 и публикации патента США 2007/0054127, которые включены здесь полностью в виде отсылки.

Выделенные локусы могут быть функционализированы фрагментом, который может повышать или понижать поверхностную энергию твердой подложки. Фрагмент может быть химически инертным или, альтернативно, представлять собой фрагмент, который является подходящим для содействия желательной химической реакции. Поверхностная энергия или гидрофобность поверхности может определять аффинность олигонуклеотида к закреплению на поверхности. Способ подготовки субстрата может включать: (a) обеспечение субстрата, имеющего поверхность, которая содержит диоксид кремния; и (b) силанирование поверхности с использованием подходящего агента для силанирования, описанного здесь или известного из других источников в данной области, например, органофункциональной молекулы алкоксисилана. В некоторых случаях

органофункциональная молекула алкоксисилана может представлять собой диметилхлор-октодецил-силан, метилдихлор-октодецил-силан, трихлор-октодецил-силан, триметил-октодецил-силан, триэтил-октодецил-силан или любую их комбинацию.

Может быть также подготовлена поверхность субстрата, имеющая низкую поверхностную энергию, с использованием любого способа, известного в данной области. Понижение поверхностной энергии может способствовать прикреплению олигонуклеотидов к поверхности. Поверхность может быть функционализирована для обеспечения ковалентного связывания молекулярных фрагментов, которые могут понижать поверхностную энергию таким образом, что смачиваемость может быть снижена. В некоторых вариантах осуществления функционализирование поверхностей позволяет повысить поверхностную энергию и смачиваемость.

В некоторых вариантах осуществления поверхность субстрата контактирует с дериватизирующей композицией, которая содержит смесь силанов, в условиях реакции, эффективных для связывания силанов с поверхностью субстрата, обычно посредством реакционноспособных гидрофильных фрагментов, присутствующих на поверхности субстрата. Как правило, силанирование используют для покрытия поверхности посредством самосборки с органофункциональными молекулами алкоксисилана. Дополнительно могут быть использованы разнообразные силоксановые функционализирущие реагенты, как известно в данной области, например, для повышения или понижения поверхностной энергии. Органофункциональные алкоксисиланы классифицируются в соответствии с их органическими функциями. Неограничивающие примеры силоксановых функционализирующих реагентов включают гидроксиалкилсилоксаны (силилирование поверхности, функционализирование дибораном и окисление спирта пероксидом водорода), диол(дигидроксиалкил)силоксаны (силилирование поверхности и гидролиз до диола), аминоалкилсилоксаны (амины не требуют промежуточной стадии функционализирования), глицидоксисиланы (3-глицидоксипропил-диметил-этоксисилан, глицидокси-триметоксисилан), меркаптосиланы (3-меркаптопропил-триметоксисилан, 3-4-эпоксициклогексил-этилтриметоксисилан или 3-меркаптопропил-метил-диметоксисилан), бициклогептенил-трихлорсилан, бутил-альдегид-триметоксисилан или димерные вторичные аминоалкилсилоксаны. Гидроксиалкилсилоксаны могут включать аллилтрихлорсилан, превращающийся в 3-гидроксипропил, или 7-окт-1-енил-трихлорхлорсилан, превращающийся в 8-гидроксиоктил. Диол(дигидроксиалкил)силоксаны включают глицидил-триметоксисилановое производное (2,3-дигидрокипропилокси)пропила. Аминоалкилсилоксаны включают 3-аминопропил-триметоксисилан, превращающийся в

3-аминопропил (3-аминопропил-триэтоксисилан, 3-аминопропил-диэтокси-метилсилан, 3-аминопропил-диметил-этоксисилан или 3-аминопропил-триметоксисилан). Димерные вторичные аминоалкилсилоксаны могут представлять собой бис(3-триметоксисилилпропил)амин, превращающийся в бис(силилоксилпропил)амин. Кроме того, в настоящем изобретении может быть использован ряд попеременно функционализированных поверхностей. Неограничивающие примеры включают следующие: 1. Полиэтилен/полипропилен (функционализирован гамма-излучением или окислением хромовой кислотой, и восстановлением до гидроксиалкильной поверхности); 2. Полистирол с высокой степенью сшивки - дивинилбензол (дериватизирован путем хлорметилирования и аминирован в бензиламиновую функциональную поверхность); 3. Нейлон (концевые аминогексильные группы являются напрямую реакционноспособными); или 4. Подвергнутый травлению восстановленный политетрафторэтилен. Другие способы и функционализирующие агенты описаны в патенте США No. 5474796, который включен здесь полностью в виде отсылки. Смесь функционализирующих групп, например силанов, может быть представлена в любых различных соотношениях. Например, без ограничения, смесь может содержать по меньшей мере два различных типа функционализирующих агентов, например, силанов. Соотношение в смеси по меньшей мере двух типов функционализирующих поверхность агентов, например силанов, может составлять примерно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 2:3, 2:5, 2:7, 2:9, 2:11, 2:13, 2:15, 2:17, 2:19, 3:5, 3:7, 3:8, 3:10, 3:11, 3:13, 3:14, 3:16, 3:17, 3:19, 4:5, 4:7, 4:9, 4:11, 4:13, 4:15, 4:17, 4:19, 5:6, 5:8, 5:9, 5:11, 5:12, 5:13, 5:14, 5:16, 5:17, 5:18, 5:19, 6:7, 6:11, 6:13, 6:17, 6:19, 7:8, 7:9, 7:10, 7:11, 7:12, 7:13, 7:15, 7:16, 7:18, 7:19, 8:9, 8:11, 8:13, 8:15, 8:17, 8:19, 9:10, 9:11, 9:13, 9:14, 9:16, 9:17, 9:19, 10:11, 10:13, 10:17, 10:19, 11:12, 11:13, 11:14, 11:15, 11:16, 11:17, 11:18, 11:19, 11:20, 12:13, 12:17, 12:19, 13:14, 13:15, 13:16, 13:17, 13:18, 13:19, 13:20, 14:15, 14:17, 14:19, 15:16, 15:17, 15:19, 16:17, 16:19, 17:18, 17:19, 17:20, 18:19, 19:20, или любое другое соотношение для достижения желательной презентации двух групп на поверхности. Без привязки к теории полагают, что презентация на поверхности будет в высокой степени пропорциональна соотношению двух групп в смеси. Желательные величины поверхностного натяжения, смачиваемости, углов контакта с водой или углов контакта с другими подходящими растворителями в соответствии со способами и композициями согласно изобретению могут быть достигнуты путем обеспечения соотношения функционализирующих агентов. Кроме того, агенты в смеси могут быть выбраны из подходящих реакционноспособных и инертных фрагментов для последующих реакций, разбавления поверхностной плотности реакционноспособных групп до желательного уровня в соответствии со способами и

композициями изобретения. В некоторых вариантах осуществления концентрация доли поверхностной функциональной группы, которая вступает в реакцию с формированием растущих олигонуклеотидов в реакции олигонуклеотидного синтеза, составляет около, менее чем около или более чем около 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 7,0, 10,0, 15,0, 20,0, 50,0, 75,0, 100,0 мкмоль/м$^2$.

В различных вариантах осуществления поверхность модифицирована для повышения ее поверхностной энергии или гидрофильности по отношению к покрытию из реакционноспособных гидрофильных фрагментов. Путем изменения поверхностной энергии различных частей поверхности субстрата можно регулировать распространение осажденных жидких реагентов, в некоторых случаях содействовать. Например, на фигуре 5 показан случай, когда каплю реагента осаждают в микролунку с помощью струйного принтера. Жидкая капля может распространяться и заполнять микролунки меньшего размера, так как в этом случае поверхность микролунок имеет более высокую поверхностную энергию по сравнению с другой соседней поверхностью. Реакционноспособные гидрофильные фрагменты на поверхности субстрата могут представлять собой гидроксильные группы, карбоксильные группы, тиольные группы и/или замещенные или незамещенные аминогруппы. Подходящие материалы включают, но без ограничения, носители, которые могут быть использованы для твердофазного химического синтеза, например, поперечносшитые полимерные материалы (например, полимеры на основе дивинилбензола и стирола), агароза (например, Sepharose®), декстран (например, Sephadex®), полимеры на основе целлюлозы, полиакриламиды, кремний, стекло (в частности, стекло с контролируемым размером пор или «CPG»), керамика и тому подобное. Носители могут быть получены коммерческим путем и использованы в том виде, в котором были получены, или могут быть обработаны или покрыты перед функционализированием.

**Гидрофильные и гидрофобные поверхности**

Поверхностная энергия или гидрофобность поверхности может быть оценена или измерена путем измерения угла контакта с водой. Угол контакта с водой представляет собой угол между поверхностью капли и твердой поверхностью, где капля воды соприкасается с твердой поверхностью. Твердая поверхность может быть гладкой, плоской или планарной поверхностью. Можно количественно определить смачиваемость твердой поверхности жидкостью (например, водой) с помощью уравнения Юнга. В некоторых случаях может наблюдаться гистерезис угла контакта с водой, изменяющийся от так называемого наступающего (максимального) краевого угла до отступающего

(минимального) краевого угла. Равновесный краевой угол может находиться в пределах этих значений и может быть из них вычислен. Гидрофобность и гидрофильность могут быть количественно выражены при сравнении с углом контакта с водой. Если поверхность имеет угол контакта с водой меньше, чем 90°, то указанная твердая поверхность может рассматриваться как гидрофильная или полярная. Если поверхность имеет угол контакта с водой больше, чем 90°, то указанная твердая поверхность может рассматриваться как гидрофобная или аполярная. Высокогидрофобные поверхности с низкой поверхностной энергией могут иметь угол контакта с водой, который составляет больше, чем 120°.

Поверхностные характеристики покрытых поверхностей можно регулировать различными способами, подходящими для олигонуклеотидного синтеза. Может быть выбрана поверхность, которая является инертной к условиям обычного олигонуклеотидного синтеза; например, твердая поверхность может не содержать свободных гидроксильных, амино- или карбоксильных групп на поверхности раздела с растворителем во время добавления мономера, в зависимости от выбранной химии. Альтернативно, поверхность может содержать реакционноспособные фрагменты до начала первого цикла или первых нескольких циклов олигонуклеотидного синтеза, и эти реакционноспособные фрагменты могут быстро истощаться до неизмеряемых поверхностных концентраций после одного, двух, трех, четырех, пяти или более циклов олигонуклеотидного синтеза. Поверхность может быть дополнительно оптимизирована для повышения или понижения смачиваемости относительно окружающих поверхностей, например, с помощью типичных органических растворителей, таких как ацетонитрил и гликолевые эфиры, или водных растворителей.

Без привязки к теории полагают, что под явлением смачиваемости понимается степень поверхностного натяжения или сил притяжения между молекулами на поверхности раздела твердой и жидкой фаз и выражается в Дин/см$^2$. Например, фторуглероды обладают весьма низким поверхностным натяжением, которое обычно объясняется исключительной полярностью (электроотрицательностью) связи углерод-фтор. В высокоструктурированных пленках типа Ленгмюра-Блоджетта поверхностное натяжение слоя определяется главным образом процентным содержанием фтора на конце аклильных цепей. Для высокоупорядоченных пленок единичная концевая трифторметильная группа может наделять поверхность почти такой же липофобностью, как перфторалкильный слой. Когда фторуглероды ковалентно присоединены к подлежащей дериватизированной твердой (например, высокосшитой полимерной) подложке, плотность реакционноспособных центров может быть ниже, чем плотность

пленок Ленгмюра-Блоджетта и групп. Например, поверхностное натяжение метилтриметоксисилановой поверхности может составлять примерно 22,5 мН/м, и аминопропилтриэтоксисилановой поверхности может составлять примерно 35 мН/м. Другие примеры силановых поверхностей описаны в Arkles B et al., "The role of polarity in the structure of silanes employed in surface modification", Silanes and Other Coupling Agents, Vol. 5, который включен здесь полностью путем отсылки. Вкратце, считается, что гидрофильное поведение поверхностей обычно возникает, когда критическое поверхностное натяжение составляет больше, чем 45 мН/м. По мере увеличения критического поверхностного натяжения предполагаемое уменьшение краевого угла сопровождается более сильным адсорбционным поведением. Считается, что гидрофобное поведение поверхностей обычно возникает, когда критическое поверхностное натяжение составляет меньше, чем 35 мН/м. Во-первых, уменьшение критического поверхностного натяжения связано с олеофильным поведением, то есть смачиванием поверхностей углеводородными маслами. При уменьшении критического натяжения поверхности до менее 20 мН/м поверхности противодействуют смачиванию углеводородными маслами и рассматриваются как олеофобные, а также гидрофобные., Модифицирование поверхности силаном можно использовать, например, для создания широкого диапазона величин критического поверхностного натяжения. Таким образом, в способах и композициях согласно изобретению можно использовать покрытия поверхности, например такие, которые содержат силаны, для достижения поверхностного натяжения меньше, чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 120 мН/м или больше. Кроме того, в способах и композициях согласно изобретению можно использовать покрытия поверхности, например такие, которые содержат силаны, для достижения поверхностного натяжения более чем 115, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6 мН/м или меньше. Угол контакта с водой и величины поверхностного натяжения для неограничивающих примеров покрытий поверхности, например таких, которые содержат силаны, представлены в таблице 1 и таблице 2 в работе Arkles et al. (Silanes and Other Coupling Agents, Vol. 5v: The Role of Polarity in the Structure of Silanes Employed in Surface Modification. 2009), которая включена здесь путем отсылки в полном объеме. Указанные таблицы представлены ниже.

**Таблица 1**

**Углы контакта с водой (градусы) на гладких поверхностях**

| | |
|---|---|
| Гептадекафтордецилтриметоксисилан | 113-115 |
| Поли(тетрафторэтилен) | 108-112 |
| Полипропилен | 108 |

| | |
|---|---|
| Октадецилдиметилхлорсилан | 110 |
| Октадецилтрихлорсилан | 102-109 |
| Трим(триметилсилокси)силилэтилдиметилхлорсилан | 103-104 |
| Октилдиметилхлорсилан | 104 |
| Бутилдиметилхлорсилан | 100 |
| Триметилхлорсилан | 90-100 |
| Полиэтилен | 88-103 |
| Полистирол | 94 |
| Поли(хлортрифторэтилен) | 90 |
| Человеческая кожа | 75-90 |
| Алмаз | 87 |
| Графит | 86 |
| Кремний (протравленный) | 86-88 |
| Тальк | 82-90 |
| Хитозан | 80-81 |
| Сталь | 70-75 |
| Метоксиэтоксиундецилтрихлорсилан | 73-74 |
| Метакрилоксипропилтриметоксисилан | 70 |
| Золото, типовое (смотри золото, чистое) | 66 |
| Слизистая оболочка кишечника | 50-60 |
| Каолин | 42-46 |
| Платина | 40 |
| Нитрид кремния | 28-30 |
| Иодид серебра | 17 |
| [Метокси(полиэтиленокси)пропил]триметоксисилан | 15-16 |
| Натрий-кальций-силикатное стекло | <15 |
| Золото, чистое | <10 |
| Триметоксисилилпропил-замещенный поли(этиленимин), гидрохлорид | <10 |

*Примечание*: В таблице 1 уголы контакта для силанов относятся к гидролитическому осаждению силана на гладких поверхностях. Данные, представленные здесь, взяты из различных литературных источников и из работ авторов. Точные сравнения между субстратами не учитывают различий в способах тестирования или то, что представленные углы контакта являются наступающими, отступающими или равновесными.

**Таблица 2**

**Величины критического поверхностного натяжения (мН/м)**

| | |
|---|---|
| Гептадекафтордецилтрихлорсилан | 12 |
| Поли(тетрафторэтилен) | 18,5 |
| Октадецилтрихлорсилан | 20-24 |
| Метилтриметоксисилан | 22,5 |
| Нонафторгексилтриметоксисилан | 23 |
| Винилтриэтоксисилан | 25 |
| Парафиновый воск | 25,5 |
| Этилтриметоксисилан | 27,0 |
| Пропилтриметоксисилан | 28,5 |
| Стекло, натрий-кальций-силикатное (сырое) | 30,0 |
| Поли(хлортрифторэтилен) | 31,0 |
| Полипропилен | 31,0 |
| Поли(пропиленоксид) | 32 |
| Полиэтилен | 33,0 |
| Трифторпропилтриметоксисилан | 33,5 |
| 3-(2-Аминоэтил)аминопропилтриметоксисилан | 33,5 |
| Полистирол | 34 |
| р-Толлилтриметоксисилан | 34 |
| Цианоэтилтриметоксисилан | 34 |
| Аминопропилтриэтоксисилан | 35 |
| Ацетоксипропилтриметоксисилан | 37,5 |
| Поли(метилметакрилат) | 39 |
| Поли(винилхлорид) | 39 |
| Фенилтриметоксисилан | 40,0 |
| Хлорпропилтриметоксисилан | 40,5 |
| Меркаптопропилтриметоксисилан | 41 |
| Глицидоксипропилтриметоксисилан | 42,5 |
| Поли(этилентерефталат) | 43 |
| Медь (сухая) | 44 |
| Поли(этиленоксид) | 43-45 |
| Алюминий (сухой) | 45 |
| Нейлон 6/6 | 45-46 |
| Железо (сухое) | 46 |
| Стекло натрий-кальций-силикатное (сухое) | 47 |

| | |
|---|---|
| Оксид титана (анатаз) | 91 |
| Оксид железа | 107 |
| Оксид олова | 111 |

Способы измерения угла контакта с водой могут включать любой способ, известный в данной области, включая статический метод лежащей капли, динамический метод лежащей капли, динамический метод Вильгельми, метод Вильгельми с единичным волокном, метод измерения угла контакта на порошках и тому подобное. В некоторых случаях поверхность субстрата или часть поверхности субстрата, как описано здесь, в настоящем изобретении может быть функционализирована или модифицирована с достижением гидрофобности, низкой поверхностной энергии или угла контакта с водой более чем около 90°, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120°, 125°, 130°, 135°, 140°, 145° или 150°, измеренный на неискривленном, гладком или плоском эквиваленте релевантной функционализированной поверхности субстрата, описанной здесь. Угол контакта с водой функционализированной поверхности, описанной здесь, может относиться к краевому углу капли воды на функционализированной поверхности в неискривленной, гладкой, плоской и планарной геометрии. В некоторых случаях поверхность субстрата или часть поверхности субстрата, как описано здесь, в настоящем документе может быть функционализирована или модифицирована с достижением гидрофильности, высокой поверхностной энергии или угла контакта с водой менее чем около 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° или 10°, измеренного на неискривленном, гладком или плоском эквиваленте релевантной функционализированной поверхности субстрата, как описано здесь. Поверхность субстрата или часть поверхности субстрата может быть функционализирована или модифицирована с достижением более гидрофильных или гидрофобных свойств по сравнению с поверхностью или частью поверхности субстрата до функционализирования или модифицирования.

В некоторых случаях одна или несколько поверхностей могут быть модифицированы с получением различия в угле контакта с водой более чем 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° или 10°, измеренном на одной или нескольких неискривленных, гладких или планарных эквивалентных поверхностях. В некоторых случаях поверхность микроструктур, каналов, выделенных локусов, выделенных колпачков реакторов или других частей субстрата может быть модифицирована с получением дифференцированной гидрофобности, соответствующей различию в угле контакта с водой более чем 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° или 10°, измеренном на неискривленных, гладких или плоских эквивалентных поверхностях таких структур. Если не указано иное, углы контакта с

водой, указанные здесь, соответствуют измерениям, проводимым на неискривленных, гладких или планарных эквивалентах рассматриваемых поверхностей.

Другие способы функционализирования поверхности описаны в патенте США № 6028189, который включен здесь путем отсылки в полном объеме. Например, гидрофильные выделенные локусы могут быть созданы сначала путем нанесения защитного агента или резиста на поверхность каждого локуса в пределах субстрата. Затем незащищенный участок может быть покрыт гидрофобным агентом с получением нереакционноспособной поверхности. Например, гидрофобное покрытие может быть создано путем химического осаждения из газовой фазы (тридекафтортетрагидрооктил)-триэтоксисилана на незащищенный оксид, окружающий защищенные круги. В заключение, защитный агент или резист может быть удален, проявляя области локусов субстрата для последующей модификации и олигонуклеотидного синтеза. В некоторых вариантах осуществления первоначальное модифицирование таких незащищенных областей может не поддаваться дополнительному модифицированию и сохранять свое функционализирование поверхности, при этом новые незащищенные участки могут быть подвергнуты последующим стадиям модифицирования.

**Множество параллельных микрожидкостных реакций**

В другом аспекте в настоящем документе описаны системы и способы проведения серии параллельных реакций. Система может содержать два или более субстратов, которые могут быть герметично соединены друг с другом, например, с возможностью последующего отсоединения, формируя после герметичного соединения множество индивидуально доступных реакционных объемов или реакторов. Новые наборы реакторов могут быть образованы путем отсоединения первого субстрата от второго субстрата и его выравнивания с третьим субстратом. Каждый субстрат может содержать реагенты, например, олигонуклеотиды, ферменты, буферы или растворители для требуемых реакций. В некоторых вариантах осуществления система содержит первую поверхность со множеством выделенных локусов при первой подходящей плотности и прикрывающий элемент со множеством выделенных колпачков реакторов при второй подходящей плотности. Система может выравнивать множество выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на первой поверхности с формированием временного уплотнения между первой поверхностью и прикрывающим элементом. Временное уплотнение между выровненными субстратами может физически разделять локус на первой поверхности на группы, состоящие примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 или более локусов. Серии

параллельных реакций, описанных здесь, могут быть выполнены в соответствии со способами и композициями настоящего изобретения. Первая поверхность со множеством выделенных локусов при первой плотности и прикрывающий элемент со множеством выделенных колпачков реакторов при второй плотности могут быть выровнены таким образом, что множество выделенных колпачков реакторов со множеством выделенных локусов на первой поверхности будут формировать временное уплотнение между первой поверхностью и прикрывающим элементом и тем самым физически разделять локусы на первой поверхности на группы, состоящие из примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 или более локусов. Первая реакция может быть выполнена с формированием первого набора реагентов. Прикрывающий элемент может быть снят с первой поверхности. После снятия колпачки реакторов, каждый, могут удерживать по меньшей мере часть первого набора реагентов в ранее герметично закрытых реакционных объемах. Множество выделенных локусов может находиться при плотности, составляющей около, по меньшей мере около или менее чем около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 75, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700, около 800, около 900, около 1000, около 1500, около 2000, около 3000, около 4000, около 5000, около 6000, около 7000, около 8000, около 9000, около 10000, около 20000, около 40000, около 60000, около 80000, около 100000 или около 500000 на 1 мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных локусов может находиться при плотности, которая составляет около, по меньшей мере около, менее чем около 100 на мм$^2$. Множество выделенных колпачков реакторов могут находиться при плотности, которая составляет около, по меньшей мере около, менее чем около 1 на мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления множество выделенных колпачков реакторов могут находиться при плотности, которая составляет около, по меньшей мере около, менее чем около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 75, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700, около 800, около 900, около 1000, около 1500, около 2000, около 3000, около 4000, около 5000, около 6000, около 7000, около 8000, около 9000, около 10000, около 20000, около 40000, около 60000, около 80000, около 100000 или около 500000 на 1 мм$^2$. Способы, описанные здесь, могут доколнительно включать обеспечение второй поверхности со множеством выделенных локусов при третьей плотности и выравнивание множества выделенных колпачков реакторов со

множеством выделенных локусов на второй поверхности, и формированием уплотнения, обычно временного или удаляемого уплотнения между второй поверхностью и прикрывающим элементом. Новое сформированное уплотнение может физически разделять локусы на второй поверхности на группы, состоящие примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200 локусов или более. Вторая реакция может быть выполнена необязательно с использованием части первого набора реагентов, формируя тем самым второй набор реагентов. Прикрывающий элемент может быть снят со второй поверхности. После снятия колпачки реакторов, каждый, могут удерживать по меньшей мере часть второго набора реагентов в ранее герметично закрытых вторых реакционных объемах. В некоторых случаях вторая поверхность со множеством выделенных локусов может иметь плотность локусов, составляющую по меньшей мере примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 50, примерно 75, примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно 1000, примерно 1500, примерно 2000, примерно 3000, примерно 4000, примерно 5000, примерно 6000, примерно 7000, примерно 8000, примерно 9000, примерно 10000, примерно 20000, примерно 40000, примерно 60000, примерно 80000, примерно 100000 или примерно 500000 на 1 $мм^2$. В настоящем документе описаны различные аспекты вариантов осуществления систем, способов и контрольно-измерительных приборов.

Блок системы может содержать любое количество статических пластин и любое количество динамических пластин. Например, система может содержать три субстрата по вертикали и четыре субстрата в ряду. Система транспортировки может содержать три статические пластины (или субстраты) и одну динамическую пластину (или субстрат). Динамические пластины могут перемещаться или переноситься между множеством статических пластин. Динамическая пластина может переноситься между тремя статически установленными пластинами. В некоторых вариантах осуществления динамическая пластина может иметь диаметр, который составляет примерно 50, 100, 150, 200 или 250 мм или 2, 4, 6 или 8 или выше. Динамические пластины могут быть монтированы в вакуумном держателе с контролируемой температурой. Системы согласно изобретению обеспечивают конфигурации, в которых динамические пластины могут двигаться в Z-направлении, которое представляет собой направление, перпендикулярное поверхности пластины, обращенной к поверхности второй пластины, с контролем или без

контроля z-положения около или менее чем около 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 мкм, и могут выравнивать тета-z пластин, угол между нормалями поверхностей двух пластин, которые обращены друг к другу, например. путем совмещения рисунка на динамической пластине с другим рисунком на статической пластине в пределах допустимых значений. Допуски позиционирования пластин могут составлять примерно или менее чем примерно 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300 350, 400, 450 или 500 микрорадиан по разнице угла вращения в x-y плоскости. В некоторых вариантах осуществления допуски позиционирования пластин могут составлять примерно или менее чем примерно 50 микрорадиан по разнице угла вращения в x-y плоскости. Допуски позиционирования пластин могут составлять примерно или менее чем примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мкм расстояния в x-направлении. Допуски позиционирования пластин могут составлять примерно или менее чем примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мкм расстояния в y-направлении. Допуски позиционирования пластин могут составлять примерно или менее чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 микрорадиан по вращениям x-y плоскости в z-направлении. В некоторых вариантах осуществления допуски позиционирования пластин могут составлять примерно или менее чем примерно 5 микрорадиан по вращениям x-y плоскости в z-направлении. В некоторых вариантах осуществления допуски позиционирования пластин могут составлять примерно или менее чем примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мкм расстояния в z-направлении.

В некоторых случаях системы и способы выполнения серии параллельных реакций могут дополнительно включать третью, четвертую, пятую, шестую, седьмую, восьмую, девятую или десятую поверхность со множество выделенных локусов и/или прикрывающих элементов со множеством выделенных колпачков реакторов. Третьи, четвертые, пятые, шестые, седьмые, восьмые, девятые или десятые поверхности могут быть выровнены и могут формировать временное уплотнение между двумя поверхностями и соответствующим прикрывающим элементом, тем самым физически разделяя локус и/или колпачки реакторов на поверхностях. Третья, четвертая, пятая, шестая, седьмая, восьмая, девятая или десятая реакция может быть выполнена с использованием части реагентов, которые остались после предыдущей реакции, а именно, второго, третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого или девятого набора реагентов, формируя тем самым третий, четвертый, пятый, шестой, седьмой, восьмой или девятый набор реагентов. Каждый из прикрывающих элементов, описанных здесь, может быть снят с его соответствующей поверхности, при этом колпачки реакторов могут

удерживать по меньшей мере часть предыдущего набора реагентов другого реакционного объема. В некоторых случаях вторая поверхность со множеством выделенных локусов может находиться при плотности по меньшей мере 2/мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления вторая поверхность со множеством выделенных локусов может находиться при плотности по меньшей мере примерно 1, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9, примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 50, примерно 75, примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900, примерно 1000, примерно 1500, примерно 2000, примерно 3000, примерно 4000, примерно 5000, примерно 6000, примерно 7000, примерно 8000, примерно 9000, примерно 10000, примерно 20000, примерно 40000, примерно 60000, примерно 80000, примерно 100000 или примерно 500000 на 1 мм$^2$. Часть реагентов, которая остается каждый раз, может различаться и контролируется для обеспечения желательной части в зависимости от подлежащих выполнению реакций.

В изобретении в различных вариантах осуществления рассматривается система для выполнения серии параллельных реакции, содержащая первую поверхность со множеством выделенных локусов и прикрывающий элемент со множеством выделенных колпачков реакторов. Множество выделенных локусов и прикрывающий элемент со множеством выделенных колпачков реакторов может быть комбинировано с формированием множества выделенных реакторов, как описано далее более подробно в других местах в настоящем документе. В некоторых случаях выделенные локусы первой поверхности первого субстрата могут содержать покрытие из реагентов. Выделенные локусы второй поверхности второго субстрата могут содержать покрытие из реагентов. В некоторых вариантах осуществления покрытие из реагентов может быть ковалентно связано с первой или второй поверхностью. В случаях, когда имеется третья, четверая, пятая, шестая, седьмая, восьмая, девятая или десятая поверхность, каждая поверхность может содержать покрытие из реагентов.

Покрытие из реагентов на первой поверхности или второй поверхности может содержать олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды могут иметь любую длину, как описано далее в других местах в настоящем документе, например, по меньшей мере 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 bp или более. При герметичном соединении выделенных локусов с выделенными колпачками реакторов олигонуклеотиды, которые содержатся в пределах покрытия из реагентов, могут высвобождаться. Различные реакции могут быть выполнены, например, реакция амплификации олигонуклеотидов, PCA,

генерирование библиотек для секвенирования или коррекция ошибок, внутри множества выделенных реакторов.

Олигонуклеотиды могут высвобождаться с покрытой поверхности с помощью различных подходящих способов, как описано более подробно в других местах в настоящем документе и известно в данной области, например, путем ферментативного расщепления, как это хорошо известно в данной области. Примеры такого ферментативного расщепления включают, но без ограничения, использование ферментов рестрикции, таких как MIyI, или других ферментов, или комбинаций ферментов, способных расщеплять одноцепочечные или двухцепочечные ДНК, такие как, но без ограничения, урацил ДНК-глюкозилаза (UDG) и ДНК-эндонуклеаза IV. Другие способы расщепления, известные в данной области, также могут быть успешно использованы в настоящем изобретении, включая, но без ограничения, химическое (устойчивое к основанию) расщепление молекул ДНК или оптическое (фотолабильное) отщепление от поверхности. Также, могут быть использованы PCR или другие реакции амплификации дляя генерирования строительного материала для синтеза генов путем копирования олигонуклеотидов, когда они все еще связаны с субстратом. Способы отделения олигонуклеотидов описаны в PCT патентной публикации No. WO2007137242 и патенте США 5750672, которые включены здесь полностью в виде отсылки.

В некоторых случаях снятие прикрывающего элемента с первой поверхности и снятие прикрывающего элемента со второй поверхности может быть выполнено с различной скоростью. Объем части реагентов, которая остается после снятия прикрывающего элемента с соответствующей поверхности, можно контролировать с помощью скорости или поверхностной энергии прикрывающего элемента и соответствующей поверхности. В некоторых случаях первая или вторая поверхность имеет различное поверхностное натяжение, поверхностную энергию или гидрофобность по отношению к заданной жидкости, такой как вода. В некоторых случаях выделенные локусы первой поверхности могут обладать высокой поверхностной энергией, поверхностным натяжением или гидрофобностью. Различие в поверхностной энергии или гидрофобности прикрывающего элемента и соответствующей поверхности может представлять собой параметр, предназначенный для контроля части реагентов, которые удерживаются после снятия. Объем первой и второй реакций может быть различным.

В некоторых случаях давление воздуха снаружи выделенных реакторов может быть больше, чем давление внутри выделенных реакторов. В других случаях давление воздуха снаружи выделенных реакторов может быть меньше, чем давление внутри выделенных реакторов. Разница в давлении воздуха снаружи выделенных реакторов и

внутри выделенных реакторов (или дифференциальное давление) может влиять на уплотнение выделенных реакторов. Путем модифицирования поверхностной энергии или гидрофобности первой поверхности и второй поверхности, дифференциальное давление может приводить к искривленной или прямой поверхности раздела воздух/жидкость в пределах зазора между первой поверхностью и колпачком реактора второй поверхности. Кроме того, силу, необходимую для снятия прикрывающего элемента с поверхности, можно контролировать с помощью дифференциального давления и дифференциальной поверхностной энергии. В некоторых случаях поверхность может быть модифицирована таким образом, чтобы иметь такую дифференциальную поверхностную энергию и дифференциальное давление, при которых прикрывающий элемент способен легко сниматься с поверхности.

Первая или вторая реакция, или любая реакция после второй реакции может включать различные молекулярные или биохимические анализы, как описано здесь, или любую подходящую реакцию, известную в данной области. В некоторых случаях первая или вторая реакция может включать полимеразную циклическую сборку. В некоторых случаях первая или вторая реакция может включать ферментативный синтез генов, отжиг и реакцию лигирования, одновременный синтез двух генов посредством гибридного гена, лигирование методом «дробовика» и колигирование, синтез генов путем вставки, синтез генов посредством одной цепи ДНК, матрично-направленное лигирование, лигазную цепную реакцию, синтез генов с помощью микрочипов, твердофазную сборку, технологию «Sloning building block technology» или синтез генов, опосредованный лигированием РНК. Реакции или способы выполнения серии параллельных реакций могут дополнительно включать охлаждение прикрывающего элемента или охлаждение первой поверхности (второй поверхности).

Общая схема технологического процесса для способов и композиций согласно настоящему изобретению с использованием описанных здесь систем показана на фигуре 8.

**Вспомогательное оборудование**

В одном аспекте настоящее изобретение относится к системам и способам синтеза олигонулеотидов. Система для синтеза олигонулкеотидов может содержать сканирующую систему осаждения. Системы для синтеза олигонулеотидов могут содержать первый субстрат (например, пластину для олигонуклеотидного синтеза), имеющий функционализированную поверхность и множество выделенных локусов, и струйный принтер, обычно содержащий множество печатающих головок. Каждая печатающая головка обычно конфигурирована для осаждения одного из разнообразных строительных

блоков для реакций, которые выполняются в выделенных локусах первого субстрата, например, нуклеотидных строительных блоков для фосфороамидитного синтеза. Выделенные локусы пластины олигонуклеотидного синтеза могут располагаться в микроканалах, как описано более подробно в других местах в настоящем документе. Субстрат может быть герметично закрыт в пределах проточной кюветы, например, путем обеспечения непрерывного течение жидкостей, таких как жидкости, содержащие необходимые реагенты для реакций в пределах выделенных локусов (например, окисление в толуоле) или растворители (например. ацетонитрил), обеспечивая точный контроль дозирования и концентрации реагентов на участках синтеза, например, выделенных локусах пластины олигонуклеотидного синтеза. Поток инертного газа, такого как азот, может быть использован для сушки субстрата, обычно путем усиленного испарения летучего субстрата. Разнообразные средства, например, источник вакуума/насос сброса давления или вакуумная камера могут быть использованы для создания пониженного относительного давления (отрицательного давления) или вакуума для улучшения сушки и сокращения остаточных объемов влаги и любых капель жидкости на поверхности. Таким образом, давление, непосредственно окружающее субстраты или их выделенные локусы, может составлять примерно или менее чем примерно 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 mTorr или меньше.

На фигуре 3 показан пример системы для синтеза олигонуклеотидов. Соответственно, пластина для синтеза олигонуклеотидов конфигурирована таким образом, чтобы обеспечить выделенные локусы для олигонуклеотидного синтеза необходимой массой реагентов через впускной манифольд, и необязательно выпускной манифольд, при этом масса реагентов может включать любые подходящие реагенты, носители, растворители, буферы или газы для синтеза олигонуклеотидов, которые обычно требуются для множества выделенных локусов в различных вариантах осуществления, такие как окислитель, деблокатор, ацетонитрил или газообразный азот. Печатающие головки струйного принтера могут перемещаться в направлении X-Y в доступные участки первого субстрата. Второй субстрат, такой как прикрывающий элемент, как описано более подробно в других местах в настоящем документе, может перемещаться в направлении Z и при необходимости в направлениях X и Y для герметичного соединения с первым субстратом, формируя множество выделенных реакторов. Альтернативно, второй субстрат может быть стационарным. В таких случаях субстрат для синтеза может перемещаться в направлении Z и при необходимости в направлениях X и Y для выравнивания и герметичного соединения со вторым субстратом. Синтезированные олигонуклеотиды могут доставляться из первого субстрата во второй субстрат.

Подходящие количества жидкостей могут проходить через впускной манифольд и выделенные локусы первого субстрата во второй субстрат для содействия доставке реагентов из первого субстрата/их выделенных локусов во второй субстрат. В другом аспекте настоящее изобретение относится к системе сборки олигонуклеотидов, включающей перемещение пластины.

В различных вариантах осуществления в настоящем изобретении используются системы сканирующего осаждения. Системы сканирующего осаждения могут включать струйную печатающую головку, которую можно использовать для осаждения реагентов на выделенные локусы или микролунки, протравленные в субстрате. В некоторых вариантах осуществления в системе сканирующего осаждения могут быть использованы органические растворители или чернила. В некоторых случаях система сканирующего осаждения может содержать множество пластин, таких как кремниевые пластины с диаметром обычно 200 мм. В некоторых случаях вся система может размещаться и функционировать в атмосферно-контролируемом корпусе. Сканирующая система осаждения может содержать рабочую камеру, блок печатающей головки, блок проточной ячейки и/или эксплуатационный корпус. В некоторых случаях блок печатающей головки может перемещаться, при этом блок проточной кюветы остается неподвижным. Сканирующая система осаждения может содержать одну или несколько проточных ячеек, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более проточных ячеек, обслуживающих один или несколько субстратов/пластин, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или более субстратов/пластин. Пластины могут оставаться фиксированными в пределах проточных клювет. В некоторых случаях система может способствовать выравниванию субстратов посредством тета-z автоматизации. Рабочая камера может включать область сканирования направления перемещения, например, около (n-1) Шаг печатающей головки + Диаметр пластины = 9*20 мм + 200 мм = 380 мм в одном конкретном варианте осуществления. Подходящие рабочие камеры могут быть предусмотрены с соответствующими установочными параметрами. Эксплуатационный корпус может содержать печатающие головки, которые зарегистрированы для обслуживания. В некоторых случаях эксплуатационный корпус может быть изолирован от более крупного корпуса. В различных вариантах осуществления системы для способов и композиций, описанных здесь, содержат системы сканирующего осаждения для олигонуклеотидного синтеза, сборки олигонуклеотидов или в общем для изготовления реагентов.

Множество выделенных локусов и множество выделенных колпачков реакторов может быть расположено на микроструктурах, которые взаимно соединены или находятся

в жидкостном взаимодействии. Такие жидкостные взаимодействия обеспечивают промывку и перфузию новых реагентов, таких как капли, или использование непрерывного потока для различных стадий реакций. Микроканалы жидкостного взаимодействия могут содержать входные отверстия и выходные отверстия внутрь и/или наружу из множества выделенных локусов и множества выделенных реакторов. Входные и/или выходные отверстия могут быть изготовлены с помощью любого способа, известного в данной области. Например, входные и/или выходные отверстия могут быть обеспечены на передней стороне и задней стороне субстрата. Способы создания входных и/или выходных отверстий описаны в публикации патента США US 20080308884 A1, которая включена здесь полностью в виде отсылки, и могут включать изготовление подходящих микроструктурных компонентов с помощью процессов литографии и травления на передней стороне; просверливания отверстий с задней стороны указанного субстрата с точным выравниванием с микроструктурами, расположенными на передней стороне, для обеспечения входных и/или выходных отверстий внутрь и/или наружу из указанной микромеханической структуры. Входные и/или выходные отверстия могут представлять собой проточные ячейки типа Хил-Шоу с жидкостью, текущей в тонкий зазор, заполняемый манифольдом. Как показано на фигуре 9A, субстраты, описанные здесь, могут формировать часть проточной ячейки. Проточная ячейка может быть закрыта путем скольжения крышки над верхней частью субстрата (то есть пластины) и зафиксирована с образованием плотного уплотнения по краям субстрата. В некоторых вариантах осуществления уплотнение может быть достаточным для уплотнения против вакуума или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атмосфер давления. Реагенты могут быть введены в тонкий зазор под субстратом (то есть пластиной) и протекать через субстрат. Затем реагенты могут быть собраны в сужающемся сборнике отходов, как показано на фигуре 9B. После конечной стадии промывки растворителем в некоторых вариантах осуществления пластина может быть оставлена для стекания, например, через нижнюю часть блока и затем продута азотом. После этого камера может быть помещена в вакуум для удаления путем сушки остаточного растворителя, содержащегося в любых микроструктурах, уменьшая содержание остаточных жидкостей или влаги до менее чем 50%, 30%, 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%,1%,0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001%, 0.00001% или менее по объему. Затем камера может быть помещена в вакуум для понижения давления, окружающего субстрат, до менее чем 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 или 1000 mTorr. В некоторых случаях камера может быть наполнена азотом после стадии помещения в вакуум, и крышка может быть снова открыта для обеспечения доступа во вспомогательные части системы, например,

принтер. В некоторых случаях проточная ячейка может быть открытой. Субстрат/пластина может быть монтирована со смещением вбок сборника отходов, как показано на фигуре 9B. Эта установка может облегчить доступ струйного устройства к пластине. На этом этапе реагенты могут быть осаждены в микролунки. В некоторых вариантах осуществления крышки выделенных замкнутых полостей (то есть проточных ячеек) могут служить в качестве сборника отходов, и туда могут поступать жидкие реагенты. Стрелки на фигурах 9B и 9C указывают иллюстративное направление течения реагентов. В некоторых случаях реагенты могут поступать через тонкий зазор в нижней части, проходить через отверстия в субстрате (например, кремниевой пластине) и собираться в сборнике отходов, как показано на фигуре 9C. В некоторых случаях газ можно продувать через верхний или нижний манифольд для вытеснения жидкости, например, через нижнюю или верхнюю часть проточной ячейки. Выходное и входное отверстие может быть соединено с вакуумом для завершения сушки. Отверстие для вакуума может соединяться со стороной сборника отходов или входного отверстия, как показано на фигуре 10. В некоторых вариантах осуществления может иметься множество отверстий сброса давления, которые проходят сквозь субстрат (то есть пластину). Множество отверстий может включать более чем примерно 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000 или 2000000. В некоторых случаях множество отверстий может составлять более чем 5 миллионов. В некоторых случаях микроструктуры для синтеза, как описано более подробно в других местах в настоящем документе, служат в качестве отверстий сброса давления. Эти отверстия могут обеспечить прохождение газа из одной стороны пластины, так как выделенные замкнутые полости вакуумированы для сушки субстрата. В некоторых случаях, например, когда воздух вытесняется со стороны й длины отходов, давление воздуха со стороны сборника отходов $P_{waste}$ может поддерживаться по существу на том же самом уровне, что и давление воздуха на стороне входного отверстия $P_{inlet}$. В некоторых вариантах осуществления может быть использовано отверстие, которое соединяет впускной манифольд со сборником отходов. Таким образом, множество стадий, описанных здесь, таких как сканирование, осаждение, заливка, промывка, продувка и/или сушка могут быть выполнены без перемещения субстратов пластин.

Выделенные реакторы, сформированные путем герметичного соединения первого субстрата и второго субстрата, могут быть заключены в камеры с контролируемой влажностью, содержанием воздуха, давлением пара и/или давлением, формируя блок с контролируемой средой. В некоторых вариантах осуществления влажность камер может быть насыщенной или составлять около 100% для предотвращения испарения жидкости

из выделенных реакторов во время реакций. Например, влажность можно контролировать до около, менее чем около или более чем около 100%, 99,5%, 99%, 98,5%, 98%, 97,5%, 97%, 96,5%, 96%, 95,5%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30% или 25%.

Системы, описанные здесь, такие как содержащие блоки с контролируемой средой, описанные выше, могут включать вакуумное устройство/предохранительный клапан и/или систему контроля температуры, оперативно связанную со множеством выделенных реакторов. Субстраты могут быть расположены на вакуумном держателе. Вакуумный держатель может содержать неровности поверхности, расположенные непосредственно под субстратом. В различных вариантах осуществления неровности поверхности могут включать каналы или углубления. Вакуумный держатель может находиться в жидкостном взаимодействии с субстратом для вытеснения газа из пространств, определяемых каналами. Способы удержания субстрата на вакуумном держателе описаны более подробно в патенте США 8247221, который включен здесь полностью путем отсылки.

В различных вариантах осуществления субстрат (например, кремниевая пластина) может быть расположена на держателе, таком как вакуумный держатель, описанный выше. На фигуре 10 показан блок системы вакуумного держателя с одной канавкой и металлокерамическая часть, расположенная между субстратом и терморегулирующим элементом. Вакуумный держатель может содержать одну канавку с размерами, подходящими для удержания субстрата. В некоторых вариантах осуществления вакуумный держатель разработан таким образом, чтобы субстрат оставался на месте во время выполнения одного или более способов, описанных здесь. Вакуумный держатель, показанный на фигуре 10А в качестве примера, содержит одну 1-5 мм канавку диаметром приблизительно 198 мм. В некоторых случаях дизайны ваккумного держателя с одной канавкой могут быть использованы для обеспечения улучшенного теплопереноса в субстрат. На фигуре 10В показана металлокерамическая вставка, которая расположена между субстратом (например, кремниевой пластиной) и вакуумным держателем, зафиксированным на месте с помощью адгезивов. В некоторых вариантах осуществления держатель может представлять собой электростатический держатель, как дополнительно описано в патенте США 5530516, который включен здесь полностью путем отсылки.

Множество выделенных колпачков реакторов может быть выровнено со множеством выделенных локусов на первой поверхности с формированием временного уплотнения между первой поверхностью и прикрывающим элементом с использованием любых способов, известных в данной области, как описано в патенте США 8367016 и европейском патенте EP 0126621 B1, оба из которых включены здесь полностью в виде

отсылки. Например, для субстрата со множеством выделенных локусов, имеющих x, y и z размеры, и центральную точку по глубине локуса, расположенную в z направлении, центральная точка по глубине локуса может быть расположена на известном расстоянии в направлении z от отметки сомещения, присутствующей в субстрате. Субстрат может быть размещен в пределах визуализирующей системы, которая может включать оптическое устройство, способное детектировать отметку совмещения. Оптическое устройство может определять оптический путь, аксиально выровненный с направлением Z, и может иметь фокальную плоскость, перпендикулярную оптическому пути. Когда фокальная плоскость движется вдоль оптического пути, отметка совмещения может быть максимально обнаружена, когда фокальная плоскость находится на глубине z, по сравнению с тем, когда фокальная плоскость по существу не находится в одной плоскости с глубиной z. Отметки совмещения могут быть избирательно помещены в подходящее пространственное расположение на первом субстрате, например, пластине синтеза, содержащей множество выделенных локусов, и/или втором субстрате, например, элементе реактора, содержащем множество прикрывающих элементов. В некоторых вариантах осуществления отметка совмещения для общего выравнивания может быть сформирована вблизи выделенных локусов. В зависимости от применения могут существовать варианты, альтернативы и модификации. Например, две из отметок совмещения могут быть расположены в непосредственной близости от выделенных локусов, и третья отметка совмещения может быть расположена у края субстрата. Для другого примера рисунок микроструктур в субстратах, описанных здесь, может быть выбран различимым образом, подходящим для выравнивания, например, в виде ассимметричного рисунка, и может быть использован для выравнивания. В некоторых случаях отметка совмещения служит в качестве точки выравнивания для коррекции глубины поля или других оптических характеристик. В патенте США 4123661, который включен здесь полностью в виде отсылки, описано выравнивание электронного пучка на субстрате, при этом отметки расположены в непосредственной близости друг к другу, но отделены расстоянием таким образом, что поднимающиеся и спадающие наклоны отметок могут быть обнаружены с помощью видеосигнала, обеспечивая тем самым выравнивания.

Система может содержать нагревательный элемент, охлаждающий элемент или регулирующий температуру элемент (например, устройство циклического термического воздействия). В различных вариантах осуществления устройство циклического термического воздействия для использования со множеством выделенных реакторов может быть изготовлено с возможностью выполнения амплификации или сборки нуклеиновых кислот, такой как PCR или PCA, или любой другой подходящей реакции

нуклеиновых кислот, описанной здесь или известной в данной области. Температуру можно контролировать таким образом, чтобы температура внутри реакторов оставалась равномерной, и мог быть быстро выполнен нагрев. В различных вариантах осуществления системы, описанные здесь, могут содержать детектирующие элементы для осуществления конечной детекции или детекции в режиме реального времени из реакторов или индивидуальных микроструктур в пределах субстратов, например, во время олигонуклеотидного синтеза, сборки генов или амплификации нуклеиновых кислот.

Любая из систем, описанных здесь, может быть оперативно связана с компьютером и может быть автоматизирована посредством компьютера локально или удаленно. Компьютеры и компьютерные системы для контроля компонентов системы, описанных здесь, дополнительно описаны в других местах в настоящем документе.

**Первичные композиции – олигонуклеотиды**

Используемые здесь термины «предварительно отобранная последовательность», «предварительно установленная последовательность» или «предварительно определенная последовательность» используются взаимозаменяемо. Термины означают, что последовательность полимера является известной и выбрана перед синтезом или сборкой полимера. В частности, различные аспекты изобретения описаны здесь в первую очередь в отношении получения молекул нуклеиновых кислот, последовательности нуклеотида или полинуклеотида, которая является известной и выбрана перед синтезом или сборкой молекул нуклеиновых кислот. В одном варианте осуществления олигонуклеотиды представляют собой короткие молекулы нуклеиновых кислот. Например, олигонуклеотиды могут содержать от около 10 до около 300 нуклеотидов, от около 20 до около 400 нуклеотидов, от около 30 до около 500 нуклеотидов, от около 40 до около 600 нуклеотидов или более чем около 600 в длину. Специалистам в данной области будет понятно, что длина олигонуклеотидов может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, от около 10 до около 400 нуклеотидов или от около 300 до около 400 нуклеотидов и т.д.). Подходящие короткие или длинные олигонуклеотиды могут быть использованы в соответствии с требованиями конкретного применения. Отдельные олигонуклеотиды могут быть разработаны таким образом, что они имеют длину, отличающуюся от длины в библиотеке. Олигонуклеотиды могут быть сравнительно короткими, например короче, чем 200, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 нуклеотида. Сравнительно более длинные олигонуклеотиды также предусматриваются; в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды имеют длину больше или равную 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600 или

более нуклеотидам. Обычно олигонуклеотиды представляют собой одноцепочечные молекулы ДНК или РНК.

В одном аспекте изобретения обеспечено устройство для синтеза множества нуклеиновых кислот, имеющих предварительно установленную последовательность. Устройство может включать подложку, содержащую множество элементов, при этом каждый элемент содержит множество олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидов, имеющих предварительно определенную последовательность, иммобилизовано на различных дискретных элементах твердой подложки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды являются одноцепочечными. В некоторых вариантах осуществления множество олигонуклеотидных повледовательностей может содержать вырожденные последовательности. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды связаны с подложкой. В некоторых вариантах осуществления устройство содержит твердую подложку, имеющую множество участков или элементов, и каждый из множества участков содержит множество связанных с подложкой олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды ковалентно связаны посредством их 3'-конца с твердой подложкой. Кроме того, в других вариантах осуществления олигонуклеотиды ковалентно связаны посредством их 5'-конца с твердой подложкой.

В некоторых вариантах осуществления связанные с поверхностью или подложкой олигонуклеотиды иммобилизованы посредством их 3'-конца. Следует учесть, что под 3'-концом понимается последовательность в направлении «даунстрим» к 5'-концу, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 или более нуклеотидов в направлении «даунстрим» от 5'-конца, для другого примера на 3' половине, трети или четверти последовательности, еще для другого примера менее 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 или 20 нуклеотидов в сторону от абсолютного 3'-конца, и под 5'-концом понимается последовательность в направлении «апстрим» к 3'-концу, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20 или более нуклеотидов в направлении «апстрим» от 3'-конца, для другого примера на 5' половине, трети или четверти последовательности, еще для другого примера менее 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15 или 20 нуклеотидов в сторону от абсолютного 5'-конца. Например, олигонуклеотид может быть иммобилизован на подложке посредством нуклеотидной последовательности (например, вырожденной связывающей последовательности), линкера или спейсера (например, фрагмента, который не участвует в гибридизации). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит спейсер или линкер для отделения олигонуклеотидной последовательности от подложки. Подходящие спейсеры или линкеры включают фоторасщепляемые линкеры или другие традиционные химические линкеры. В одном

варианте осуществления олигонуклеотиды могут быть присоединены к твердой подложке посредством расщепляемого фрагмента линкера. Например, твердая подложка может быть функционализирована для обеспечения расщепляемых линкеров для ковалентного присоединения к олигонуклеотидам. Линкерный фрагмент может содержать шесть или более атомов в длину. Альтернативно, расщепляемый фрагмент может находиться в пределах олигонуклеотида и может быть введен во время синтеза in situ. Широкий ряд расщепляемых фрагментов доступен в области твердофазного синтеза и синтеза олигонуклеотидов на микрочипах (смотри, например, Pon, R., Methods Mol. Biol. 20:465-496 (1993); Verma et al, Annu. Rev. Biochem. 67:99-134 (1998); патенты США 5739386, 5700642 и 5830655; и публикации патента США 2003/0186226 и 2004/0106728). Может быть выбран подходящий расщепляемый фрагмент, который совместим с природой защитной группы нуклеозидных оснований, выбранной твердой подложкой и/или, среди прочего, способом доставки реагентов. В иллюстративном варианте осуществления олигонуклеотиды, отщепленные от твердой подложки, содержат на 3'-конце свободную –ОН-группу. Альтернативно, 3'-конец, содержащий свободную –ОН-групп, может быть также получен путем химической или ферментативной обработки с последующим отщеплением олигонуклеотидов. В различных вариантах осуществления изобретение относится к способам и композициям для высвобождения связанных с подложкой или поверхностью олигонуклеотидов в раствор. Отщепляемый фрагмент может быть удален в условиях, при которых не происходит деградация олигонуклеотидов. Предпочтительно линкер может быть отщеплен с использованием двух подходов, либо одновременно в таких же условиях, что и стадия снятия защиты, или последовательного с использованием различных условий или реагента для отщепления линкера после завершения стадии снятия защиты.

В других вариантах осуществления олигонуклеотиды находятся в растворе. Например, олигонуклеотиды могут быть обеспечены в пределах дискретного объема, такого как капля или микрокапля, в различных дискретных элементах. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы дискретные микрообъемы от около 0,5 пл до около 100 нл. Однако можно использовать меньшие или большие объемы. В некоторых вариантах осуществления подходящее устройство для дозирования или непрерывный поток, такой как поток через микроструктуры, который активируется насосом, может быть использован для переноса объемов, составляющих менее чем 100 пл, менее чем 10 нл, менее чем 5 нл, менее чем 100 пл, менее чем 10 пл или менее чем 0,5 пл, внурь или между микроструктур субстратов, описанных здесь. Например, малые объемы из одной или более микроструктур пластины синтеза олигонуклеотидов могут быть

внесены в колпачок реактора прикрывающего элемента путем проталкивания жидкости через пластину синтеза олигонуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления множество конструктов нуклеиновых кислот обеспечено в различных элементах подложки. В некоторых вариантах осуществления конструкты нуклеиновых кислот, включая короткие олигонуклеотиды и длинные/собранные полинуклеотиды, представляют собой частично двухцепочечные или дуплексные структуры олигонуклеотидов. Используемый здесь термин «дуплекс» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая является по меньшей мере частично двухцепочечной. Термины «нуклеозид» или «нуклеотид» предполагают включение таких фрагментов, которые содержат не только известные пуриновые или пиримидиновые основания, но также другие гетероциклические основания, которые были модифицированы. Такие модицикации включают метилированные пурины или пиримидины, ацилированные пурины или пиримидины, алкилированные рибозы или другие гетероциклы или любые другие подходящие модификации, описанные здесь или известные из других источников в данной области. Кроме того, термин «нуклеозид» и «нуклеотид» включает такие фрагменты, которые содержат не только типичные сахара рибозу или дезоксирибозу, но также другие сахара. Модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды также включают модификации на сахарном фрагменте, например, в котором одна или несколько гидроксильных групп заменены на атомы галогена или алифатические группы, или функционализированы как эфиры, амины или тому подобное.

Следует понимать, что используемые здесь термины «нуклеозид» и «нуклеотид» относятся к нуклеозидам и нуклеотидам, содержащим не только типичные пуриновые и пиримидиновые основания, то есть аденин (A), тимин (T), цитозин (C), гуанин (G) и урацил (U), но также их защищенные формы, например, в которых основание защищено защитной группой, такой как ацетил, дифторацетил, трифторацетил, изобутирил или бензоил, и пуриновые и пиримидиновые аналоги. Подходящие аналоги известны специалистам в данной области и описаны в соответствующих текстах и литературе. Типичные аналоги включают, но без ограничения, 1-метиладенин, 2-метиладенин, N6-метиладенин, N6-изопентиладенин, 2-метилтио-N6-изопентиладенин, N,N-диметиладенин, 8-бромаденин, 2-тиоцитозин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, 5-этилцитозин, 4-ацетилцитозин, 1-метилгуанин, 2-метилгуанин, 7-метилгуанин, 2,2-диметилгуанин, 8-бромгуанин, 8-хлоргуанин, 8-аминогуанин, 8-метилгуанин, 8-тиогуанин, 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-иодурацил, 5-этилурацил, 5-пропилурацил, 5-метоксиурацил, 5-гидроксиметилурацил, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-(метиламинометил)урацил, 5-

(карбоксиметиламинометил)урацил, 2-тиоурацил, 5-метил-2-тиоурацил, 5-(2-бромвинил)урацил, урацил-5-оксиуксусная кислота, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, псевдоурацил, 1-метилпсевдоурацил, квеуозин, изозин. 1-метилинозин, гипоксантин, ксантин, 2-аминопурин, 6-гидроксиаминопурин, 6-тиопурин и 2,6-диаминопурин. Кроме того, термины «нуклеозид» и «нуклеотид» включают такие фрагменты, которые содержат не только традиционные сахара рибозу и дезоксирибозу, но также другие сахара. Модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды также включают модификации на сахарном фрагменте, например, когда одна или более гидроксильных групп заменены на атомы галогена или алифатические группы, или являются функционализированными как эфиры, амины, или тому подобное.

Используемый здесь термин «олигонуклеотид» является дженериком для полидезоксинуклеотидов (содержащих 2-дезокси-D-рибозу), для полирибонуклеотидов (содержащих D-рибозу), для любого другого типа полинуклеотида, а именно N-гликозида пуринового или пиримидинового основания, и для других полимеров, содержащих ненуклеотидные основные цепи (например, РНК), при условии, что полимеры содержат нуклеотидные основания в конфигурации, которая обеспечивает спаривание оснований и межплоскостное взаимодействие оснований, такое как обнаруживаемое в ДНК и РНК. Таким образом, эти термины включают известные типы модификаций олигонуклеотидов, например, замену одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогами, модификации межнуклеотидных связей, такие как, например, модификации незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфорамидаты, карбаматы и т.п.), отрицательно заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.п.) и положительно заряженными связями (например, аминоалкилфосфорамидаты, аминоалкилфосфотриэфиры), модификации, содержащие подвесные составляющие, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.п.), модификации интеркалирующими агентами (например, акридином, псораленом и т.п.), модификации, содержащие комплексоны (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.п.). Не существует специального разграничения по длине между термином «полинуклеотид» и «олигонуклеотид», и эти термины используются взаимозаменяемо.

Термин «прикрепленный», используемый, например, в отношении поверхности субстрата, содержащей «прикрепленный» к ней фрагмент, включает ковалентное связывание, адсорбцию и физическую иммобилизацию. Термины «связывание» и «связь» идентичны по значению термину «прикрепленный».

В различных вариантах осуществления изобретение относится к синтезу, такому как химический синтез молекул, отличных от нуклеиновых кислот. Термины «петид», «петидил» и «пептидный», используемые по всему описанию и формуле изобретения, предполагают включение любой структуры, состоящей из двух или более аминокислот. В основном пептиды в матрицах по настоящему изобретению содержат примерно от 5 до 10000 аминокислот, предпочтительно примерно от 5 до 1000 аминокислот. Аминокислоты, формирующие весь или часть пептида, могут представлять собой любую из двадцати общепринятых природных аминокислот, то есть аланин (A), цистеин (C), аспартовую кислоту (D), глутамовую кислоту (E), фенилаланин (F), глицин (G), гистидин (H), изолейцин (I), лизин (K), лейцин (L), метионин (M), аспарагин (N), пролин (P), глутамин (Q), аргинин (R), серин (S), треонин (T), валин (V), триптофан (W) и тирозин (Y). Любая из аминокислот в пептидных молекулах, формирующих матрицы по настоящему изобретению, может быть заменена нетипичной аминокислотой. Как правило, консервативные замены являются предпочтительными. Консервативные замены заменяют исходную аминокислоту на нетипичную аминокислоту, которая имеет сходство с исходной аминокислотой по одному или нескольким характеристикам (например, заряд, гидрофобность, стеариновая нагрузка; например, одна может заменять Val на Nval). Термин «нетипичная аминокислота» относится к аминокислотам, отличным от типичных аминокислот, и включает, например, изомеры и модификации типичных аминокислот (например, D-аминокислоты), небелковых аминокислот, посттрансляционно модифицированных аминокислот, ферментативно модифицированных аминокислот, конструкты или структуры, разработанные для имитации аминокислот (например, α,α-дизамещенные аминокислоты, N-алкильные аминокислоты, молочная кислота, β-аланин, нафтилаланин, 3-пиридилаланин, 4-гидроксипролин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, и не-лейцин), и пептиды, содержащие природную амидную связь –CONH-, замененную в одном или нескольких участках в пределах пептидной основной цепи нетипичной связью, такой как N-замещенная амидная, сложноэфирная, тиоамидная, ретропептидная (-NHCO-), ретротиоамидная (-NHCS-), сульфонамидная (-SO2NH-) и/или пептоидная (N-замещенная глициновая) связи. Таким образом, пептидная молекула массива включает псевдопептиды и пептидомиметики. Таким образом, пептидные молекулы матрицы включают псевдопептиды и пептидомиметики. Пептиды согласно настоящему изобретению могут быть (a) природного происхождения, (b) получены путем химического синтеза, (c) получены путем технологий рекомбинантных ДНК, (d) получены путем биохимической или ферментативной фрагментации более крупных молекул, (e) получены с помощью

способов, разработанных путем комбинирования способов (a) – (d), указанных выше, или (f) получены любыми другими способами, предназначенными для получения пептидов.

Термин «олигомер» охватывает любой полинуклеотид или полипептид, или другое химическое соединение с повторяющимися фрагментами, такими как нуклеотиды, аминокислоты, карбогидраты и тому подобное.

В некоторых примерах устройство содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 1000, 4000, 10000, 100000, 1000000 или более различных элементов (или «областей» или «участков») в конкретном месте (то есть «адрес»). Следует понимать, что устройство может содержать одну или несколько твердых подложек. Каждый адресуемый участок устройства может содержать разную композицию, такую как разный олигонуклеотид. Альтернативно, группы адресуемых участков устройства могут содержать полностью или по существу сходные композиции, например, олигонуклеотиды, которые отличаются от олигонуклеотидов, содержащихся в других группах микроструктур устройства.

Количество каждого олигонуклеотида, которое может быть получено с помощью способов согласно изобретению в индивидуально адресуемых участках и/или в смешанных популяциях, может изменяться от пяти до 500000, от 500 до 500000, от 1000 до 500000, от 5000 до 500000, от 10000 до 500000, от 20000 до 500000, от 30000 до 500000, от 5000 до 250000, от 5000 до 100000, от пяти до 5000, от пяти до 50000, от 5000 до 800000, от 5000 до 1000000, от 5000 до 2000000, от 10000 до 2000000, от 20000 до 1000000, от 30000 до 2000000 и т.д. В различных вариантах осуществления может быть синтезировано примерно или более чем пимерно 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000, 100000000 или более копий каждого олигонуклеотида. В некоторых случаях может быть синтезировано менее чем 100000000, 10000000, 1000000, 100000, 10000, 1000, 100 или меньше копий олигонуклеотида.

Фосфоротиоаты олигонуклеотидов (OPS) представляют собой модифицированные олигонуклеотиды, где один из атомов кислорода в фосфатном фрагменте заменен на серу. Фосфоротиоаты, содержащие серу в немостиковом положении, широко используются. OPS являются значительно более стабильными в отношении гидролиза нуклеазами. Это свойство делает OPS предпочтительным кандидатом для использования в качестве антисмысловых олигонуклеотидов в применениях in vitro и in vivo, включающих экстенсивное подвергание воздействию нуклеаз. Аналогичным образом, для улучшения стабильности миРНК, по меньшей мере одна фосфортиоатная связь часто вводится в 3'-конец смысловой и/или антисмысловой цепей. В некоторых вариантах осуществления способы и композиции согласно изобретению относятся к de novo/химическому синтезу

OPS. Синтез большого числа OPS может быть осуществлен параллельно с использованием способов и композиций, описанных здесь.

**Амплификация одноцепочечных нуклеиновых кислот**

В различных вариантах осуществления способы и системы относятся к амплификации одноцепочечных нуклеиновых кислот. Таким образом, одноцепочечные нуклеиновые кислоты, например, одноцепочечные ДНК (ssDNA) могут быть амплифицированы в изолированном образце, во множестве образцов параллельно или в мультиплексном формате, имеющем множество различных одноцепочечных нуклеиновых кислот в пределах одного и того же образца. Множество образцов, которые могут быть амплифицированы в параллельном формате, может составлять по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 50, 55,100, 150, 200, 250, 300, 350, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 или более. Множество образцов, которые могут быть амплифицированы в параллельном формате, может находиться в диапазоне 1-1000, 2-950, 3-900, 4-850, 5-800, 10-800, 20-750, 25-700, 30-650, 35-600, 40-550, 45-500, 50-450, 55-400, 60-350, 65-250, 70-200, 75-150, 80-100. Специалистам в данной области будет понятно, что множество образцов, которые могут быть амплифицированы в параллельном формате, может находиться в пределах любых диапазонов, ограниченных любыми из этих значений, например, 3 – 800. Количество реакций мультиплексной амплификации может составлять по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 50, 100 или более. Количество реакций мультиплексной амплификации может находиться в диапазоне 1-100, 2-50, 3-25, 4-20, 5-10. Специалистам в данной области будет понятно, что количество реакций мультиплексной амплификации может находиться в пределах любых диапазонов, ограниченных любыми из этих значений, например, 3 – 100.

Количество различных одноцепочечных нуклеиновых кислот в пределах одного и того же образца может составлять по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1, 2, 3, 10, 50, 100, 150, 200, 1000, 10000, 100000 или более. Количество различных одноцепочечных нуклеиновых кислот в пределах одного и того же образца может составлять не более или не более чем примерно 10000, 10000, 1000, 200, 150, 100, 50, 10, 3, 2, 1 или меньше. Количество различных одноцепочечных нуклеиновых кислот в пределах одного и того же образца может находиться в диапазоне 1-100000, 2-10000, 3-1000, 10-200, 50-100. Специалистам в данной области будет понятно, что количество различных одноцепочечных нуклеиновых кислот в пределах одного и того же образца может находиться в пределах любых диапазонов, ограниченных любыми из этих значений, например, 3 – 100.

Одноцепочечные целевые нуклеиновые кислоты могут иметь длину по меньшей мере или по меньшей мере примерно 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 3000 или более нуклеотидов. Одноцепочечные целевые нуклеиновые кислоты могут иметь длину не более или не более чем примерно 3000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10 или менее нуклеотидов. Одноцепочечные целевые нуклеиновые кислоты могут иметь длину в диапазоне 50-500, 75-450 или 100-400 нуклеотидов. Специалистам в данной области будет понятно, что длина одноцепочечных целевых нуклеиновых кислот может находиться в пределах любых диапазонов, ограниченных любыми из этих значений, например, 50 – 1000.

При обращении к фигуре 64, одноцепочечная целевая нуклеиновая кислота может быть фланкирована последовательностями для гибридизации с одним или несколькими адаптерами. Эти последовательности для гибридизации с адаптером могут иметь длину по меньшей мере или по меньшей мере примерно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. Эти последовательности для гибридизации с адаптером могут иметь длину по меньшей мере или по меньшей мере примерно 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 или меньшей нуклеотидов. Последовательности для гибридизации с адаптером могут иметь длину в диапазоне 15-20, 16-19, 17-18 нуклеотидов. Специалистам в данной области будет понятно, что длина последовательностей для гибридизации с адаптером может находиться в пределах любых диапазонов, ограниченных любыми из этих значений, например, 15-17, 12-20, или 13, 25. Последовательности для гибридизации с адаптером могут быть общими для множества нуклеиновых кислот в пределах образца, при этом такое множество одноцепочечных нуклеиновых кислот имеет изменяющиеся области одноцепочечных целевых нуклеиновых кислот. Множество групп одноцепочечных нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит различные последовательности для гибридизации с адаптером, могут существовать совместно в пределах образца и подвергаться описанным здесь способам амплификации. Различные последовательности для гибридизации с адаптером могут отличаться друг от друга по меньшей мере или по меньшей мере примерно на 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов. Различные последовательности для гибридизации с адаптером могут отичаться друг от друга не более или не более чем примерно на 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 или меньше нуклеотидов. Различные последовательности для гибридизации с адаптером могут отичаться друг от друга по количеству нуклеотидов в диапазоне 1-50, 2-45, 5-40, 10-35, 15-25 или 20-30. Специалистам в данной области будет понятно, что различные последовательности для гибридизации с адаптером могут отличаться друг от друга по количеству нуклеотидов, которое находится в пределах любых диапазонов, ограниченных любыми из этих значений, например, 2 – 50. Таким образом, один универсальный адаптер

может быть использован для множества одноцепочечных нуклеиновых кислот, имеющих общие концевые последовательности, таким образом, что универсальный адаптер гибридизируется с ними со всеми. Множество адаптеров может быть использовано в образце со множеством групп одноцепочечных нуклеиновых кислот, при этом каждый из адаптеров гибридизируется с концевыми последовательностями в одной или более группах. По меньшей мере или по меньшей мере примерно 1, 2, 3, 4, 5,10, 20, 25, 30, 50, 100 или более адаптеров может быть использовано в мультиплексном формате. Не более или не более чем примерно 100, 50, 30, 25, 20, 10, 5, 4, 3, 21, 1 или меньше адаптеров может быть использовано в мультиплексном формате. Адаптеры в диапазоне 1-100, 2-50, 3-30, 4-25, 5-20 могут быть использованы в мультиплексном формате. Специалистам в данной области будет понятно, что количество адаптеров, которое может быть использовано в мультиплексном формате, может находиться в пределах любых диапазонов, ограниченных любыми из этих значений, например, 2 – 30. Первая последовательность на адаптере может гибридизироваться с 5’-концом одноцепочечной нуклеиновой кислоты и вторая последовательность на адаптере может гибридизироваться с 3’-концом этой же самой одноцепочечной нуклеиновой кислоты, содействуя змыканию в кольцо одноцепочечной нуклеиновой кислоты.

Одноцепочечные нуклеиновые кислоты могут быть замкнуты в кольцо при гибридизации с адаптером. Кольцевая одноцепочечная нуклеиновая кислота может соединяться по 5’ и 3’ концам, формируя непрерывное кольцо. Различные способы лигирования и ферменты, подходящие для реакции, описаны здесь или известны из других источников в данной области.

Адаптер может быть удлинен с использованием кольцевой одноцепочечной нуклеиновой кислоты в качестве матрицы. Альтернативно, один или несколько различных праймеров могут быть использованы для отжига где-либо в другом месте на кольце дополнительно или вместо адаптера, и могут быть удлинены с помощью фермента полимеразы. Реакция удлинения, такая как амплификация по типу катящегося кольца, амплификация по типу катящегося кольца с использованием множества праймеров или любая другая подходящая реакция удлинения может содействовать созданию одного длинного и линейного продукта амплификации нуклеиновых кислот (ампликона), содержащего чередующиеся копии одноцепочечной матричной нуклеиновой кислоты и последовательности для гибридизации с адаптером. В некоторых вариантах осуществления объединенные копии последовательностей для гибридизации с адаптером представляют собой копии последовательности адаптера или отличаются менее чем на 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотида. Эти последовательности для упрощения совместно

называются «копии адаптера», но будет понятно, что они могут относиться множеству различных типов последовательностей, образованных в результате реакции удлинения с использованием кольца в качестве матрицы.

Один или более вспомогательных олигонуклеотидов может быть обеспечено для отжига с одноцепочечным продуктом амплификации нуклеиновых кислот (ампликоном). Вспомогательные олигонуклеотиды могут быть частично или полностью комплементарными копиям адаптера. В результате гибридизации вспомогательного олигонуклеотида с одноцепочечным продуктом амплификации нуклеиновых кислот (ампликоном) могут быть сформированы чередующиеся одноцепочечные и двухцепочечные области. Одноцепочечные области могут соответствовать копиям последовательности одноцепочечной матричной нуклеиновой кислоты. В результате гибридизации вспомогательного олигонуклеотида с одноцепочечным продуктом амплификации нуклеиновых кислот (ампликоном), например, при копиях адаптера, могут быть созданы сайты узнавания для расщепляющего агента, такого как эндонуклеаза рестрикции, например, эндонуклеаза рестрикции IIS-типа. Последовательности могут быть разработаны таким образом, что разрезаемые сайты для расщеляющего агента находятся внутри или около мест соединения одноцепочечных и двухцепочечных областей. В некоторых случаях при расщеплении одним или несколькими расщепляющими агентами образуется множество одноцепочечных копий одноцепочечных целевых нуклеиновых кислот, при этом одноцепочечные целевые нуклеиновые кислоты не содержат любых частей из копий адаптера, или содержат менее 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида из копий адаптера.

Вспомогательные олигонуклеотиды могут содержать аффинную метку, такую как биотин или производное биотина. Аффинная метка может находиться на 5’-конце, 3’-конце, или в середине олигонуклеотида. Выделение вспомогательных олигонуклеотидов из образца может быть стимулировано путем использования партнера аффинного связывания на среде для выделения, такой как покрытые стрептавидином частицы, или любого другого подходящего аффинного способа очистки. Отщепленные копии адаптера или его части также могут быть выделены вместе со вспомогательными олигонуклеотидами при помощи их гибридизации со вспомогательными олигонуклеотидами. В мультиплексных реакциях с использованием множества адаптеров может быть использовано множество олигонуклеотидов, каждый из которых гибридизируется с различной группой одноцепочечных продуктов амплификации нуклеиновых кислот (ампликонов), например, в участках копий адаптера. Альтернативные

способы очистки, такие как очистка методом HPLC или PAGE, могут быть использованы с олигонуклеотидами, содержащими или не содержащими аффинную метку.

При обращении к фигуре 65, одноцепочечные нуклеиновые кислоты могут быть также амплифицированы аналогично способу, описанному для фигуры 64, за исключением того, что последовательности и расщепляющий агент выбраны таким образом, что участки разрезания находятся в пределах копий адаптера, так что формируются одноцепочечные копии повледовательности одноцепочечной нуклеиновой кислоты с фланкирующими областями. Такие фланкирующие области могут представлять собой обратные комплементы фланкирующих областей исходной последовательности одноцепочечной целевой нуклеиновой кислоты. Альтернативно, в зависимости от конкретной локализации разрезаемого сайта, они могут «сдвигать» нуклеотиды из одной фланкирующей области в другую. В таких случаях обратный олигонуклеотид, комплементарный нуклеотиду адаптера, все еще может эффективно гибридизироваться с обоими концами, способствуя следующему кругу циклизации. Таким образом, способ, показанный на фигуре 65, может повторяться множество раз, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или более раз, отдельно или в качестве реакции, предшествующей способу, показанному на фигуре 64, для амплификации одноцепочечной целевой нуклеиновой кислоты. Способ, показанный на фигуре 64, может быть использован как последний круг для избавления от фланкирующих областей, оставляя амплифицированные одноцепочечные копии или реплики одноцепочечных целевых нуклеиновых кислот.

Продукт реакции удлинения, такой как продукт амплификации по механизму катящегося кольца, содержащий одноцепочечные повторяющиеся единицы амплифицированных желаемых олигонуклеотидов и олигонуклеотидного адаптера, может быть расщеплен в пределах или вблизи олигонуклеотидного адаптера с генерированием высвобожденных желаемых олигонуклеотидов, при этом высвобожденные желаемые олигонуклеотиды могут содержать или могут не содержать нуклеотиды адаптера на 5’- или 3’-концах желаемого олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления расщепление происходит на каждом участке соединения одноцепочечных повторяющихся единиц амплифицированных желаемых олигонуклеотидов и последовательностей адаптера. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько областей последовательности адаптера содержат молекулярный штрихкод, участок белкового связывания, сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления продукт амплификации расщепляется одной или несколькими эндонуклеазами рестрикции в сайте или около сайта узнавания эндонуклеазы рестрикции,

при этом сайт узнавания расположен в пределах последовательности олигонуклеотидного адаптера. Перед расщеплением эндонуклеазой продукт амплификации может быть гибридизирован со вспомогательным олигонуклеотидом, содержащим последовательность, комплементарную последовательности олигонуклеотидного адаптера, содержащей сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции.

Продукт амплификации может быть отщеплен на 5'-конце сайта узнавания эндонуклеазами II-типа. Разрезаемые участки могут представлять собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более нуклеотидов в направлении «апстрим» от первого нуклеотида сайта узнавания. На 5'- или 3'-конце сайта узнавания может формироваться выступающий («липкий») конец длиной 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. «Тупые» эндонуклеазы II типа, которые расщепляют с образованием 0 выступающих нуклеотидов, включают MlyI и SchI. Иллюстративные эндонуклеазы IIS-типа, которые образуют 5'-выступающие концы (например выступающие концы длиной 1, 2, 3, 4, 5 нуклеотидов) включают, но без ограничения, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI и LguI. Никующие эндонуклеазы, которые удаляют сайт узнавания и расщепляют на 5'-конце сайта узнавания, включают, но без ограничения, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I и UbaPI.

Продукт амплификации может быть расщеплен эндонуклеазами, не относящимися к типу IIS, которые расщепляют на 5'-конце сайта узнавания на обеих цепях с образованием «тупых» концов. Продукт амплификации может быть расщеплен эндонуклеазами, не относящимися к типу IIS, которые расщепляют на 5'-конце сайта узнавания на одной цепи и в середине сайта узнавания на другой цепи с образованием 5'-выступающих концов. Примеры эндонуклеаз, которые образуют 5'-выступающие концы, включают, но без ограничения, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI и Psp6I.

Продукт амплификации может быть расщеплен никующими эндонуклеазами, которые расщепляют на 5'-конце сайта узнавания с получением одноцепочечного разрыва (ника). Никующий сайт может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более нуклеотидов в направлении «апстрим» от первого нуклеотида сайта узнавания. Иллюстративные никующие эндонуклеазы включают, но без ограничения, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I и UbaPI.

Продукт амплификации может быть расщеплен на 3’-конце сайта узнавания эндонуклеазами IIS-типа. На 5’- или 3’-конце сайта узнавания может быть образован выступающий конец длиной 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. Разрезаемые сайты могут представлять собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более нуклеотидов в направлении «даустрим» от последнего нуклеотида сайта узнавания. Эндонуклеазы IIS-типа, которые расщепляют с образованием 0 нуклеотидов в направлении «даустрим» от последнего нуклеотида сайта узнавания, включают MlyI и SchI. Иллюстративные эндонуклеазы IIS-типа, которые генерируют 3’-выступающие концы (например, выступающие концы длиной 1, 2, 3, 4, 5 нуклеотидов), включают, но без ограничения, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI и BscCI. Эндонуклеазы, не относящиеся к типу II, которые удаляют сайт узнавания на одной цепи и генерируют 3’-выступающий конец или «тупой» конец на другой цепи, включают, но без ограничения, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI и TseFI. Никующие эндонуклеазы, которые удаляют сайт узнавания и разрезают на 3’-конце сайта узнавания, включают Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI и Nt.BspQI.

Расстояние между сайтом узнавания и расщепляемым сайтом может зависеть от используемой для расщепления эндонуклеазы рестрикции. Например, эндонуклеазы рестрикции с сайтами разрезания, расположенными на расстоянии 1 пары оснований в направлении «даустрим» или «апстрим» от сайта узнавания, которые могут эффективно расщеплять в оптимальных условиях реакции, включают, но без ограничения, AgeI, ApaI, AscI, BmtI, BsaI, BsmBI, BsrGI, DdeI, DraIII, HpaI, MseI, PacI, PciI, PmeI, PvuI, SacII, SapI, Sau3AI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, StuI и XmaI. Эндонуклеазы рестрикции с сайтами разрезания, расположенными на расстоянии 2 пар оснований в направлении «даунстрим» или «апстрим» от сайта узнавания, которые могут эффективно расщеплять в оптимальных условиях реакции, включают, но без ограничения, AgeI, AluI, ApaI, AscI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, DdeI, DralII, EagI, HpaI, KpnI, MseI, NlaIII, PacI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, RsaI, SacII, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI и XmaI. Эндонуклеазы рестрикции с сайтами разрезания, расположенными на расстоянии 3 пар оснований в направлении «даунстрим» или «апстрим» от сайта узнавания, которые могут эффективно расщеплять в оптимальных условиях реакции, включают, но без ограничения, AgeI, AluI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, DdeI, DralII, EagI, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, PacI, PciI, PmeI, PstI, RsaI, SacI, SacII, SalI, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI и XmaI. Эндонуклеазы рестрикции с сайтами разрезания, расположенными на

расстоянии 4 пар оснований в направлении «даунстрим» или «апстрим» от сайта узнавания, которые могут эффективно расщеплять в оптимальных условиях реакции, включают, но без ограничения, AgeI, AluI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, ClaI, DdeI, DralII, EagI, EcoRI, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, PacI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, SacI, SacII, SaII, SapI, Sau3AI, Sbfl, ScaI, Sfil, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI, XhoI и XmaI. Эндонуклеазы рестрикции с сайтами разрезания, расположенными на расстоянии 5 пар оснований в направлении «даунстрим» или «апстрим» от сайта узнавания, которые могут эффективно расщеплять в оптимальных условиях реакции, включают, но без ограничения, AgeI, AluI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, ClaI, DdeI, DralII, EagI, EcoRI, EcoRV, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, NspI, PacI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, SacI, SacII, SaII, SapI, Sau3AI, Sbfl, ScaI, Sfil, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI, XhoI и XmaI.

Последовательность адаптера может содержать один или более сайтов рестрикции, узнаваемых рестриктазой. В некоторых вариантах осуществления сайт узнавания имеет длину по меньшей мере 4, 5 или 6 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления сайт узнавания является непалиндромным. В некоторых вариантах осуществления последовательность адаптера содержит два или более сайтов узнавания. Два или более сайтов узнавания могу быть расщеплены одним или несколькими ферментами рестрикции. Специалистам в данной области будет понятно, что расщепление двух или более сайтов узнавания двумя или более ферментами рестрикции может быть достигнуто и/или улучшено с помощью буфера и оптимизации температуры реакции. Иллюстративные пары сайтов узнавания в последовательности адаптера включают, но без ограничения, MlyI-MlyI, MlyI-Nt.AlwI, BsaI-MlyI, MlyI-BciVI и BfuCI-MlyI.

**Гены**

Способы и композиции согласно изобретению в различных вариантах осуществления обеспечивают возможность конструирования библиотек генов, содержащих коллекцию индивидуально доступных представляющих интерес полинуклеотидов. Полинуклеотиды могут быть линейными, могут содержаться в векторах (например, плазмида или фаг), клетках (например, бактериальных клетках, в виде очищенной ДНК или в других подходящих формах, известных в данной области. Члены библиотеки (которые называются по-разному как клоны, конструкты, полинуклеотиды и т.д.) могут храниться различными способами для извлечения и использования, в том числе, например, в мультилуночных культуральных или микротитровальных планшетах, в пробирках, в подходящей клеточной среде (например, клетки E. coli), в виде композиций

очищенной ДНК на подходящем устройстве хранения данных (например, Storage IsoCodeD IDTM DNA library card; Schleicher & Schuell BioScience), или в других разнообразных подходящих формах библиотек, известных в данной области. Библиотека генов может содержать по меньшей мере около 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7500, 10000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 75000, 100000 или более членов. Молекулы нуклеиновой кислоты, описанной здесь, могут быть получены в микроколичествах (например, количествах от фемтомолярных до наномолярных, таких как от около 0,001 фемтомоля до около 1,0 наномоля, от около 0,01 фемтомоля до около 1,0 наномоля, от около 0,1 фемтомоля до около 1,0 наномоля, от около 0,001 фемтомоля до около 0,1 наномоля, от около 0,001 фемтомоля до около 0,01 наномоля, от около 0,001 фемтомоля до около 0,001 наномоля, от около 1,0 фемтомоля до около 1,0 наномоля, от около 1,0 фемтомоля до около 0,1 наномоля, от около 1,0 фемтомоля до около 0,01 наномоля, от около 1,0 фемтомоля до около 0,001 наномоля, от около 10 фемтомолей до около 1,0 наномоля, от около 10 фемтомолей до около 0,001 наномоля, от около 20 фемтомолей до около 1,0 наномоля, от около 100 фемтомолей до около 1,0 наномоля, от около 500 фемтомолей до около 1,0 наномоля, от около 1 наномоля до около 800 наномолей, от около 40 наномолей до около 800 наномолей, от около 100 наномолей до около 800 наномолей, от около 200 наномолей до около 800 наномолей, от около 500 наномолей до около 800 наномолей, от около 100 наномолей до около 1000 наномолей и т.д.). Специалистам в данной области будет понятно, что количество нуклеиновых кислот может находиться в любом диапазоне, ограниченном любыми из этих значений (например, от около 0,001 фемтомоля до около 1000 наномолей или от около 0,001 фемтомоля до около 0,01 фемтомоля). Как правило, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены в количествах, которые составляют около или более чем около 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 фемтомолей; 1, 10, 100 пикомолей; 1, 10, 100 наномолей; 1 микромоль или больше. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены в количествах, которые составляют меньше, чем около 1 микромоль; 100, 10, 1 наномоль; 100, 10, 1 пикомоль; 100, 10, 1, 0,1, 0,001, 0,001 фемтомоль или меньше. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты могут быть получены при концентрациях, которые составляют примерно или больше, чем примерно 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000 нМ. В некоторых вариантах осуществления библиотека генов синтезирована/собрана/ и/или содержится в пространстве, которое составляет менее чем 1000, 100, 10, 1 $м^3$, 100, 10, 1 $дм^3$, 100, 10, 1 $см^3$ или меньше.

Место расположения индивидуально доступных членов может быть доступным или легко определяться. Индивидуально доступные члены могут быть легко извлечены из библиотеки.

В различных вариантах осуществления способы и композиции согласно изобретению обеспечивают возможность получения синтетических (то есть синтезированных de novo) генов. Библиотеки, содержащие синтетические гены, могут быть сконструированы различными способами, описанными более подробно в других местах в настоящем документе, такими как методы PCA, не относящиеся к PCA методы сборки генов или иерархическая сборка генов, комбинирование («сшивание») двух или более двухцепочечных полинуклеотидов (называемых здесь как «синтоны») с получением более крупных единиц ДНК (то есть мультисинтонов или шасси). Библиотеки крупных конструктов могут включать полинуклеотиды, которые имеют длину по меньшей мере 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500 kb или больше. Крупные конструкты могут быть ограничены независимо выбранным верхним пределом, составляющим примерно 5000, 10000, 20000 или 50000 пар оснований. Представляет интерес синтез любого количества нуклеотидных последовательностей сегментов, кодирующих полипептид, в том числе последовательностей, кодирующих нерибосомальные пептиды (NRP), модульные нерибосомальные пептид-синтетазы (NRPS) и синтетические варианты, полипептидных сегментов других модулярных белков, таких как антитела, полипептидных сегментов из других семейств белков, включая некодирующие ДНК и РНК, такие как регуляторные последовательности, например, промоторы, факторы транскрипции, энхансеры, миРНК, shRNA, РНК-интерференция, микроРНК, малая нуклеолярная РНК, полученная из микроРНК, или любая функциональная или структурная единица ДНК или РНК. Используемый здесь термин «ген» относится в широком смысле к любому типу кодирующего или некодирующего длинного полинуклеотида или аналога полинуклеотида.

В различных вариантах осуществления способы и композиции согласно изобретению относятся к библиотеке генов. Библиотека генов может содержать множество подсегментов. В одном или более подсегментов гены библиотеки могут быть ковалентно связаны друг с другом. В одном или более подсегментов гены библиотеки могут кодировать компоненты первого метаболического пути с одним или несколькими конечными продуктами метаболизма. В одном или более подсегментов гены библиотеки могут быть выбраны исходя из способа изготовления одного или нескольких целевых конечных продуктов метаболизма. Один или более конечных продуктов метаболизма

содержат биотопливо. В одном или более подсегментах гены библиотеки могут кодировать компоненты второго метаболического пути с одним или более конечными продуктами метаболизма. Один или более конечных продуктов первого и второго метаболических путей могут содержать один или несколько общих конечных продуктов. В некоторых случаях первый метаболический путь содержит конечный продукт, который обработан во втором метаболическом пути.

В некоторых вариантах осуществления подсегмент библиотеки может содержать, состоять или состоять по существу из генов, кодирующих часть или весь геном синтетического организма, например, вируса или бактерии. Таким образом, термины «ген», «полинуклеотид», «нуклеотид», «нуклеотидная последовательность», «нуклеиновая кислота» и «олигонуклеотид» используются взаимозаменяемо и относятся к нуклеотидному полимеру. Если не ограничивается другим, указанные термины включают известные аналоги природных нуклеотидов, которые могут функционировать (например, гибридизоваться) аналогично природным нуклеотидам. Они могут представлять собой полимерную форму нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотиды или рибонуклеотиды, или их аналоги. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную и неизвестную. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, межгенная ДНК, локусы (локус), определенные на основании анализа связи, экзоны, интроны, мРНК, транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (миРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микроРНК (miRNA), малая ядрышковая РНК, рибозимы, комплементарная ДНК (кДНК), которая представляет ДНК-отображение мРНК, обычно получаемая обратной транскрипцией матричной РНК (мРНК) или амплификацией; молекулы ДНК, полученные синтетическим путем или посредством амплификации, геномная ДНК, рекомбинантные олинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированную ДНК любой последовательности, изолированную РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. В случае их присутствия, модификации нуклеотидной структуры могут быть произведены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может быть прервана ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, такой как конъюгирование с компонентом для мечения. Полинуклеотидные последовательности в случае обеспечения указаны в направлении 5' - 3', если не указано иное.

Термин «нуклеиновая кислота» охватывает двух- или трехцепочечные нуклеиновые кислоты, а также одноцепочечные молекулы. В двух- или трехцепочечных нуклеиновых кислотах цепи нуклеиновых кислот должны быть одинаковой длины (то есть двухцепочечная нуклеиновая кислота не обязательно должна быть двухцепочечной на всем протяжении обеих цепей).

Термин «нуклеиновая кислота» также охватывает любую ее химическую модификацию, такую как метилирование и/или кэппинг. К модификациям нуклеиновых кислот могут относиться добавление химических групп, которые вводят дополнительный заряд, поляризуемость, связывание водорода, электростатическое взаимодействие и функциональность в отдельные основания нуклеиновых кислот или в нуклеиновую кислоту в целом. К таким модификациям могут относиться модификации оснований, такие как модификации сахара во 2′-положении, модификации пиримидина в 5 положении, модификации пурина в 8-положении, модификации по экзоциклическим аминам цитозина, замены 5-бромурацила, модификации остова, необычные сочетания спаривания оснований, такие как изооснования изоцитидин и изогуанидин и тому подобное.

В частности, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут включать полидезоксирибонуклеотиды (содержащие 2-дезокси-D-рибозу), полирибонуклеотиды (содержащие D-рибозу) и любой другой тип нуклеиновой кислоты, т.е. N- или C-гликозид пуринового или пиримидинового основания, а также другие полимеры, содержащие ненуклеотидные остовы, например полиамидные (например, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA)) и полиморфолино (коммерчески доступные у фирмы Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oreg., как Neugene) полимеры и другие синтетические полимеры нуклеиновых кислот со специфической последовательностью при условии, что полимеры содержат нуклеотиды в конфигурации, которая обеспечивает спаривание оснований и стэкинг оснований, такие, которые обнаружены в ДНК и РНК. Термин «нуклеиновая кислота» также охватывает замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA), которые описаны в патентах США 6794499, 6670461, 6262490 и 6770748, которые включены здесь полностью путем отсылки ввиду описания в них LNA.

Под используемым здесь термином «комплементарность» понимают способность образовывать пары между двумя нуклеотидами. Т.е. если нуклеотид в данном положении нуклеиновой кислоты способен к образованию водородной связи с нуклеотидом другой нуклеиновой кислоты, то полагают, что две нуклеиновые кислоты комплементарны друг другу в этом положении. Комплементарность между двумя одноцепочечными молекулами нуклеиновых кислот может быть «частичной», при этом связываются лишь некоторые

нуклеотиды, или она может быть полной при наличии полной комплементарности между одноцепочечными молекулами. Степень комплементарности между цепями нуклеиновых кислот существенно влияет на эффективность и силу гибридизации между цепями нуклеиновых кислот.

«Гибридизация» и «отжиг» обозначает реакцию, в которой один или несколько полинуклеотидов взаимодействуют с образованием комплекса, который стабилизируется через образование водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Образование водородных связей может происходить путем спаривания оснований по Уотсону-Крику, путем связывания по Хугстену или любым другим последовательность-специфическим образом. Комплекс может содержать две цепи, формируя дуплексную структуру, три или более цепей, формируя мультицепочечный комплекс, единичную самогибридизирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может являться стадией более экстенсивного процесса, такого как инициация PCR или другие реакции амплификации, или ферментативное расщепление полинуклеотида рибозимом. Первая последовательность, которая может быть стабилизирована посредством водородного связывания с основаниями нуклеотидных остатков второй последовательности, считается «поддающейся гибридизации» с указанной второй последовательностью. В таком случае вторая последовательность также может считаться поддающейся гибридизации с первой последовательностью.

Термин «гибридизированный» в отношении полинуклеотида относится к полинуклеотиду в комплексе, который стабилизирован посредством водородного связывания между основаниями нуклеотидных остатков. Образование водородной связи может происходить путем спаривания оснований по Уотсону-Крику, связывания по Хугстену или любым другим последовательность-специфическим образом. Комплекс может содержать две цепи, формируя дуплексную структуру, три или более цепей, формируя мультицепочечный комплекс, единичную самогибридизирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может являться стадией более экстенсивного процесса, такого как инициация PCR-реакции или ферментативное расщепление полинуклеотида рибозимом. Последовательность, гибридизованная с заданной последовательностью, называется «комплементом» заданной последовательности.

Под «специфической гибридизацией» понимают связывание нуклеиновой кислоты с нуклеотидной последовательностью-мишенью в отсутствие существенного связывания с другими нуклеотидными последовательностями, присутствующими в смеси для гибридизации при условиях определенной жесткости. Специалистам в данной области

будет понятно, что снижение жесткости условий гибридизации позволяет допускать неспаривания последовательностей.

В целом, «комплемент» заданной последовательности представляет собой последовательность, которая полностью или по существу комплементарна и способна к гибридизации с заданной последовательностью. В целом, первая последовательность, которая способна к гибридизации со второй последовательностью или набором вторых последовательностей, специфически или селективно гибридизируется со второй последовательностью или набором вторых последовательностей, таким образом, что гибридизация со второй последовательностью или набором вторых последовательностей является предпочтительной (например, термодинамически более стабильная в заданных условиях, таких как жесткие условия, обычно используемые в данной области) для гибридизации с нецелевыми последовательностями во время реакции гибридизации. Обычно способные к гибридизации последовательности имеют общую степень комплементарности последовательность по всей или части их соответствующей длины, такую как комплементарность в диапазоне 25%-100%, включая по меньшей мере примерно 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100% комплементарности последовательноти.

Под термином «праймер» понимают олигонуклеотид, который способен к гибридизации (также называемой «отжигом») с нуклеиновой кислотой и служит в качестве сайта инициации полимеризации нуклеотидов (РНК или ДНК) при подходящих условиях (то есть при наличии четырех различных нуклеозид-трифосфатов и агента для полимеризации, такого как ДНК- или РНК-полимераза или обратная транскриптаза) в подходящем буфере и при подходящей температуре. Подходящая длина праймера зависит от назначения праймера, но праймеры обычно имеют по меньшей мере 7 нуклеотидов в длину и чаще находятся в диапазоне от 10 до 30 нуклеотидов или даже чаще от 15 до 30 нуклеотидов в длину. Другие праймеры могут быть несколько длиннее, например от 30 до 50 или от 40 до 70 нуклеотидов в длину. Специалистам в данной области будет понятно, что длина праймера может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, от 7 до 70, или от 50 до 70). Олигонуклеотиды различной длины, как описано здесь далее, могут быть использованы в качестве праймеров или строительных блоков для амплификации и/или реакций сборки генов. В этом контексте под «длиной праймера» понимают участок олигонуклеотида или нуклеиновой кислоты, который гибридизуется с комплементарной последовательностью-«мишенью» и праймирует синтез нуклеотидов. Молекулы коротких праймеров, как

правило, требуют более низких температур для образования в достаточной степени устойчивых комплексов гибридов с матрицей. Праймер не обязан воспроизводить точную последовательность матрицы, но должен быть в достаточной степени комплементарен для гибридизации с матрицей. Под термином «сайт праймера» или «сайт связывания праймера» понимают сегмент нуклеиновой кислоты-мишени, с которым праймер гибридизуется. Конструк, презентирующий сайт связывания праймера, часто называют «готовый конструкт премирования» или «готовый конструкт амплификации».

Считается, что праймер отжигается на другой нуклеиновой кислоте, если праймер или его участок гибридизуется с нуклеотидной последовательностью, содержащейся в нуклеиновой кислоте. Утверждение, что праймер гибридизуется с определенной нуклеотидной последовательностью, не уточняет, гибридизуется ли праймер с этой нуклеотидной последовательностью полностью либо частично.

**Олигонуклеотидный синтез**

Олигонуклеотиды, синтезированные на субстратах, описанных здесь, могут содержать больше, чем около 100, предпочтительно больше, чем около 100, более предпочтительно больше, чем около 16000 и наиболее предпочтительно больше, чем около 50000 или 250000, или даже больше, чем около 1000000 различных олигонуклеотидных зондов, предпочтительно в менее чем 20, 10, 5, 1, 0,1 $см^2$ или меньшей площади поверхности.

Способ быстрого синтеза n-mer олигонуклеотидов, таких как олигонуклеотиды длиной около или по меньшей мере около 100, 150, 200, 250, 300, 350 или более нуклеотидов, на субстрате описан здесь далее в различных вариантах осуществления. В способе может быть использован субстрат с выделенными локусами, которые функционализированы химическим фрагментом, подходящим для связывания нуклеотидов. В некоторых случаях может быть использована стандартная фосфорамидитная химия. Соответственно, по меньшей мере два строительных блока связываются со множество растущих олигонуклеотидных цепей, каждая из которых расположена на одном из выделенных локусов, с высокой скоростью, такой как скорость, составляющая по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200 нуклеотидов в час или более. В некоторых вариантах осуществления используют адениновые, гуаниновые, тиминовые, цитозиновые или уридиновые строительные блоки или их аналоги/модифицированные версии, как описано более подробно в других местах в настоящей документе. В некоторых случаях добавленные строительные блоки содержат динуклеотиды, тринуклеотиды или строительные блоки на основе более длинных

нуклеотидов, такие как строительные блоки, содержащие около или по меньшей мере около 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления большие библиотеки n-mer олигонуклеотидов синтезируют параллельно на субстрате, например, субстрате, содержащем около или по меньшей мере около 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000 выделенных локусов, осуществляющих синтез олигонуклеотидов. Индивидуальные локусы могут осществлять синтез олигонуклеотидов, которые отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления при проведении фосфорамидитной химии, например, процесса со стадиями связывания, кэппирования, окисления и деблокирования, дозирование реагента можно точно контролировать с помощью циклов непрерывного/замещающего течения жидкостей и стадий вакуумной сушки, такой как стадия вакуумной сушки до связывания новых строительных блоков. Субстрат может содержать сквозные межсоединения, например, по меньшей мере около 100, 1000, 10000, 100000, 1000000 или более сквозных межсоединений, обеспечивающих жидкостное взаимодействие между первой поверхностью субстрата и второй поверхностью субстрата. Субстраты могут находиться на месте во время одной или всех стадий в пределах цикла фосфорамидитной химии, и поток реагентов может проходить сквозь субстрат.

Типичный способ получения синтетических нуклеиновых кислот основан на фундаментальной работе Caruthers и известен как фосфорамидитный метод (M. H. Caruthers, Methods in Enzymology 154, 287-313, 1987; включенный здесь полностью путем отсылки). Последовательность конечных молекул можно контролировать порядком синтеза. Другие способы, такие как H-фосфонатный метод, предназначены для этих же целей успешного синтеза полимера из его субъединиц.

Как правило, синтез ДНК-олигомеров с помощью способов согласно изобретению может быть достигнут посредством стандартной фосфорамидитной химии. Химический синтез нуклеиновых кислот на основе фосфороамидитов хорошо известен специалисту с данной области, и описан в Streyer, Biochemistry (1988) pp 123-124 и патенте США 4415732, включенных здесь путем отсылки. Фосфорамидитные реагенты, включая фосфорамидитные B-цианоэтильные (CE) мономеры и реагенты CPG (стекло с контролируемым размером пор), используемые в изобретении, могут быть получены из различных коммерческих источников, включая American International Chemical (Natick Mass.), BD Biosciences (Palo Alto Calif.), и другие.

В различных вариантах осуществления химический синтез нуклеиновых кислот выполняют преимущественно с использованием вариаций фосфорамидитной химии на

твердых поверхностях (Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Lett. 1981;22:1859–1862; Caruthers MH. Gene synthesis machines – DNA chemistry and its uses. Science. 1985;230:281–285. ), оба из которых включены здесь полностью путем отсылки.

Например, методы на основе фосфорамидита могут быть использованы для синтеза дезоксирибо- и рибонуклеиновых кислот, а также аналогов нуклеиновых кислот со множеством модификаций оснований, остова и сахаров (Beaucage SL, Iyer RP. Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. Tetrahedron. 1992;48:2223–2311; Beigelman L, Matulic-Adamic J, Karpeisky A, Haeberli P, Sweedler D. Base-modified phosphoramidite analogs of pyrimidine ribonucleosides for RNA structure-activity studies. Methods Enzymol. 2000;317:39–65; Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. Drug Discov. Today. 2005;10:587–593; Pankiewicz KW. Fluorinated nucleosides. Carbohydrate Res. 2000;327:87–105; Lesnikowski ZJ, Shi J, Schinazi RF. Nucleic acids and nucleosides containing carboranes. J. Organometallic Chem. 1999;581:156–169; Foldesi A, Trifonova A, Kundu MK, Chattopadhyaya J. The synthesis of deuterionucleosides. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2000;19:1615–1656; Leumann CJ. DNA Analogues: from supramolecular principles to biological properties. Bioorg. Med. Chem. 2002;10:841–854; Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. Trends Biotechnol. 2003;21:74–81; De Mesmaeker A, Altmann K-H, Waldner A, Wendeborn S. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. Curr. Opin. Struct. Biol. 1995;5:343–355), все из которых включены здесь полностью путем отсылки.

Фосфорамидитная химия была адаптирована для синтеза in situ ДНК на твердых субстратах, например, микроматрицах. Такой синтез обычно достигается путем пространственного контроля одной стадии цикла синтеза, что приводит к получению от тысяч до сотен тысяч уникальных олигонуклеотидов, распределенных в малой площади, например, площади в несколько квадратных сантиметров. Архитектуры площадей и субстратов для синтеза олигонуклеотидов описаны далее более подробно в других местах в настоящем документе. Подходящие методы, используемые для достижения пространственного контроля, могут включать (i) контроль стадии связывания с помощью струйной печати (Agilent, Protogene; Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. Nat. Biotechnol. 2001;19:342–347; Butler JH, Cronin M, Anderson KM, Biddison GM, Chatelain F, Cummer M, Davi DJ, Fisher L, Frauendorf AW, Frueh FW, et al. In situ synthesis of oligonucleotide arrays

by using surface tension. J. Am. Chem. Soc. 2001;123:8887–8894) или физических масок (Southern EM, Maskos U, Elder JK. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. Genomics. 1992;13:1008–1017.), (ii) контроль стадии деблокирования 5′-гидроксильной группы с помощью классического (Affymetrix; Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid dna-sequence analysis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994;91:5022–5026.) и без использования маски (Nimblegen; Singh-Gasson S, Green RD, Yue YJ, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, Cerrina F. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. Nat. Biotechnol. 1999;17:974–978) фотолитографического снятия защиты фотолабильных мономеров или (iii) цифровая активация фотогенерированных кислот для проведения стандартного детритилирования (Xeotron/Atactic; Gao XL, LeProust E, Zhang H, Srivannavit O, Gulari E, Yu PL, Nishiguchi C, Xiang Q, Zhou XC. A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. Nucleic Acids Res. 2001;29:4744–4750), все из которых включены здесь полностью в виде отсылки.

Олигонуклеотиды, изготовленные на субстратах, могут быть отщеплены от твердой поверхности и необязательно объединены в пул для обеспечения новых применений, таких как сборка генов, амплификация нуклеиновой кислоты, библиотеки для секвенирования, библиотеки shRNA и т.д. (Cleary MA, Kilian K, Wang YQ, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, et al. Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nature Methods. 2004;1:241–248), синтеза генов (Richmond KE, Li MH, Rodesch MJ, Patel M, Lowe AM, Kim C, Chu LL, Venkataramaian N, Flickinger SF, Kaysen J, et al. Amplification and assembly of chip-eluted DNA (AACED): a method for high-throughput gene synthesis. Nucleic Acids Res. 2004;32:5011–5018; Tian JD, Gong H, Sheng NJ, Zhou XC, Gulari E, Gao XL, Church G. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. Nature. 2004;432:1050–1054) и сайт-направленного мутагенеза (Saboulard D, Dugas V, Jaber M, Broutin J, Souteyrand E, Sylvestre J, Delcourt M. High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips. BioTechniques. 2005;39:363–368), все из которых включены здесь полностью в виде отсылки.

Успешный синтез длинных олигонуклеотидов высокого качества в значительной мере подтверждается высокими уровнями ступенчатого связывания, например, выходами ступенчатого связывания, которые составляют по меньшей мере около 99,5%. В различных вариантах осуществления способы и композиции согласно изобретению предусматривают выход связывания более чем 98%, 98.5%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%,

99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,96%, 99,97%, 99,98%, 99,99% или выше. Без привязки к теории полагают, что если эффективность связывания является низкой, например, ниже 99%, воздействие на целостность последовательности обычно следует одну из двух сценариев. Если используется кэппирование, то низкая эффективность связывания будет подтверждаться короткими усеченными последовательностями. Если кэппирование не используется, или если кэппирование является неудачным, в олигонуклеотиде могут возникнуть делеции единичных оснований и в результате будет образовано большое число неудачных последовательностей, лишенных одного или двух нуклеотидов. Эффективное удаление 5′-гидроксильной защитной группы дополнительно содействует синтезу длинных олигонуклеотидов высокого качества с желательными высокими выходами, например, высокими показателями эффективности, достигающими 100% в каждом цикле, например, превышающими или равными 98%, 98,5%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,96%, 99,97%, 99,98%, 99,99% или более. Эта стадия может быть оптимизирована путем точного контроля дозирования реагентов, а также других параметров окружающей среды с использованием описанных здесь способов и композиций, избегая смесей конечного продукта, содержащих семейство олигомеров с делециями единичных оснований дополнительно к желаемому продукту.

Кроме того, для синтеза длинных олигонуклеотидов важно свести к минимуму наиболее значимую побочную реакцию – депуринизацию (Carr PA, Park JS, Lee YJ, Yu T, Zhang SG, Jacobson JM. Protein-mediated error correction for de novo dna synthesis. Nucleic Acids Res. 2004; 32:e162). Депуринизация приводит к образованию участка, лишенного азотистого основания, что обычно не препятствует удлинению цепи. Критическое повреждение ДНК возникает во время конечного удаления защитных групп с нуклеотидного основания в основных условиях, что также расщепляет олигонуклеотидные цепи в участках, лишенных азотистых оснований. Без привязки к теории полагают, что депуринизация может нарушать целостность последовательности путем образования коротких усеченных последовательностей, которые обычно могут быть картированы на пуриновые нуклеотидные основания. Таким образом, синтез с высоким выходом олигонуклеотидов высокого качества обеспечивается путем контроля депуринизации в сочетании с высокоэффективными реакциями связывания и удаления 5′-гидроксильной защитной группы. Олигонуклеотиды высокого качества с высокими выходами связывания и низким уровнем депуринизации могут быть синтезированы без необходимости в экстенсивной очистке и/или PCR-амплификации для компенсации низкого выхода. Способы и композиции согласно изобретению в различных вариантах

осуществления обеспечивают условия для достижения таких высоких выходов связывания, низкой депуринизации и эффективного удаления защитных групп.

В различных вариантах осуществления способы и композиции согласно изобретению, описанные здесь, основаны на стандартной фосфорамидитной химии на функционализированном субстрате, например, силилированной пластине, необязательно с использованием подходящих модификаций, известных в данной области. Как правило, после осаждения мономера, например, мононуклеотида, динуклеотида или более длинного олигонуклеотида с подходящими модификациями для фосфорамидитной химии, одна или несколько следующих стадий могут быть выполнены по меньшей мере один раз для достижения ступенчатого синтеза in situ полимеров высокого качества: 1) связывание, 2) кэппирование, 3) окисление, 4) сульфирование, 5) деблокирование (детритилирование) и 6) промывка. Как правило, в качестве одной из стадий будет использовано окисление или сульфирование, но не то и другое. На фигуре 11 показан четырехступенчатый фосфорамидитный метод синтеза, включающий стадии связывания, кэппирования, окисления и деблокирования.

Элонгация растущего олигодезоксинуклеотида может быть достигнута путем последовательных добавлений фосфорамидитных строительных блоков, обычно посредством образования фосфотриэфирной межнуклеотидной связи. Во время стадии связывания раствор фосфорамидитных строительных блоков, например, фосфорамидита нуклеозида (или смесь нескольких фосфорамидитов), обычно при концентрации 0,02-0,2 М в ацетонитриле может быть активирован, например, раствором кислого азольного катализатора, 1H-тетразола, 2-этилтиотетразола (Sproat et al., 1995, "An efficient method for the isolation and purification of oligoribonucleotides". Nucleosides & Nucleotides 14 (1&2): 255–273), 2-бензилтиотетразола (Stutz et al., 2000, "Novel fluoride-labile nucleobase-protecting groups for the synthesis of 3'(2')-O-amino-acylated RNA sequences", Helv. Chim. Acta 83 (9): 2477–2503; Welz et al., 2002, "5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis", Tetrahedron Lett., 43 (5): 795–797), 4,5-дицианоимидазола (Vargeese et al., 1998, "Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis", Nucl. Acids Res., 26 (4): 1046–1050) или ряда аналогичных соединений, обычно при концентрации 0,2-0,7 М. Смешивание может быть достигнуто в линиях тока струйного устройства Inkjet при доставке компонентов в выбранные участки подходящего субстрата, описанного более подробно в других местах в настоящем документе. Фосфороамидитные строительные блоки, например такие, которые активированы, как описано выше, обычно обеспечивают в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80,

90, 100-кратном или более избытке над связанным с субстратом материалом, затем приводят в контакт с исходной твердой подложкой (первое связывание) или связанным с подложкой предшественником олигонуклеотида (после связываний). В 3'-5' синтезе 5'-гидроксильная группа предшественника может взаимодействовать с активированным фосфорамидитным фрагментом поступающего фосфороамидита нуклеозида с формированием фосфотриэфирной связи. Реакция также высокочувствительна к присутствию воды, особенно при использовании разбавленных растворов фосфорамидитов, и обычно проводится в безводном ацетонитриле. После завершения связывания любые несвязанные реагенты и побочные продукты могут быть удалены с помощью стадии промывки.

Продукт реакции связывания может быть обработан кэппирующим агентом, который может, например, этерифицировать неудачные последовательности и/или расщеплять фосфатные продукты реакции на гетероциклических основаниях. Стадия кэппирования может быть выполнена путем обработки связанного с твердой подложкой материала смесью уксусного ангидрида и 1-метилимидазола или DMAP в качестве катализаторов, и может служить двум целям: После завершения реакции связывания, фракция связанных с твердой подложкой 5'-OH групп (например, от 0,1 до 1%) может оставаться необработанной. Эти непрореагировавшие группы могут быть необратимо блокированы от дальнейшей элонгации цепи для предотвращения формирования олигонуклеотидов с делецией внутреннего основания, обычно называемых (n-1) shortmers. Непрореагировавшие 5'-гидроксильные группы могут быть ацетилированы кэппирующей смесью. Кроме того, фосфорамидиты, активированные 1H-тетразолом, взаимодействуют в незначительной степени с O6 положением гуанозина. Без привязки к теории полагают, что при окислении $I_2$/водой этот побочный продукт, возможно посредством миграции O6-N7, может подвергаться депуринизации. AP-сайты могут обрываться, отщепляясь в ходе конечного удаления защитных групп с олигонуклеотида, таким образом, уменьшая выход продукта полной длины. Модификации O6 могут быть удалены путем обработки кэппирующим реагентом до окисления $I_2$/водой.

Синтез фосфоротиоатов олигонуклеотидов (OPS; описанных более подробно в других местах в настоящем документе) обычно не включает окисление $I_2$/водой, и поэтому не вызывает возникновение побочной реакции, описанной выше. С другой стороны, кэппирующая смесь может препятствовать реакции переноса серы. Без привязки к теории полагают, что кэппирующая смесь может вызвать избыточное формирование фосфотриэфирных внутринуклеозидных связей вместо желательных PS триэфиров. Таким

образом, для синтеза OPS стадия сульфирования может быть выполнена до проведения любых стадий кэппирования.

Связанный с подложкой материал может быть обработан йодом и водой, обычно в присутствии слабого основания (например, приридин, лутидин или коллидин) для воздействия на окисление фосфотриэфира в тетракоординированный фосфотриэфир, защищенный предшественник природной фосфодиэфирной внутринуклеозидной связи. Окисление может быть выполнено в безводных условиях с использованием, например, трет-бутил-гидропероксида или (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил)-оксазиридина (CSO). Стадия окисления может быть заменена стадией сульфирования для получения фосфоротиоатов олигонуклеотидов.

Синтез фосфоротиоатов олигонуклеотидов (OPS) может быть осуществлен аналогично синтезу природных олигонуклеотидов с использованием способов и композиций согласно изобретению в различных вариантах осуществления. Вкратце, стадия окисления может быть заменена реакцией переноса серы (сульфирование) и после сульфирования могут быть выполнены любые стадии кэппирования. Много реагентов способно эффективно переносить серу, включая, но без ограничения, 3-(диметиламинометилиден)амино)-3H-1,2,4-дитиазол-3-тион, DDTT, 3H-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксид, также известный как Beaucage reagent, и N,N,N'N'-тетраэтилтиурамдисульфид (TETD).

Стадия деблокирования (или детритилирование) может служить для удаления блокирующих групп, таких как группа DMT, например, раствором кислоты, такой как 2% трихлоруксусная кислота (TCA) или 3% дихлоруксусная кислота (DCA), в инертном растворителе (дихлорметане или толуоле). Может быть выполнена стадия промывки. Связанный с твердой подложкой предшественник олигонуклеотида подвергается воздействию, чтобы нести свободную 5'-концевую гидроксильную группу. Проведение детритилирования в течение длительного периода времени или с помощью более сильных, чем рекомендуемые растворов кислот может привести к увеличенной депуризизации связанного с твердой подложкой олигонуклеотида и, таким образом, уменьшить выход желаемого продукта полной длины. Способы и композиции согласно изобретению, описанные здесь, обеспечивают контролируемые условия деблокирования, ограничивая нежелательные реакции депуризизации.

В некоторых вариантах осуществления может быть использован окисляющий раствор, содержащий около 0,02 M $I_2$ в THF/пиридин/H2O, или любые подходящие варианты, очевидные специалисту в данной области. Раствор детритилирования может представлять собой 3%-ный раствор дихлоруксусной кислоты (DCA) или 2%-ный раствор

трихлоруксусной кислоты (TCA) в толуоле или дихлорметане или любом другом подходящем инертном растворителе. Подходящие варианты раствора детритилирования будут очевидны для специалиста в данной области. Способы и композиции согласно изобретению обеспечивают замену раствора детритилирования без значительного испарения растворителя, предотвращая образование концентрированных областей подвергаемых депуринизации компонентов, например, DCA или TCA. Например, вытесняющий раствор может быть использован после раствора детритилирования. Насыщенность вытесняющего раствора можно регулировать для достижения процесса «первый поступил – первый выводится» (first in first out). Немного более насыщенный вытесняющий раствор может быть использован для достижения этого результата. Например, раствор детритилирования может быть вытеснен окисляющим раствором. Вытесняющий раствор содержит гасящий агент, такой как пиридин. В некоторых вариантах осущствления используются условия непрерывной жидкости до тех пор, пока деблокирующий раствор не будет по существу удален из локуса олигонуклеотидного синтеза на субстрате. Концентрация депуринизирующих компонентов может находиться под жестким контролем, например, их концентрация на локусах субстрата олигонуклеотидного синтеза может быть ограничена менее чем в 3, 2,5, 2, 1,5, 1,4, 1,3, 1,25, 1,2, 1,15, 1,1, 1,05, 1,04, 1,03, 1,02, 1,01, 1,005 раз или меньше по сравнению с исходной концентрацией.

Процесс вытеснения может быть оптимизирован для адекватного контроля содержания химических реагентов на локусе олигонуклеотидного синтеза в пределах приемлемого диапазона. Содержание может в целом относиться к сумме кинетических эффектов времени, концентрации и температуры на завершение предполагаемой реакции (детритилирования) и степени побочной реакции (депуринизации).

Кроме того, детритилирование, благодаря обратимости, может привести к синтезу серий олигомеров, лишенных одного или более правильных нуклеотидов. Двухстадийная химия, предложенная Sierzchala et al. (Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: A two-step cycle using peroxy anion deprotection. J. Am. Chem. Soc. 2003;125:13427–13441), может решить проблему депуринизации путем устранения использования кислотного снятия защиты 5'- или 3'-концов растущей цепи. В двухстадийном цикле синтеза используют водные перокси-анионы, забуференные в умеренных основных условиях, например, при pH около 9,6, для удаления арилоксикарбонильной группы, которая замещает DMT-группу, обычно используемую в четырехстадийном фосформидитном синтезе. Таким образом, перокси-анионный раствор или любая подходящая вариация с сильными нуклеофильными или умеренными окислительными свойствами обеспечивает

консолидацию стадий деблокирования и окисления в одну стадию. Кроме того, высокие циклические выходы обеспечивают устранение стадий кэппирования.

Удаление защитных групп и отщепление ДНК от субстрата может быть выполнено, как описано Cleary et al. (Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nature Methods. 2004;1:241–248), например, путем обработки $NH_4OH$, путем воздействия ультрафиолетового света на фоторасщепляемый линкер, путем направленного воздействия, например тепловой обработки, на АР-сайты, образованные путем обработки урацил-ДНК-гликозилазой введенных dU-остатков, или любым подходящим способом отщепления, известным в данной области. Олигонуклеотиды могут быть извлечены после отщепления путем лиофилизации.

Для фосфорамидитной химии поверхность локусов субстрата олигонуклеотидного синтеза может быть химически модифицирована для обеспечения надлежащих сайтов для связывания растущей нуклеотидной цепи с поверхностью. Существуют различные типы химии для модификации поверхности, которые обеспечивают прикрепление нуклеотида к поверхности субстрата. Модификации поверхности могут различаться по их выполнению в зависимости от того, подлежит ли отщеплению олигонуклеотидная цепь от поверхности одновременно с удалением защитных групп с оснований нуклеиновых кислот, или должна оставаться прикрепленной к поверхности после удаления защитных групп. Различные типы подходящей химии для модификации поверхности известны в данной области и описаны на веб-сайте www.glenresearch.com, который включен здесь полностью путем отсылки. Один метод модифицирования поверхности обеспечивает удаление защитных групп с экзоциклических атомов N оснований A, G и C, при этом олигонуклеотидная цепь остается прикрепленной к субстрату.

Другая схема включает взаимодействие триалкоксисилиламина (например, (CH3CH2O)3Si-(CH2)2-NH2) с группами SiOH на стеклянной или кремниевой поверхности с последующим взаимодействием янтарного ангидрида с амином с образованием амидной связи и свободной OH-группы, на которой может быть инициирован рост нуклеотидной цепи.

Третий тип линкерной группы может быть основан на фоторасщепляемых праймерах. Этот тип линкера обеспечивает удаление олигонуклеотида из субстрата (путем воздействия света, например света с длиной волны 350 нм) без расщепления защитных групп на азотистые функциональные группы на каждом основании. Типичная обработка амииаком или NH3 снимает защитные группы при использовании в качестве реагента для отщепления олигомеров от субстрата. Использование фоторасщепляемых линкеров этого типа описано на веб-сайте www.glenresearch.com. Различные другие подходящие

расщепляемые линкерные группы известны в данной области и могут быть альтернативно использованы.

Продолжительность окисления и детритилирования обычно составляют около 30 сек и 60 сек, соответственно. Реагенты могут быть слиты с последующими промывками ацетонитрилом (ACN). В контролируемых депуринизацией процессах детритилирования раствор для детритилирования может быть вытеснен с использованием непрерывного входящего потока окисляющего раствора без промежуточной стадии слива.

Точный контроль потока реагентов во время стадий синтеза in situ обеспечивает улучшенный выход, однородность и качество продуктов. Например, можно точно контролировать концентрацию кислоты и продолжительность детритилирования. Угол контакта с водой для субстрата, в частности, для областей синтеза in situ и/или окружающих участков может быть выбран для уменьшения депуринизации и/или скорости синтеза. Надлежащие желательные величины угла контакта с водой описаны в других местах в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления более низкие величины депуринизации могут быть достигнуты на поверхностях с более высокой поверхностной энергией, то есть более низким углом контакта.

Способы и композиции согласно изобретению обеспечивают уменьшенную скорость депуринизации во время олигонуклеотидного синтеза, например, менее чем 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002%, 0,0001% на цикл или меньше. Кроме того, способы и композиции согласно изобретению, описанному здесь, обеспечивают уменьшение или устранение градиента депуринизации по поверхности субстрата, способствуя синтезу in situ олигонуклеотидов. Таким образом, синтез олигонуклеотидов с высокой однородностью, высоким качеством и высоким выходом может быть достигнут на субстратах, которые могут содержать высокую плотность выделенных олигонуклеотидных локусов.

Синтез in situ олигонуклеотидов обычно начинают с твердой подложки, которая является относительно гидрофобной, и становится все более гидрофильной с помощью элементов для синтеза олигонуклеотидов, влияющих на ее поверхностную энергию. Элементы олигонуклеотидного синтеза могут приобрести значительную поверхностную энергию при увеличении длины олигонуклеотидов. В целом, эти участки или элементы, состоящие из защищенного олигонуклеотида, приобретают достаточную поверхностную энергию для того, чтобы спонтанно смачиваться органическими растворителями, обладающими высоким поверхностным натяжением, обычно используемыми в

фосфорамидитном синтезе, такими как ацетонитрил или пропиленкарбонат, после примерно 10-20 циклов синтеза. Способы и композиции согласно изобретению допускают изменение параметров, таких как время, скорость потока, температура, объем, вязкость или концентрация реагентов, во время синтеза растущего олигонуклеотида как функцию длины для учета изменения поверхностных свойств на локусе олигонуклеотидного синтеза. Такое изменение можно применять путем непрерывного изменения параметров с постоянными или различными приращениями при повторении циклов синтеза. Альтернативно, параметры могут быть изменены только на выбранных циклах синтеза и могут необязательно следовать рисунку, например, на каждом следующем цикле, каждом третьем, четвертом, пятом, шестом, седьмом, восьмом, девятом, десятом и т.д.

В различных вариантах осуществления в способах и композициях согласно изобретению предлагается библиотека олигонуклеотидов, синтезированных на субстрате, при этом библиотека содержит олигонуклеотиды различных размеров, как описано более подробно далее в других местах в настоящем документе. Кроме того, способы и композиции согласно изобретению обеспечивают синтез по существу сходных количеств олигонуклеотидов или в некоторых случаях различающихся предварительно выбранных количеств олигонуклеотидов различного размера, последовательности или нуклеотидной композиции на субстрате. Варьирование воличеств может ограничиваться до менее чем 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1% или менее между двумя синтезированными олигонуклеотидами или, альтернативно, в качестве относительной ошибки или процента отклонения по библиотеке. Способы и композиции согласно изобретению, описанному здесь, рассматривают синтезированные олигонуклеотиды на субстрате в желательных количествах, как описано более подробно в других местах в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способы и композиции согласно изобретению обеспечивают синтез библиотек олигонуклеотидов на субстратах, при этом стехиометрия каждого олигонуклеотида жестко контролируется и регулируется путем изменения относительного числа синтезируемых элементов. Подходящие функционализирования и покрытия поверхности для точного регулирования плотности растущих олигонуклеотидов на выделенных локусах субстратов описаны более подробно в других местах в настоящем документе и могут быть в равной мере применены ко всем микроструктурам субстрата или, альтернативно, могут быть применены при выбранных количествах и соотношениях к индивидуальным микроструктурам.

Способы синтеза in situ включают способы, описанные в патенте США 5449754 для синтеза массивов пептидов, а также в WO 98/41531 и ссылках, указанных в нем, для

синтеза полинуклеотидов (в частности, ДНК) с использованием фосфорамидитной или другой химии. Дополнительные патенты, описывающие протоколы синтеза in situ массивов нуклеиновых кислот и устройства, включают публикацию заявки на патент США 2013/0130321 и публикацию заявки на патент США 2013/0017977, и ссылки, размещенные в них, включенные здесь полностью в виде отсылки.

Такие способы синтеза in situ могут в основном рассматриваться как повторяющие последовательность осаждения капель: защищенного мономера на предварительно определенные участки на субстрате для связывания с подходящим образом активированной поверхностью субстрата (или с ранее осажденным мономером со снятой защитой); удаление защитных групп с осажденного мономера таким образом, чтобы он мог взаимодействовать с последовательно осажденным защищенным мономером; и осаждение другого защищенного мономера для связывания. Различные мономеры могут быть осаждены в различных областях на субстрате во время любого цикла таким образом, что различные области завершенной матрицы будут содержать различные биополимерные последовательности, желательные в завершенной матрице. Одна или несколько промежуточных дополнительных стадий может потребоваться при каждом повторении, таких как стадии окисления, сульфирования и/или промывки.

Различные способы, которые могут быть использованы для создания матрицы олигонуклеотидов на единичном субстрате, описаны в патентах США 5677195, 5384261 и PCT публикации WO 93/09668. В способах, раскрытых в этих заявках, реагенты доставляются в субстрат путем (1) затекания в канал, определенный на предварительно определенных областях, или (2) «точечного нанесение» на предварительно определенные области, или (3) использования фоторезиста. Однако могут быть использованы другие подходы, а также комбинации точечного нанесения и затекания. В каждом случае определенные активированные области субстрата являются механически отделенным от других областей, когда растворы мономеров доставляются в различные реакционные участки. Таким образом, синтез in situ олигонуклеотидов может быть достигнут путем применения различных подходящих способов синтеза, известных в данной области, для способов или композиций, описанных здесь. Один такой способ основан на фотолитографическом методе, который включает направление синтеза *in situ* олигонуклеотидов в выделенные предварительно определенные участки на твердой или полимерной поверхности с использованием фотолабильных защитных групп (Kumar et al., 2003). Гидроксильные группы могут быть образованы на поверхности и блокированы фотолабильными защитными группами. При воздействии на поверхность УФ-света, например, через фотолитографическую маску, на поверхности может быть образован

рисунок свободных гидроксильных групп. Эти гидроксильные группы могут вступать во взаимодействие с фотозащищенными фосфорамидитами нуклеозида в соответствии с фосфорамидитной химией. Вторая фотолитографическая маска может быть нанесена и поверхность может быть подвергнута воздействию УФ-света с образованием второго рисунка гидроксильных групп с последующим связыванием с 5'-фотозащищенным фосфорамидитом нуклеозида. Аналогично, рисунки могут быть созданы и олигомерные цепи могут быть удлинены. Некоторые фотобалильные защитные группы, которые могут быть удалены аккуратно и быстро из 5'-гидроксильынх функциональных групп, известны в данной области. Без привязки к теории полагают, что лабильность фоторасщепляемой группы зависит от длины волны и полярности используемого растворителя, и на скорость фоторасщепления может влиять продолжительность воздействия и интенсивность света. На этот способ может влиять ряд факторов, например, точность выравнивания масок, эффективность удаления фото-защитных групп и выходы стадии фосфорамидитного связывания. Кроме того, непредусмотренное просачивание света в соседние участки может быть сведено к минимууму. Плотность синтезированного олигомера на участок можно контролировать путем регулирования нагрузки лидерного нуклеозида на поверхность синтеза.

Следует понимать, что в способах и композициях согласно изобретению могут быть использованы различные подходящие технологии конструирования, которые хорошо известны в данной области, например, технологии Maskless Array Synthesizer (MAS), светонаправленные способы с использованием масок, методы с использованием проточных каналов, методы точечного нанесения и т.д. В некоторых вариантах осуществления синтез конструкции и/или отбор олигонуклеотидов осуществляют на твердой подложке с использованием технологии Maskless Array Synthesizer (MAS). Технология Maskless Array Synthesizer (MAS) описана, например, в заявке на патент PCT WO 99/42813 и в соответствующем патенте США 6375903. Известны другие примеры устройств, в которых не используется маска, с помощью которых можно изготовить микроматрицу ДНК согласно требованиям заказчика, в которой каждый из элементов в матрице содержит одноцепочечную молекулу ДНК желаемой последовательности. Другие способы синтеза конструкции и/или отбора олигонуклеотидов включают, например, светонаправленные методы с использованием масок, методы с использованием проточных каналов, методы точечного нанесения, методы с использованием игл («pin-based method») и методы с использованием множества подложек. Светонаправленные методы с использованием масок (например, методы VLSIPS™) для синтеза олигонуклеотидов описаны, например, в патентах США 5143854, 5510270 и 5527681. Эти способы

включают активацию предварительно определенных областей твердой подложки и последующее контактирование подложки с раствором предварительно выбранного мономера. Выбранные области могут быть активированы путем облучения светом через маску аналогично технологиям фотолитографии, используемым при изготовлении интегрированных схем. Другие области подложки остаются неактивными, так как освещение блокируется маской, и они остаются химически защищенными. Таким образом, световой рисунок определяет области взаимодействия подложки с заданным мономером. Путем повторного активирования различных наборов предварительно определенных областей и контактирования различных растворов мономеров с подложкой на подложке образуются различные матрицы полимеров. Дополнительно могут быть использованы другие стадии, такие как промывка, для удаления раствора непрореагировавших мономеров с подложки. Другие подходящие способы включают механические методы, такие как описано в патенте США 5384261. Дополнительные способы, подходящие для синтеза конструкции и/или отбора олигонуклеотидов на единичной подложке, описаны, например, в патенте США 5384261. Например, реагенты могут быть доставлены на подложку путем протекания по каналу, который определен в предварительно определенных областях или «точечно нанесен» на предварительно определенные области. Также, могут быть использованы другие подходы, а также комбинации точечного нанесения и протекания. В каждом случае определенные активированные области подложки являются механически отделенными от других областей при доставке растворов мономеров в различные активные центры. Методы с использованием проточных каналов включают, например, микрожидкостные системы для контроля синтеза олигонуклеотидов на твердой подложке. Например, различные полимерные последовательности могут быть синтезированы в выбранных областях твердой подложки путем формирования проточных каналов на поверхности или внутри поверхности подложки, через которые протекают подходящие реагенты или в которые помещены подходящие реагенты. Методы точечного нанесения для получения олигонуклеотидов на твердой подложке включают доставку реагентов в сравнительно малых количествах путем прямого их осаждения в выбранных областях или структурах, находящихся в жидкостном взаимодействии. В некоторых случаях раствор может быть нанесен путем распыления или иным способом на всю поверхность подложки. С помощью дозатора, который перемещается от области к области, можно осаждать по каплям точно отмеренные объемы растворов мономеров. Методы на основе игл для синтеза олигонуклеотидов на твердой подложке описаны, например, в патенте США 5288514. В методах на основе игл используется подложка, содержащая множество игл или

других удлинений. Иглы, каждая, вставляют одновременно в контейнеры с индивидуальным реагентом в поддоне.

В альтернативном подходе свето-направляемый синтез высокоплотных микромассивов может быть достигнут в 5'-3' направлении (Albert et al., 2003). Этот подход обеспечивает возможность проведения последующих реакций, таких как параллельное генотипирование или секвенирование, на поверхности синтеза, так как 3'-конец является доступным для ферментативных реакций, таких как реакции последовательность-специфического удлинения праймера и лигирования. Может быть использовано полное или по существу полное удаление защитных групп с фотозащищенных 5'-OH групп, снятие фотозащиты при содействии основания с NPPOC (2-(2-нитрофенил)пропоксикарбонил) (Beier et al., 2002).

библиотек длинных и высококачественных нуклеиновых кислот. синтетических нуклеиновых кислот с использованием синтеза in situ на субстратах различной геометрии, включая плоские или неровные поверхности. Различные материалы, подходящие для этих субстратов, например кремний, описаны здесь или известны из других источников в данной области. Субстрат может быть нагружен множеством различных последовательностей во время ситеза. Способы синтеза in situ на субстратах обеспечивают получение множества олигомеров различных и определенных последовательностей в адресных участках на общей подложке. Способы и композиции, описанные здесь, обеспечивают синтез in situ олигонуклеотидов, которые являются более длинными и имеют более высокое качество, как описано в других местах в настоящем документе. Стадии синтеза могут включать различные наборы исходных материалов, при этом для олигонуклеотидного синтеза обычно используют 4 основания A, G, T и C, а также подходящие модифицированные основания, известные в данной области, некоторые из которых описаны здесь, конструируя тем самым желаемые последовательности полимеров нуклеиновых кислот выделенным образом на подложке или субстрате.

Кроме того, изготовление и применение олигонуклеотидов высокой плотности на твердой подложке, например матрицах, описано, например, в публикациях PCT WO 97/10365, WO 92/10588, патенте США 6309822, поданном 23 декабря 1996 года; с серийным номером 6040138, поданном 15 сентября 1995 года; с серийным номером 08/168904, поданном 15 декабря 1993 года; с серийным номером 07/624114, поданном 6 декабря 1990 года, с серийным номером 07/362901, поданном 7 июня 1990 года, и в патенте США 5677195, все из которых включены путем отсылки для всех целей. В некоторых вариантах осуществления, в которых используются высокоплотные матрицы,

высокоплотные матрицы олигонуклеотидов синтезированы с использованием способов, таких Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis (VLSIPS), раскрытый в патентах США 5445934 и 6566495, оба из которых включены здесь для всех целей путем отсылки. Каждый олигонуклеотид занимает известное положение на субстрате.

Различные другие подходящие способы формирования высокоплотных матриц олигонуклеотидов, пептидов и других полимерных последовательностей с минимальным количеством стадий синтеза известны в данной области. Матрицы аналогов олигонуклеотидов могут быть синтезированы на твердом субстрате различными способами, включая, но без ограничения, свето-направленное химическое связывание и механически направленное связывание. Смотри Pirrung et al., патент США 5143854 (смотри также PCT публикацию WO 90/15070) и Fodor et al., PCT публикации WO 92/10092 и WO 93/09668, и заявка на патент США 07/980523, в которых раскрыты способы формирования больших массивов пептидов, олигонуклеотидов и других молекул с использованием, например, технологий свето-направляемого синтеза. Смотри, также Fodor et al., Science, 251, 767-77 (1991). Эти процедуры для синтеза полимерных матриц называются в настоящее время как процедуры VLSIPS. С использованием подхода VLSIPS одна гетерогенная матрица полимеров преобразуется посредством одновременного связывания во множестве активных центров в различные гетерогенные матрицы. Смотри заявки на патент США 07/796243 и 07/980523.

В случае, когда в процедуре VLSIPS используют олигонуклеотидный аналог с полиамидной основной цепью, использование фосфорамидитной химии для выполнения стадий синтеза часто является неприемлемым, так как мономеры не соединяются друг с другом посредством фосфатной связи. Вместо этого способы синтеза пептидов могут быть заменены, например, как описано Pirrung et al в патенте США 5143854, который включен здесь путем отсылки в полном объеме.

Индивидуальные молекулярные соединения (объекты) могут быть отделены друг от друга с помощью отдельных жидкостных компартментов, предназначенных для добавления исходных материалов для синтеза, как например в так называемом методе точечного нанесения или пьезоэлектрических технологиях, основанных на технологии струйной печати (A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996). Синтез олигонуклеотидов in situ на выделенных участках может быть достигнут путем пространственно-выделенной активации участков для синтеза, которая возможна посредством селективного освещения, посредством селективного или пространственно-выделенного генерирования реагентов

для активации (реагентов для снятия защиты) или посредством селективного добавления реагентов для активации (реагентов для удаления защитных групп).

Примерами способов, известных в настоящее время для синтеза in situ матриц, являются фотолитографический синтез, основанный на свете (McGall, G. et al.; J. Amer. Chem. Soc. 119; 5081-5090; 1997), синтез на основе светоизлучателя на основе света (PCT/EP99/06317), жидкостной синтез посредством физического разделения реакционных пространств (известный специалисту в данной области из работы Prof. E. Southern, Oxford, UK, и компании Oxford Gene Technologies, Oxford, UK), непрямой свето-контролируемый синтез на основе светоизлучателя с использованием активируемых светом фотокислот и подходящих реакционных камер или физически разделенных реакционных пространств в реакционной подложке, электронно индуцируемый синтез путем пространственно-выделенного снятия защиты на индивидуальных электродах на подложке с использованием выработки протонов, индуцированных электродами, и жидкостной синтез путем пространсвенно-выделенного осаждения активированных мономеров синтеза (известный из A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996).

Способы получения синтетических нуклеиновых кислот, в частности, двухцепочечных нуклеиновых кислот на типичной твердой подложке также известны из публикаций PCT WO 00/49142 и WO 2005/051970, которые включены здесь полностью в виде отсылки.

Получение in situ матриц нуклеиновых кислот может быть достигнуто в направлении 3′ - 5′, а также чаще в направлении 5' - 3'. Добавление реагентов может быть достигнуто путем импульсного струйного осаждения, например, подходящего нуклеотид-фосфорамидита и активатора в каждый выделенный локус на/внутри поверхности субстрата, например, покрытую кремнием поверхность пластины. Выделенные локусы субстрата могут быть затем подвергнуты воздействию дополнительных реагентов на других стадиях фосфорамидитного цикла (удаление защитных групп с 5′-гидроксильной группы, окисление, сульфирование и/или сульфировани), которые могут проводиться параллельно. Стадии осаждения и типичного фосфорамидитного цикла могут быть выполнены без перемещения пластины олигнуклеотидного синтеза. Например, реагенты могут пропускаться над выделенными локусами в пределах субстрата, путем их протекания сквозь субстрат с одной поверхности на противоположную поверхность субстрата. Альтернативно, субстрат может перемещаться, например, к проточной ячейке, для некоторых стадий фосфорамидитного цикла. Субстрат затем может быть заново

установлен, заново зарегистрирован и/или заново выровнен перед печатью следующего слоя мономеров.

Субстраты с олигонуклеотидами могут быть изготовлены с использованием капельного осаждения из импульсного устройства звеньев предшественника полинуклеотида (таких как мономеры) в случае изготовления in situ, или ранее синтезированного полинуклеотида. Такие способы описаны подробно, например, в публикации патента США 2013/0130321 и публикации патента США 2013/0017977, и размещенных в них ссылках, включенных здесь полностью в виде отсылки. Эти ссылки включены здесь путем отсылки. Другие способы капельного осаждения могут быть использованы для изготовления, как описано в других местах в настоящем документе. Также, вместо способов капельного осаждения могут быть использованы методы свето-направленного изготовления, известные в данной области. Наличие участков между элементами является необязательным, особенно при изготовлении матриц в соответствии с протоколами метода свето-направленного синтеза.

Множество известных устройств может быть приспособлено для изготовления in situ, при этом иллюстративные импульсно-струйные устройства включают, но без ограничения, такие устройства, которые описаны в публикации патента США US2010/0256017, публикации патента США US20120050411, и патенте США 6446682, которые включены здесь полностью в виде отсылки.

В различных вариантах осуществления биополимерные матрицы на поверхности или внутри субстратов могут быть изготовлены с использованием осаждения ранее полученных биополимеров или методов синтеза in situ. Методы осаждения обычно включают осаждение биополимеров в предварительно определенные участки на поверхности или в субстрате, которые подходящим образом активируют для связывания с биополимерами. Биополимеры различных последовательностей можно осаждать в различных областях на поверхности или внутри субстрата. Типичные процедуры известные в данной области для осаждения ранее полученных полинуклеотидов, в частности ДНК, таких как целые олигомеры или кДНК, включают, но без ограничения, загрузку полинуклеотида в капельный дозатор в форме импульсно-струйной головки и нанесения на субстрат. Такая технология описана в WO 95/25116 и WO 98/41531, которые включены здесь полностью в виде отсылки. Различные подходящие формы струйных устройств для капельного осаждения на выделенные участки субстрата известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к использованию предварительно синтезированных олигонуклеотидов в пределах всей библиотеки

олигонуклеотидов или ее частей, например, олигонуклеотидной библиотеки, иммобилизованной на поверхности. Субстраты, имеющие высокую плотность матриц нуклеиновых кислот, могут быть изготовлены путем осаждения предварительно синтезированных или природных нуклеиновых кислот в предварительно определенные положения на поверхности, внутри или сквозь субстрат. Синтезированные или природные нуклеиновые кислоты могут быть осаждены на определенные участки субстрата путем свето-направленного нацеливания, олигонуклеотид-направленного нацеливания или любым другим подходящим способом, известным в данной области. Нуклеиновые кислоты накже могут быть направлены в специфические участки. Может быть использован дозатор, который перемещается от области к области для осаждения нуклеиновых кислот в определенных точках. Дозатор может осаждать нуклеиновую кислоту посредством микроканалов, ведущих в отобранные области. Типичные дозаторы включают микропипетку или капиллярную иглу для доставки нуклеиновой кислоты в субстрат и автоматичекую систему контроля положения микропипетки относительно субстрата. В других вариантах осуществления дозатор включает серии трубок, манифольд, набор пипеток или капиллярных игл или тому подобное, для одновременной доставки различных реагентов в реакционные области.

Прикрепление предварительно синтезированных олигонуклеотидных и/или полинуклеотидных последовательностей к подложке и их синтез in situ с использованием свето-направленных методов, проточного канала и точечного нанесения, методы струйного распыления, методы на основе игл и методы на основе частиц дополнительно представлены в следующих ссылках: McGall et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 13555; Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering, Vol. 20: 111, Plenum Press (1998); Duggan et al. (1999) Nat. Genet. S21 : 10 ; Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, 2003; заявки на патент США 2003/0068633 и 2002/0081582; патенты США 6833450, 6830890, 6824866, 6800439, 6375903 и 5700637; и PCT публикации WO 04/031399, WO 04/031351, WO 04/029586, WO 03/100012, WO 03/066212, WO 03/065038, WO 03/064699, WO 03/064027, WO 03/064026, WO 03/046223, WO 03/040410 и WO 02/24597; которые включены здесь полностью в виде отсылки для всех целей. В некоторых вариантах осуществления предварительно синтезированные олигонуклеотиды прикреплены к подложке или синтезирвоаны с использованием метода точечного нанесения, при котором растворы мономеров осаждают по каплям с помощью дозатора, который перемещается от области к области (например, струйное устройство). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды точечно

наносят на подложку с использованием, например, активированного механического волной дозатора.

Системы, описанные здесь, могут дополнительно включать элемент для обеспечения капли в первом участке (или элементе), содержащем множество связанных с подложкой олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления капля может включать одну или несколько композиций, содержащих нуклеотиды олигонуклеотиды (также называемые здесь как конструкты нуклеотидного добавления), содержащие подлежащий добавлению специфический или предварительно определенный нуклеотид и/или реагенты, которые обеспечивают проведение одного или нескольких из процессов гибридизации, денатурации, удлинения цепи, лигирования и разложения. В некоторых вариантах осуществления различные композиции или различные конструкты нуклеотидного добавления можно осаждать в различных участках на подложке во время любой стадии, чтобы создать матрицу предварительно определенных олигонуклеотидных последовательностей (различные элементы подложки, имеющие различные предварительно определенные олигонуклеотидные последовательности). Один особенно подходящий способ осаждения композиций состоит в осаждении одной или нескольких капель, при этом каждая капля содержит требуемый реагент (например, конструкт нуклеотидного добавления) из импульсного-струйного устройства, расположенного на расстоянии от поверхности подложки, на поверхность подложки или элементов, встроенных в поверхность подложки.

Для того, чтобы автоматизировать химический способ синтеза полимеров из субъединиц, часто используют твердые фазы, на которых заякорена растущая молекулярная цепь. После завершения синтеза ее можно отщепить путем разрушения подходящего линкера между фактическим полимером и твердой фазой. Для автоматизации в способе можно использовать непосредственно поверхность субстрата или в способе можно использовать поверхность твердых фаз субстрата в форме активированных частиц, которые упакованы в колонку или микроканал в субстрате, например, стекле с контролируемым размером пор (CPG). Поверхность субстрата иногда может содержать один специфически удаляемый тип олигонуклеотида с предварительно определенной последовательностью. Затем контролируемым образом могут быть добавлены индивидуальные реагенты для синтеза. Количество синтезированных молекул можно контролировать с помощью различных показателей, включая, но без ограничения, размер целевой поверхности субстрата, количество материала подложки, размер партий, используемых для реакций, доступную функционализированную площадь субстрата для

синтеза, степень функционализирования или продолжительности реакций, используемых для синтеза.

Таким образом, различные варианты осуществления изобретения относятся к изготовлению и использованию субстратов, содержащих библиотеку композиций, обычно олигонуклеотидов. Субстрат с выделенными элементами является «доступным», когда он содержит множество областей различных фрагментов (например, различных полинуклеотидных последовательностей), при этом область (то есть «элемент» или «участок» поверхности) в конкретном предварительно определенном положении (то есть «адресе») на субстрате будет обнаруживать конкретную мишень или класс мишеней (хотя элемент может случайно обнаруживать не мишени этого положения). Элементы субстрата обычно, но необязательно, отделены друг от друга промежуточным пространством. В некоторых случаях элементы могут быть встроены в субстрат и могут создавать одно-, двух- или трехмерные микрожидкостные геометрии. Под «топологией субстрата» понимается одна или более характеристик элементов, таких как расположение элементов на субстрате, один или несколько размеров элементов и указание фрагмента в заданном положении.

**Синтез других молекул**

Способы и композиции согласно изобретению могут быть использованы для синтеза других типов представляющих интерес молекул. Синтез пептидов в выбранных областях сетки является одним таким случаем. Различные подходящие химии, используемые в методе ступенчатого наращивания пептидов на поверхности матрицы, являются известными в данной области. Методы синтеза пептидов, описанные в патенте США 5449743, включенном здесь полностью в виде отсылки, могут быть использованы в настоящем изобретении. Способы и композиции согласно описанному здесь изобретению также можно применять в химическом синтезе лекарственных средств, белковых ингибиторов или любом химическом синтезе, в котором желателен быстрый синтез множества соединений.

**Сборка генов**

В различных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к получению полинуклеотидной последовательности (также называемой «ген») путем сборки перекрывающихся более коротких олигонуклеотидов, синтезированных или точечно нанесенных на поверхности субстратов, или в альтернативном случае субстратов, которые содержат поверхности, подходящие для синтеза или точечного нанесения олигонуклеотидов, например частицы. Более короткие олигонуклеотиды могут быть соединены вместе на одной и той же цепи путем отжига олигонуклеотидов с

комплементарными областями с последующими собранными олигонуклеотидами, например, с использованием полимеразы, лишенной активности по замене цепи, лигазы, химии «Click» или любого другого подходящего способа сборки, известного в данной области. В этом отношении последовательность подвергаемого отжигу нуклеотида может быть реплицирована между последовательными олигонуклеотидами противоположной цепи. В некоторых случаях последовательные олигонуклеотиды этой же цепи могут быть соединены вместе без введения элементов последовательности из подвергаемого отжигу олигонуклеотида, например, с использованием лигазы, химии «Click» или любой другой известной в данной области подходящей химии для сборки. В некоторых случаях более длинные полинуклеотиды могут быть синтезирвоаны иерархически посредством циклов сборки более коротких полинуклеотидов/олигонуклеотидов.

Гены или геномы могут быть синтезированы de novo из олигонуклеотидов путем сборки крупных полинуклеотидов, как описано в синтезе вирусного генома (7,5 kb; Cello et al, Science, 2002, 297, 1016), генома бактериофага (5,4 kb; Smith et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 15440) и кластера гена не более 32 kb (Kodumal et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, 15573), все из которых включены здесь полность в виде отсылки. Библиотеки длинной синтетической последовательности ДНК могут быть получены в соответствии со способами сборки генома бактерии 582 kb (Mycoplasma genitalium), описанными в работе Venter и соавторами (Gibson et al, Science, 2008, 319, 1215), которая включена здесь полностью в виде отсылки. Кроме того, крупные биомолекулы ДНК могут быть сконструированы с помощью олигонуклеотидов, как описано для нуклеиновой кислоты 15 kb (работа Tian et al, Nature, 2004, 432, 1050; которая включена здесь полностью в виде ссылки). В способах и композициях согласно изобретению описаны крупные библиотеки синтезированных de novo полинуклеотидных последовательностей с использованием способов сборки генов, описанных здесь или известных в данной области. Синтез таких последовательностей обычно выполняют параллельно при высоких плотностях на подходящих областях субстратов, которые описаны более подробно в других местах в настоящем документе. Кроме того, эти крупные библиотеки могут быть синтезированы с очень низкой частотой ошибок, как описано более подробно в других местах в настоящем документе.

Гены могут быть собраны из большого числа синтезированных олигонуклеотидов, которые объединены в пул. Например, может быть применен синтез генов с использованием пула из 600 различных олигонуклеотидов, как описано в работе Tian et al. (Tian et al. Nature, 432:1050, 2004). Длина собранных генов может быть дополнительно увеличена путем использования более длинных олигонуклеотидов. Даже для более

крупных генов и фрагментов ДНК, например крупнее, чем около 0,5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 kb или больше, можно применять более одного цикла синтеза в пределах иерархического процесса сборки генов. Описанную здесь сборку методом PCR и синтез из олигонуклеотидов можно адаптировать для последовательного применения, как описано ниже.

Разнообразные способы сборки генов можно использовать в соответствии со способами и композициями согласно изобретению, например, лигазную цепную реакцию (LCR) (Chalmers and Curnow, Biotechniques, 30(2), 249-52, 2001; Wosnick et al, Gene, 60(1), 115-27, 1987) для серий PCR-стратегий (Stemmer et al, 164, Gene, 49-53, 1995; Prodromou and L. H. Pearl, 5(8), Protein Engineering, 827-9, 1992; Sandhu et al, 12(1), BioTechniques, 14-6, 1992; Young and Dong, Nucleic Acids Research, 32(7), e59, 2004; Gao et al, Nucleic Acids Res., 31, e143, 2003; Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32(12), e98, 2004) (фигура 11). Несмотря на то, что большинство протоколов сборки начинается с пулов перекрывающихся синтезированных олигонуклеотидов и заканчивается амплификацией методом PCR собранного гена, путь между этими двумя точками может различаться. В случае LCR начальная популяция олигонуклеотидов имеет фосфорилированные 5′-концы, которые позволяют лигазе, например Pfu ДНК-лигазе, ковалентно соединять вместе эти «строительные блоки» с формированием исходной матрицы. Однако в PCR-сборка обычно используются нефосфорилированные олигонуклеотиды, которые подвергаются повторным циклам PCR для удлинения и создания матрицы полной длины. Кроме того, в процессах LCR могут потребоваться концентрации олигонуклеотидов в диапазоне мкМ, тогда как в одноцепочечных и двухцепочечных условиях PCR требования к концентрации являются значительно более низкими (например, диапазон нМ).

В публикациях, касающихся синтеза, используют олигонуклеотиды размером в диапазоне 20-70 bp, со сборкой посредством гибридизации перекрывающихся последовательностей (6-40 bp). Поскольку многие факторы определяются длиной и композицией олигонуклеотидов (Tm, вторичная структура, и т.д.), размер и гетерогенность этой популяции может значительно влиять на эффективность сборки и качество собранных генов. Процентное содержание правильного конечного ДНК-продукта зависит от качества и количества «строительных блоков» олигонуклеотидов. Более короткие олигонуклеотиды имеют более низкое число мутаций по сравнениюс более длинными олигонуклеотидами, но для построения ДНК-продукта требуется большое количество олигонуклеотидов. Кроме того, уменьшение перекрытий более коротких олигонуклеотидов приводит к более низкому значению $T_m$ реакции отжига, что способствует неспецифическому отжигу и уменьшает эффективность процесса сборки.

Способы и композиции изобретения решают эту проблему путем доставки длинных олигонуклеотидов с низкой частотой ошибок.

Изменяющееся во времени температурное поле относится к регулируемому по времени нагреву микрожидкостного устройства для обеспечения возникновения PCR-амплификации или PCA реакций. Изменяющееся во времени температурное поле может прилагаться снаружи, например, путем помещения субстрата с реакторами, например нанореакторами, на верхнюю часть нагревательного блока, или может быть интегрировано в микрожидкостное устройство, например, в виде тонкопленочного нагревателя, расположенного непосредственно под камерами PCA и PCR. Терморегулятор может изменять температуру нагревательного элемента в сочетании с температурным датчиком, связанным с нагревательным элементом, или интегрированным в реакционную камеру. Таймер может изменять продолжительность нагрева реакционных камер.

Температура температурного поля может изменяться в соответствии со стадиями денатурации, отжига и удлинения PCR- или PCA-реакций. Как правило, нуклеиновые кислоты денатурируют при температуре около 95 °C в течение 2 мин с последующими 30 или более циклами денатурации при 95 °C в течение 30 сек, отжига при 40-60 °C в течение 30 сек и удлинения при около 72 °C в течение 30 сек, и последнего удлинения при 72 °C в течение 10 мин. Используемые продолжительность и температуры могут изменяться в зависимости от композиции олигонуклеотидов, PCR праймеров, размера амплифицированного продукта, матрицы и используемых реагентов, например, полимеразы.

Полимеразы представляют собой ферменты, которые включают трифосфаты нуклеозидов или трифосфаты дезоксинуклеозидов, для удлинения 3′ гидроксильного конца праймера для PCR, олигонуклеотида или фрагмента ДНК. Общее описание полимераз содержится, например, в работе Watson, J. D. et al, (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. Подходящие полимеразы включают, но без ограничения, KOD-полимеразу; Pfu-полимеразу; Taq-полимеразу; E. coli ДНК-полимеразу-I, фрагмент Кленова, T7-полимеразу, T4-полимеразу, T5-полимеразу и обратную транскриптазу, которые известны в данной области. Полимераза, обладающая корректорной способностью, такая как Pfu и Pyrobest, может быть использована для репликации ДНК с высокой достоверностью. ДНК-полимераза Pfu обладает 3′-5′-экзонуклеазной корректорной активностью, таким образом, она может исправлять ошибки встраивания нуклеотида. В различных вариантах осуществления изобретения фрагменты нуклеиновой кислоты соединены вместе предпочтительно путем реакции специфической гибридизации между перекрывающимися областями взаимно комплементарных сегментов

фрагментов нуклеиновых кислот с получением тем самым более длинных синтетических двухцепочечных нуклеиновых кислот. Индивидуальные сегменты последовательностей, используемые для построения более длинных нуклеиновых кислот, могут иметь длину, например, 20-200, 50-300, 75-350 или 100-400 нуклеотидных строительных блоков. Специалистам в данной области будет понятно, что длина сегментов последовательности может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, 20-350 или 200-350).

Сегменты последовательности предпочтительно выбраны таким образом, что они по меньшей мере частично перекрываются с сегментом последовательности антисмысловой цепи комплементарной нуклеиновой кислоты, которая подлежит синтезу, таким образом, что цепь нуклеиновой кислоты, подлежащая синтезу, может быть построена путем гибридизации индивидуальных сегментов последовательности. В альтернативном варианте осуществления сегменты последовательности предпочтительно выбраны таким образом, чтобы сегменты последовательности на обеих цепях нуклеиновой кислоты, подлежащей синтезу, полностью перекрывались и, таким образом, в этом случае для получения более или менее полной двойной цепи требуется лишь ковалентная связь фосфодиэфирного остова. Длина комплементарных областей или перекрытий между индивидуальными фрагментами может составлять, например, 10-50, 10-100, 12-25, 20-80, 15-20, или 15-25 нуклеотидных строительных блоков. Специалистам в данной области будет понятно, что длина сегментов последовательности может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, 25-100 или 10-25). Если перекрывающаяся или комплементарная область между двумя фрагментами нуклеиновой кислоты имеют высокое содержание AT, например, содержание AT больше, чем 50%, 60%, 65% или выше, то константа связывания является более низкой по сравнению с GC-богатыми последовательностями. Таким образом, с термодинамической точки зрения гибридизация между этими фрагментами может иметь сравнительно низкую эффективность. Это может влиять на сборку 2 или более фрагментов. Возможным зависимым от последовательности следствием является уменьшенный выход двухцепочечных нуклеиновых кислот с правильной целевой последовательностью. Таким образом, сегменты последовательности для сборки генов могут быть разработаны с желательными уровнями содержания GC в перекрывающихся областях, например, содержанием GC более чем 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65% или выше. Более подробное описание иллюстративных способов сборки генов содержится в патенте США 8367335, который включен здесь полностью в виде отсылки.

В различных вариантах осуществления стратегии на основе полимеразной цепной реакции (PCR) и не на основе полимеразной циклической сборки (PCA) могут быть использованы для химического синтеза генов. Кроме того, не основанный на PCA химический синтез генов с использованием различных стратегий и способов, включая ферментативный синтез генов, отжиг и реакцию лигирования, одновременный синтез двух генов посредством гибридного гена, лигирование по принципу «выстрела из дробового ружья» и колигирование, синтез методом генной вставки, синтез генов посредством одной цепи ДНК, матрично-направленное лигирование, лигазную цепную реакцию, синтез генов с помощью микрочипов, технологию твердой подложки Blue Heron, технологию строительных блоков Sloning, РНК-опосредованную сборку генов, термодинамически сбалансированную обратную PCR (PCR-based thermodynamically balanced inside-out, TBIO) (Gao et al., 2003), двуступенчатый полный генный синтез, объединенный с двойной асимметричной PCR и PCR с удлинением перекрывающихся фрагментов (DA- PCR) (Sandhu et al., 1992), PCR с перекрывающимися праймерами (Young and Dong, 2004), двуступенчатый синтез ДНК на основе PCR (PTDS) (Xiong et al., 2004b), метод последовательной PCR (Xiong et al., 2005, 2006a), или любые другие подходящие способы, известные в данной области, можно использовать в сочетании со способами и композициями, описанными здесь, для сборки более длинных полинуклеотидов из более коротких олигонуклеотидов.

Последовательности ДНК, которые были химически синтезированы с использованием способов и композиций согласно изобретению, могут быть удлинены до длинных полинуклеотидных последовательностей, например, полинуклеотидных последовательностей длиной более чем 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 7500, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 75000, 100000 пар оснований или больше. Способы и композиции согласно изобретению также обеспечивают химически синтезированные полинуклеотидные последовательности с очень низкой частотой ошибок, как описано далее в других местах в настоящем документе.

В различных вариантах осуществления для химического синтеза полинуклеотидов используют вариации опосредованных полимеразой технологий сборки, совместно называемых конструированием и амплификацией с помощью полимеразы. Некоторые из обычно используемых технологий, известных в области синтеза генов согласно требованиям заказчика, основаны на полимеразной циклической сборке и обеспечивают синтез de novo более длинных полинуклеотидов посредством сборки пула олигонуклеотидов. Пул олигонуклеотидов может быть синтезирован в виде строительных блоков, предназначенных для использования в различных технологиях синтеза генов.

Последовательность, длина и конкретное распределение олигонуклеотидов, а также любые перекрытия последовательностей в пределах пула могут быть разработаны в соответствии с желаемой полинуклеотидной последовательность и используемым методом сборки. Желаемая ДНК полной длины может быть получена, например, с помощью нескольких стадий PCR с необходимыми температурными условиями для денатурации, отжига и элонгации перекрывающихся олигонуклеотидов.

**Сборка PCR (PCA)**

В PCR-сборке используется опосредованное полимеразой удлинение цепи в сочетании по меньшей мере с двумя олигонуклеотидами, имеющими комплементарные концы, которые можно подвергнуть отжигу таким образом, что по меньшей мере один из полинуклеотидов будет иметь свободный 3′-гидроксил, способный удлинять полинуклеотидную цепь с помощью полимеразы (например, термоустойчивой полимеразы, такой как Taq-полимераза, VENT™ полимераза (New England Biolabs), KOD (Novagen) и подобные). Перекрывающиеся олигонуклеотиды могут быть смешаны в стандартной PCR-реакции, содержащей containing dNTP, полимеразу и буфер. Перекрывающиеся концы олигонуклеотидов при отжиге образуют области последовательностей двухцепочечных нуклеиновх кислот, которые служат в качестве праймеров для элонгации полимеразой в PCR-реакции. Продукты реакции элонгации служат в качестве субстратов для формирования более длинных последовательностей двухцепочечных нуклеиновых кислот, что в конечном итоге приводит к синтезу целевой последовательности полной длины. Условия PCR могут быть оптимизированы для увеличения выхода целевой длинной ДНК-последовательности.

Различные методы на основе PCR могут быть использованы для синтеза генов из олигонуклеотидов. Эти методы включают, но без ограничения, термодинамически сбалансированный метод (TBIO) (Gao et al, Nucleic Acids Research, 31:e143, 2003), метод последовательной PCR (Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004), дуальной ассимметричной PCR (DA-PCR) (Sandhu et al, Biotechniques, 12:14, 1992), PCR с перекрывающимися расширениями (OE-PCR) (Young and Dong, Nucleic Acids Research, 32:e59, 2004; Prodromou and Pearl, Protein Eng., 5:827, 1992) и PCR на основе двуступенчатого синтеза ДНК (PTDS) (Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004), все из которых включены здесь путем отсылки в полном объеме и могут быть адаптированы для сборки PCR-матрицы в микрожидкостном устройстве.

Метод DA-PCR представляет собой одноступенчатый процесс конструирования синтетических генов. В одном примере четыре соседних олигонуклеотидов, например, длиной 17-100 оснований с перекрытиями, например, 15-17 оснований использовали в

качестве праймеров в PCR-реакции. Другие подходящие размеры олигонуклеотидов и перекрытий находятся в объеме изобретения, как описано здесь далее. Количество двух внутренних праймеров является высоко ограниченным и конечная реакция вызывает асимметриную одноцепочечную амплификацию двух половин тотальной последовательности вследствие избытка двух фланкирующих праймеров. В последующих циклах PCR эти дуальные асимметрически амплифицированные фрагменты, которые перекрываются друг с другом, обеспечивают получение двухцепочечного продукта полной длины.

Синтез методом TBIO требует только праймеры смысловой цепи для амино-концевой половины и только праймеры антисмысловой цепи для карбокси-концевой половины последовательности гена. Кроме того, праймеры TBIO могут содержать идентичные области оптимизированных по температуре перекрытий праймеров. Метод TBIO включает комплементацию между следующей парой внешних праймеров с концевым полностью синтезированным внутренним фрагментом. Двунаправленная элонгация TBIO завершается для заданной пары внешних праймеров до начала следующего цикла двунаправленной элонгации.

Последовательная PCR (successive PCR) представляет собой одноступенчатую процедуру проведения PCR, в которой половина смысловых праймеров соответствуют одной половине матрицы, подлежащей сборке, и антисмысловые праймеры соответствуют второй половине матрицы, подлежащей сборке. При данном подходе двунаправленная амплификация с парой внешних праймеров не будет происходить до тех пор, пока не завершится амплификация с использованием пары внутренних праймеров.

Как правило, PDTS включает две стадии. Сначала синтезируют индивидуальные фрагменты представляющей интерес ДНК: В некоторых вариантах осуществления 10-12 олигонуклеотидов, таких как олигонуклеотиды длиной около 60, 80, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 или более нуклеотидов с перекрытием около 20 bp, смешивают и реакцию PCR проводят с полимеразой, такой как ДНК-полимераза pfu, с получением более длинных фрагментов ДНК. И во-вторых, синтезируют всю последовательность представляющей интерес ДНК: 5-10 продуктов PCR из первой стадии объединяют и используют в качестве матрицы для второй реакции PCR с полимеразой, такой как ДНК-полимераза Pyrobest с двумя наиболее удаленными олигонуклеотидами в качестве праймеров.

Хотя PCR-сборка с использованием коротких олигонуклеотидов хорошо работает для сравнительно коротких нуклеиновых кислот, существует ограничение по максимальному количеству олигонуклеотидов, которые могут быть собраны в пределах

одной реакции. Это может накладывать на двухцепочечный ДНК-продукт ограничение по размеру. Решением этой проблемы является последовательное получение ДНК. По этой схеме множество ДНК-сегментов меньшего размера синтезируют параллельно в отдельных камерах, во множестве чипов или сериями и затем вводят вместе в качестве предшественников для PCA-реакции для сборки в "более крупный» фрагмент ДНК для последующей PCR-амплификации. Другими словами, сборка методом PCR с использованием олигонуклеотидов будет приводить к получению матрицы (матрицы первой серии) для PCR-амплификации. Множество матриц первой серии, полученных таким образом, может служить в качестве предшественников для PCA-сборки фрагментов ДНК более крупного размера, чем матрицы первой серии, получая, таким образом, матрицы второй серии. В свою очередь, матрицы второй серии могут служить в качестве предшественников для сборки матриц третьей серии и т.д. Подход можно повторять до получения желаемой ДНК.

Олигонуклеотиды, используемые в реакциях синтеза, обычно представляют собой одноцепочечные молекулы для сборки нуклеиновых кислот большей длины, чем сами олигонуклеотиды. Олигонуклеотид может состоять, например, из 20-200, 50-300, 75-350 или 100-400 нуклеотидных строительных блоков. Специалистам в данной области будет понятно, что длина сегмента последовательности может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, 20-350 или 200-350). Камера PCA, содержащая множество олигонуклеотидов, относится к пулу олигонуклеотидов, необходимых для получения матрицы, соответствующей гену или фрагменту ДНК. Когда реакции и устройства для синтеза используются последовательно, камера PCA в последующих сериях реакций будет содержать пул фрагментов ДНК вместо исходных олигонуклеотидов для сборки в матрицы для PCR. На фигуре 12 показана полимеразная циклическая сборка более длинных конструктов из пула перекрывающихся олигонуклеотидов в постепенно более длинные конструкты посредством множества циклов реакции.

Должно быть понятно, что более длинные олигонуклеотиды, описанные здесь, можно успешно использовать в различных методах сборки генов для того, чтобы избежать ошибок сборки и повысить качество синтезированных генов (фигура 13). Гомологичные повторы или области с высоким содержанием GC в последовательности, подлежащей сборке, могут вводить ошибки, связанные с правильным порядком и гибридизацией олигонуклеотидов меньшего размера. Более длинные олигонуклеотиды могут преодолевать эти проблемы путем уменьшения количества олигонуклеотидов, подлежащих упорядочению и выравниванию, путем избежания проблемных

последовательностей, таких как гомологичные повторы или области с высоким содержанием GC из сайтов выравнивания, и/или путем уменьшения количества циклов сборки, требуемых для сборки желаемого гена.

Более крупные гены могут быть синтезированы путем иерархического комбинирования способов сборки генов, как показано на фигуре 14. Таким образом, ряд генов промежуточной длины, например, около 2 kb, может быть собрано с использованием первого метода сборки генов, такого как PCA. Второй метод сборки генов, например, Gibson Assembly (Gibson et al, Science, 2008, 319, 1215), может быть использован для объединения генов промежуточной длины в более крупные гены, например, примерно от 5 до 10 kb. Иерархическая сборка может применяться постадийно. Рекомбинантные технологии in vitro могут быть использованы для сборки кассет генов промежуточной длины в значительно более длинные последовательности, например, более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 kb или более.

Олигонуклеотиды, полезные для сборки генов de novo, могут быть синтезированы на одной или нескольких твердых подложках. Иллюстративные твердые подложки включают, например, покровные стекла, шарики, чипы, частицы, нити, гели, листы, трубки, сферы, контейнеры, капилляры, коврики, пластины, пленки, листы, полимеры или микрожидкостное устройство. Кроме того, твердые подложки могут быть биологическими, небиологическими, органическими, неорганическими или их комбинацией. Подложки, которые являются по существу планарными, могут быть физически разделены на области, например, с помощью канавок, бороздок, лунок или химических барьеров (например, гидрофобных покрытий, и т.п.). Подложки также могут содержать физически разделенные области, встроенные в поверхность, необязательно проходящие по всей ширине поверхности. Подходящие подложки для улучшенного олигонуклеотидного синтеза описаны здесь далее.

В одном аспекте олигонуклеотиды могут быть обеспечены на твердой подложке для использования в микрожидкостном устройстве, например, как часть камеры PCA-реакции. Альтернативно, олигонуклеотиды могут быть синтезированы и затем введены в микрожидкостное устройство.

Как правило, полная последовательность генов разбивается на (N) олигонуклеотидов вариабельной или фиксированной длины по мере необходимости. Может быть выбрана подходящая длина олигонуклеотдов, например, 20-200, 50-300, 75-350 или 100-400 нуклеотидных строительных блоков. Специалистам в данной области будет понятно, что длина сегмента последовательности может находиться в пределах

любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, 20-350 или 200-350). Длина перекрытия между суб-последовательностями составляет примерно или менее чем примерно N/2, но может быть выбрана в завивимости от требований реакции сборки, например, перекрытие длиной 6-40 bp, 10-20 bp и 20-30 bp. Специалистам в данной области будет понятно, что длина сегмента последовательности может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, 20-40 или 6-30). Величина частичной комплементарности оснований может изменяться в зависимости от используемого метода сборки. Для различных методов сборки перекрывающихся генов PCA-олигонуклеотиды могут перекрываться на обоих 5′- и 3′-концах, за исключением тех, которые формируют концы конечной PCR-матрицы. Ошибочные спаривания оснований между олигонуклеотидами могут влиять на гибридизацию в зависимости от природы ошибочного спаривания. Ошибочные спаривания на 3′-конце или около 3′-конца олигонуклеотида могут ингибировать удлинение. Однако G/C-богатые области перекрытия могут обойти ошибочные спаривания, приводя, таким образом, к получению матриц, содержащих ошибки. Таким образом, при дизайне олигонуклеотидов следует учитывать последовательность перекрытия, температуру плавления, потенциал для кросс-гидридизации и вторичную структуру.

Последовательности нуклеиновой кислоты, полученные в результате реакции сборки методом PCR, могут быть названы матрицами и служить в качестве целевой нуклеиновой кислоты для воспроизведения комплементарной цепи путем PCR. Как правило, после реакции сборки продукты PCR-сборки могут представлять собой двухцепочечные ДНК различных размеров, вероятно вследствие неполной сборки и/или конкатамеров. В некоторых вариантах осуществления матрица первой серии собрана из олигонуклеотидов. В других вариантах осуществления матрица второй серии собрана из фрагментов ДНК, содержащих по меньшей мере две матрицы первой серии, при этом указанные две матрицы являются продуктами PCR-реакции, необязательно очищенными и/или фильтрованными на ошибки, полученными в результате первых двух серий. Матрица третьей серии собрана из фрагментов ДНК, содержащих по меньшей мере две матрицы второй серии, которые аналогично могут быть фильтрованы на ошибки, и так далее.

Стратегии, не основанные на полимеразной циклической сборке, такие как отжиг и реакция лигирования (Climie and Santi, 1990; Smith et al., 1990; Kalman et al., 1990), синтез на основе генной вставки (Insertion gene synthesis, IGS) (Ciccarelli et al., 1990), синтез генов посредством одной цепи (Chen et al., 1990), матрично-направленное лигирование

(Template-directed ligation, TDL) (Strizhov et al., 1996), лигазная цепная реакция (Au et al., 1998) или любой подходящий метод сборки, известный в данной области, также могут быть использованы для химического синтеза полинуклеотидов. Другие стратегии синтеза генов, не основанные на полимеразной циклической сборке, включают, но без ограничения, технологию синтеза генов на основе микрочипов (Zhou et al., 2004), технологию на основе твердой подложки Blue Heron, технологию строительных блоков Sloning (Ball, 2004; Schmidt, 2006; Bugl et al., 2007) и РНК-опосредованную сборку генов из ДНК-чипов (Wu et al., 2012).

**Ферментативный синтез генов**

Ферменты, которые восстанавливают одноцепочечные разрывы в двухцепочечных ДНК, впервые открытые в 1960-х годах в *E. coli* и в Т4 бактериофаге, инфицированном клетками *E.coli* (Meselson, 1964; Weiss and Richardson, 1967; Zimmerman et al., 1967), могут быть использованы для соединения химически синтезированных олигонуклеотидов, таких как дезоксирибополинуклеотиды, с формированием непрерывных двуспиральных структур (Gupta et al., 1968a). В другом примере ДНК-полимераза I (Klenow) может быть использована для соединения олигонуклеотидов в более длинные полинуклеотиды. Кроме того, олигонуклеотиды могут быть соединены вместе посредством лигирования, например с использованием лигазы, а именно, с использованием полинуклеотидной лигазы Т4. В некоторых случаях олигонуклеотиды могут быть лигированы иерархически, с формированием все более длинных полинуклеотидов на каждой стадии.

**Реакция отжига и лигирования**

Другой подход для содействия синтезу генов включает сборку полинуклеотида из множества олигонуклеотидов посредством реакции отжига и лигирования (Climie and Santi, 1990; Smith et al., 1990; Kalman et al., 1990). Во-первых, обе цепи желательных последовательностей могут быть разделены с короткими когезивными концами таким образом, что соседние пары комплементарных олигонуклеотидов могут быть подвергнуты отжигу. Синтезированные олигонуклеотиды могут быть фосфорилированы, например, с использованием киназы, и подвергнуты отжигу перед лигированием в дуплекс.

**Лигирование методом «дробовика» и колигирование**

Подход с использованием метода «дробовика» включает сборку полного гена из нескольких синтезированных блоков (Eren and Swenson, 1989). Таким образом, ген может быть подсобран в нескольких секциях, каждая из которых сконструирована путем ферментативного лигирования нескольких комплементарных пар химически синтезированных олигонуклеотидов с короткими единичными цепями,

комплементарными цепям соседней пары. Колигирование секций может обеспечить синтез конечного полинуклеотида.

**Синтез методом генной вставки**

Синтез методом генной вставки (Insertion gene synthesis, IGS) (Ciccarelli et al., 1990) может быть использован для сборки ДНК-последовательности ступенчатым образом в пределах плазмиды, содержащей точку начала репликации одноцепочечной ДНК фага. Метод IGS основан на последовательных направленных вставках длинных олигонуклеотидов ДНК в пределах плазмиды путем олигонуклеотид-направленного мутагенеза.

**Синтез генов посредством одной цепи**

Синтез генов посредство одной цепи относится к способу синтеза гена посредством одной цепи (Chen et al.; 1990). Плюс-цепочечная ДНК целевого гена может быть собрана с помощью ступенчатой или одноступенчатой реакции Т4 ДНК лизагы с несколькими, например, шестью олигонуклеотидами в присутствии множества, например, двух концевых комплементарных олигонуклеотидов и множества, например, трех коротких межфрагментарных комплементарных олигонуклеотидов. Использование меньшего числа синтезированных оснований по сравнению с двухцепочечными или перекрывающимися методами может уменьшить затраты.

**Матрично-направленное лигирование**

Матрично-направленное лигирование относится к способу конструирования крупных синтетических генов путем лигирования модулей олигонуклеотидов, путем частичного отжига с одноцепочечной ДНК-матрицей, полученной из гена дикого типа (Strizhov et al.; 1996). Могут быть синтезированы олигонуклеотиды, содержащие только одну цепь, в отличие от других технологий, в которых требуется синтез двух цепей. Лигаза, такая как ДНК-лигаза *Pfu*, может быть использована для выполнения циклического температурного воздействия для сборки, отбора и лигирования олигонуклеотидов полной длины, а также для линейной амплификации продукта матрично-направленного лигирования (Template-directed ligation, TDL). Благодаря его зависимости от гомологичной матрицы, этот способ является подходящим для синтеза только ограниченного числа последовательностей, обладающих сходством с существующей молекулой полинуклеотида.

**Лигазная цепная реакция**

Лигазная цепная реакция (Ligase chain reaction, LCR) может быть использована в качестве метода синтеза полинуклеотидов (Au et al.; 1998). Фрагменты могут быть собраны из нескольких олигонуклеотидов путем лигирования с использованием лигазы,

например ДНК-лигазы *Pfu*. После LCR ген полной длины может быть амплифицирован со смесью фрагментов, которые имеют общее перекрытие, путем денатурирования и удлинения с использованием двух внешних олигонуклеотидов.

**Опосредованный микрочипом синтез генов**

Опосредованный микрочипом синтез генов, в качестве общего понятия, основан на способности иммобилизовывать десятки тысяч специфических зондов на малой твердой поверхности (Lockhart and Barlow, 2001). Для получения чипов ДНК может быть синтезирована непосредственно на твердой подложке (Lipshutz et al., 1999; Hughes et al., 2001) или может быть осаждена в предварительно синтезированной форме на поверхность, например, с помощью игл или струйных принтеров (Goldmann and Gonzalez, 2000). Полученные олигонуклеотиды могут быть использованы для лигирования в условиях циклического воздействия температур для создания ДНК-конструктов из нескольких сотен пар оснований. Другая технология на основе микрочипов для точного мультплексного синтеза генов, модифицированная технология синтеза генов, опосредованная чипами (Tian et al., 2004), является сходной с методом Amplification and assembly of chip-eluted DNA (AACED), способом, разработанным для высокопроизводительного синтеза генов (Richmond et al., 2004). Пулы из тысяч олигонуклеотидов «конструирования» и меченых комплементарных олигонуклеотидов «отбора» могут быть синтезированы на фотопрограммируемых микрожидкостных чипах, высвобожены, амплифицированы путем лигирования и отобраны для гибридизации для уменьшения ошибок синтеза (Tian et al., 2004).

**Технология Blue Heron**

Технология Blue Heron, разработанная компанией Blue Heron Biotechnology, основана стратегии твердофазной подложки на основе платформы GeneMaker и обеспечивает автоматизацию (Parker and Mulligan, 2003; Mulligan and Tabone, 2003; Mulligan et al., 2007). Протокол GeneMaker обычно включает введение пользователем данных последовательности, алгоритм создания подходящих олигонуклеотидов для сборки введенной последовательности, синтез олигонуклеотидов и гибридизацию в дуплексы, автоматизированное лигирование на основе твердофазной сборки посредством автоматизированных последовательных добавлений внутрь колонки на твердую матрицу подложки, и/или клонирование и верификацию последовательности. Технология Blue Heron основана на последовательном добавлении строительных блоков для уменьшения ошибок, которые возникают в других методах сборки генов, основанных на несерийных пулах строительных блоков, таких как методы PCR.

В различных вариантах осуществления используются методы серийной и иерархической сборки, как проиллюстрировано в описании технологии Blue Heron.

**Технология строительных блоков Sloning**

Технология строительных блоков Sloning (Slonomics™; Sloning Biotechnology GmbH, Puchheim, Germany) представляет собой еще один метод с использованием стратегии на основе лигирования для химического синтеза генов (Adis International, 2006). Метод синтеза Sloning состоит из серии параллельных повторяющихся и стандартизированных стадий реакций (отмеривание пипеткой, смешивание, инкубация, промывка) (Schatz and O'Connell, 2003; Schatz et al., 2004; Schatz, 2006). В отличе от лигирования олигонуклеотидов, специально разработанных и синтезированных для заданного генетического конструкта, в технологии Sloning используется библиотека стандартизированных строительных блоков, которые могут быть комбинированы для формирования любой желаемой последовательности с помощью серий стандартизированных, полностью автоматизированных, низкозатратных стадий реакций (Schatz and O'Connell, 2003; Schatz, 2006).

**Сборка Golden-gate**

В методе Golden Gate (смотри, например, Engler et al. (2008) *PLoS ONE*, 3(11): e3647; Engler et al. (2009) PLoS ONE 4(5): e5553) предлагается стандартизированная сборка ДНК из множества «частей». В методе Golden-gate могут быть использованы эндонуклеазы II-типа, сайты узнавания которых расположены дистально от их сайтов разрезания. Существует несколько различных эндонуклеаз II-типа, которые можно выбрать, например, BsaI. Метод Golden-gate может быть эффективным при использовании единичной эндонуклеазы II-типа. Метод Golden-gate дополнительно описан в публикации патента США 2012/0258487, который включен здесь полность в виде отсылки.

В некоторых случаях способы и композиции для сборки генов могут включать комбинацию специфически синтезированных строительных блоков и предварительно синтезированных строительных блоков. Библиотеки предварительно синтезированных олигонуклеотидов могут храниться, и процессы сборки желательных целевых нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы для максимального использования предварительно синтезированных олигонуклеотидов, сводя к минимуму необходимость в новом синтезе. Специфически синтезированные олигонуклеотиды могут достраивать части целевой нуклеиновой кислоты, для которой не существует покрытия в библиотеках предварительно синтезированных олигонуклеотидов.

**РНК-опосредованная сборка генов**

В различных вариантах осуществления РНК-опосредованная сборка генов используется для сборки РНК-транскриптов из ДНК-элементов, необязательно иммобилизованных на поверхность с формированием иммобилизованной ДНК-матрицы. Элементы ДНК разработаны с возможностью включения последовательности промотора РНК-полимеразы (RNAP), такой как последовательность промотора T7 РНК-полимеразы, в направлении 5'-конца. Гибридизация олигонуклеотида, кодирующего последовательность промотора, такую как последовательность промотора T7 RNAP, с элементом ДНК может обеспечить получение двухцепочечного промотора. Добавление RNAP может влиять на транскрипцию из этих необязательно связанных с поверхностью промоторов с получением множества копий РНК. Эти амплифицированные молекулы РНК разработаны с возможностью самосборки с получением более длинной РНК. Вкратце, элементы ДНК могут быть разработаны с возможностью кодирования «последовательностей сегментов», которые представляют собой участки желательного транскрипта РНК полной длины, и «коротких точных последовательностей (splint sequences)», являющихся комплементарными РНК, которые служат в качестве матриц для контроля правильной сборки сегментов РНК. Элементы ДНК, кодирующие сегменты РНК или короткие точные последовательности (splints), могут быть выбраны для оптимизации одной или более реакций во время синтеза собранных полинуклеотидов. Например, элементы ДНК могут быть сконструированы таким образом, что 5'-конец каждого транскрипта РНК соответствует динуклеотиду GG, который, как полагают, влияет на эффективность транскрипции, проявляемой T7 РНК-полимеразой (T7 RNAP). Тринуклеотидных последовательностей GGG на 5'-конце можно в свою очередь избежать для того, чтобы избежать возникновения лэддера поли-G транскриптов, в которых число G остатков может изменяться от 1 до 3 за счет «проскальзывания» фермента во время связывания с GTP. Сборка может быть достигнута путем РНК:РНК гибридизации сегментов с короткими точными последовательностями (splints). Одноцепочечные разрывы могут быть сшиты химически или ферментативно с использованием подходящего фермента, известного в данной области. В одном примере сборка последовательностей сегментов РНК в транскрипт РНК полной длины включает лигирование в РНК-лигазой 2 T4. Трифосфорилированные транскрипты, такие как генерированные с помощью РНК-полимеразы T7, могут быть «усечены» до их монофосфорилированных аналогов до лигирования. Усечение может быть выполнено путем обработки пула транскриптов РНК 5' пирофосфогидролазой с удалением пирофосфатной группы с 5'-конца каждой РНК. После синтеза транскрипт может быть реплицирован методом полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (RT-

PCR) с получением соответствующего гена. Собранная последовательность РНК или ее ДНК-эквивалент может быть амплифицирована с использованием подходящего метода амплификации нуклеиновых кислот, включая методы, описанные в других местах в настоящем документе. Кроме того, способ описан в Wu et al. (Cheng-Hsien Wu, Matthew R. Lockett, and Lloyd M. Smith, RNA-Mediated Gene Assembly from DNA Arrays, 2012, Angew. Chem. Int. Ed. 51, 4628-4632), который включен здесь полностью в виде отсылки.

**Неферментативное химическое лигирование ДНК**

Другие подходы включают неферментативное химическое лигирование ДНК, например, с использованием бромида цианогена в качестве конденсирующего агента, как описано для синтеза 183 bp биологически активного мини-гена (Shabarova et al., 1991).

В некоторых вариантах осуществления сборка олигонуклеотидов включает использование химии CLICK. Подходящие способы для связывания различных молекул с использованием химии CLICK известны в данной области (связывание олигонуклеотидов с использованием химии CLICK описано, например, в El-Sagheer et al. (PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011). Химия CLICK может быть выполнена в присутствии Cu1.

**Частота ошибок и исправления**

Важным ограничением существующей в настоящее время технологии синтеза генов является неточность последовательности в процессе сборки генов: клоны генов, созданные из химически синтезированной ДНК, часто содержат ошибки последовательности. Эти ошибки могут быть введены на многих стадиях процесса: во время химического синтеза составляющих олигонуклеотидов, во время сборки двухцепочечных олигонуклеотидов и путем химического повреждения, возникающего во время манипуляции и выделения ДНК, или во время процесса клонирования.

Известные способы генерирования химически синтезированных фрагментов ДНК имеют очень высокую частоту ошибок последовательности, например, в среднем каждый от 200 до 500 bp. Способы, описанные здесь, обеспечивают начальный de novo синтез олигонуклеотидов и более длинного полинуклеотида с очень низкой частотой ошибок. Типичные мутации в олигонуклеотидах включат делеции, которые могут возникать в результате неудачного кэппирования, окисления и/или деблокирования. Другие значимые побочные реакции включают модификацию гуанозина (G) аммиаком с получением 2,6-диаминопурина, который кодируется как аденозин (A). Также, возможно дезаминирование цитидина (C) в уридин (U) и аденозина в изозин (I).

Без привязки к теории, неограничивающие примеры модификаций оснований, обычно возникающих во время синтеза олигонуклеотида с использованием фосфорамидитного метода, включают трансаминирование O6-кислорода

дезоксигуанозина с образованием 2,6-диаминопуринового остатка, дезаминирование N4-амина дезоксицитидина с образованием уридинового остатка (Eadie, J. S. and Davidson, D. S., Nucleic Acids Res. 15:8333, 1987), депуринизацию N6-бензоилдезоксиаденозина с получением AP-сайта (Shaller, H. and Khorana, H. G., J. Am. Chem. Soc. 85:3828, 1963; Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981) и неполное удаление N2-изобутиламидной защиной группы на дезоксигуанозине. Каждый из этих побочных продуктов (промежуточных продуктов) может влиять на возникновение ошибок последовательности в клонированных синтетических полинуклеотидах.

Кроме того, типичные способы олигонуклеотидного синтеза имеют тенденцию к формированию усеченных продуктов, которые имеют длину, которая меньше полной длины желаемого олигонуклеотида. Твердофазный подход к синтезу олигнуклеотидов включает построение олигомерной цепи, которая заякорена к твердой подложке обычно посредством своей 3'-гидроксильной группы, и элонгирована путем связывания строительных блоков со своим 5'-концом. Выход каждой стадии связывания в заданном цикле элонгации цепи обычно составляет <100%. Для олигонуклеотида длины n имеется n-1 связей, и предполагаемый максимальный выход будет обычно подчиняться [эффективность связывания]$^{n-1}$. Для 25-mer, принимая эффективность связывания равной 98%, рассчитанный максимальный выход продукта полной длины будет составлять около 61%. Таким образом, конечный продукт будет содержать уменьшающиеся количества n−1, n-2, n-3 и т.д. ошибочных последовательностей.

Другим классом ошибок синтеза является образование «n+» продуктов, которые имеют длину, которая больше полной длины желаемого олигонуклеотида. Без привязки к теории полагают, что эти продукты могут возникать в результате ответвления растущего олигонуклеотида, в котором фосфорамидитный мономер реагирует посредством оснований, особенно N-6 аденозина и O-6 гуанозина. Другим источником n+ продуктов является возникновение и распространение из нежелательных реакционных центров на твердой подложке. Продукты n+ также могут формироваться, если 5'-тритильная защитная группа случайно удалена во время стадии связывания. Это преждевременное воздействие 5'-гидроксильной группы обеспечивает возможность двойного добавления фосфорамидита. Этот тип ошибки синтеза в процессе олигонуклеотидного синтеза также может влиять на ошибки последовательности в синтезируемых генах. Способы и композиции согласно изобретению в различных вариантах осуществления обеспечивают уменьшение ошибок во время синтеза de novo олигонуклеотидов путем точного регулирования параметров реакции, как описано более подробно в других местах в настоящем документе.

Другие типы ошибок могут быть введены во время сборки олигонуклеотидов в более длинные конструкты во время методов сборки на основе PCR и на основе методов, не относящихся к PCR. Например, лигирование синтетических двухцепочечных олигонуклеотидов с другими синтетическими двухцепочечными олигонуклеотидами с формированием более крупных синтетических двухцепочечных олигонуклеотидов может быть подвержено ошибкам. Например, ДНК-лигаза T4 проявляет слабую точность, сшивая разрывы с 3′ и 5′ A/A или T/T ошибки (Wu, D. Y., and Wallace, R. B., Gene 76:245-54, 1989), 5′ G/T mismatches (Harada, K. and Orgel, L. Nucleic Acids Res. 21:2287-91, 1993) или 3′ C/A, C/T, T/G, T/T, T/C, A/C, G/G или G/T ошибки (Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J., and Hood, L., Science 241:1077-80, 1988).

Частота ошибок также ограничивает величину синтеза генов для получения библиотек вариантов генов. При частоте ошибок 1/300, около 0,7% клонов в гене длиной 1500 пар оснований будет правильным. Поскольку большинство ошибок во время синтеза олигонуклеотидов приводит к мутациям со сдвигом рамки, свыше 99% клонов в такой библиотеке не будут продуцировать белок полной длины. Уменьшение частоты ошибок на 75% будет увеличивать долю правильных клонов в 40 раз. Способы и композиции согласно изобретению обеспечивают возможность быстрого синтеза de novo больших библиотек олигонуклеотидов и генов с более низкой частотой ошибок, чем обычно наблюдается, благодаря улучшенному качеству синтеза и применению методов исправления ошибок, которые задействованы массово-параллельным и оперативным образом. Таким образом, могут быть синтезированы библиотеки с ошибками, приводящими к вставке, делеции, замене оснований или общей частотой ошибок, которая составляет 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/8000, 1/9000, 1/10000, 1/12000, 1/15000, 1/20000, 1/25000, 1/30000, 1/40000, 1/50000, 1/60000, 1/70000, 1/80000, 1/90000, 1/100000, 1/125000, 1/150000, 1/200000, 1/300000, 1/400000, 1/500000, 1/600000, 1/700000, 1/800000, 1/900000, 1/1000000 или меньше по всей библиотеке, или по более чем 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98%, 99,99% библиотеки или более. Способы и композиции согласно изобретению дополнительно относятся к большим библиотекам синтетических олигонуклеотидов и генов с низкой частотой ошибок, в которых по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98%, 99,99% или более олигонуклеотидов или генов, содержащихся по меньшей мере в поднаборе библиотеки, относятся к последовательностям, не содержащим ошибок, по сравнению с предварительно определенной/предварительно отобранной последовательностью. В

некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98%, 99,99% или более олигонуклеотидов или генов в выделенном объеме в пределах библиотеки имеют одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98%, 99,99% или более любых олигонуклеотидов или генов, обладающих более чем 95%, 96%, 97%. 98%, 99%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% или более сходством или идентичностью, имеют одинаковую последовательность. В некоторых вариантах осуществления частота ошибок, относящаяся к конкретному локусу на олигонуклеотиде или гене, является оптимизированной. Таким образом, заданный локус или множество отобранных локусов одного или нескольких олигонуклеотидов или генов, составляющих часть большой библиотеки, могут каждый в отдельности иметь частоту ошибок, которая составляет менее 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/8000, 1/9000, 1/10000, 1/12000, 1/15000, 1/20000, 1/25000, 1/30000, 1/40000, 1/50000, 1/60000, 1/70000, 1/80000, 1/90000, 1/100000, 1/125000, 1/150000, 1/200000, 1/300000, 1/400000, 1/500000, 1/600000, 1/700000, 1/800000, 1/900000, 1/1000000 или меньше. В различных вариантах осуществления такой оптимизированный по ошибкам локус может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 100000, 500000, 1000000, 2000000, 3000000 или более локусов. Оптимизированный по ошибкам локус может быть распределен по меньшей мере по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 100000, 500000, 1000000, 2000000, 3000000 или более олигонуклеотидам или генам.

Частота ошибок может быть получена с исправлением или без исправления ошибок. Частота ошибок может быть получена по всей библиотеке или по более чем 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98%, 99,99% или более библиотеки.

Библиотека может содержать более чем 100, 200, 300, 400, 500, 600, 750, 1000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 75000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 750000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000 или более различных олигонуклеотидов или генов. Различные олигонуклеотиды или гены могут быть связаны с предварительно определенными/предварительно отобранными последовательностями.

Библиотека может содержать олигонуклеотиды или гены, которые имеют длину более 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1250 bp, 1500 bp, 1750 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 7000 bp, 8000 bp, 9000 bp, 10 kb, 20 kb, 30 kb, 40 kb, 50 kb, 60 kb, 80 kb, 90 kb, 100 kb или более. Следует понимать, что библиотека может содержать множество различных подразделов, таких как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более подразделов, которые зависят от различной частоты ошибок и/или размеров конструктов. Композиции и способы согласно изобретению дополнительно обеспечивают конструирование указанных выше больших библиотек синтетических олигонуклеотидов или генов с низкой частотой ошибок, описанной выше, за короткий период времени, например, менее чем за три месяца, два месяца, один месяц, три недели, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 дня или меньше. Гены указанных выше библиотек могут быть синтезированы путем сборки синтезированных de novo олигонуклеотидов с помощью подходящих методов сборки генов, дополнительно описанных подробно в других местах в настоящем документе или известных из других источников в данной области.

Несколько способов известно в данной области для удаления содержащих ошибку последовательностей в синтезированном гене. ДНК мисматч-связывающий белок, MutS (из *Thermus aquaticus*), может быть использован для удаления ошибочных продуктов из синтетических генов с использованием различных стратегий (Schofield and Hsieh, 2003; Carr et al., 2004; Binkowski et al., 2005). Некоторые другие стратегии (Pogulis et al., 1996; Ling and Robinson, 1997; An et al., 2005; Peng et al., 2006b) используют сайт-направленный мутагенез с помощью PCR с перекрывающимися праймерами для исправления ошибок, и могут сочетаться с двумя или более циклами клонирования и секвенирования, а также дополнительным синтезом олигонуклеотидов. Функциональный отбор и идентификация после синтеза генов является еще одним подходом (Xiong et al., 2004b; Smith et al., 2003). В другом подходе для исправления ошибок используется эндонуклеаза SURVEYOR (трансгеномная), мисматч-специфическая ДНК эндонуклеаза для сканирования известных и неизвестных мутаций и полиморфизмов в гетеродуплексной ДНК. Технология SURVEYOR основана на мисматч-специфической ДНК эндонуклеазе из сельдерея, нуклеазы Surveyor, которая является членом семейства CEL нуклеазы растительных ДНК эндонуклеаз (Qiu et al., 2004). Нуклеаза Surveyor с высокой специфичностью расщепляет на 3'-конце любого мисматча замены основания и другого нарушенного участка по обеим цепям ДНК, включая все замены оснований и вставки/делеции длиной до по меньшей мере 12 нуклеотидов. Мисматчи вставки/делеции и все мисматчи замены оснований могут быть выявлены с различной эффективностью расщепления на основе последовательности мисматча. В одном примере технология нуклеазы Surveyor может быть использована для

детекции мисматча в способе, включающем четыре стадии: (i) необязательная амплификация полинуклеотида, например PCR, желаемых полинуклеотдных мишеней с мутантными/вариантными и дикого типа/желательными последовательностями; (ii) гибридизация с образованием гетеродукплексов, содержащих мисматчи; (iii) обработка гетеродукплексов нуклеазой Surveyor для расщепления сайтов мисматча; и (iv) необязательный анализ расщепленных полинуклеотидных продуктов с использованием оптимальной платформы детекции/разделения (фигуры 15-16). Продукты расщепления, образовавшиеся в результате обработки гетеродукплексов, могут быть подвергнуты PCA после устранения ошибки в участке расщепления, например, экзонуклеазой, для генерирования продуктов, не имеющих ошибки (фигура 15). Ошибочно спаренные основания могут быть в основном или в некоторых случаях полностью удалены с получением цепей, не содержащих ошибок. В некоторых вариантах осуществления расщепленные цепи могут быть подвергнуты повторному отжигу с мишенями в пуле полинуклеотидов и удлинены. Так как частота содержащих ошибки полинуклеотидов является очень низкой после начального отжига и расщепления гетеродуплексов, удаляющих мисматчи, большинство расщепленных цепей будут отжигаться с мишенями, имеющими последовательности, не содержащие ошибки на участке первоначального мисматча. Посредством удлинения вдоль мишеней полинуклеотиды могут быть повторно синтезированы без первоначального мисматча. Различные примеры сборки генов включают исправление ошибки. Например, протокол PCR-based accurate synthesis (PAS) может включать: дизайн гена и олигонуклеотидов, очистку олигонуклеотидов, первую PCR для синтеза сегментов, вторую PCR для сборки гена полной длины, и секвенирование и исправление ошибки (Xiong et al., 2006). Альтернативно, образец может быть подвергнут PCR, при этом расщепленные продукты не способны принимать участие, разбавляя тем самым множество ошибок в образце (фигура 16).

В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы селективного удаления двухцепочечных олигонуклеотидов, таких как молекулы ДНК, содержащие «мисматчи», деформации и малые петли, химически измененные основания и другие гетеродуплексы, образующиеся в ходе процесса химического синтеза ДНК, из растворов, содержащих превосходно совпадающие синтетические фрагменты ДНК. Способы обеспечивают разделение специфических комплексов белок-ДНК, образовавшихся непосредственно на гетеродуплексной ДНК или посредством аффинной системы, содержащей встроенный нуклеотидный аналог, например аналог, который основан на комплексах авидин-биотин-ДНК, образовавшихся после встраивания молекулы биотина или аналога биотина в гетеродуплекс, содержащий ДНК, и

последующего связывания любым членом авидинового семейства белков, включая стрептавидин. Авидин может быть иммобилизован на твердой подложке.

Центральное значение для способа имеют ферменты, которые узнают и специфически связываются с ошибочно спаренными основаниями или непарными основаниями в пределах молекулы двухцепочечного олигонуклеотида (например, ДНК) и остаются связанными с сайтом или около сайта гетеродуплекса, создают одно- или двухцепочечный разрыв или способны инициировать перенос цепи после реакции транспозиции на сайте или вблизи сайта гетеродуклекса. Удаление ошибочно спаренных оснований, неправильно спаренных и химически измененных гетеродуплексных молекул ДНК из синтетического раствора молекул ДНК приводит к пониженной концентрации молекул ДНК, которые отличаются от ожидаемой синтезированной последовательности ДНК.

Белки узнавания «мисматча» обычно связываются с «мисматчем» или вблизи «мисматча». Реагенты для исправления ошибки на основе белков узнавания «мисматча» могут включать белки, которые представляют собой эндонуклеазы, ферменты рестрикции, рибонуклеазы, ферменты репарации «мисматча», резольвазы, геликазы, лигазы, антитела, специфические к «мисматчам» и их варианты. Ферменты могут быть выбраны, например, из Т4 эндонуклеазы-7, Т7 эндонуклеазы-1, S1, эндонуклеазы золотистой фасоли, MutY, MutS, MutH, MutL, клеавазы и HINF1. В определенных вариантах осуществления изобретения белок узнавания «мисматча» расщепляет по меньшей мере одну цепь ДНК, содержащую «мисматч», вблизи сайта «мисматча».

В случае белков, которые узнают и расщепляют гетеродуплекс ДНК с формированием одноцепочечного ника, например, фермент эндонуклеаза CELI, полученный ник может быть использован в качестве субстрата для ДНК-полимеразы для встраивания модифицированных нуклеотидов, подходящих для аффинных взаимоотношений, например, тех, которые содержат фрагмент биотина или его аналог. Существует множество примеров белков, которые распознают ошибочно спаренные основания ДНК и расщепляют с формированием одноцепочечного ника, включая эндонуклеазы резолвазу, гликозилазы и специальные подобные MutS белки, которые обладают активностью эндонуклеазы. В некоторых случаях ник образуется в гетеродуплексной молекуле ДНК после дополнительного процессинга, например, тимин-ДНК-гликозилазы могут быть использованы для узнавания ошибочно спаренных оснований ДНК и гидролизировать связь между дезоксирибозой и одним из оснований в ДНК, генерируя АР-сайт без необходимого расщепления сахарной фосфатной основной цепи ДНК. АР-сайт может быть преобразован АР-эндонуклеазой в содержащий разрыв

субстрат, подходящий для удлинения ДНК-полимеразы. Комплексы белок-гетеродуплексная ДНК могут быть, таким образом, образованы напрямую, например, в белках MutS, или не напрямую после встраивания нуклеотидных аналогов, например биотина или его аналогов, в содержащую гетеродуплекс цепь и последующего связывания биотина или аналогов биотина с белками стрептавидином или авидином.

Другие методы исправления ошибок могут основываться на ферментах транспозазах, таких как MuA транспозаза, преимущественно встраивающей меченую ДНК, например, меченую биотином или аналогом биотина ДНК, содержащую предварительно расщепленную версию участка связывания ДНК с транспозазой, внутрь или вблизи сайта неправильно спаренного основания в ДНК in vitro посредством реакции переноса цепи. Перенос цепи in vitro, направляемый MuA транспозазой, известен специалистам в данной области, знакомым с активностью транспозазы, которая является специфической для содержащей неправильно спаренные основания ДНК. В этом способе предварительно расщепленный участок связывания MuA с ДНК может быть биотинилирован на 5′-конце молекулы, обеспечивая образование комплекса белок-биотин-ДНК с белком стрептавидином или авидином с последующим переносом цепи в содержащую гетеродуплекс ДНК.

Разделение комплексов белок-ДНК in vitro может быть достигнуто путем инкубации раствора, содержащего комплексы белок-ДНК, с твердой матрицей, которая обладает высокой аффинностью и способностью связывания с белком, и низкой аффинностью связывания с ДНК. В некоторых случаях такие матрицы могут быть помещены в пределах микрожидкостных устройств в соответствии с различными вариантами осуществления изобретения, описанного здесь.

Несколько крупных классов ферментов преимущественно расщепляют гетеродуплексные полинуклеотиды, такие как субстраты ДНК, содержащие «мисматчи», делеции или поврежденные основания. Как правило, эти ферменты превращают их поврежденные или содержащие «мисматчи» субстраты в ники или парные гэпы с единичными основаниями (в некоторых случаях с помощью AP-эндонуклеазы, которая превращает AP-сайты в ники). ДНК гликозилазы, эндонуклеазы, и белки репарации мисматчей MutSLH являются особенно полезными благодаря их эффективности в отношении модфицирования синтетических фрагментов, которые содержат ошибки. Способы и композиции согласно настоящему изобретению могут основываться на этих никах или малых гэпах для идентификации содержащих ошибки молекул ДНК и удаления их из процесса клонирования.

Комбинация технологий может быть использована для удаления обработанных полинуклеотидов, содержащих ошибки. ДНК гликозилазы представляют собой класс ферментов, которые удаляют неправильно спаренные основания и в некоторых случаях расщепляют конечный апуриновый/апиримидиновый (AP) сайт. Тимин-ДНК-гликозилазы (TDG) могут быть использованы для обогащения содержащих «мисматчи» или превосходно совпадающих ДНК популяций из смесей комплексов (X. Pan and S. Weissman, "An approach for global scanning of single nucleotide variations" 2002 PNAS 99:9346-9351). ДНК-гликозилазы могут быть использованы для гидролиза связи между дезоксирибозой и одним из оснований в ДНК, генерируя AP-сайт без необходимости расщепления сахарной фосфартной основной цепи ДНК. Все четыре группы «мисматчей» единичных оснований и некоторые другие «мисматчи» могут быть гидролизованы смесью из двух TDG. Кроме того, высокая аффинность ферментов в отношении AP-сайтов в присутствии магния может быть использована для разделения молекул ДНК на популяции, обогащенные или истощенные гетеродуплексами. Очень большое количество ДНК-гликозилаз было идентифицировано и неограничивающие примеры содержатся в публикации патента США 2006/0134638, который включен здесь полностью в виде отсылки. ДНК-гликозилазы обычно действую на поднабор неприродных, поврежденных или ошибочно спаренных оснований, удаляя основание и оставляя субстрат для последующей репарации. Как класс, ДНК-гликозилазы обладают широкими, различными и перекрывающимися специфичностями в отношении химических субстратов, которые они будут удалять из ДНК. Обработка гликозилазой может быть особенно полезной в отношении уменьшения частоты ошибок замен оснований до низких уровней. Гликозилазы, которые оставляют AP-сайт, объединены с AP-эндонуклеазой, такой как E. coli эндонуклеаза IV или Exo III для генерирования разрыва в ДНК.

Неограничивающие примеры «мисматч» ферментов эндонуклеаз для разрыва ДНК в областях несовпадений или поврежденной ДНК включают T7 эндонуклеазу I, E. coli эндонуклеазу V, T4 эндонуклеазу VII, нуклеазу золотой фасоли, Cell, E. coli эндонуклеазу IV и UVDE.

Использование комплекса MutSLH для удаления большей части ошибок из PCR фрагментов описано в работе Smith et al. (J. Smith and P. Modrich, "Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products." 1997, PNAS 94:6847-6850), которая включена здесь путем отсылки в полной объеме. В отсутствие метилирования DAM комплекс MutSLH может быть использован для катализирования двухцепочечного расщепления на участках (GATC). Продукты PCR могут быть обработаны MutSLH в присутствии ATP.

Более подробное раскрытие, касающееся исправления ошибок в синтетических полинуклеотидах содержится в публикации патента США 2006/0134638 и патенте США 6664112, которые включены здесь полностью в виде отсылки.

Ферменты, партнеры связывания и другие реагенты, используемые для исправления ошибок синтезированных полинуклеотидов в соответствии со способами и композициями изобретения, могут быть иммобилизованы на поверхностях, таких как покрытые или функционализированные поверхности, на подложках и субстратах, описанных здесь. Реакции могут быть проведены in situ с одним или несколькими иммобилизованными компонентами. Схемы очистки, которые обеспечивают полинуклеотиды с меньшим количеством ошибок или отсутствием ошибок с помощью таких компонентов на соответствующих поверхностях, предполагаются быть включенными в объем настоящего изобретения.

В конечном итоге, стратегии для сборки генов основаны на олигонуклеотидах высокого качества для достижения синтеза de novo полинуклеотидов с низкой частотой ошибок. Способы и композиции, описанные здесь, обеспечивают в различных вариантах осуществления синтез таких олигонуклеотидов высокого качества.

**Амплификация нуклеиновых кислот**

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, описанные здесь, являются амплифицированными. Амплификация может быть выполнена любыми способами, известными в данной области. В некоторых случаях нуклеиновые кислоты амплифицированы с помощью полимеразной цепной реакции (PCR). Различные способы PCR известны в данной области, как описано, например, в патентах США 5928907 и 6015674, полное содержание которых включено здесь путем отсылки для любых целей. Другие способы амплификации нуклеиновых кислот включают, например, лигазную цепную реакцию, лигирование олигонуклеотидных зондов и гибридизацию с использованием зондов. Эти и другие способы описаны более подробно в патентах США 5928907 и 6015674. Оптические системы детекции в режиме реального времени известны в данной области, и описаны также подробно, например, в патентах США 5928907 и 6015674, включенных здесь. Другие методы амплификации, которые могут быть использованы в настоящем документе, включают методы, описанные в патентах США 5242794; 5494810; 4988617; и 6582938, все из которых включены здесь в полном объеме в виде отсылки.

В некоторых аспектах изобретения используется экспоненциальная амплификация нуклеиновых кислот или полинуклеотидов. Эти способы часто зависят от катализируемого продуктом формирования множества копий молекулы нуклеиновой

кислоты или полинуклеотида, или ее комплемента. Продукты амплификации иногда называются «ампликоны». Одним таким методом ферментативной амплификации специфических двухцепочечных последовательностей ДНК является полимеразная цепная реакция (PCR). Эта in vitro процедура амплификации основана на повторяющихся циклах денатурирования, отжига олигонуклеотидных праймеров и удлинения праймеров с помощью термофильной матрично-зависимой полимеразы полинуклеотида, что приводит к экспоненциальному увеличению копий желательной последовательности полинуклеотидного аналита, фланкированного праймерами. Два различных PCR праймера, которые отжигают с противоположными цепями ДНК, располагают таким образом, чтобы катализируемый полимеразой продукт удлинения одного праймера мог служить в качестве матричной цепи для другой, что приводит к накоплению дискретного двухцепочечного фрагмента, длина которого определяется расстоянием между 5′-концами олигонуклеотидных праймеров. Другие методы амплификации, которые могут быть использованы в способах согласно настоящему изобретению, включают, например, AFLP (полиморфизм длины амплифицированных фрагментов, Amplified fragment length polymorphism) PCR (смотри, например: Vos et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-14), аллель-специфическую PCR (смотри, например, Saiki R K, Bugawan T L, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes Nature 324: 163-166), Alu PCR, полимеразную циклическую сборку (PCR) (смотри, например, Stemmer W P, Crameri A, Ha K D, Brennan T M, Heyneker H L (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides Gene 164: 49-53), асимметричную PCR (смотри, например, Saiki R K supra), метод молекулярных колоний (PCR), геликаза-зависимую амплификацию (PCR) (смотри, например, Myriam Vincent, Yan Xu and Huimin Kong (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification EMBO reports 5 (8): 795-800), PCR «горячего старта» (hot start PCR), «инвертированную» PCR (inverse PCR) (смотри, например, Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetics. 1988 November; 120(3):621-3), in situ PCR, Intersequence-specific PCR или IS SR PCR, цифровую PCR, Linear-After-The-Exponential-PCR или Late PCR (смотри, например, Pierce K E and Wangh L T (2007). Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells Methods Mol. Med. 132: 65-85), PCR длинных фрагментов, гнездовую PCR, PCR в режиме реального времени, дуплекс-PCR, мультидуплекс-PCR, количественную PCR, количественную флуоресцентную PCR (QF-PCR), мультиплекс-флуоресцентную PCR (MF-PCR), PCR и метод полиморфизма по

длинам рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP), PCK-RFLPIRT-PCR-IRFLP, Polonony PCR, амплификацию in situ по типу катящегося кольца (RCA), Bridge PCR, Picotiter PCR и эмульсионную PCR, или Single cell PCR. Другие подходящие методы амплификации включают транскрипционную амплификацию, самоподдерживающуюся репликацию последовательностей, селективную амплификацию целевых полинуклеотидных последовательностей, праймированную консенсусной последовательностью полимеразную цепную реакцию (CP-PCR), произвольно праймированную полимеразную цепную реакцию (AP-PCR), и полимеразную цепную реакцию с использованием частично вырожденных праймеров (Degenerate oligonucleotide-primed PCR, DOP-PCR). Другой метод амплификации включает амплификацию одноцепочечного полинуклеотида с использованием одного олигонуклеотидного праймера. Одноцепочечный полинуклеотид, который подлежит амплификации, содержит две не непрерывные последовательности, которые являются по существу или полностью комплементарными друг другу и, таким образом, способны гибридизироваться вместе с образованием структуры «петля-на-стебле». Этот одноцепочечный полинуклеотид уже может являться частью полинуклеотидного аналита или может быть образован как результат присутствия полинуклеотидного аналита.

Другой способ амплификации нуклеиновых кислот известен как лигазная цепная реакция (Ligase chain reaction, LCR). В этом способе используется фермент лигаза для соединения двух пар предварительно образованных зондов нуклеиновых кислот. Зонды гибридизируются с каждой комплементарной цепью аналита нуклеиновой кислоты, в случае присутствия, и лигаза используется для связывания каждой пары зондов вместе с получением двух матриц, которые служат в следующем цикле для повторения конкретной последовательности нуклеиновой кислоты.

Другим способом достижения амплификации нуклеиновой кислоты является амплификация, основанная на последовательности нуклеиновой кислоты (Nucleic acid sequence based amplification, NASBA). Этот метод представляет собой промотор-направленный ферментативный процесс, который индуцирует in vitro непрерывную, гомогенную и изотермическую амплификацию специфической нуклеиновой кислоты для получения копий РНК нуклеиновой кислоты. Реагенты для проведения NASBA включают первый ДНК-праймер с «хвостом» на 5′-конце, содержащим промотор, второй ДНК-праймер, обратную транскриптазу, RNase-H, T7 РНК-полимеразу, NTP и dNTP.

Другим методом амплификации конкретной группы нуклеиновых кислот является метод Q-бета-репликазы, который основан на способности Q-бета-репликазы экспоненциально амплифицировать свой РНК-субстрат. Реагенты для проведения такой

амплификации включают «миди-вариант РНК» (амплифицируемый гибридизационный зонд), NTP и Q-бета-репликазу.

Другой способ для амплификации нуклеиновых кислот известен как 3SR и аналогичен NASBA, за исключением того, что активность RNase-H присутствует в обратной транскриптазе. Амплификация методом 3SR представляет собой РНК-специфический целевой метод, в котором РНК амплифицируется в изотермическом процессе, объединяющем промотор-направленную РНК-полимеразу, обратную транскриптазу и RNase H с целевой РНК. Смотри, например, Fahy et al. PCR Methods Appl. 1:25-33 (1991).

Другой метод амплификации нуклеиновых кислот представляет собой транскрипционно-опосредованную амплификацию (Transcription Mediated Amplification, TMA) используемую Gen-Probe. Способ аналогичен NASBA в в отношении использования двух ферментов в самоподдерживающейся репликации последовательностей. Смотри патент США 5299491, включенный здесь путем отсылки.

Другой метод амплификации нуклеиновых кислот представляет собой амплификацию с замещением цепей (Strand Displacement Amplification, SDA) (Westin et al 2000, Nature Biotechnology, 18, 199-202; Walker et al 1992, Nucleic Acids Research, 20, 7, 1691-1696), который представляет собой метод изотермической амплификации, основанный на способности эндонуклеазы рестрикции, такой как HincII или BsoBI, разрывать немодифицированную цепь гемифосфоротиоатной формы ее сайта узнавания, и способности экзонуклеаза-дефицитной ДНК-полимеразы, такой как ДНК-полимераза exo minus Klenow или Bst полимераза, удлинять 3′-конец разрыва и заменять цепь ДНК в направлении даустрим. Экспоненциальная амплификация происходит в результате сочетания смысловых и антисмысловых реакций, в которых цепи, вытесненные из смысловой реакции, служат в качестве мишеней для антисмысловой реакции, и наоборот.

Другой метод амплификации нуклеиновых кислот представляет собой амплификацию по типу катящегося кольца (Rolling Circle Amplification, RCA) (Lizardi et al. 1998, Nature Genetics, 19:225-232). RCA можно использовать для амплификации одноцепочечных молекул в форме колец нуклеиновых кислот. В самой простой форме RCA включает гибридизацию единичного праймера с кольцевой нуклеиновой кислотой. Удлинение праймера ДНК-полимеразой с активностью в отношении замещения цепи приводит к получению множества копий кольцевой нуклеиновой кислоты, последовательно соединенных в одну цепь ДНК.

В некоторых вариантах осуществления RCA сочетается в лигированием. Например, один олигонуклеотид может быть использован для лигирования и в качестве кольцевой

матрицы для RCA. Этот тип полинуклеотида может называться как «замыкающий кольцо зонд» или «RCA-зонд». Что касается замыкающего кольцо зонда, оба конца олигонуклеотида содержат последовательности, комплементарные домену в пределах последовательности представляющей интерес нуклеиновой кислоты. Первый конец замыкающего кольцо зонда является по существу комплементарным первому домену на последовательности представляющей интерес нуклеиновой кислоты, и второй конец замыкающего кольцо зонда является по существу комплементарным второму домену, расположенному рядом с первым доменом около первого домена. Гибридизация олигонуклеотида с целевой нуклеиновой кислотой вызывает формирование комплекса гибридизации. Лигирование концов замыкающего кольцо зонда приводит к формированию модифицированного комплекса гидридизации, содержащего кольцевой полинуклеотид. В некоторых случаях перед лигированием полимераза может заполнять гэп путем удинения одного конца замыкающего кольцо зонда. Образованный таким образом кольцевой полинуклеотид может служить в качестве матрицы для RCA, что с добавлением полимеразы приводит к образованию амплифицированного продукта нуклеиновой кислоты. Способы согласно изобретению, описанные здесь, могут обеспечить амплифицированные продукты с определенными последовательностями на обоих 5′- и 3′-концах. Такие амплифицированные продукты можно использовать в качестве замыкающих кольцо зондов.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении используют линейную амплификацию нуклеиновых кислот или полинуклеотидов. В целом, линейная амплификация относится к способу, который включает образование одной или более копий комплемента только одной цепи молекулы нуклеиновой кислоты или полинуклеотида, обычно аналита нуклеиновой кислоты или полинуклеотида. Таким образом, основное различие между линейной амплификацией и экспоненциальной амплификацией состоит в том, что в последнем процессе продукт служит в качестве субстрата для формирования большего количества продукта, тогда как в первом процессе исходная последовательность является субстратом для формирования продукта, но продукт реакции, то есть репликация исходной матрицы, не является субстратом для генерирования продуктов. В линейной амплификации количество образовавшегося продукта увеличивается как линейная функция времени, в противоположность экспоненциальной амплификации, при которой количество образовавшегося продукта является экспоненциальной функцией времени.

В некоторых вариантах осуществления методы амплификации могут представлять собой твердофазную амплификацию, полони-амплификацию, эмульсионную PCR, Bead

RCA, Surface RCA, Surface SDA и т.д., которые известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы методы амплификации, которые приводят к амплификации свободных молекул ДНК в растворе или привязанных к подходящей матрице только одним концом молекулы ДНК. Могут быть использованы методы, которые основаны на мостиковой PCR, при которой оба праймера PCR присоединены к поверхности (смотри, например, WO 2000/018957 and Adessi et al., Nucleic Acids Research (2000): 28(20): E87). В некоторых случаях способы согласно изобретению могут создавать «технологию полимеразной колонии» или «полони», которая относится к мультиплексной амплификации, которая сохраняет пространственную кластеризацию идентичных ампликонов (смотри Harvard Molecular Technology Group and Lipper Center for Computational Genetics website). Это включает, например, полимеразные колонии in situ (Mitra and Church, Nucleic Acid Research 27, e34, Dec. 15, 1999), амплификацию по типу катящегося кольца in situ (Rolling circle amplification, RCA) (Lizardi et al., Nature Genetics 19, 225, July 1998), мостиковую PCR (патент США 5641658), Picotiter PCR (Leamon et al., Electrophoresis 24, 3769, November 2003), и эмульсионную PCR (Dressman et al., PNAS 100, 8817, Jul. 22, 2003). Способы согласно изобретению обеспечивают новые способы генерирования и использования полимеразных колоний.

Амплификация может быть достигнута посредством любого процесса, с помощью которого возрастает число копий целевой последовательности, например, PCR. Условия, благоприятные для амплификации целевых последовательностей с помощью PCR, известны в данной области, могут быть оптимизированы на различных стадиях процесса и зависят от характеристик элементов в реакции, таких как тип мишени, концентрация мишени, длина последовательности, подлежащей амплификации, последовательность мишени и/или одного или более праймеров, длина праймера, концентрация прайммера, используемая полимераза, реакционный объем, отношение одного или более элементов к одному или более другим элементам, и другие, некоторые из которых или все могут быть изменены. В целом, PCR включает стадии денатурирования мишени, подлежащей амплификации (в случае двухцепочечной), гибридизации одного или более праймеров с мишенью, и удлинение праймеров с помощью ДНК-полимеразы, со стадиями, повторяющимися (или «циклически повторяющимися») для амплификации целевой последовательности. Стадии в этом процессе могут быть оптимизированы для различных конечных результатов, таких как повышение выхода, уменьшение формирования паразитных составляющих и/или увеличения или уменьшения специфичности отжига праймеров. Способы оптимизации хорошо известны в данной области и включают

регулирование типа или количества элементов в реакции амплификации и/или условий заданной стадии в процессе, таких как температура на конкретной стадии, длительность конкретной стадии и/или число циклов. В некоторых вариантах осуществления реакция амплификации включает по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 или более циклов. В некоторых вариантах осуществления реакция амплификации включает не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 или более циклов. Циклы могут содержать любое число стадий, такое как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более стадий. Стадии могут содержать любую температуру или градиент температру, подходящий для достижения цели заданной стадии, включая, но без ограничения удлинение 3'-конца (например, наполнение адаптера), отжиг праймеров, удлинение праймеров и денатурирование цепи. Стадии могут иметь любую продолжительность, включая, но без ограничения, примерно, менее чем примерно или более чем примерно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 или более секунд, включая неопределенное количество времени до ручного прерывания. Циклы в любом количестве, содержащие различные стадии, могут быть комбинированы в любом порядке. В некоторых вариантах осуществления различные циклы, включающие различные стадии, комбинированы таким образом, что общее количество циклов в комбинации составляет примерно, менее чем примерно или более чем примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 или более циклов. Амплификация может быть выполнена в любой точке во время процедуры, состоящей из множества реакций, с использованием способов и композиций согласно изобретению, например, до или после объединения в пул секвенируемых библиотек из независимых реакционных объемов и может быть использована для амплификации целевой молекулы, описанной здесь.

**Реакции лигирования**

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды могут быть лигированы или связаны с адаптерами или штрихкодами. Связывающий агент может представлять собой лигазу. В некоторых вариантах осуществления лигаза представляет собой Т4-ДНК-лигазу, с использованием хорошо известных процедур (Maniatis, T. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)). Также, могут быть использованы другие ДНК-лигазы. Для лигирования могут быть использованы другие лигазы, например полученные из термофильных организмов, обеспечивая, таким образом, лигирование при более высоких температурах, что позволяет использовать более длинные олигонуклеотиды (с повышенной специфичностью), которые могут быть подвергнуты отжигу и лигированы одновременно в условиях более высоких температур, обычно допускаемых для отжига таких олигонуклеотидов.

Используемые здесь термины «соединение» и «лигирование» в отношении двух полинуклеотидов, относятся к ковалентному присоединению двух отдельных полинуклеотидов с получением одного более крупного полинуклеотида с непрерывной основной цепью. Способы соединения двух полинуклеотидов известны в данной области и включают, без ограничения, ферментативные и неферментативные (например, химические) способы. Примеры реакций лигирования, которые являются неферментативными, включают методы неферментативного лигирования, описанные в патентах США 5780613 и 5476930, которые включены здесь полностью в виде отсылки. В некоторых вариантах осуществления адаптерный олигонуклеотид соединен с целевым полинуклеотидом с помощью лигазы, например ДНК-лигазы или РНК-лигазы. Множество лигаз, каждая из которых имеет охарактеризованные условия реакции, известны в данной области и включают, без ограничения, $NAD^+$-зависимые лигазы, включая tRNA-лигазу, Taq-DNA-лигазу, *Thermus filiformis* ДНК-лигазу, Escherichia coli ДНК-лигазу, Tth-ДНК-лигазу, *Thermus scotoductus* ДНК-лигазу (I и II), термостабильную лигазу, термостабильную ДНК-лигазу амплигазу (Ampligase), лигазу VanC-типа, 9° N ДНК-лигазу, Tsp-ДНК-лигазу и новые лигазы, открытые путем биоразрабоки; ATP-зависимые лигазы, включая T4-РНК-лигазу, T4-ДНК-лигазу, T3-ДНК-лигазу, T7-ДНК-лигазу, Pfu-ДНК-лигазу, ДНК-лигазу 1, ДНК-лигазу III, ДНК-лигазу IV, и новые лигазы, открытые путем биоразработки; и дикого типа, мутантные изоформы и их варианты, созданные методами генетической инженерии. Лигирование может быть между полинуклеотидами, имеющими гибридизируемые последовательности, такие как комплементарные выступающие концы. Лигирование также может быть между двумя «тупыми» концами. Как правило, в реакции лигирования используют 5'-концевой фосфат. 5'-Концевой фосфат может быть обеспечен целевым полинуклеотидом, адаптерным олигонуклеотидом или обоими. По необходимости 5'-концевые фосфаты могут быть добавлены к полинуклеотидам или удалены из полинуклеотидов, подлежащих соединению. Способы добавления или удаления 5'-концевых фосфатов известны в данной области и включают, без ограничения, ферментативные и химические процессы. Ферменты, подходящие для добавления и/или удаления 5'-концевых фосфатов, включают киназы, фосфатазы и полимеразы. В некоторых вариантах осуществления оба из двух концов, соединенных в реакции лигирования (например, конец адаптера и конец целевого полинуклеотида) обеспечивают 5'-концевой фосфат, таким образом, что при соединении двух концов образуются две ковалентные связи. В некоторых вариантах осуществления только один из двух концов, соединенных в реакции лигирования (например, только один из конца адаптера и конца целевого полинуклеотида) обеспечивает 5'-фосфат, таким образом, что

при соединении двух концов образуется только одна ковалентная связь. В некоторых вариантах осуществления только одна цепь на одном или обоих концах целевого полинуклеотида соединена с адаптерным олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления обе цепи на одном или обоих концах целевого полинуклеотида соединены с адаптерным олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления 3' фосфаты удалены до лигирования. В некоторых вариантах осуществления адаптерный олигонуклеотид добавлен к обоим концам целевого полинуклеотида, при этом одна или обе цепи на каждом конце соединены с одним или более адаптерными олигонуклеотидами. Когда обе цепи на обоих концах соединены с адаптерным олигонуклеотидом, соединение может следовать за реакцией расщепления, которая отщепляет 5'-выступающий конец, который может служить в качестве матрицы для удлинения соответствующего 3'-конца, при этом 3'-конец может включать или может не включать один или более нуклеотидов, полученных из адаптерного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид соединен с первым адаптерным олигонуклеотидом на одном конце, и второй адаптерный олигонуклеотид на втором конце. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид и адаптер, к которому он присоединен, содержит «тупые» концы. В некоторых вариантах осуществления отдельные реакции лигирования проводятся для каждого образца с использованием другого первого адаптерного олигонуклеотида, содержащего по меньшей мере одну последовательность штрихкода для каждого образца, таким образом, что последовательность штрихкода соединена с целевыми полинуклеотидами более чем одного образца. Целевой полинуклеотид, который содержит олигонуклеотидный адаптера/праймер, соединенный с ним, рассматривается как «меченый» присоединенным адаптером.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, описанные здесь, соединены с использованием CLICK химии. Подходящие способы для связывания различных молекул с использованием CLICK химии известны в данной области (CLICK химию для связывания олигонуклеотидов смотри, например, в El-Sagheer et al. (PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011). CLICK химия может быть выполнена в присутствии Cu1.

**Штрихкоды**

Штрихкоды представляют собой обычно известные последовательности аминокислот, которые позволяют идентифицировать некоторые элементы полинуклеотида, с которым штрихкод связан. В некоторых вариантах осуществления штрихкод содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая при соединении с

целевым полинуклеотидом служит в качестве идентификатора образца, из которого получен целевой полинуклеотид.

Штрихкоды могут быть разработаны подходящей длины для обеспечения достаточной степени идентификации, например длиной, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ,36 ,37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 или более нуклеотидов. Множество штрихкодов, такое как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более штрихкодов, может быть использовано на одной и той же молекуле, необязательно отделенные последовательностями, не относящимися к штрихкоду. В некоторых вариантах осуществления штрихкоды имеют длину короче, чем 10, 9, 8, 7, 6, 5 или 4 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления штрихкоды, связанные с некоторыми полинуклеотидами, имеют длину, отличающуюся от длины штрихкодов, связанных с другими полинуклеотидами. В целом, штрихкоды имеют достаточную длину и содержат последовательности, которые являются достаточно разными, чтобы обеспечить идентификацию образцов на основе штрихкодов, с которыми они связаны. В некоторых вариантах осуществления штрихкод и источник образца, с которым он связан, может быть точно идентифицирован после мутации, вставки или делеции одного или более нуклеотидов в последовательности штрихкода, например мутации, вставки или делеции 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждый штрихкод во множестве штрихкодов отличается от других штрихкодов из множества по меньшей мере на три положения нуклеотидов, например, по меньшей мере на 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений.

**Секвенирование**

Синтезированные de novo олигонуклеотидные и более длинные олигонуклеотидные продукты, описанные здесь, могут быть подвергнуты контролю качества перед переходом на следующую стадию процедуры, такой как процедура, состоящая из множества реакций. Контроль качества может быть проведен при содержании индивидуальных продуктов в отдельных объемах, таких как выделенные элементы на субстрате, как описано здесь. Для контроля качества отбирают аликвоты некоторого объема, при этом оставшиеся объемы, относящиеся к каждому продукту, остаются индивидуально доступными.

На фигуре 17 показан пример процедуры контроля качества, включающей секвенирование следующего поколения. Ген-специфические замыкающие кольцо зонды, нацеленные на определенный продукт, разработаны для охвата перекрывающихся сегментов последовательностей продукта, проходящего тестирование. Концы

индивидуальных замыкающих кольцо проб, специфических в отношении генного продукта, могут быть выполнены с возможность гибридизации с областями, размещенными вдоль генного продукта для надлежащего покрытия во время секвенирования. Все зонды, специфические в отношении одного и того же генного продукта, могут содержать последовательность штрихкода, связанную с этим генным продуктом. Подходящая полимераза и/или лигаза может быть использована для наполнения между концами замыкающих кольцо проб вдоль мишени генного продукта. В некоторых случаях замыкающие кольцо пробы будут формировать кольцевые одноцепочечные ДНК. Типичный линейный генный продукт может быть расщеплен, например, после аликвотирования доли объема генного продукта. Альтернативно, доля объема генного продукта может быть аликвотирована перед добавлением замыкающих кольцо проб. Замыкающие кольцо пробы, несущие сегменты генного продукта, могут быть амплифицированы, например, с использованием ПЦР. Универсальные или специфические области связывания с праймером на замыкающих кольцо пробах могут быть нацелены во время амплификации. Секвенируемые связывающие праймер области могут необязательно присутствовать на замыкающих кольцо пробах или могут быть добавлены во время последующих стадий, например, путем использования секвенирующих адаптеров до, во время или после амплификации.

В различных вариантах осуществления специфические к генному продукту замыкающие кольцо пробы будут объединены в пул после стадий начального секвенирования библиотеки. В таких случаях специфические к генному продукту штрихкоды могут быть использованы для направления информации о последовательности обратно в индивидуальные генные продукты. Информация о секвенировании, полученная с помощью любых подходящих способов, описанных здесь или известных из других источников в данной области, может быть обратно свернута, например, путем сортировки на индивидуальный пул последовательности на основе информации о штрихкоде. Подходящие алгоритмы выравнивания и подтверждения последовательности, известные в данной области, могут быть использованы для завершения контроля качества. Показатели частоты ошибок и локализации могут быть анализированы по локусу последовательности, генному продукту, по библиотеке или по субсегменту библиотеки. Анализ ошибок может дать информацию о приемке или отклонении продуктов для последующих стадий или для доставки заказчику.

В любом из вариантов осуществления детекция или количественный анализ олигонуклеотидов может быть выполнен путем секвенирования. Субъединицы или все синтезированные олигонуклеотиды могут быть детектированы посредством полного

секвенирования всех олигонуклеотидов с помощью любых подходящих способов, известных в данной области, например, Illumina HiSeq 2500, включая методы секвенирования, описанные здесь.

Секвенирование может быть выполнено посредством классических методов секвенирования по Сенгеру, которые являются известными в данной области. Секвенирование также может быть выполнено с использованием высокопроизводительных систем, некоторые из которых обеспечивают возможность детекции секвенированного нуклеотида сразу же после или при его встраивании в растущую цепь, то есть детекции последовательности в режиме реального времени или по существу реального времени. В некоторых случаях высокопроизводительное секвенирование генерирует по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000, по меньшей мере 10000, по меньшей мере 20000, по меньшей мере 30000, по меньшей мере 40000, по меньшей мере 50000, по меньшей мере 100000 или по меньшей мере 500000 считываний последовательности в час; при этом каждое считывание представляет по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90, по меньшей мере 100, по меньшей мере 120 или по меньшей мере 150 оснований на считывание.

В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительное секвенирование включает использование технологии на основе Illumina's Genome Analyzer IIX, MiSeq personal sequencer или систем HiSeq, такие как системы с использованием HiSeq 2500, HiSeq 1500, HiSeq 2000 или HiSeq 1000. В этих машинах используется секвенирование на основе обратимого терминатора с помощью химии синтеза. Эти машины могут производить считывание 200 биллионов ДНК за восемь дней. Системы меньшего размера могут быть использованы для функционирования в течение 3, 2, 1 дня или меньшего количества времени. Короткие циклы синтеза могут быть использованы для сведения к минимум времени, которое требуется для получения результатов секвенировани.

В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительное секвенирование включает использованием технологии с применением ABI Solid System. Эта платформа для генетического анализа обеспечивает массово-параллельное секвенирование клонально-амплифицированных фрагментов ДНК, связанных с частицами. Методология секвенирования основана на последовательном лигировании с окрашенными красителем олигонуклеотидами.

Секвенирование следующего поколения может включать ионное полупроводниковое секвенирование (например, с использованием технологии от фирмы Life Technologies (Ion Torrent)). Ионное полупроводниковое секвенирование может иметь

преимущество, состоящее в том, что когда нуклеотид встроен в цепь ДНК, может происходить высвобождение иона. Для выполнения ионного полупроводникового секвенирования может быть сформирован чип высокой плотности из микромашинных лунок. Каждая лунка может содержать единичную ДНК-матрицу. Под лункой может находиться ионно-чувствительный слой, и под ионно-чувствительным слоем может находиться ионный сенсор. При добавлении нуклеотида в ДНК может происходить высвобождение H+, что может быть измерено как изменение значения pH. Ионы H+ могут быть конвертированы в напряжение и зарегистрированы полупроводниковым сенсором. Матричный чип может быть последовательно заполнен нуклеотидами. Не требуется сканирования, света или камер. В некоторых случаях для секвенирования нуклеиновых кислот используют IONPROTON™ Sequencer. В некоторых случаях используют IONPGM™ Sequencer. Машина Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) может производить 10 миллионов считываний за два часа.

В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительное секвенирование включает использование технологии, доступной от фирмы Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, Massachusetts), такой как метод Single Molecule Sequencing by Synthesis (SMSS). Метод SMSS является уникальным, так как позволяет секвенировать весь геном человека за 24 часа. В заключение, метод SMSS является мощным, поскольку также как технология MIP, не требует стадии предварительной амплификации перед гибридизацией. Фактически, метод SMSS не требует какой-либо амплификации. Метод SMSS частично описан в публикациях заявок на патент США 2006002471 I; 20060024678; 20060012793; 20060012784; и 20050100932.

В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительное секвенирование включает использование технологии, доступной от компании 454 Lifesciences, Inc. (Branford, Connecticut), такой как устройство Pico Titer Plate device, которое включает волоконно-оптическую пластину, которая передает хемилюминесцентный сигнал, генерированный реакцией секвенирования, который регистрируется камерой CCD в приборе. Это использование оптоволокна позволяет детектировать минимально 20 миллионов пар оснований за 4,5 часа.

Методы использования амплификации на частицах с последующей детекцией на основе оптоволокна описаны в Marguiles, M., et al. "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors", Nature, doi: 10.1038/nature03959; а также в публикациях США 20020012930; 20030058629; 20030100102; 20030148344; 20040248161 ; 20050079510, 20050124022; и 20060078909.

В некоторых вариантах осуществления высокопроизводительное секвенирование выполняют с использованием Clonal Single Molecule Array (Solexa, Inc.) или Sequencing-by-synthesis (SBS) с использованием химии обратимого терминатора. Эти технологии описаны в патентах США 6969488; 6897023; 6833246; 6787308; и в публикациях заявок на патент США 20040106130; 20030064398; 20030022207; м Constans, A., The Scientist 2003, 17(13):36. Высокопроизводительное секвенирование олигонуклеотидов может быть достигнуто с использованием любого подходящего метода секвенирования, известного в данной области, например таких методов, которые коммерционализированы фирмами Pacific Biosciences, Complete Genomics, Genia Technologies, Halcyon Molecular, Oxford Nanopore Technologies и т.п. Другие системы высокопроизводительного секвенирования включают системы, раскрытые в Venter, J., et al. Science 16 February 2001; Adams, M. et al, Science 24 March 2000; и M. J, Levene, et al. Science 299:682-686, January 2003; а также в публикации заявок на патенты США 20030044781 и 2006/0078937. Все такие системы включают секвенирование целевой молекулы олигонуклеотида, имеющей множество оснований, путем временного добавления оснований посредством реакции полимеризации, измеряемой на молекуле олигонуклеотида, то есть активность полимеризующего нуклеиновую кислоту фермента на матричной молекуле олигонуклеотида, подлежащей секвенированию, отслеживается в режиме реального времени. Затем последовательность может быть выведена путем идентификации, какое основание является встроенным в растущую комплементарную цепь целевого олигонуклеотида путем каталитической активности полимеризующего нуклеиновую кислоту фермента на каждой стадии в присутствии добавленных оснований. Полимераза на комплексе молекулы целевого олигонуклеотида обеспечена в положении, подходящем для перемещения вдоль целевой молекулы олигонуклеотида и удлинения олигонуклеотидного праймера в активном центре. Множество меченых типов нуклеотидных аналогов обеспечено в непосредственной близости от активного центра, при этом каждый тип олигонуклеотидного аналога является комплементарным другом нуклеотиду в целевой олигонуклеотидной последовательности. Растущую олигонуклеотидную цепь удлиняют путем использования полимеразы для добавления нуклеотидного аналога в олигонуклеотидную цепь в активном центре, при этом добавленный нуклеотидный аналог является комплементарным нуклеотиду целевого олигонуклеотида в активном центре. Нуклеотидный аналог, добавленный в олигонуклеотидный праймер в результате стадии полимеризации, является идентифицированным. Стадии обеспечения меченых нуклеотидных аналогов, полимеризации растущей олигонуклеотидной цепи и идентификации добавленного

нуклеотидного аналога повторяют для того, чтобы дополнительно удлинить олигонуклеотидную цепь и определить последовательность целевого олигонуклеотида.

Технологии секвенирования следующего поколения включают технологию (SMRT™) фирмы Pacific Biosciences. В технологии SMRT каждое из четырех оснований ДНК может быть присоединено к одному из четых различных флуоресцентных красителей. Эти красители могут быть связаны фосфатной связью. Единичная ДНК-полимераза может быть иммобилизована с единичной молекулой одноцепочечной ДНК-матрицы в нижней части световода с нулевой модой (zero-mode waveguide, ZMW). Световод ZMW может иметь структуру с удержанием, которая обеспечивает возможность наблюдения за встраиванием единичного нуклеотида ДНК-полимеразой против фона флуоресцентных нуклеотидов, которые могут быстро диффундировать внутрь и наружу из ZMW (за микросекунды). Для встраивания нуклеотида в растущую цепь может потребоваться несколько миллисекунд. За это время флуоресцентная метка может возбуждаться и испускать флуоресцентный сигнал, и флуоресцирующая метка может расщепляться. ZMW может облучаться снизу. Ослабленный свет от возбуждающего пучка может проникать внутрь на более чем 20-30 нм каждого ZMW. Может быть использован микроскоп с пределом детекции 20 zepto литров (10" литров). Ничтожно малый объем детекции может обеспечить 1000-кратное улучшение сокращения фоновых помех. Детекция соответствующей флуоресценции красителя может указать, какое основание было встроено. Процесс может быть повторен.

В некоторых случаях секвенирование следующего поколения представляет собой секвенирование через нанопоры (смотри, например, Soni GV and Meller A. (2007) Clin Chem 53: 1996-2001). Нанопоры могут представлять собой маленькие отверстия порядка около одного нанометра в диаметре. Погружение нанопор в проводящую жидкость и приложение потенциала может привести к возникновению незначительного электического тока вследствие проводимости ионов через нанопоры. Величина текущего тока может быть чувствительной к размеру нанопор. Так как молекула ДНК проходит через нанопоры, каждый нуклеотид на молекуле ДНК может засорять нанопоры до различной степени. Таким образом, изменение тока, проходящего через нанопоры, так как молекула ДНК проходит через нанопоры, может представлять считывание последовательности ДНК. Технология секвенирования через нанопоры может быть от фирмы Oxford Nanopore Technologies; например, система GridlON. Единичная нанопора может быть вставлена в полимерную мембрану поперек верхней части микролунки. Каждая микролунка может иметь электрод для индивидуального измерения. Микролунки могут быть встроены в чип матрицы, с 100000 или более микролунками (например, более чем 200000, 300000,

400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000 или 1000000) на чип. Прибор (или узел) може быть использован для анализа чипа. Данные могут быть анализированы в режиме реального времени. Одновременно могут функционировать один или более приборов. Нанопора может представлять собой нанопору на основе белка, например, белка альфа-гемолизина, гептамерную белковую пору. Нанопора может представлять собой твердотельную нанопору, например, отверстие нанометрового размера, сформированное в синтетической мембране (например, SiNx или Si02). Нанопора может представлять собой гибридную пору (например, интеграция белковой поря в твердотельную мембрану). Нанопора может представлять собой нанопору с интегрированными сенсорами (например, электроды туннельных детекторов, емкостные детекторы или графеновые детекторы с нанозазором или граничным состоянием (смотри, например, Garaj et al. (2010) Nature vol. 67, doi: 10.1038/nature09379)). Нанопора может быть фнукционализирована для анализа специфического типа молекулы (например, ДНК, РНК или белка). Секвенирование через нанопоры может включать «секвенирование цепи», при котором интактные ДНК полимеры могут проходить через белковую нанопору с секвенированием в режиме реального времени по мере перемещения ДНК перемещается в пору. Фермент может разделять цепи двухцепочечной ДНК и подавать цепь через нанопору. На одном конце ДНК может содержать «шпильку», и система может читать обе цепи. В некоторых случаях секвенирование через нанопоры представляет собой «секвенирование экзонуклеазой», при котором индивидуальные нуклеотиды могут отщепляться от цепи ДНК процессивной экзонуклеазой, и нуклеотиды могут проходить через белковую нанопору. Нуклеотиды могут транзиентно связываться с молекулой в поре (например, циклодекстран). Характерное разрушение в токе может быть использовано для идентификации оснований.

Может быть использована технология секвенирования через поры от фирмы GENIA. Сконструированная белковая пора может быть заключена в липидную бислойную мембрану. Технология «активного контроля» может быть использована для обеспечения эффективной сборки нанопора-мембрана и контроля движения ДНК через канал. В некоторых случаях технология секвенирования через поры может быть от фирмы NABsys. Геномная ДНК может быть фрагментирована на цепи средней длины около 100 kb. Фрагменты 100 kb могут быть изготовлены одноцепочечными и затем гибридизированы с зондом 6-mer. Геномные фрагменты с зондами могут перемещаться через нанопору, что может создавать запись кривой зависимости тока от времени. Запись тока может обеспечить положения зондов на каждом геномном фрагменте. Геномные фрагменты могут быть выровнены для создания карты зондов для генома. Процесс может

быть проведен параллельно для библиотеки зондов. Может быть создана карта геном-длина зонда для каждого зонда. Ошибки могут быть фиксированы с помощью процесса, называемого «moving window Sequencing By Hybridization (mwSBH)». В некоторых случаях технология секвенирования через поры представлена фирмой IBM/Roche. Пучок электронов может быть использован для изготовления отверстия размером с нанопору в микрочипе. Электрическое поле может быть использовано для проталкивания или протягивания ДНК через нанопору. Устройство ДНК-транзистор в нанопоре может водержать чередующиеся слои нанометрового размера из металла и диэлектрика. Дискретные заряды в основной цепи ДНК могут улавливаться электрическими полями внутри ДНК нанопоры. При включении и выключении величины напряжения на затворе транзистора могут обеспечить считывание последовательности ДНК.

Секвенирование следующего поколения может включать секвенирование ДНК на наносферах (проводимое, например, фирмой Complete Genomics; смотри, например, Drmanac et al. (2010) Science 327: 78-81). ДНК может быть изолирована, фрагментирована и отобрана по размеру. Например, ДНК может быть фрагментирована (например, путем разрушения ультразвуком) до средней длины около 500 bp. Адаптеры (Adl) могут быть присоединены к концам фрагментов. Адаптеры могут быть использованы для гибридизации с якорями для реакций секвенирования. ДНК с адаптерами, присоединенными к каждому концу, могут быть амплифицированы методом PCR. Последовательности адаптера могут быть модифицированы таким образом, чтобы комплементарные одноцепочечные концы связывались друг с другом, образуя кольцевую ДНК. ДНК может быть метилирована для защиты ее от расщепления ферментом рестрикции IIS-типа, используемой на следующей стадии. Адаптер (например, правый адаптер) может иметь сайт узнавания рестрикции и этот сайт узнавания рестрикции может оставаться неметилированным. Неметилированный сайт узнавания рестрикции в адаптере может узнаваться ферментом рестрикции (например, AcuI) и ДНК может расщепляться AcuI 13 bp справа от правого адаптера с образованием линейной двухцепочечной ДНК. Вторая серия правого и левого адаптеров (Ad2) может быть лигирована на каждый конец линейной ДНК, и все ДНК с присоединенными обоими адаптерами могут быть PCR-амплифицированы (например, методом PCR). Последовательности Ad2 могут быть модифицированы для обеспечения возможности их связывания друг с другом и образования кольцевой ДНК. ДНК может быть метилирована, но сайт узнавания фермента рестрикции может оставаться неметилированным на левом адаптере Adl. Может быть применен фермент рестрикции (например, AcuI) и ДНК может расщепляться на расстоянии 13 bp слева от Adl с образованием линейного фрагмента ДНК. Третий набор

правого и левого адаптера (Ad3) может быть лигирован к правому и левому фланку линейной ДНК, и полученный фрагмент может быть амплифицирован методом PCR. Адаптеры могут быть модифицированы таким образом, что они могут связываться друг с другом и формировать кольцевую ДНК. Может быть добавлен фермент рестрикции III-типа (например, EcoP15); EcoP15 может расщеплять ДНК на расстоянии 26 bp слева от Ad3 и 26 bp справа от Ad2. Это расщепление может удалить большой сегмент ДНК и линеаризовать снова ДНК. Четвертый набор правого или левого адаптеров (Ad4) может быть лигорован к ДНК, ДНК может быть амплифицирована (например, методом PCR), и модифицированы таким образом, что они могут связываться друг с другом и формировать законченную кольцевую ДНК-матрицу.

Репликация по типу «катящегося кольца» (например, с использованием Phi 29 ДНК-полимеразы) может быть использвоана для амплификации малых фрагментов ДНК. Четыре последовательности адаптеров могут содержать палиндромные последовательности, которые могут гибридизироваться, и одна цепь может сворачиваться с формированием ДНК-наносферы (DNB™), которая может составлять в среднем приблизительно 200-300 нанометров в диаметре. ДНК-наносфера может быть присоединена (например, путем адсорбции) к микроматрице (проточная кювета секвеирования). Проточная кювета может представлять собой кремниевую пластину, покрытую диоксидом кремния, титаном и гексаметилдисилазаном (HMDS), и фоторезистентным материалом. Секвенирование может быть выполнено путем свободного секвенирования путем лигирования флуоресцентных зондов к ДНК. Флуоресцентное окрашивание считываемого положения может быть визуализировано при помощи камеры с высоким разрешением. Могут быть определены идентичности нуклеотидных последовательностей между последовательностями адаптеров.

**Струйное осаждение**

В способах и композициях согласно изобретению в некоторых вариантах осуществления используют осаждание, позиционирование или помещение композиции в определенное положение на поверхности или внутри поверхности подложки. Осаждение может включать контактирование одной композиции с другой. Осаждение может быть ручным или автоматизированным, например, осаждение может быть выполнено автоматизированными роботизированными устройствами. Импульсные или струйные устройства могут быть использованы для осаждения капель жидкой композиции на подложку. Импульсные устройства обычно функционируют путем доставки импульса давления (например, с помощью пьезоэлектрического или термоэлектрического элемента)

в жидкость рядом с выходным отверстием или соплом таким образом, чтобы из него могла быть дозирована капля.

Жидкие реагенты могут быть нанесены путем осаждения на выделенные локусы субстрата, описанного более подробно в других местах в настоящем документе, с использованием различных способов или систем, известных в данной области. Микрокапли жидкости могут быть доставлены на поверхность или выделенные локусы на поверхности или внутри субстрата, описанные в настоящем изобретении, с субмикронной точностью. В качестве способа микродозирования указанного ниже объема жидкости можно использовать коммерчески доступное оборудование для дозирования с использованием струйной технологии. Капли, образующиеся с использованием струйной технологии, являются высоко воспроизводимыми и могут контролироваться таким образом, что капля может быть помещена на определенное место в определенное время в соответствии с данными изображения, хранящимися в цифровом формате. Типичные диаметры капли для функционирования струйных устройств в режиме по требованию («Demand mode ink-jet devices») могут составлять 30-100 мкм, что в переводе на объемы капли составляет 14-520 пл. Скорости создания капель для устройств «Demand mode ink-jet devices» могут составлять 2000-5000 капель в секунду. Микродозирование с помощью устройства «Demand mode ink-jet device» может быть использовано при подходящих показателях разрешающей способности и производительности, чтобы обслуживать субстраты с высокими плотностями выделенных локусов, описанных более подробно в других местах в настоящем документе. Способы и системы, предназначенные для осаждения или доставки реагентов, описаны более подробно в патентах США 5843767 и 6893816, которые включены здесь полностью в виде отсылки.

Системы, предназначенные для осаждения или доставки реагентов в выделенные локусы, могут содержать одну или более подсистем, включая, но без ограничения: дозирующую головку MicroJet, систему доставки жидкости или струйный насос, систему позиционирования X-Y, видеосистему или системный контроллер. Дозирующая головка MicroJet может представлять собой сборочный узел из множества устройств MicroJet (например, 8 устройств MicroJet) и необходимых электронных систем управления. Сложность системы может быть сведена к минимуму путем использования одного канала электронных систем управления для мультиплексирования 8 или 10 дозирующих устройств. Требования к управлению формой сигнала для каждого индивидуального устройства могут быть загружены из системного контроллера. Электронные системы управления могут быть изготовлены с использованием общепринятых способов, которые известны в данной области. Системы доставки жидкостей или струйный насос может быть

от фирмы Beckman Biomec, который модифицирован для функционирования в качестве системы ввода множества реагентов. Между ним и дозирующей головкой MicroJet может находиться система соленоидных клапанов, которые контролируются системным контроллером. Они обеспечивают подачу под давлением промывочной жидкости и воздуха для продувки реагента из системы, и вакуум для загрузки реагента в систему. Система позиционирования X-Y может представлять собой любую коммерчески доступную систему точного позиционирования X-Y с контроллером. Система позиционирования может быть расположена таким образом, чтобы соответствовать множеству датчиков. Видеосистема может быть использована для калибровки «зоны посадки» каждого устройства MicroJet относительно системы позиционирования. Калибровка может происходить после каждого цикла загрузки реагента. Также, видосистема может определять местоположение каждого участка дозирования на каждом датчике, когда сенсорный лоток сначала загружен посредством отметок совмещения на датчиках. Может быть использована система на основе программного обеспечения или видеосистема, ориентированная на аппаратное обеспечение. Системный контроллер может представлять собой стандартную компьютерную систему, которая используется в качестве контроллера всей системы. Захват и обработка изображения видеосистемой также находятся на системном контроллере. Системы для осаждения или доставки реагентов в выделенные локусы описаны более подробно в публикации PCT WO2000039344, которая включена здесь полностью в виде отсылки.

На фигуре 18 показан пример системы струйных сопел. В некоторых вариантах осуществления система струйных сопел может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 45, 48, 50, 56, 60, 64, 72, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более головок струйных сопел. Головки струйных сопел, каждая, могут осаждать строительные блоки различных кодонов (тринуклеотидов). В иллюстративном варианте осуществления головки струйных сопел могут иметь диафрагмы из кремния (Silicon orifice plates) с 256 соплами на 254 мкм центрах и высотой струи 100 мкм. Каждая головка может иметь доступ к каждой лунке, которая перемещается. Система струйных сопел имеет скорость сканирования около 100 мм/с с погрешностью при движении с плоскости (x, y), которая составляет около 2 мкм. В некоторых случаях высота сканирования над пластиной системы струйных сопел может составлять около 100 мкм с отклонением от плоскостности около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мкм. В некоторых случаях система струйных сопел может содержать видеосистему для выравнивания сопла с субстратами, например,

кремниевыми пластинами, закрепленными на вакуумном держателе, в некоторых случаях как часть проточной кюветы.

В некоторых случаях способы и системы осаждения реагентов во множество выделенных локусов, описанных здесь, могут включать осаждение посредством струйного насоса по меньшей мере одной микрокапли первого реагента на первый локус из множества локусов, и осаждение посредством струйного насоса по меньшей мере одной микрокапли второго реагента во второй локус из множества выделенных локусов. В некоторых вариантах осуществления второй локус может быть расположен рядом с первым локусом, и первый и второй реагенты могут различаться. Первый и второй локусы могут располагаться на микроструктурах, встроенных в поверхность подложки, и микроструктуры могут содержать по меньшей мере один канал. В некоторых случаях по меньшей мере один канал имеет глубину более чем 100 мкм. В некоторых вариантах осуществления первый и второй реагенты могут быть одинаковыми. В некоторых случаях микроструктуры содержат микроканал большого размера и один или более микроканалов, которые находятся в жидкостном взаимодействиии с первым микроканалом. Исходный микроканал большого размера вначале получает осажденную жидкость, обычно уменьшая любое перекрестное загрязнение реагентов, поступающих или выходящих из соседних микроструктур. Содержимое капли может затем затекать в один или более микроканалов меньшего размера, которые могут иметь подходящие поверхности для реакций, описанных здесь, таких как олигонуклеотидный синтез.

По меньшей мере один канал может иметь глубину, которая может составлять примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один канал может иметь глубину, которая может находиться в диапазоне 50-100, 50-150, 50-200, 100-200, 100-300, 20-300 или 20-100 мкм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один канал может иметь глубину более чем 100 мкм.

Каждая из капель реагентов может иметь подходящий объем, который может проходить на глубину микроканала, не теряя темпа продвижения. Подходящий объем может содержать желательное количество реагентов для олигонуклеотидного синтеза. Например, без ограничения, каждая из капель, содержащих реагент, может иметь объем, который составляет примерно или по меньшей мере примерно 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500 pl, 1, 1.5,

2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 500 нл или более. В различных вариантах осуществления система отрегулирована таким образом, что любые сопровождающие капли, прихваченные осаждаемой каплей, являются достаточно малыми, сводя к минимуму перекрестное загрязнение. В случае струйного сопла, печатающие головки могут приводиться на достаточно близкое расстояние от субстрата, например, в пределах 100 мкм таким образом, что осажденная капля и ее сопровождающие капли находятся по существу внутри канала субстрата до возникновения аэрозольного движения. Сопровождающие капли могут иметь диаметр менее чем 0,5, 1, 1,5 или 2 мкм. В различных вариантах осуществления объемная доля сопровождающих капель, захваченных в аэрозольное движение, составляет менее чем 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01% или менее от осаждаемой капли.

Как описано в других местах в настоящем документе, микроструктуры могут содержать множество каналов, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. В некоторых случаях микроструктуры могут содержать по меньшей мере три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять каналов, находящихся в жидкостном взаимодействии друг с другом. Каналы могут иметь разные размеры, например, ширину и длину, как описано более подробно в других местах в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления находящиеся в жидкостном взаимодействии друг с другом каналы микроструктур могут включать два или более каналов, которые являются одинаковыми по ширине, длине и/или другим линейным размерам.

Микрокапли жидкости могут быть доставлены на поверхность или выделенные локусы внутри субстрата, как описано в других местах в настоящем документе, с высокой точностью с минимальным перекрестным загрязнением. В некоторых случаях первый локус может получать менее чем 0,1% второго реагента, который предназначен для осаждения во второй локус, и аналогично, второй локус может получать менее чем 0,1% первого реагента. В некоторых случаях первый локус может получать менее чем примерно 0,5%, 0,45%, 0,4%, 0,35%, 0,3%, 0,25%, 0,2%, 0,15%, 0,1%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% или 0,01% второго реагента. Второй локус может получать менее чем примерно 0,5%, 0,45%, 0,4%, 0,35%, 0,3%, 0,25%, 0,2%, 0,15%, 0,1%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% или 0,01% первого реагента.

В некоторых случаях реагенты могут быть доставлены в каплях, которые имеют диаметр примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мкм. Капли реагентов могут иметь диаметр, который составляет менее чем около 2 мкм. Реагенты могут быть доставлены в каплях, которые имеют диаметр менее чем примерно 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60,

70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мкм. Реагенты могут быть доставлены в каплях, которые имеют диаметр в диапазоне 2-10, 2-5, 10-200, 10-150, 10-100, 10-500, 20-200, 20-150, 20-100, 30-100, 30-200, 30-150, 40-100, 40-80 или 50-60 мкм.

Капли реагентов можно осаждать со скоростью примерно или по меньшей мере примерно 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 или 5000 капель в секунду.

**«Мягкое приземление» (Soft Landing)**

Системы и способы, предназначенные для осаждения капель на множество микролунок, также описаны в настоящем документе. В одном аспекте капли можно осаждать на микролунку микрожидкостной системы, содержащей первую поверхность со множеством микролунок. Капля может иметь подходящее значение числа Рейнольдса, такое как около 1-1000, 1-2000, 1-3000, 0,5-1000, 0,5-2000, 0,5-3000, 0,5-4000, 0,5-5000, 1-500, 2-500, 1-100, 2-100, 5-100, 1-50, 2-50, 5-50 или 10-50, при котором турбулентность жидкостей уменьшается до минимального значения при достижении дна микролунки. Специалистам в данной области будет понятно, что значение числа Рейнольдса может находиться в пределах любого диапазона, ограниченного любыми из этих значений (например, от около 0,5 до около 500). Подходящие способы точного определения значений числа Рейнольдса в жидких системах описаны в Clift et al. (Clift, Roland, John R. Grace, and Martin E. Weber, Bubbles, Drops and Particles, 2005. Dover Publications) и Happel et al. (Happel, John and Howard Brenner, 1965. Prentice-Hall), которые включены здесь полностью в виде отсылки.

Плотность множества микролунок может составлять более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 или более на мм$^2$. Следуя способам, описанным здесь, капля жидкости может постепенно протекать через микролунку и мягко приземляться на дно микролунки.

Капли жидкости можно осаждать с использованием любых способов и систем, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления микрожидкостная система может дополнительно содержать струйный насос. Струйный насос можно использовать для осаждения капли жидкости на одну из множества микролунок. Различные варианты осуществления систем осаждения жидкостей описаны в других местах в настоящем документе.

В некоторых случаях микролунки могут иметь различную ширину, одинаковую ширину или комбинацию одинаковой или различной ширины в пределах подобластей субстрата. Микролунки могут иметь любую различную ширину. Например, без ограничения, ширина микролунки может составлять примерно, шире чем примерно или

уже чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкм.

Микролунки могут иметь любую различную длину. Например, без ограничения, длина микролунок может составлять примерно, длиннее чем примерно или короче чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 мкм.

Мкролунки могут находиться в жидкостном взаимодействии, по меньшей мере, с одним микроканалом. Микролунки могут иметь отношение площади поверхности к длине, или периметр, примерно, по меньшей мере примерно или менее чем примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкм.

Капли жидкости могут иметь объем, который является подходящим для описанных здесь способов. В некоторых вариантах осуществления капля может иметь объем, который составляет менее чем примерно 0,5 микролитров (мкд), менее чем примерно 1 мкл, менее чем примерно 1,5 мкл, менее чем примерно 2 мкл, менее чем примерно 2,5 мкл, менее чем примерно 3 мкл, менее чем примерно 3,5 мкл, менее чем примерно 4 мкл, менее чем примерно 4,5 мкл, менее чем примерно 5 мкл, менее чем примерно 5,5 мкл, менее чем примерно 6 мкл, менее чем примерно 6,5 мкл, менее чем примерно 7 мкл, менее чем примерно 7,5 мкл, менее чем примерно 8 мкл, менее чем примерно 8,5 мкл, менее чем примерно 9 мкл, менее чем примерно 9,5 мкл, менее чем примерно 10 мкл, менее чем примерно 11 мкл, менее чем примерно 12 мкл, менее чем примерно 13 мкл, менее чем примерно 14 мкл, менее чем примерно 15 мкл, менее чем примерно 16 мкл, менее чем примерно 17 мкл, менее чем примерно 18 мкл, менее чем примерно 19 мкл, менее чем примерно 20 мкл, менее чем примерно 25 мкл, менее чем примерно 30 мкл, менее чем примерно 35 мкл, менее чем примерно 40 мкл, менее чем примерно 45 мкл, менее чем примерно 50 мкл, менее чем примерно 55 мкл, менее чем примерно 60 мкл, менее чем примерно 65 мкл, менее чем примерно 70 мкл, менее чем примерно 75 мкл, менее чем примерно 80 мкл, менее чем примерно 85 мкл, менее чем примерно 90 мкл, менее чем примерно 95 мкл или менее чем примерно 100 мкл. В некоторых вариантах осуществления капля может иметь объем, который составляет около 0,5 микролитров (мкл), около 1 мкл, около 1,5 мкл, около 2 мкл, около 2,5 мкл, около 3 мкл, около 3,5 мкл, около 4 мкл, около 4,5 мкл, около 5 мкл, около 5,5 мкл, около 6 мкл, около 6,5 мкл, около 7 мкл, около 7,5 мкл, около 8 мкл, около 8,5 мкл, около 9 мкл, около 9,5 мкл, около 10

мкл, около 11 мкл, около 12 мкл, около 13 мкл, около 14 мкл, около 15 мкл, около 16 мкл, около 17 мкл, около 18 мкл, около 19 мкл, около 20 мкл, около 25 мкл, около 30 мкл, около 35 мкл, около 40 мкл, около 45 мкл, около 50 мкл, около 55 мкл, около 60 мкл, около 65 мкл, около 70 мкл, около 75 мкл, около 80 мкл, около 85 мкл, около 90 мкл, около 95 мкл или около 100 мкл.

В некоторых случаях микроканалы могут быть покрыты фрагментом, таким как химически инертный фрагмент, который повышает поверхностную энергию. Типы подходящих химически инертных или реакционноспособных фрагментов описаны в других местах в настоящем документе.

Значение числа Рейнольдса капли может находиться в пределах значений числа Рейнольдса, которые позволяют жидкости равномерно протекать через микролунки и/или микроканалы, как описано здесь. В некоторых вариантах осуществления значение числа Рейнольдса капли может составлять менее чем около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000. В некоторых вариантах осуществления значение числа Рейнольдса капли может составлять более чем около 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000. В некоторых случаях капли могут протекать через микролунки в режиме ламинарного течения или почти ламинарного течения.

Каплю можно наносить или осаждать со скоростью по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 м/сек или выше.

**Программируемое разделение**

Система, как описано здесь, может содержать множество выделенных локусов и множество выделенных колпачков реакторов, которые могут быть герметично соединены друг с другом с формированием множества выделенных реакторов. Множество выделенных реакторов может содержать реагенты. Уплотнение может быть обратимым или съемным, и множество выделенных колпачков реакторов может отсоединить от множества выделенных локусов. При отсоединении от первой поверхности, содержащей множество выделенных локусов, колпачки реакторов могут удерживать, по меньшей мере, часть реагентов. Путем контроля отсоединения колпачков реакторов от множества выделенных локусов можно контролировать разделение жидкости или реагентов. В одном аспекте настоящего изобретения способ разделения описан в настоящем документе. Способ может включать приведение в контакт первой поверхности, содержащей жидкость в первом множестве выделенных локусов, со второй поверхностью, содержащей второе множество выделенных локусов, таких как колпачки реакторов, при этом первая

поверхность может иметь первое поверхностное натяжение с жидкостью, вторая поверхность может иметь второе поверхностное натяжение с жидкостью, а также определение скорости отсоединения таким образом, чтобы желаемая доля жидкости могла быть перенесена из первого множества выделенных локусов во второе множество выделенных локусов. При отсоединении второй поверхности от первой поверхности при этой рассчитанной скорости желаемая доля содержимого реакторов может удерживаться в реакторах. Первая поверхность, содержащая первое множество выделенных локусов, может содержать множество выделенных локусов, которые покрыты олигонулеотидами. Вторая поверхность, содержащая второе множество выделенных локусов, может представлять собой прикрывающий элемент, содержащий множество колпачков реакторов. В некоторых случаях способ может дополнительно включать приведение в контакт третьей поверхности с третьим множеством выделенных локусов. Различные аспекты или варианты осуществления описаны в настоящем документе.

Жидкость, которая удерживается во второй поверхности, может удерживаться любыми способами, известными в данной области. В некоторых случаях первая или вторая поверхность может содержать микроканалы, удерживающие, по меньшей мере, часть жидкости. В некоторых случаях первая или вторая поверхность может содержать нанореакторы, удерживающие, по меньшей мере, часть жидкости. В некоторых случаях жидкость может удерживаться за счет различий в поверхностном натяжении между первой и второй поверхностью. Без привязки к теории полагают, что для жидкостей на водной основе более высокая доля жидкости может удерживаться на поверхности, которая имеет более высокую поверхностную энергию или является менее гидрофобной.

Жидкость может быть разделена таким образом, чтобы желательная доля реагентов могла удерживаться на первой или второй поверхности при высвобождении. Например, без ограничения, желательная доля может составлять примерно, по меньшей мере примерно или более чем примерно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%.

**Методы параллельного микрожидкостного смешивания**

В другом аспекте настоящего изобретения описаны способы смешивания жидкостей. Способы могут включать обеспечение первого субстрата, содержащего множество встроенных в него микроструктур; обеспечение второго субстрата, содержащего множество выделенных колпачков реакторов; выравнивание первого и второго субстратов таким образом, что колпачок первого реактора из множества выполнен с возможностью получать жидкость из n микроструктур в первом субстрате; и

доставку жидкости из n микроструктур в первый колпачок реактора, смешивая тем самым жидкость из n микроструктур с образованием смеси. Различные варианты осуществления и вариации описаны в настоящем документе.

Плотность выделенных колпачков реакторов может представлять собой любую подходящую плотность, которая обеспечивает желательное выравнивание микроструктур первого субстрата и колпачков реакторов второго субстрата. В некоторых случаях плотность выделенных колпачков реакторов может составлять по меньшей мере 1/мм$^2$. В некоторых случаях плотность выделенных реакторов может составлять около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 75, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700, около 800, около 900, около 1000, около 1500 или около 2000 участков на 1 мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления плотность выделенных реакторов может составлять по меньшей мере около 1, меньшей мере около 2, меньшей мере около 3, меньшей мере около 4, меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 400, по меньшей мере около 500, по меньшей мере около 600, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 900, по меньшей мере около 1000, по меньшей мере около 1500, по меньшей мере около 2000 или по меньшей мере около 3000 участков на 1 мм$^2$.

Микроструктуры могут находиться при любой плотности, подходящей в соответствии со способами и композициями согласно изобретению. В некоторых случаях микроструктуры могут находиться при плотности около, по меньшей мере около или менее чем около 1, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 50, около 75, около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 600, около 700, около 800, около 900, около 1000, около 1500, около 2000 или около 3000 участков на 1 мм$^2$. В некоторых вариантах осуществления микроструктуры могут находиться при плотности по меньшей мере 100 на 1 мм$^2$. В некоторых случаях микроструктуры могут иметь поверхностную плотность, которая является приблизительно такой же, как плотность выделенных реакторов.

В некоторых случаях имеется зазор, например зазор менее чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130,

140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мкм между первым и вторым субстратами после выравнивания первого и второго субстратов таким образом, что колпачок первого реактора из множества выполнен с возможностью получать жидкость из n микроструктур в первом субстрате.

В некоторых случаях смесь или жидкость может частично распространяться в зазор между первым и вторым субстратами после выравнивания первого и второго субстратов таким образом, что колпачок первого реактора из множества выполнен с возможностью получать жидкость из n микроструктур в первом субстрате. Жидкость или смесь, которая частично распространяется в зазор, может формировать капиллярный («capillary burst valve»). Способы смешивания могут дополнительно включать герметичное закрытие зазора путем сближения первого и второго субстратов. В некоторых случаях первый и второй субстраты могут находиться в прямом физическом контакте.

Множество микроструктур и выступов реакторов могут иметь любой подходящий дизайн или размеры, как описано более подробно в других местах в настоящем документе. По меньшей мере один канал может иметь поперечное сечение в форме круга, и может иметь радиус поперечного сечения, который составляет около, по меньшей мере около, менее чем около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мкм.

В некоторых случаях каналы могут быть покрыты фрагментом, таким как химически инертный фрагмент, который повышает поверхностную энергию, соответствующую углу контакта с водой, составляющему менее чем 90°. Поверхностную энергию или гидрофобность поверхности можно оценить или измерить путем измерения угла контакта с водой. Угол контакта с водой, который составляет менее 90°, может функционализировать твердую поверхность относительно гидрофильным образом. Угол контакта с водой, который составляет более чем 90°, может функционализировать твердую поверхность относительно гидрофобным образом. Высоко гидрофобные поверхности с низкой поверхностной энергией могут иметь углы контакта с водой больше, чем 120°. В некоторых случаях поверхность каналов или одного из двух каналов, как описано здесь, может быть функционализирована или модифицирована таким образом, чтобы быть гидрофобной, иметь низкую поверхностную энергию или иметь угол контакта с водой, который может составлять более чем около 90°, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120°, 125°, 130°, 135°, 140°, 145° или 150°, измеренный на неискривленной поверхности. В некоторых случаях поверхность каналов или одного из двух каналов, как описано здесь, может быть функционализирована или модифицирована таким образом, чтобы быть гидрофильной, иметь высокую поверхностную энергию или иметь угол

контакта с водой, который может составлять менее чем около 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° или 10°, измеренный на неискривленной поверхности. Поверхность каналов или одного из двух каналов может быть функционализирована или модифицирована таким образом, чтобы быть более гидрофильной или гидрофобной. В некоторых случаях поверхности первого и второго субстратов могут иметь различную поверхностную энергия с заданной жидкостью, такой как вода. В некоторых случаях поверхности первого и второго субстратов могут иметь дифференциальный угол контакта с водой около 5°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°. Другие способы функционализирования поверхности описаны в патенте США 6028189, который включен здесь полностью в виде отсылки.

В некоторых вариантах осуществления доставка может быть выполнена под действием давления. Доставка жидкости из n микроструктур в колпачок первого реактора может привести к смешиванию жидкости из n микроструктур и образованию смеси.

В некоторых случаях объем всей смешанной жидкости может быть больше, чем объем выступа реактора. Все поверхности или часть поверхностей выступа реактора, такая как поверхность ободка, могут быть модифицированы с использованием подходящих способов модификации поверхности, описанных более подробно в других местах в настоящем документе или известных из других источников в данной области. В некоторых случаях создаются неровности поверхности. Химические модификации и неровности поверхности служат для регулирования угла контакта ободка с водой. Аналогичные обработки поверхности могут быть произведены на поверхности субстрата, который приближен к колпачкам реакторов, формируюя уплотнение, например, обратимое уплотнение. Капиллярный клапан может быть использован между двумя поверхностями, как описано более подробно в других местах в настоящем документе. Обработки поверхности могут быть полезными для точного контроля таких уплотнений, содержащих капиллярные клапана.

В некоторых случаях снятие прикрывающего элемента с первой поверхности и снятие прикрывающего элемента из второй поверхности может быть выполнено с различной скоростью. Объем доли реагентов, которая удерживается при снятии прикрывающего элемента с соответствующей поверхности, может контролироваться скоростью или поверхностной энергией прикрывающего элемента и соответствующей поверхности. Различие в поверхностной энергии или гидрофобность прикрывающего элемента и соответствующей поверхности может служить параметром для контроля доли реагентов, которая удерживается при снятии. Объем первой и второй реакций может различаться.

**Последующие применения**

Способы и композиции согласно изобретению могут быть использованы для гибридизационных исследований нуклеиновой кислоты, таких как анализ экспрессии генов, генотипирование, гетеродуплексный анализ, анализ секвенирования нуклеиновых кислот на основе гибридизации, синтез ДНК, РНК, пептидов, белков или других олигомерных или неолигомерных молекул, комбинаторных библиотек для оценки кандидатных лекарственных средств.

ДНК и РНК, синтезированные в соответствии с изобретением, могут быть использованы для любого применения, например, зондов для методов гибридизации, таких как анализ генной экспрессии, генотипирование путем гибридизации (конкурентный гибридизационный и гетеродуплексный анализ), секвенирование путем гибридизации, зонды для Саузерн-блоттинга (меченые праймеры), зонды для матричной гибридизации (микроматрица или матрица фильтров), замыкающие кольцо зонды «padlock», используемые с переносящими энергию красителями для детекции гибридизации в анализах генотипирования или экспрессии, или другие типы зондов. ДНК и РНК, полученные в соответствии с изобретением, могут быть также использованы в реакциях на основе ферментов, таких как полимеразная цепная реакция (PCR), в качестве праймеров для PCR, матриц для PCR, технологий аллель-специфической PCR (генотипирование/гаплотипирование), PCR в режиме реального времени, количественная PCR, PCR с обратной транскриптазой и другие технологии PCR. ДНК и РНК могут быть использованы для различных технологий лигирования, включая генотипирование на основе лигирования, анализы олиго-лигирования (OLA), амплификация на основе лигирования, лигирование последовательностей адаптера для экспериментов по клонированию, дидеокси-секвенирование по Сенгеру (праймеры, меченые праймеры), высокопроизводительное секвенирование (с использованием электрофоретического разделения или других методов разделения), удлинение праймера, мини-секвенирования, и метод удлинения праймера на одно основание (Single base extensions, SBE). ДНК и РНК, полученные в соответствии с изобретением, могут быть использованы в исследованиях мутагенеза (введение мутации в известную последовательность с олиго), обратной транскрипции (получение копии кДНК транскрипта РНК), синтезе генов, введении сайтов рестрикции (форма мутагенеза), исследование связывания белок-ДНК и подобных экспериментах. Разнообразные другие применения ДНК и РНК, полученных с помощью способов согласно настоящему изобретению, будут предложены специалистами в данной области, и такие применения также рассматриваются как находящиеся в объеме настоящего изобретения.

**Компьютерные системы**

В различных вариантах осуществления способы и системы согласно изобретению могут дополнительно включать программное обеспечение для компьютерных систем и их применение. Таким образом, компьютеризированный контроль синхронизации функций дозирования/вакуума/повторного наполнения, такой как организация работы и синхронизация движения печатающей головки, действия дозатора и активации вакуума, находятся в объеме изобретения. Компьютерные системы могут быть программированы для связывания между заданной пользователем последовательностью основания и положением головки дозатора для доставки правильных реагентов в заданные области субстрата.

Компьютерная система 1900, представленная на фигуре 19, может рассматриваться как логический аппарат, который может считывать инструкции с носителя 1911 и/или сетевого порта 1905, который может быть необязательно соединен с сервером 1909, содержащим жесткий диск 1912. Система, такая, как показано на фигуре 19, может включать CPU 1901, дисковод 1903, необязательно устройства для ввода данных, такие как клавиатура 1915 и/или мышь 1916, и необязательно монитор 1907. Передача данных может быть достигнута посредством указанной среды передачи данных на сервер, расположенный локально или удаленно. Среда передачи информации может включать любые свредства передачи и/или получения данных. Например, среда передачи информации может представлять собой сетевое соединение, беспроводное соединение или интернет-соединение. Такое соединение может обеспечить передачу информации через всемирную компьютерную сеть. Предполагается, что данные, относящиеся к настоящему изобретению, могут передаваться по таким сетям или соединениям для приема и/или изучения стороной 1922, как показано на фигуре 19.

На фигуре 20 показана блок-диаграмма, иллюстрирующая первый пример архитектуры компьютерной системы 2000, которая может быть использована в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения. Как показано на фигуре 20, иллюстративная компьютерная система может включать процессор 2002 для обработки инструкций. Неограничивающие примеры процессоров включают: процессор Intel XeonTM, процессор AMD OpteronTM, процессор Samsung 32-bit RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0TM, процессор ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100TM, процессор ARM Cortex-A8 Apple A4TM, процессор Marvell PXA 930TM или функционально эквивалентный процессор. Множество потоков вычислений может быть использовано для параллельной обработки. В некоторых вариантах осуществления может быть использовано множество процессоров или процессоров со множеством ядер либо в одной

компьютерной системе, в кластере, или распределенных по системам по сети, содержащим множество компьютеров, мобильных телефонов и/или карманных компьютеров.

Как показано на фигуре 20, высокоскоростной кэш 2004 может быть соединен или встроен в процессор 2002 для обеспечения быстродействующего запоминающего устройства для инструкций или данных, которые недавно или часто использовались процессором 2002. Процессор 2002 соединен с северным мостом 2006 с помощью процессорной шины 2008. Северный мост 2006 соединен с запоминающим устройством с произвольной выбркой (RAM) 2010 с помощью шины зампоминающего устройства 2012 и контролирует доступ к RAM 2010 с помощью процессора 2002. Северный мост 2006 также соединен с южным мостом 2014 с помощью шины чипсета. В свою очередь, южный мост 2014 соединен с периферийной шиной 2018. Периферийная шина может представлять собой, например, PCI, PCI-X, PCI Express или другую периферийную шину. Северный мост и южный мост часто называются как чипсет процессора и контролируют передачу данных между процессором, RAM и периферийными компонентами на периферийной шине 2018. В некоторых альтернативных архитектурах функциональность северного моста может быть встроена в процессор вместо использования отдельного чипа северного моста.

В некоторых вариантах осуществления система 2000 может включать плату акселератора 2022, присоединенную к периферийной шине 2018. Акселератор может включать программируемые пользователем вентильные матрицы (Field programmable gate arrays, FPGA) или другие аппаратные средства для ускорения определенной обработки. Например, акселератор может быть использован для адаптивной реструктуризации данных или для оценки алгебраических выражений, используемых в обработке расширенных наборов.

Программное обеспечение и данные хранятся на внешнем запоминающем устройстве 2024 и могут быть загружены в RAM 2010 и/или кэш 2004 для использования процессором. Система 2000 включает операционную систему для управления системными ресурсами; неограничивающие примеры операционных систем включают: Linux, WindowsTM, MACOSTM, BlackBerry OSTM, iOSTM и другие функционально эквивалентные операционные системы, а также применение программного обеспечения, работающего на операционной системе, для управления хранением данных и оптимизации в соответствии с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения.

В этом примере система 2000 также включает сетевые интерфейсные карты (NIC) 2020 и 2021, соединенные с периферийной шиной для обеспечения сетевых интерфейсов

внешнего запоминающего устройства, такого как сетевое устройство хранения данных (Network Attached Storage, NAS), и других компьютерных систем, которые могут быть использованы для распределенной параллельной обработки.

На фигуре 21 представлен схема, на которой показана сеть 2100 со множеством компьютерных систем 2102a и 2102b, множество мобильных телефонов и карманных компьютеров 2102c, и сетевое устройство хранения данных (NAS) 2104a и 2104b. В иллюстративных вариантах осуществления системы 2102a, 2102b и 2102c могут контролировать хранение данных и оптимизировать доступ к данным, хранящимся в сетевом устройстве хранения данных (NAS) 2104a и 2104b. Математическая модель может быть использована для данных и вычисляться с использованием распределенной параллельной обработки на компьютерных системах 2102a и 2102b, и системах мобильных телефонов и карманных компьютеров 2102c. Компьютерные системы 2102a и 2102b, и системы мобильных телефонов и карманных компьютеров 2102c могут также обеспечивать параллельную обработку для адаптивной реструктуризации данных, хранящихся в сетевом устройстве хранения данных (NAS) 2104a и 2104b. На фигуре 21 показан лишь пример, и широкое разнообразие других компьютерных архитектур и систем может быть использовано в сочетании с различными вариантами осуществления настоящего изобретения. Например, blade-сервер может быть использован для обеспечения параллельной обработки. «Лезвия» процессора могут быть соединены посредством соединительной платы для обеспечения параллельной обработки. Запоминающее устройство также может быть соединено с соединительной платой или как сетевое устройство хранения данных (NAS) посредством отдельного сетевого интерфейса.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления процессоры могут содержать отдельные пространства памяти и передавать данные через сетевые интерфейсы, соединительную плату или другие коннекторы для параллельной обработки другими процессорами. В других вариантах осуществления некоторые или все процессоры могут использовать совместное адресное пространство виртуальной памяти.

На фигуре 22 показана блок-диаграмма многопроцессорной вычислительной системы 2200, в которой используется совместное адресное пространство виртуальной памяти в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. Система включает множество процессоров 2202a-f, которые имеют доступ к подсистемам с совместно используемой памятью 2204. Система включает множество алгоритмических процессоров (Memory algorithm processors, MAP) программируемого аппаратного обеспечения 2206a-f в подсистеме памяти 2204. Каждый MAP 2206a-f может содержать память 2208a-f и одну

или несколько программируемых пользователем вентильных матриц (Field programmable gate arrays, FPGA) 2210a-f. MAP обеспечивает конфигурируемый функциональный блок и, в частности, алгоритмы или части алгоритмов могут быть обеспечены для FPGA 2210a-f для обработки в тесной кооридинации с соответствующим процессором. Например, MAP могут быть использованы для оценки алгебраических выражений, касающихся модели данных и для выполнения адаптивной реструтуризации данных в иллюстративных вариантах осуществления. В этом примере каждый MAP является глобально доступным для всех процессоров в этих целях. В одной конфигурации каждый MAP может использовать прямой доступ к памяти (Direct Memory Access, DMA) для доступа к ассоциативной памяти 2208a-f, позволяя ей выполнять задачи независимо и асинхронно от соответствующего микропроцессора 2202a-f. В этой конфигурации MAP может направлять результаты напрямую в другой MAP для конвейерной обработки и параллельного выполнения алгоритмов.

Указанные выше компьютерные архитектуры и системы являются лишь примерами, и может быть использовано широкое разнообразие других архитектур и систем компьютеров, мобильных телефонов и карманных компьютеров в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления, включая системы с использованием любой комбинации стандартных процессоров, сопроцессоров, FPGA и других программируемых логических устройств, систем на кристаллах (System on chips, SOC), специализированных интегральных микросхем (Application specific integrated circuits, ASIC) и других обрабатывающих и логических элементов. В некоторых вариантах осуществления вся или часть компьютерной системы может быть реализована в программном обеспечении или аппаратном обеспечении. Любые устройства хранения данных могут быть использованы в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления, включая запоминающее устройство с произвольной выборкой, жесткие диски, флэш-память, ленточные накопители, дисковые массивы, сетевые устройства хранения данных (NAS) и другие локальные или распределенные устройства и системы хранения данных.

В иллюстративных вариантах осуществления компьютерная система может быть реализована с использованием модулей систем программного обеспечения, выполняемых в любых из указанных выше или других компьютерных архитектур и систем. В других вариантах осуществления функции сустемы могут быть реализованы частично или полностью во встроенном программном обеспечении, программируемых логических устройствах, таких как программируемые пользователем вентильные матрицы (FPGA), как показано на фигуре 22, системы на кристаллах (SOC), специализированные

интегральные микросхемы (ASIC), или других обрабатывающих и логических элементах. Например, установка процессора и оптимизатора может быть реализована с аппаратным ускорением посредством использования платы аппаратного ускорителя, такой как плата усориеля 122, показанная на фигуре 20.

**ПРИМЕР 1: Предварительная обработка кремниевой пластины для создания микролунки**

Кремниевые пластины подвергают травлению для создания иллюстративного субстрата, содержащего множество микролунок, с использованием метода предварительной обработки, как показано на фигуре 23. Начиная с SOI субстрата со слоем оксида на обеих поверхностях субстрата, слой фоторезиста наносят с использованием метода фотолитографии на обрабатываемую сторону субстрата на предпочтительные участки. После нанесения фоторезиста глубокое реактивное ионное травление (DRIE) выполняют на обрабатываемой стороне до достижения слоя оксида в середине пластины. Затем покрытие фоторезиста снимают, проявляя лежащий под ним слой оксида. Аналогично, второй слой фоторезиста наносят методом фотолитографии на субстрат со стороны устройства на предпочтительные участки с подходящими диаметрами. После нанессения второго слоя фоторезиста снова выполняют DRIE на кремниевой пластине со стороны устройства до достижения слоя оксида в середине кремниевой пластины. Затем фоторезист и слой окида в середине пластины удаляют. В заключение, оксид наносят на всю поверхность пластины, создавая кремниевую пластину со множеством микроструктур, каждая из которых содержит микролунку большего размера и один или несколько микроканалов, находящихся в жидкостном взаимодействии с микролункой.

**ПРИМЕР 2: Окончательная обработка кремниевой пластины для функционализирования отобранной поверхности микролунки**

Кремниевую пластину с протравленными микролунками затем обрабатывают для функционализирования выбранных частей микролунок с использованием метода окончательной обработки, как показано на фигуре 24. В качестве исходного материала для покрытия только поверхности микролунки меньшего размера, находящейся в пределах микролунки, активным функционализирующим агентом, который повышает поверхностную энергию, используют продукт, полученный в примере 1. Каплю фоторезиста осаждают на микроканал с использованием струйного принтера, как описано здесь. Капля фоторезиста заполняет микроканал, находящийся в жидкостном взаимодействии с микролункой. После осаждения фоторезиста выполняют травление в плазме кислорода для подтравливания («etch back») избыточного фоторезиста, оставляя более ровную поверхность фоторезиста, как показано на фигуре 24. Слой химически

инертного фрагмента наносят на все экспонированные поверхности кремниевой пластины для создания слоя пассивного функционализирования с низкой поверхностной энергией. После этого фоторезист снимают, проявляя поверхность микроканала меньшего размера, находящегося в жидкостном взаимодействии с микролункой. После удаления фоторезиста слой агента активного функционализирования наносят на поверхность микроканала меньшего размера для увеличения поверхностной энергии поверхности микролунки и/или для обеспечения химии поверхности для олигонуклеотидного роста. Ранее функционализированные поверхности остаются по существу незатронутыми вторым применением функционализирования поверхности. В результате на твердом субстрате получают множество микролунок с функционализированием первой поверхности, каждая из которых находится в жидкостном взаимодействии с одним или несколькими микроканалами, и с функционализированием второй поверхности.

**ПРИМЕР 3: Микрожидкостное устройство**

Микрожидкостное устройство, содержащее по существу планарную часть субстрата, изготавливали в соответствии со способами и композициями согласно изобретению, как показано на фигуре 25D. Попереченое сечение субстрата показано на фигуре 25E. Субстрат содержит кластеры 108, при этом каждый кластер содержит 109 группировок жидкостных соединений. Каждая группировка содержит 5 вторых каналов, проходящих из первого канала. На фигуре 25A представлен вид со стороны устройства каждого кластера, содержащего 109 группировок. На фигуре 25C представлен вид с обрабатываемой стороны кластеров фигуры 25A. На фигуре 25B показан вид в разрезе фигуры 25A, показывающий ряд из 11 группировок. На фигуре 25F представлен еще один вид субстрата, показанного на фигуре 25D, где показано положение метки. Фигура 25G представляет собой развернутый вид фигуры 25A, указывающей 109 группировок кластеров.

Как показано на фигурах 25A и 25C, 109 группировок расположены в виде смещенных рядов с формированием кластера в рисунок, подобный кругу, при этом индивидуальные области не перекрываются друг с другом. Индивидуальные группировки формируют круг. Как указано поз. 2503, расстояние между тремя рядами этих группировок составляет 0,254 мм. Как показано поз. 2506, расстояние между двумя группировками в ряду группировок составляет 0,0978 мм. Поперечное сечение первого канала в группировке, как показано поз. 2504, составляет 0,075 мм. Поперечное сечение каждого второго канала в группировке, как показано поз. 2505, составляет 0,020 мм. Длина первого канала в группировке, как показано поз. 2502, составляет 0,400 мм. Длина каждого второго канала в группировке, как показано 2501, составляет 0,030 мм.

Кластеры из 109 группировок, показанные на фигурах 25A и 25C, организованы в конформацию, подходящую для помещения в одну реакционную лунку, которая может быть помещена рядом с кластером, показанным на фигурах 25A и 25C. Остальные кластеры на фигуре 25D аналогичным образом организованы таким образом, чтобы способствовать доставке в ряд реакционных лунок, например, нанореакторный планшет, описанный на фигуре 26 и в примере 4. Субстрат содержит 108 реакционных лунок, обеспечивая 11772 группировки.

Ширина субстрата вдоль одного направления, как указано поз. 2508, составляет 32,000 мм. Ширина субстрата вдоль другого направления, как указано поз. 2519, составляет 32,000 мм.

По существу планарная часть субстрата, как показано на фигуре 25D, содержит 108 кластеров группировок. Кластеры организованы в ряды, формируя квадратную форму. Самое дальнее расстояние от центра кластера до начальной точки в одном направлении, как позазано поз. 2518, составляет 24,467 мм. Самое дальнее расстояние от центра кластера до начальной точки в другом направлении, как указано поз. 2509, составляет 23,620 мм. Самое близкое расстояние от центра кластера до начальной точки в одном направлении, как показано поз. 2517, составляет 7,533 мм. Самое близкое расстояние от центра кластера до начальной точки в другом направлении, как показано поз. 2512, составляет 8,380 мм. Расстояние между центрами двух кластеров в одном и том же ряду, как показано поз. 2507 и поз. 2522, составляет 1,69334 мм.

Субстрат содержит 3 отметки совмещения для содействия выравниванию микрожидкостного устройства с другими компонентами системы. Первая отметка совмещения расположена около начальной точки, при этом отметка совмещения расположена ближе к начальной точке, чем любой кластер. Первая отметка совмещения расположена на расстоянии 5,840 мм от начальной точки в одном направлении (2516) и на расстоянии 6,687 мм от начальной точки в другом направлении (2513). Первая отметка совмещения расположена на расстоянии 1,69334 мм от кластера в одном направлении (2515) и на расстоянии 1,69344 мм от этого же самого кластера в другом направлении (2514). Две другие отметки совмещения, каждая, расположены на расстоянии 0,500 мм от края субстрата 92510 и 2520) и на расстоянии 16,000 мм (2511 и 2521) от начальной точки.

Попереченое сечение субстрата показано на фигуре 25E, при этом общая длина группировки, как указано поз. 2523, составляет 0,430 мм.

Другой вид субстрата показан на фигуре 25F, на которой показано расположение 108 кластеров и положение метки. Метка расположена на расстоянии 1,5 мм (2603) от

края субстрата. Метка расположена на расстоянии от 4,0 мм (2602) до 9,0 мм (2601), измеренном от начальной точки.

**ПРИМЕР 4: Нанореактор**

Нанореактор изготовлен в соответствии со способами и композициями согласно изобретению, как показано на фигурах 26B и 26C. Поперечное сечение нанореактора показано на фигуре 26A. Нанореактор содержит 108 лунок. На фигуре 26D представлен вид нанореактора со стороны несущего толстого слоя. На фигуре 26E представлен другой вид нанореактора, показанного на фигуре 26B, при этом показано положение метки.

Как показано на фигуре 26B, 108 лунок организованы в ряды с формированием квадратного рисунка, при этом индивидуальные лунки приподняты из основания нанореактора. Как показано поз. 2711, расстояние между центрами двух лунок в ряду лунок составляет 1,69334 мм. Поперечное сечение внутри лунки, как показано поз. 2721, составляет 1,15 мм. Поперечное сечение лунки, включая ободок лунки, как показано поз. 2720, составляет 1,450 мм. Высота лунки в нанореакторе, как показано поз. 2702, составляет 0,450 мм. Общая высота нанореактора, как показано поз. 2701, составляет 0,725 мм.

Лунки на фигуре 26B расположены таким образом, чтобы содействовать доставке из микрожидкостного устройства, содержащего 108 лунок, как проиллюстрировано фигурой 26, в 108 реакционных лунок нанореактора.

Ширина нанореактора вдоль одного направления, как показано поз. 2703, составляет 24,000 мм. Ширина нанореактора вдоль другого направления, как показано поз. 2704, составляет 24,000 мм.

Нанореактор, как показано на фигуре 26B, содержит 108 лунок. Лунки организованы в ряды, формируя квадратную форму. Самое дальнее расстояние от центра лунки до начальной точки в одном направлении, как показано поз. 2706, составляет 20,467 мм. Самое дальнее расстояние от центра лунки до начальной точки в другом направлении, как указано поз. 2705, составляет 19,620 мм. Самое близкое расстояние от центра лунки до начальной точки в одном направлении, как показано поз. 2710, составляет 3,533 мм. Самое близкое расстояние от центра лунки до начальной точки в другом направлении, как показано поз. 2709, составляет 4,380 мм. Расстояние между центрами двух лунок в одном и том же ряду, как показано поз. 2711 и поз. 2712, составляет 1,69334 мм. Расстояние от центра лунки до края нанореактора в одном направлении, как показано поз. 2707, составляет 3,387 мм. Расстояние от центра лунки до края нанореактора в другом направлении, как показано поз. 2708, составляет 2,540 мм.

Нанореактор содержит 3 отметки совмещения со стороны рабочего тонкого слоя для содействия выравниванию нанореактора с другими компонентами системы, например, микрожидкостным устройством, как описано в примере 3. Первая отметка совмещения расположена около начальной точки, при этом отметка совмещения расположена на более близком расстоянии к начальной точке, чем любая лунка. Первая отметка совмещения расположена на расстоянии 1,840 мм от начальной точки в одном направлении (2717) и на расстоянии 2,687 мм от начальной точки в другом направлении (2716). Первая отметка совмещения расположена на расстоянии 1,6933 мм от лунки в одном направлении (2719) и на расстоянии 1,6934 мм от этой же самой лунки в другом направлении (2718). Две другие отметка совмещения, каждая, расположены на расстоянии 0,500 мм от края нанореактора (2714 и 2715) и на расстоянии 12,000 мм (2713) от начальной точки.

Нанореактор содержит 4 отметки совмещения на стороне несущего толстого слоя, как показано на фигуре 26D. Расстояние от центра или отметки совмещения и ближайшего угла нанореактора в одном направлении составляет 1,000 мм (поз. 2722 и поз. 2723). Длина отметки совмещения в одном направлении составляет 1,000 мм (поз. 2724 и поз. 2725). Ширина отметки совмещения, как показано поз. 2726, составляет 0,050 мм.

Другой вид нанореактора представлен на фигуре 26E, на которой показано расположение 108 лунок и положение метки. Метка расположена на расстоянии 1,5 мм (2728) от края нанореактора. Метка расположена на расстоянии 1,0 мм (2727) от угла нанореактора. Метка имеет длину 9,0 мм (2726).

**ПРИМЕР 5: Изготовление устройства для синтеза олигонуклеотидов**

Пластину со структурой кремний-на-изоляторе (SOI) с рабочим тонким слоем толщиной около 30 мкм и несущим толстым слоем толщиной около 400 мкм, между которыми расположен электроизоляционный слой диоксида кремния, подвергают травлению для создания иллюстративного субстрата, описанного в примере 3, содержащего множество элементов, имеющих трехмерные микрожидкостные соединения, с использованием метода предварительной обработки, как показано на фигуре 28. На фигуре 27 показан подробный дизайн элементов устройства. Пластину SOI окисляют для покрытия ее термическим оксидом на обеих поверхностях (фигура 28A). Фотолитографию применяют на стороне рабочего тонкого слоя для создания маски фоторезиста (красная), как показано на фигуре 28B. Стадию глубокого реактивного ионного травления (DRIE) используют для травления вертикальных боковых стенок на глубину около 30 мкм до слоя оксида SOI (фигура 28C) на участках, свободных от фоторезиста. Фоторезист снимают с использованием стандартного процесса снятия резиста, известного в данной области.

Фотолитографию, DRIE и снятие фоторезиста повторяют на стороне несущего толстого слоя (фигуры 28E-G) для создания желательного рисунка в соответствии с устройством, описанным в примере 3. Углубленный оксид (BOX) удаляют с использованием процесса жидкостного травления (фигура 28G). Загрязняющие фторполимеры, которые могут осаждаться на боковые стенки микрожидкостных элементов, удаляют путем термического окисления. Термическое окисление удаляют с использованием процесса жидкостного травления.

Подергнутые травлению пластины SOI подвергают стадиям обработки, как описано на фигуре 29.

Во-первых, пластину очищают на стадии мокрой очистки с использованием раствора «пираньи» с последующим подерганием воздействию сухой $O_2$ плазмы. Слой чипа на стороне рабочего тонкого слоя (на верхней части на фигуре 29B) покрывают фоторезистом в ходе процесса, который осуществляется путем капиллярного проникания в каналы рабочего тонкого слоя, которые имеют ширину около 20 мкм. Фоторезист структурируют с использованием фотолитографии для воздействия на участки, которые желательно оставить пассивными (без будущего олигонуклеотидного синтеза). Этот процесс проводят путем воздействия на резист света через бинарную маску, которая имеет необходимый рисунок. После экспозиции резист в подвергнутых воздействию областях удаляют проявляющим раствором (фигура 29C).

Поверхности без фоторезиста обрабатывают газообразным фторсиланом путем химического осаждения в газовой фазе (CVD). Это приводит к осаждению фтоуглерода на поверхностях без фоторезиста. В альтернативных применениях для этой стадии используют органосилоксан. Силанизированные поверхности не взаимодействуют с дополнительными слоями силана, образуя на поверхности монослой. Фоторезист затем растворяют в органическом растворителе, оставляя поверхность фторированной на поверхности и проявляя кремний/диоксид кремния, находящийся под фоторезистом. Конечную стадию активного функционализирования выполняют для получения поверхности для олигонуклеотидного роста (фигура 29F).

Контролируемая поверхностная плотность гидроксильных групп (фигура 30) была достигнута на поверхности с помощью жидкостного процесса с использованием 1% раствора N-(3-TRIETHOXYSILYLPROPYL-4HYDROXYBUTYRAMIDE в этаноле и уксусной кислоте в течение 4 часов с последующим помещением чипов на горячую плиту при 150 °C на 14 часов. В альтернативных применениях CVD процесс выполняют путем доставки силана на поверхность в газообразном состоянии и приложения давления управляемого осаждения около 200 mTor и контролируемой температуры около 150 °C.

CVD-процесс обеспечивает плазменную очистку in-situ и хорошо подходит для получения высоко упорядоченных самособирающихся монослоев (SAM).

На фигуре 31 показано изображение устройства, изготовленного в соответствии с описанными выше способами.

**ПРИМЕР 6. Изготовление нанореакторного устройства**

Изготавливают чип нанореактора с нанолунками, как описано на фигуре 32. Кремниевую пластину подходящего размера окисляют для покрытия ее термическим оксидом на обеих поверхностях (фигура 33A).

Фотолитографию применяют на задней стороне для создания маски фоторезиста (красная), как показано на фигуре 33B. Заднюю сторону травят на участках, не содержащих фоторезист, за пределами слоя термического оксида, создавая неглубокие лунки (фигура 33C). Фоторезист снимают с использованием стандартного процесса снятия резиста, известного в данной области (фигура 33D).

Стадию фотолитографии повторяют на фтонтальной стороне в соответствии с рисунком на фигуре 33E. Стадию глубокого реактивного ионного травления (DRIE) используют для травления вертикальных боковых стенок до глубины около 450 мкм с использованием регулируемого по времени травления. В других случаях используют пластину SOI, и слой с обрабатываемой стороны протравливают до BOX, при этом BOX может служить для остановки травления (фигура 33F). Фоторезист на фтонтальной стороне снимают (фигура 33G), генерируя желаемый рисунок в соответствии с устройством, описанным на фигуре 32. Загрязняющие фторполимеры, которые могут осаждаться на боковые стенки микрожидкостных элементов, удаляют путем термического окисления, и термическое окисление удаляют с использованием процесса жидкостного травления (фигура 33H).

Затем пластину очищают на стадии мокрой очистки с использованием раствора «пиранья» с последующим подерганием воздействию сухой $O_2$ плазмы (фигура 34A). Резист затем осаждают на индивидуальные лунки с использованием системы осаждения микрокапли (поверх, на фигуре 34B). Поверхности без фоторезиста обрабатывают газообразным фторсиланом путем химического осаждения в паровой фазе (CVD; фигура 34C). Это приводит к осаждению фтоуглерода на поверхностях без фоторезиста. В альтернативных применениях для этой стадии используют органосилоксан или другие типы силанов. Силированные поверхности не взаимодействуют с дополнительными слоями силана, образуя на поверхности монослой. Фоторезист затем растворяют в органическом растворителе, оставляя поверхность фторированной и проявляя поверхность кремния, находящегося под фоторезистом.

На фигуре 35 A-B показаны нанолунки в нанореакторном устройстве, изготовленные, как описано выше.

**ПРИМЕР 7: Синтез 50-mer последовательности на 2D устройстве для синтеза олигонуклеотидов**

Двумерное устройство для синтеза олигонуклеотидов собирают в проточной кювете, при этом устройство является соединенным с проточной клюветой (Applied Biosystems (ABI394 DNA Synthesizer"). Двумерное устройство для синтеза олигонуклеотидов, равномерно функционализированное N-(3-TRIETHOXYSILYLPROPYL)-4-HYDROXYBUTYRAMIDE (Gelest, shop.gelest.com/Product.aspx?catnum=SIT8189.5&Index=0&TotalCount=1), использовали для синтеза иллюстративного олигонуклеотида длиной 50 bp (пар оснований) («олигонуклеотида 50-mer») с использованием описанных здесь способов синтеза.

Последовательность 50-mer представляет собой такую, как описано в SEQ ID NO.: 1.

5'AGACAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTCGGCAT## TTTTTTTTTT3' (SEQ ID NO.: 1), где # обозначает тимидин-сукцинил гексамид CED фосфорамидит (CLP-2244 от фирмы ChemGenes), который представляет собой расщепляемый линкер, обеспечивающий высвобождение олигонуклеотида с поверхности во время депротекции.

Синтез проводят с использованием стандартной химии синтеза ДНК (связывание, кэппирование, окисление и деблокирование) в соответствии с протоколом, представленным в таблице 3, и синтезатора ABI.

Таблица 3:

| | **Таблица 3** | |
|---|---|---|
| **Общий процесс синтеза ДНК, наименование** | **Стадия процесса** | **Время (сек)** |
| **ПРОМЫВКА** (промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 23 |
| | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| **ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ ДНК** (Фосфорамидит + поток активатора) | Промывка манифольда активатора | 2 |
| | Активатор в проточную кювету | 6 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 6 |

**Таблица 3**

| **Общий процесс синтеза ДНК, наименование** | **Стадия процесса** | **Время (сек)** |
|---|---|---|
| | Активатор в проточную кючету | 0.5 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 5 |
| | Активатор в проточную кювету | 0.5 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 5 |
| | Активатор в проточную кювету | 0.5 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 5 |
| | Инкубация в течение 25 сек | 25 |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| **ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ ДНК (Фосфорамидит + поток активатора)** | Промывка манифольда активатора | 2 |
| | Активатор в проточную кювету | 5 |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 18 |
| | Инкубация в течение 25 сек | 25 |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| **КЭППИРОВАНИЕ** (Кэп A+B, 1:1, поток) | Кэп A+B в проточную кювету | 15 |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |

**Таблица 3**

| **Общий процесс синтеза ДНК, наименование** | **Стадия процесса** | **Время (сек)** |
|---|---|---|
| **ОКИСЛЕНИЕ** (поток окислителя) | Окислитель в проточную кювету | 18 |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 23 |
| | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| **ДЕБЛОКИРОВАНИЕ** (поток деблокирующего агента) | Деблокирующий агент в проточную кювету | 36 |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 18 |
| | Промывка системы N2 | 4.13 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4.13 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |

Комбинацию фосфорамидит/активатор доставляют аналогично доставке массы реагентов через проточную кювету. Стадии сушки не выполняют, так как среда остается «влажной» в течение всего периода времени.

Ограничитель потока удаляют из синтезатора ABI 394 для обеспечения более высокой скорости потока. Без ограничителя потока показатели скорости потока для амидитов (0,1М раствор в ACN), активатора (0,25М раствор бензоилтиотетразола («BTT»; 30-3070-xx от фирмы GlenResearch) в ACN) и Ox (0,02М раствор $I_2$ в смеси 20% пиридина,

10% воды и 70% THF) составляют приблизительно ~100 мкл/сек, для ацетонитрила («ACN») и кэппирующих реагентов (смесь 1:1 CapA и CapB, где CapA представляет собой уксусный ангидрид в смеси THF/пиридин, и CapB представляет собой 16%-ный раствор 1-метилимидизола в THF) приблизительно ~200 мкл/сек и для деблокирующего агента (3%-ный раствор дихлоруксусной кислоты в толуоле) приблизительно ~300 мкл/сек (по сравнению с ~50 мкл/сек для всех реагентов с ограничителем потока).

Фиксируют время полного вытеснения окислителя, соответственно регулируют по времени химические потоки и дополнительную промывку ацетонитрилом (ACN) вводят между различными химическими соединениями.

После синтеза олигонуклеотидов снимают защиту с чипа в газообразном аммиаке в течение ночи при 75 psi. На поверхность наносят пять капель воды для извлечения олигонуклеотидов (фигура 45A). Извлеченные олигонуклеотиды затем подвергают анализу на BioAnalyzer small RNA chip (фигура 45B).

**ПРИМЕР 8: Синтез 100-mer последовательности на 2D устройстве для синтеза олигонуклеотидов**

Такой же процесс, как описано в примере 7 для синтеза 50-mer последовательности использовали для синтеза 100-mer олигонуклеотида («100-mer олигонуклеотид»; 5' CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTT GCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAACCCCGCA T##TTTTTTTTTT3', где # означает тимидин-сукцинил гексамид CED фосфорамидит (CLP-2244 от фирмы ChemGenes); SEQ ID NO.: 2) на двух различных кремниевых чипах, при этом первый однородно функционализирован N-(3-ТРИЭТОКСИСИЛИЛПРОПИЛ)-4-ГИДРОКСИБУТИРАМИДОМ, и второй функционализирован смесью 5/95 11-ацетоксиундецилтриэтоксисиланом и n-децилтриэтоксисиланом, и олигонуклеотиды, снятые с поверхности, анализировали на биоанализаторе BioAnalyzer (фигура 46).

Все десять образцов из двух чипов затем амплифицировали методом PCR с использованием прямого (5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'; SEQ ID NO.: 3) и обратного (5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'; SEQ ID NO.: 4) праймеров в 50 мкл смеси для проведения PCR (25 мкл NEB Q5 Мастермикс, 2,5 мкл 10 мкМ прямого праймера, 2,5 мкл 10 мкМ обратного праймера, 1 мкл олигонуклеотида, снятого с поверхности, и до 50 мкл воды) с использованием следующего циклического температурного режима:

98 °C, 30 сек

98 °C, 30 сек; 63 °C, 10 сек; 72 °C, 10 сек; 12 повторных циклов

72 °C, 2 мин

Продукты PCR также анализировали на BioAnalyzer (фигура 47), которые показали острые пики в положении 100-mer.

Затем PCR-амплифицированные образцы клонировали и подвергали секвенированию по Сенгеру. В таблице приведены обобщенные результаты секвенирования по Сенгеру образцов, взятых из точек 1-5 из чипа 1, и для образцов, взятых из точек 6-10 из чипа 2.

**Таблица 4:**

| **Точка** | **Частота появления ошибок** | **Эффективность цикла** |
|---|---|---|
| 1 | 1/763 bp | 99,87% |
| 2 | 1/824 bp | 99,88% |
| 3 | 1/780 bp | 99,87% |
| 4 | 1/429 bp | 99,77% |
| 5 | 1/1525 bp | 99,93% |
| 6 | 1/1615 bp | 99,94% |
| 7 | 1/531 bp | 99,81% |
| 8 | 1/1769 bp | 99,94% |
| 9 | 1/854 bp | 99,88% |
| 10 | 1/1451 bp | 99,93% |

Таким образом, высокое качество и однородность синтезированных олигонуклеотидов повторялись на двух чипах с различной химией поверхности. Всего 89% последовательностей, соответствующих 233 из 262 секвенированных 100-mer последовательностей, оказались превосходными и не содержали ошибок.

На фигурах 48 и 49 показаны карты выравнивания для образцов, взятых соответственно из точек 8 и 7, где «x» обозначает делецию одного основания, «зведочка» означает мутацию одного основания и «+» означает точки низкого качества в секвенировании по Сенгеру. Выровненные последовательности на фигуре 48 вместе представляют частоту ошибок около 97%, при этом 28 из 29 прочтений соответствуют отличным последовательностям. Выровненные последовательности на фигуре 49 вместе представляют частоту ошибок около 81%, при этом 22 из 27 прочтений соответствуют отличным последовательностям.

В итоге, в таблице 5 приведены обобщенные ключевые характеристики ошибок для последовательностей, полученных из образцов олигонуклеотидов из точек 1-10.

**Таблица 5:**

| ID образца/ no. точки | OSA_0046/ 1 | OSA_0047/ 2 | OSA_0048/ 3 | OSA_0049/ 4 | OSA_0050/ 5 | OSA_0051/ 6 | OSA_0052/ 7 | OSA_0053/ 8 | OSA_0054/ 9 | OSA_0055/1 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Всего последо-вательностей | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| Качество секвенирова-ния | 25 из 28 | 27 из 27 | 26 из 30 | 21 из 23 | 25 из 26 | 29 из 30 | 27 из 31 | 29 из 31 | 28 из 29 | 25 из 28 |
| Качество олиго | 23 из 25 | 25 из 27 | 22 из 26 | 18 из 21 | 24 из 25 | 25 из 29 | 22 из 27 | 28 из 29 | 26 из 28 | 20 из 25 |
| ROI Кол-во соответствий | 2500 | 2698 | 2561 | 2122 | 2499 | 2666 | 2625 | 2899 | 2798 | 2348 |
| ROI Мутация | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| ROI Делеция множества оснований | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ROI Малые вставки | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ROI Делеция одного основания | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Кол-во крупных делеций | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Мутация: G>A | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| Мутация: T>C | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ROI Кол-во ошибок | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 |
| ROI Частота ошибок | Ошибка: ~1 в 834 | Ошибка: ~1 в 1350 | Ошибка: ~1 в 1282 | Ошибка: ~1 в 708 | Ошибка: ~1 в 2500 | Ошибка: ~1 в 2667 | Ошибка: ~1 в 876 | Ошибка: ~1 в 2900 | Ошибка: ~1 в 1400 | Ошибка: ~1 в 2349 |
| ROI Частота ошибок минус праймер | Ошибка минус праймер: ~1 в 763 | Ошибка минус праймер: ~1 в 824 | Ошибка минус праймер: ~1 в 780 | Ошибка минус праймер: ~1 в 429 | Ошибка минус праймер: ~1 в 1525 | Ошибка минус праймер: ~1 в 1615 | Ошибка минус праймер: ~1 в 531 | Ошибка минус праймер: ~1 в 1769 | Ошибка минус праймер: ~1 в 854 | Ошибка минус праймер: ~1 в 1451 |

**ПРИМЕР 9: Синтез 100-mer последовательности на 3D устройстве для синтеза олигонуклеотидов**

Трехмерное устройство для синтеза олигонуклеотидов, как описано в примере 3, которое дифференциально функционализировано смесью 5/95 11-ацетоксиундецилтриэтоксисилана и n-децилтриэтоксисилана, на активных участках для синтеза собирали в проточной кювете для синтеза 100-mer олигонуклеотида примера 8 с использованием описанных здесь способов синтеза олигонуклеотидов. Синтез проводили с использованием стандартной химии для синтеза ДНК (связывание, кэппирование, окисление и деблокирование), как описано в примере 7, в соответствии с протоколом, представленным в таблице 3. Защиту с чипа снимали в газообразном аммиаке при 75 psi в течение ночи, и олигонуклеотиды элюировали в 500 мкл воды. После выпаривания все олигонуклеотиды ресуспендировали в 20 мкл воды для последующего анализа. Ресуспендированный образец анализировали на биоанализаторе BioAnalzyer (фигура 50A).

Ресуспендированный образец также амплифицировали методом PCR с использованием прямого (5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'; SEQ ID NO.: 5) и обратного (5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'; SEQ ID NO.: 6) праймеров в 50 мкл смеси для проведения PCR, включающей 25 мкл NEB Q5 Мастермикс, 2,5 мкл 10 мкМ прямого праймера, 2,5 мкл 10 мкМ обратного праймера, 1 мкл олигонуклеотида, снятого с

поверхности, и до 50 мкл воды, в соответствии со следующим циклическим температурным режимом:

1 цикл: 98 °C, 30 сек

12 циклов: 98 °C, 10 сек; 63 °C, 10 сек; 72 °C, 10 сек

1 цикл: 72 °C, 2 мин

Продукты PCR также анализировали на BioAnalyzer (фигура 50B), которые показали острые пики в положении 100-mer.

Результаты секвенирования продуктов PCR показали, что 23 из 29 последовательностей были превосходными и частота ошибок составила ~1 в 600 bp, как показано с помощью карты выравнивания на фигуре 51, где «x» обозначает делецию одного основания, «звездочка» обозначает мутацию одного основания, и «+» обозначает точки низкого качества в секвенировании по Сенгеру.

**ПРИМЕР 10: Параллельный синтез олигонуклеотидов на трехмерном микрожидкостном устройстве синтеза олигонуклеотидов**

Протокол синтеза, взятый из примера 7, модифицировали с использованием «house set-up» для выполнения параллельного синтеза олигонуклеотидов на трехмерном микрожидкостном устройстве из примера 9.

В таблице 6 представлено параллельное сравнение двух протоколов.

**Таблица 6:**

| | **Протокол из ПРИМЕРА 7** | | **Протокол «Twist In-House Synthesizer»** | |
|---|---|---|---|---|
| **Общий процесс синтеза ДНК, наименование** | **ПРИМЕР 7 Стадия процесса** | **Время (сек)** | **Стадия «Twist Process»** | **Время (сек)** |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | NA | |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 23 | | |
| | Промывка системы N2 | 4 | | |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | | |
| **ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ ДНК** (фосфорамидит + поток активатора) | Промывка манифольда активатора | 2 | Печать печатающей головкой 1:1 Активатор + форсфорамидит непосредственно на активные центры чипа | 120 |
| | Активатор в проточную кювету | 6 | | |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 6 | | |
| | Активатор в проточную кювету | 0.5 | | |
| | Активатор + фосфорамидит в | 5 | | |

| | Протокол из ПРИМЕРА 7 | | Протокол «Twist In-House Synthesizer» | |
|---|---|---|---|---|
| **Общий процесс синтеза ДНК, наименование** | **ПРИМЕР 7 Стадия процесса** | **Время (сек)** | **Стадия «Twist Process»** | **Время (сек)** |
| | проточную кювету | | | |
| | Активатор в проточную кювету | 0.5 | | |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 5 | | |
| | Активатор в проточную кювету | 0.5 | | |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 5 | | |
| | Инкубация в течение 25 сек | 25 | | |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | | |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 | | |
| | Промывка системы N2 | 4 | | |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | | |
| **ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ ДНК** (фосфорамидит + поток активатора) | Промывка манифольда активатора | 2 | | |
| | Активатор в проточную кювету | 5 | | |
| | Активатор + фосфорамидит в проточную кювету | 18 | | |
| | Инкубация в течение 25 сек | 25 | | |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы N2 | 4 | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| **КЭППИРОВАНИЕ** (CapA+B, 1:1, поток) | CapA+B в проточную кювету | 15 | CapA+B в проточную кювету | 15 |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| **ОКИСЛЕНИЕ** (Поток окислителя) | Окислитель в проточную кювету | 18 | Окислитель в проточную кювету | 18 |

| | Протокол из ПРИМЕРА 7 | | Протокол «Twist In-House Synthesizer» | |
|---|---|---|---|---|
| **Общий процесс синтеза ДНК, наименование** | **ПРИМЕР 7 Стадия процесса** | **Время (сек)** | **Стадия «Twist Process»** | **Время (сек)** |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Промывка системы N2 | 4 | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| | Промывка системы N2 | 4 | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 23 | Ацетонитрил в проточную кювету | 23 |
| | Промывка системы N2 | 4 | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| **ДЕБЛОКИРОВАНИЕ** (Поток деблокирующего агента) | Деблокирующий агент в проточную кювету | 36 | Деблокирующий агент в проточную кювету | 36 |
| **ПРОМЫВКА** (Промывка потоком ацетонитрила) | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Промывка системы N2 | 4 | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 18 | Ацетонитрил в проточную кювету | 18 |
| | Промывка системы N2 | 4 | Промывка системы N2 | 4 |
| | Промывка системы ацетонитрилом | 4 | Промывка системы ацетонитрилом | 4 |
| | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 | Ацетонитрил в проточную кювету | 15 |
| **СУШКА ПРОТОЧНОЙ КЮВЕТЫ** (Специально для Twist synthesizer) | NA | | Промывка системы N2 | 4 |
| | | | N2 в проточную кювету | 19.5 |
| | | | Промывка системы N2 | 4 |
| | | | Вакуумная сушка на проточной кювете | 10 |
| | | | Промывка системы N2 | 4 |
| | | | N2 в проточную кювету | 19.5 |

Ацетонитрил (ACN) проходит через встроенный дегазатор (модель № 403-0202-1; Random Technologies), пропускающий жидкость через высокогидрофобную мембрану,

который, как было показано ранее, функционирует при скорости потока в диапазоне 50-400 мкл/сек и удаляет пузырьки газа, которые образуются на проточной кювете, без привязки к теории, по всей вероятности растворяя их в недостаточно насыщенном растворителе.

В проточной кювете реагенты заменяются различными реагентами следующим образом:

1) В проточную кювету поступает исходный реагент.

2) Заливка нового реагента путем регулирования клапанов на «вытеснение» предшествующего реагента из линии подачи. Клапан остается в таком состоянии в течение 3,75 сек.

3) 2D состояние клапана: Регулирование клапанов на замещение предыдущего реагента, присутствующего на поверхности проточной кюветы, новым реагентом. Это происходит пока еще стадия 2 является активной в течение 3,75 сек. Одновременно стадии 2 и 3 являются активными в течение 0,25 сек, после чего заливной клапан переводится в состояние «выключено».

4) 3D состояние клапана: Клапана включают для обеспечения течения реагентов через трехмерные микрожидкостные кремниевые элементы в проточной кювете, которое начинается через 0,75 сек после перевода 2D состояние клапана в положение «выключено» на стадии 3.

5) Течение реагента: 2D состояние клапана и 3D состояние клапана остаются окрытыми в течение определенного количества времени для обеспечения адекватного дозирования реагента на крениевую поверхность в чипе.

Таким образом, в течение 5 секундного цикла замены реагентов доставка жидкости осуществляется путем заливки во время начального периода в течение 0-4 секунд, путем переключения 2D состояния клапана в положение «Включено» на 2,75-5 секунд, и путем переключения 3D состояния клапана в положение «Включено» на 4,5-5 секунд.

Доставку комбинации фосфорамидит/активатор осуществляют с использованием стадии струйной печати. Доставка может представлять собой капельное осаждение («drop-on-drop deposition») на кремниевую поверхность в соотношении 1:1. Размер капли может составлять около 10 пл. В некоторых вариантах осуществления размер капли может составлять по меньшей мере или по меньшей мере около 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 пиколитров или более. В некоторых вариантах осуществления размер капли составляет не более или не более чем около 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0,1 пиколитров или менее. Размер капли может находиться в диапазоне 0,1-50, 1-150 или 5-75 пиколитров или менее. Размер

капли может находиться в пределах диапазона, который ограничен любыми из этих значений, например, 2-50 пиколитров. Капли можно осаждать с начальной скоростью 1-100 м/сек. В некоторых случаях капли можно осаждать с начальной скоростью по меньшей мере или по меньшей мере примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 40, 35, 40, 45, 50, 75, 100 м/сек или выше. В некоторых случаях капли можно осаждать с начальной скоростью не более или не более чем примерно 100, 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 м/сек или ниже. Капли можно осаждать с начальной скоростью, которая находится в диапазоне примерно 1-50 м/сек, 5-15 м/сек, 5-30 м/сек или 1-30 м/сек. Специалистам в данной области будет понятно, что капли можно осаждать с начальной скоростью, которая находится в диапазоне, ограниченном любыми из этих значений.

Стадия сушки обеспечивает подготовку кремниевой поверхности для стадий печати после последовательного применения реагентов. Для достижения сухих условий, которые способствуют взаимодействию нанесенных методом печати реагентов, проточную кювету промывают газообразным $N_2$ при около 5 PSI в течение примерно 19,5 секунд, слабый вакуум прикладывают к камере проточной кюветы в течение 10 секунд, и проточную кювету снова промывают газообразным N2 еще в течение 19,5 секунд. Скорость течения всех реагентов составляет около 200-400 мкл/сек.

Скорость течения можно контролировать во встроенной системе путем изменения давления. Скорость течения является одним из ограничивающих аспектов коммерчески доступных синтезаторов. Установочные параметры скорости потока в машине могут совпадать со значениями, представленными в примере 7, или могут быть по необходимости увеличены или уменьшены для улучшения процесса синтеза. Как правило, более высокие скорости потока являются предпочтительными, так как позволяют более эффективно вытеснять пузырьки и обеспечивают более высокую эффективность замены на свежие реагенты на поверхности в течение заданного периода времени по сравнению с более низкими скоростями потока.

**ПРИМЕР 11: Перенос методом блоттинга олигонуклеотидов из устройства олигонуклеотидного синтеза в нанореакторное устройство**

Олигонуклеотиды 50-mer синтезировали на 3-D устройстве олигонуклеотидного синтеза, как описано в примере 9. Активное функционализирование не применяли. На фигуре 53 A-B показано распределение каналов олигонуклеотидного синтеза в кластере на стороне рабочего тонкого слоя олигонуклеотидного синтеза, и на фигуре 53C показано функционализирование поверхности. Олигонуклеотиды высвобождались с поверхности путем обработки в камере с газообразным аммиаком при 75 psi в течение 14 часов.

Ячейки нанореакторного устройства, которое изготовлено в соответствии с примером 4, с гидрофильными внутренними стенками и гидрофобными верхними крышками (фигура 54), сначала заполняли подходящим для PCA буфером в качестве отрицательного контроля (буфер 5X Q5; New England Biolabs). Аликвоту в 200-300 нл отмеряли пептикой для ввода в BioAnalyzer для подтверждения отсутствия любых загрязняющих нуклеиновых кислот в индивидуальных нанореакторах.

Затем нанореакторы заполняли примерно 650 нл PCA-буфера с образованием мениска, который является слегка выпуклым (фигура 53). Нанореакторное устройство состыковывали с олигонуклеотидным устройством для заполнения каналов олигонуклеотидного синтеза («револьверов») PCA-буфером со скоростью около 5 мм/сек. В других случаях скорость состыковки двух устройств может изменяться, как описано здесь, для достижения, помимо прочего, более или менее эффективного переноса жидкости между устройствами, обеспечивая контролируемое внесение желательных объемов жидкости, или контроль испарения. Олигонуклеотидное устройство и нанореактор оставляют состыкованными с зазором около 50 мкм между двумя устройствами примерно на 10 минут, что позволяет олигонуклеотидам диффундировать в раствор (фигура 57). В некоторых случаях сборочный узел или устройство олигонуклеотидного синтеза может вибрировать или качаться для содействия более быстрой диффузии. Длительность диффузии более 10 мин, такая как по меньшей мере или по меньшей мере около 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 мин или больше, также может быть использована для содействия более высокому выходу. Нанореакторное устройство освобождали от олигонуклеотидного устройства со скоростью около 5 мм/сек, захватывая высвобожденные олигонуклеотиды в индивидуальных нанореакторах. В других случаях скорость освобождения для отсоединения двух устройств может изменяться, как описано здесь, для достижения, помимо прочего, более или менее эффективного переноса жидкости между устройствами, обеспечивая контролируемое внесение желательных объемов жидкости. При этом наблюдается, что незначительное количество жидкости остается на олигонуклеотидном устройстве.

Образцы объемом около 300 нл отмеривали пипеткой из нескольких индивидуальных нанореакторов в нанореакторном устройстве и разбавляли до объема 1 мкл с получением 4,3-кратного разведения. Разбавленные образцы индивидуально анализирована на BioAnalyzer, подтверждая высвобождение олигонуклеотидов в нанореакторы (фигура 55).

Дополнительные образцы отбирали в качестве положительного контроля с использованием обычного шприца. Трубки Tygon использовали для создания торцевого

уплотнения с устройством олигонуклеотидного синтеза. Шприц, заполненный 500 мкл воды, использовали для смывания вниз жидкости по всему кластеру, а также частям соседних кластеров с обрабатываемой стороны. Смытую жидкость собирали в 1,5 мл пробирки Эппендорфа на стороне рабочего тонкого слоя. Образец сушили в вакууме и затем ресуспендировали в 10 мкл воды. Затем образец анализировали аналогичным образом в BioAnalyzer. С учетом степеней разбавления сопоставимое количество олигонуклеотидов высвобождалось с использованием метода положительного контроля и метода блоттинга.

**ПРИМЕР 12: Перенос олигонуклеотидов на основе инжекции из устройства олигонуклеотидного синтеза в нанореактор**

Олигонуклеотиды 50-mer синтезировали на 3-D устройстве олигонуклеотидного синтеза, как описано в примере 9. Олигонуклеотиды высвобождались с поверхности путем обработки в камере с аммиаком при 75 psi в течение около 14 часов. Альтернативно, может быть использовано давление в диапазоне 20-120 psi в течение 1-48 часов или дольше для высвобождения олигонуклеотидов. Температура является комнатной. В некоторых случаях скорость депротекции может быть увеличена путем повышения температуры, например, по меньшей мере или по меньшей мере примерно до 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C или выше. Также, можно использовать газообразный метиламин для депротекции при комнатной температуре или при повышенной температуре, составляющей по меньшей мере или по меньшей мере около 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C или выше. Депротекция в метиламине обычно протекает быстрее, чем в газообразном аммиаке.

Устройство олигонуклеотидного синтеза собрано в проточную ячейку Хеле-Шоу с одним входным отверстием и одним выходным отверстием. Течение создается с использованием шприца, который соединен с проточной ячейкой посредством трубки Tygon и управляется вручную (57). На фигуре 56 представлено схематическое изображение струйных элементов в проточной ячейке. Контур циркуляции жидкости используется для течения жидкости с обрабатываемой стороны в первые каналы (или сквозные межсоединения) и затем жидкость стекает во вторые каналы, например каналы, образующие рисунок «револьвер», содержащий участки синтеза олигонуклеотидов. Жидкость поступает из единичного точечного входного отверстия и собирается из единичного точечного выходного отверстия (фигура 56B). В других случаях линия подачи и линия стекания могут быть использованы для пропускания жидкостей (фигура 56A). Без привязки к теории полагают, что комбинация точечной подачи/стекания формирует равномерный воздушный фронт, который может быть более эффективным для вытеснения

всей жидкости из проточной ячейки Хеле-Шоу. После удаления жидкости из проточной ячейки жидкость содержится только в сквозных межсоединениях на обрабатываемой стороне и вторых каналах или каналах олигонуклеотидного синтеза, например, в рисунке «револьвер» на стороне рабочего тонкого слоя. Предполагается, что этот объем составляет 300 нл на кластер сквозных межсоединений (или первых каналов). Такая задержка жидкости может способствовать формированию однородных неподвижных капель на поверхности слоя устройства олигонуклеотидного синтеза.

Для выполнения этой стадии подходящий для высвобождения буфер, такой как PCA-совместимый буфер, выбирают для растворения высвобожденных в раствор олигонуклеотидов. После заполнения сквозных межсоединений и вторых каналов жидкость смывают с проточной ячейки Хеле-Шоу на обрабатываемой поверхности чипа олигонуклеотидного синтеза с использованием около 500-1000Па, оставляя жидкость только в застойной зоне (обрабатываемой и «револьверной») устройства, с предполагаемым объемом 300 нл на кластер (фигура 56C). Единичное точечное выходное отверстие блокируют и нагнетаемый воздух поступает на поверхность слоя с обрабатываемой стороны при около 3000-5000 Па для выталкивания капель на поверхность слоя со стороны устройства (фигура 56D). Буфер для достаточного высвобождения проталкивается через проточную ячейку с формированием неподвижных капель, выходящих из вторых каналов (или каналов олигонуклеотидного синтеза) на поверхность со стороны устройства олигонуклеотидного синтеза. Размер неподвижной капли может составлять около 300-400 нл, но может изменяться до подходящего размера в соответствии с конкретными размерами кластеров олигонуклеотидного синтеза и/или нанореакторами, а также в соответствии с желаемой концентрацией олигонуклеотидов. Например, может сформироваться неподвижная капля размером 500 нл. Формирование неподвижных капель можно контролировать с помощью микроскопа для подтверждения завершения формирования капель на устройстве олигонуклеотидного синтеза. В некоторых случаях жидкость, формирующая неподвижные капли, может быть приготовлена из смеси компонентов таким образом, чтобы был достигнут желательный угол контакта на слое устройства. Таким образом, раствор может быть дополнен компонентом, таким как детергент, например, полисорбат 20 (полиоксиэтилен (20)-сорбитан-монолаурат, также называемый как Tween-20).

Альтернативно, подходящее количество буфера для высвобождения осаждают на индивидуальные лунки/первые каналы с обрабатываемой стороны и проталкивают через канал олигонуклеотидного синтеза, например, путем приложения давления с обрабатываемой стороны путем формирования проточной ячейки Хела-Шоу на

обрабатываемой стороне. Нанореакторное устройство состыковывают с устройством олигонуклеотидного синтеза со стороны устройства с подходящей скоростью, например, около 1-10 мм/сек и зазором около 50 мкм. Состыковка может быть выполнена быстро после формирование капли для избежания испарения. Испарение также является минимальным после того как два устройства (нанореактор или реактор олигонуклеотидного синтеза) состыковываются.

**ПРИМЕР 13: Сборка генов в нанореакторах с использованием PCA из реакционных смесей, перенесенных со стороны устройства олигонуклеотидного синтеза.**

Реакционную смесь для проведения PCA готовили, как описано в таблице 7 с использованием SEQ ID NO.: 7-66 из таблицы 8 для сборки гена LacZ 3075 bp (SEQ ID NO.: 67; таблица 8).

**Таблица 7:**

| PCA | 1 (x100 мкл) | конеч.конц. |
|---|---|---|
| H2O | 62,00 | |
| 5x Q5-буфер | 20,00 | 1x |
| 10 мМ dNTP | 1,00 | 100 мкМ |
| BSA 20 мг/мл | 5,00 | 1 мг/мл |
| Смесь олиго, 50 нМ каждого | 10,00 | 5 нМ |
| Q5 полимераза 2 ЕД/мкл | 2,00 | 2 ЕД/50 мкл |

**Таблица 8:**

| **Название последовательности** | **Последовательность** |
|---|---|
| Олиго _1, SEQ ID NO.: 7 | 5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGG3' |
| Олиго _2, SEQ ID NO.: 8 | 5'GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3' |
| Олиго _3, SEQ ID NO.: 9 | 5'CCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC3' |
| Олиго _4, SEQ ID NO.: 10 | 5'CGGCACCGCTTCTGGTGCCGGAAACCAGGCAAAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3' |
| Олиго _5, SEQ ID NO.: 11 | 5'CACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTC3' |
| Олиго _6, SEQ ID NO.: 12 | 5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGG3' |
| Олиго _7, SEQ ID NO.: 13 | 5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTG3' |
| Олиго _8, SEQ ID NO.: 14 | 5'GTCTGGCCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAACATTAAATGTGAGCGAGTAACAACCCGTCGGATTCTCCGTG3' |

| **Название последовательности** | **Последовательность** |
|---|---|
| Олиго _9, SEQ ID NO.: 15 | 5'GCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATG GCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG3' |
| Олиго _10, SEQ ID NO.: 16 | 5'CAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACTGTCCTGGCCGTA ACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACG3' |
| Олиго _11, SEQ ID NO.: 17 | 5'CGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCG CCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTG3' |
| Олиго _12, SEQ ID NO.: 18 | 5'GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTG CCGTCACTCCAGCGCAGCACCATCACCGCGAG3' |
| Олиго _13, SEQ ID NO.: 19 | 5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTC GTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTC3' |
| Олиго _14, SEQ ID NO.: 20 | 5'CTCCAGTACAGCGCGGCTGAAATCATCATTAAAGCGAGT GGCAACATGGAAATCGCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATG3' |
| Олиго _15, SEQ ID NO.: 21 | 5'ATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGT GCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTT3' |
| Олиго _16, SEQ ID NO.: 22 | 5'AAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTTTCACCCTGC CATAAAGAAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACG3' |
| Олиго _17, SEQ ID NO.: 23 | 5'GCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGC GTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACG3' |
| Олиго _18, SEQ ID NO.: 24 | 5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCCACAGTTTCGGGTT TTCGACGTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCA3' |
| Олиго _19, SEQ ID NO.: 25 | 5'GAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGA ACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAG3' |
| Олиго _20, SEQ ID NO.: 26 | 5'CAGCAGCAGACCATTTTCAATCCGCACCTCGCGGAAACC GACATCGCAGGCTTCTGCTTCAATCAGCGTGCCG3' |
| Олиго _21, SEQ ID NO.: 27 | 5'CGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCG TTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCA3' |
| Олиго _22, SEQ ID NO.: 28 | 5'GCAGGATATCCTGCACCATCGTCTGCTCATCCATGACCTG ACCATGCAGAGGATGATGCTCGTGACGGTTAACGC3' |
| Олиго _23, SEQ ID NO.: 29 | 5'CAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAAC AACTTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAAC3' |
| Олиго _24, SEQ ID NO.: 30 | 5'TCCACCACATACAGGCCGTAGCGGTCGCACAGCGTGTAC CACAGCGGATGGTTCGGATAATGCGAACAGCGCAC3' |
| Олиго _25, SEQ ID NO.: 31 | 5'GCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAAC CCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATG3' |
| Олиго _26, SEQ ID NO.: 32 | 5'GCACCATTCGCGTTACGCGTTCGCTCATCGCCGGTAGCCA GCGCGGATCATCGGTCAGACGATTCATTGGCAC3' |
| Олиго _27, SEQ ID NO.: 33 | 5'CGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCG AGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAG3' |
| Олиго _28, SEQ ID NO.: 34 | 5'GGATCGACAGATTTGATCCAGCGATACAGCGCGTCGTGA TTAGCGCCGTGGCCTGATTCATTCCCCAGCGACCAGATG3' |

| **Название последовательности** | **Последовательность** |
|---|---|
| Олиго _29, SEQ ID NO.: 35 | 5'GTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTG CAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGC3' |
| Олиго _30, SEQ ID NO.: 36 | 5'CGGGAAGGGCTGGTCTTCATCCACGCGCGCGTACATCGG GCAAATAATATCGGTGGCCGTGGTGTCGGCTC3' |
| Олиго _31, SEQ ID NO.: 37 | 5'TGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGT CCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGAC3' |
| Олиго _32, SEQ ID NO.: 38 | 5'CCAAGACTGTTACCCATCGCGTGGGCGTATTCGCAAAGG ATCAGCGGGCGCGTCTCTCCAGGTAGCGAAAGCC3' |
| Олиго _33, SEQ ID NO.: 39 | 5'CGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTG GCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGC3' |
| Олиго _34, SEQ ID NO.: 40 | 5'GCCGTTTTCATCATATTTAATCAGCGACTGATCCACCCAG TCCCAGACGAAGCCGCCCTGTAAACGGGGATACTGACG3' |
| Олиго _35, SEQ ID NO.: 41 | 5'CAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGG TCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACG3' |
| Олиго _36, SEQ ID NO.: 42 | 5'GCGGCGTGCGGTCGGCAAAGACCAGACCGTTCATACAG AACTGGCGATCGTTCGGCGTATCGCCAAA3' |
| Олиго _37, SEQ ID NO.: 43 | 5'CGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAAC ACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCG3' |
| Олиго _38, SEQ ID NO.: 44 | 5'CTCGTTATCGCTATGACGGAACAGGTATTCGCTGGTCACT TCGATGGTTTGCCCGGATAAACGGAACTGGAAAAACTGC3' |
| Олиго _39, SEQ ID NO.: 45 | 5'AATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTG GATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCG3' |
| Олиго _40, SEQ ID NO.: 46 | 5'GTTCAGGCAGTTCAATCAACTGTTTACCTTGTGGAGCGA CATCCAGAGGCACTTCACCGCTTGCCAGCGGCTTACC3' |
| Олиго _41, SEQ ID NO.: 47 | 5'CAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAG CCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTA3' |
| Олиго _42, SEQ ID NO.: 48 | 5'GCGCTGATGTGCCCGGCTTCTGACCATGCGGTCGCGTTC GGTTGCACTACGCGTACTGTGAGCCAGAGTTG3' |
| Олиго _43, SEQ ID NO.: 49 | 5'CCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCG GAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGC3' |
| Олиго _44, SEQ ID NO.: 50 | 5'CCAGCTCGATGCAAAAATCCATTTCGCTGGTGGTCAGAT GCGGGATGGCGTGGGACGCGGCGGGGAGCGTC3' |
| Олиго _45, SEQ ID NO.: 51 | 5'CGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGG CAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTG3' |
| Олиго _46, SEQ ID NO.: 52 | 5'TGAACTGATCGCGCAGCGGCGTCAGCAGTTGTTTTTTATC GCCAATCCACATCTGTGAAAGAAAGCCTGACTGG3' |
| Олиго _47, SEQ ID NO.: 53 | 5'GCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAA CGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGAC3' |
| Олиго _48, SEQ ID NO.: 54 | 5'GGCCTGGTAATGGCCCGCCGCCTTCCAGCGTTCGACCCA GGCGTTAGGGTCAATGCGGGTCGCTTCACTTA3' |

| **Название последовательности** | **Последовательность** |
|---|---|
| Олиго _49, SEQ ID NO.: 55 | 5'CGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCA CGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGAT3' |
| Олиго _50, SEQ ID NO.: 56 | 5'TCCGGCTGATAAATAAGGTTTTCCCCTGATGCTGCCACGC GTGAGCGGTCGTAATCAGCACCGCATCAGCAAGTG3' |
| Олиго _51, SEQ ID NO.: 57 | 5'GGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGAT TGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGA3' |
| Олиго _52, SEQ ID NO.: 58 | 5'GGCAGTTCAGGCCAATCCGCGCCGGATGCGGTGTATCGC TCGCCACTTCAACATCAACGGTAATCGCCATTTGAC3' |
| Олиго _53, SEQ ID NO.: 59 | 5'GCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAG AGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAG3' |
| Олиго _54, SEQ ID NO.: 60 | 5'GGCAGATCCCAGCGGTCAAAACAGGCGGCAGTAAGGCG GTCGGGATAGTTTTCTTGCGGCCCTAATCCGAGC3' |
| Олиго _55, SEQ ID NO.: 61 | 5'GTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATAC CCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGC3' |
| Олиго _56, SEQ ID NO.: 62 | 5'GTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTCAATTCGCG CGTCCCGCAGCGCAGACCGTTTTCGCTCGG3' |
| Олиго _57, SEQ ID NO.: 63 | 5'ACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCT ACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATC3' |
| Олиго _58, SEQ ID NO.: 64 | 5'GAAACCGTCGATATTCAGCCATGTGCCTTCTTCCGCGTGC AGCAGATGGCGATGGCTGGTTTCCATCAGTTGCTG3' |
| Олиго _59, SEQ ID NO.: 65 | 5'CATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGG CGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCG3' |
| Олиго_60, SEQ ID NO.: 66 | 5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGACCG GCGCTCAGCTGGAATTCCGCCGATACTGACGGGC3' |
| Ген LacZ– SEQ ID NO: 67 | 5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAA CGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATC GCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAG CGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGC AGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCAC CAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTC CTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGAT GCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTAT CCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATC CGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAG CTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGC GTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGG TCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGA CCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCG GTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAA GATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACG TCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTT CCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCT GTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGT GACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAA |

| **Название последовательности** | **Последовательность** |
|---|---|
| | CGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAA |
| | TTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACT |
| | ACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGA |
| | AATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACC |
| | GCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTC |
| | GGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGC |
| | TGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCA |
| | CGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAG |
| | ACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAAC |
| | TTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAACCATCCGC |
| | TGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGT |
| | GGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAAT |
| | GAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATG |
| | AGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAAT |
| | CACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAG |
| | GCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAA |
| | ATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGC |
| | GGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGT |
| | ACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCC |
| | GAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGA |
| | GACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCCACGCGATG |
| | GGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGT |
| | TTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGA |
| | CTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGG |
| | CAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACG |
| | CCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTG |
| | CCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAAC |
| | ACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAAC |
| | CATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGAT |
| | AACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAG |
| | CCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCAC |
| | AAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGC |
| | CGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAG |
| | TGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACA |
| | TCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCA |
| | GTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCT |
| | GACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAAT |
| | AAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCAC |
| | AGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGACGCCGC |
| | TGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACAT |
| | TGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTG |
| | GGTCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGA |
| | AGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGAT |
| | GCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAG |
| | GGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGATTG |
| | ATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGT |
| | GGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAA |
| | CTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCT |
| | CGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTACT |

| **Название последовательности** | **Последовательность** |
|---|---|
| | GCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACA TGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCG CTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCCACACCAGTG GCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAA CAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCAC GCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCAT ATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTAT CGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCA GTTGGTCTGGTGTCAAAAATAA3' |

Капли объемом около 400 нл вносили с использованием дозатора Mantis (Formulatrix, MA) поверх «револьверов» (каналов олигонуклеотидного синтеза) на стороне рабочего тонкого слоя олигонуклеотидного синтеза. Чип нанореактора вручную закрывали устройством олигонуклеотидного синтеза для захвата капель, содержащих реакционную смесь для проведения PCA. Капли захватывались индивидуальными нанореакторами в нанореакторном чипе путем освобождения нанореактора от устройства олигонуклеотидного синтеза сразу же после захвата капли (фигура 59).

Нанореакторы герметично накрывали Heat Sealing Film/Tape cover (Eppendorf, eshop.eppendorfna.com/products/Eppendorf_Heat_Sealing_PCR_Film_and_Foil) и помещали в амплификатор подходящей конфигурации, который был сконтруирован с использованием набора для амплификации (OpenPCR).

На амплификаторе использовали следующий температурный режим:

1 цикл: 98 °C, 45 секунд

40 циклов: 98 °C, 15 секунд; 63 °C, 45 секунд; 72 °C, 60 секунд;

1 цикл: 72 °C, 5 минут

1 цикл: 4 °C, выдержка

Из индивидуальных лунок 1-10 собирали аликвоты в 0,50 мкл, как показано на фигуре 60, и амплифицировали в пластиковых пробирках в реакционной смеси для проведения PCR (таблица 9) и в соответствии со следующей программой амплификатора с использованием прямого (F-праймер; 5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3'; SEQ ID NO: 68) и обратного (R-праймер; 5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGG3'; SEQ ID NO: 69) праймеров:

Амплификатор:

1 цикл: 98 °C, 30 секунд

30 циклов: 98 °C, 7 секунд; 63 °C, 30 секунд; 72 °C, 90 секунд

1 цикл: 72 °C, 5 минут

1 цикл: 4 °C, выдержка

**Таблица 9:**

| PCR | 1 (x25 мкл) | конеч.конц. |
|---|---|---|
| H2O | 17,50 | |
| 5x Q5-буфер | 5,00 | 1x |
| 10 мМ dNTP | 0,50 | 200 мкМ |
| F-праймер 20 мкМ | 0,63 | 0,5 мкМ |
| R-праймер 20 мкМ | 0,63 | 0,5 мкМ |
| BSA 20 мг/мл | 0,00 | |
| Q5 полимераза 2 ЕД/мкл | 0,25 | 1 ЕД/50 мкл |
| матрица (PCA-сборка) | 0,50 | 1 мкл/50 мкл rxn |

Конечные продукты амплификации анализировали на приборе BioAnalyzer (фигура 60BB, изображения 1-10), а также на геле (фигура 60C), демонстрируя продукт, который немного крупнее, чем 3000 bp. Одиннадцатую PCR-реакцию проводили с использованием PCR-реакции, выполняемой в пластиковой пробирке, в качестве положительного контроля (фигура 60B, изображение 11 и фигура 60C). Двенадцатую PCR-реакцию проводили без матрицы PCR в качестве отрицательного контроля, демонстрируя отсутствие продукта (фигура 60B, изображение 12 и фигура 60C).

**ПРИМЕР 14: Исправление ошибок собранных нуклеиновых кислот**

**Таблица 10**

| **Нуклеиновая кислота** | **Последовательность** |
|---|---|
| Собранные ген, SEQ ID NO.: 70 | 5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT<br>GACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC<br>ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA<br>TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTT<br>GCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAG<br>TGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGC<br>AGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCC<br>CATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGT<br>TGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAG<br>GCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCT<br>GTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTG<br>CCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACC<br>GCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGA<br>AGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCG<br>TTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCA<br>CTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGT<br>TCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCT<br>TTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCG<br>GCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCAC<br>ACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAAT |

| **Нуклеиновая кислота** | **Последовательность** |
|---|---|
| | CCCGAATCTCTATC3' |
| Сборка олиго-нуклеотида 1, SEQ ID NO.: 71 | 5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT GACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC 3' |
| Сборка олиго-нуклеотида 2, SEQ ID NO.: 72 | 5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCT GCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGGCCTCAGGAAGATCGC ACTCCAGCCAGCTTTCCGGCACCGCTTCTGGTGCCGGAAACCAGGC AAAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3' |
| Сборка олиго-нуклеотида 3, SEQ ID NO.: 73 | 5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCG TTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTA ATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTT TGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG3' |
| Сборка олиго-нуклеотида 4, SEQ ID NO.: 74 | 5' GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCGTCA CTCCAGCGCAGCACCATCACCGCGAGGCGGTTTTCTCCGGCGCGTA AAAATGCGCTCAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACTGTCCTGGC CGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACG 3' |
| Сборка олиго-нуклеотида 5, SEQ ID NO.: 75 | 5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGC TGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCG CTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAG ATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTT 3' |
| Сборка олиго-нуклеотида 6, SEQ ID NO.: 76 | 5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCCACAGTTTCGGGTTTTCGA CGTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCATAACCACCACGCTCATC GATAATTTCACCGCCGAAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTT TCACCCTGCCATAAAGAAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACG 3' |

Ген длиной около 1 kb (SEQ ID NO.: 70; таблица 10) собирали с использованием 6 приобретенных олигонуклеотидов (5 нМ каждого во время PCA) (Ultramer; SEQ ID NO.: 71-76; таблица 10), и собирали с помощью PCA-реакции с использованием 1x NEB Q5-буфера с 0,02 ЕД/мкл полимеразы Q5 Hot-Start High-Fidelity и 100 мкМ dNTP следующим образом:

1 цикл: 98 °C, 30 сек

15 циклов: 98 °C, 7 сек; 62 °C, 30 сек; 72 °C, 30 сек

1 цикл: 72 °C, 5 мин

Предполагается, что олигонуклеотиды Ultramer имеют частоту ошибок по меньшей мере 1 в 500 нуклеотидах, более вероятно по меньшей мере 1 в 200 нуклеотидах или более.

Собранный ген амплифицировали с помощью PCR-реакции с использованием прямого праймера (5' ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3' SEQ ID NO.: 77) и

обратного праймера (5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCC3' SEQ ID NO.: 78), с использованием 1x NEB Q5-буфера с 0,02 ЕД/мкл полимеразы Q5 Hot-Start High-Fidelity, 200 мкМ dNTP и 0,5 мкМ праймеров следующим образом:

1 цикл: 98 °C, 30 сек

30 циклов: 98 °C, 7 сек; 65 °C, 30 сек; 72 °C, 45 сек

1 цикл: 72 °C, 5 мин

Амплифицированный собранный ген анализировали на BioAnalyzer (фигура 52A) и клонировали. «Mini-preps» из ~24 колоний секвенировали по методу Сенгера. Анализ на BioAnalyzer обеспечил широкий пик и «хвост» для неисправленного гена, указывающего на высокую частоту ошибок. Секвенирование показало частоту ошибок 1/789 (данные не показаны). Два цикла исправления ошибок выполняли с использованием CorrectASE (Life Technologies, www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A14972) в соответствии с инструкциями изготовителя. Конечные образцы генов аналогично анализировали на BioAnalyzer после первого цикла (фигура 60B) и второго цикла (фигура 60C), и клонировали. Для секвенирования отбирали 24 колонии. Результаты секвенирования показали частоту ошибок 1/5190 bp и 1/6315 bp после первого и второго циклов исправления ошибок, соответственно.

**ПРИМЕР 15: Генерирование большого количества не содержащих праймеры одноцепочечных олигонуклеотидов**

Реагенты. Все ферменты и буферы, за исключением phi29 ДНК-полимеразы, получали от фирмы NEB, если не указано иное. Phi29 ДНК-полимеразу получали от фирмы Enzymatics.

Генерирование олигонуклеотидов. Замыкающий кольцо («padlock») олигонуклеотид (OS_1518), содержащий последовательность, обратно комплементарную желаемому олигонуклеотиду, синтезировали по методу фирмы IDT (таблица 1). Также, синтезировали дополнительные «padlock» олигонуклеотиды OS_1515, OS_1516, OS_1517, OS_1519 для работы с комбинациями адаптеров/вспомогательных олигонуклеотидов, которые работают с различными наборами рестрикционных ферментов. «Padlock» олигонуклеотиды фосфорилировали путем смешивания 5 мкл «padlock» (200 нМ) с 5 мкл T4 PNK-буфера, 0,5 мкл ATP (100 мМ), 2 мкл T4 PNK (10 ЕД/мкл), 1 мкл BSA (100 мкг/мкл), 2 мкл DTT (100 мМ) и 32,5 мкл воды, и инкубирования смеси в течение 60 мин при 37 °C с последующей инкубацией в течение 20 мин при 65 °C. Синтезировали адаптерный олигонуклеотид, имеющий последовательность, комплементарную «padlock» олигонуклеотиду, по методу фирмы IDT (таблица 11). Вспомогательный олигонуклеотид,

имеющий последовательность, комплементарную адаптерному олигонуклеотиду, синтезировали по методу фирмы IDT и биотинилировали.

**Таблица 11. Олигонуклеотидные последовательности**

| | |
|---|---|
| Padlock, SEQ ID NO.: 79 | 5'ATCTTTGAGTCTTCTGCTTGGTCAGACGAGTGCATGTGCGTGACA AATTGGCGCGAGGAGCTCGTGTCATTCACAACTGCTCTTAGGCTAC TCAGGCATGGTGAGATGCTACGGTGGTTGATGGATACCTAGAT3' |
| Адаптер, SEQ ID NO.: 80 | 5'CAGAAGACTCAAAGATATCTAGGTATCCATCAAC3' |
| Вспомогательный, SEQ ID NO.: 81 | /5Biosg/GTTGATGGATACCTAGATATCTTTGAGTCTTCTG3' |
| Подчеркивание = комплементарность адаптерному олигонуклеотиду<br>Волнистая линия = сайт рестрикции<br>/5Biosg/ = сайт биотинирования | |

Гибридизация и лигирование. 48 мкл реакционной смеси для фосфорилирования «padlock» объединяли с 1,5 мкл адаптерного олигонуклеотида (2 мкМ) и 0,5 мкл Т4-лигазы. Реакционную смесь инкубировали в течение 60 мин при 37 °С с последующими 20 мин при 65 °С. Образец реакционной смеси объемом 5 мкл смешивали с 5 мкл 2х загрузочного буфера и анализировали в 15% геле с TBE-мочевиной (180 В, 75 мин).

Необязательную обработку экзонуклеазой выполняли следующим образом. 10 мкл продукта лигирования обрабатывали 0,15 мкл ExoI и ExoIII (фирма NEB или Enzymatics) при 37 °С в течение 60 мин, затем при 95 °С в течение 20 мин. После инкубации 0,3 мкл адаптерного олигонуклеотида (2 мкМ) добавляли в каждый 10 мкл раствор, нагревали до 95 °С в течение 5 мин и медленно охлаждали. 5 мкл образца реакционной смеси смешивали с 5 мкл 2х загрузочного буфера и анализировали в 15% геле с TBE-мочевиной (180 В, 75 мин).

Амплификация по принципу «катящегося кольца». 10 мкл 2-кратной смеси Master mix для проведения RCA готовили путем объединения 0,6 мкл phi29 ДНК-полимеразы (низкая концентрация, фирма Enzymatics), 0,5 мкл 10 мМ dNTP, 1 мкл Т4 РНК-буфера, 0,2 мкл 100х BSA, 0,5 мкл 100 мМ DTT и 7,2 мкл воды на льду. В некоторых случаях можно использовать добавки PCR, такие как бетаин, например, 5М бетаин, для снижения ошибок амплификации. 10 мкл смеси Mastermix для проведения RCA объединяли с 10 мкл продукта лигирования (с обработкой или без обработки экзонуклеазой) и инкубировали при 40 °С в течение 90 мин или 4 ч. Затем реакционную смесь инкубировали при 70 °С в течение 10 мин для деактивации phi29 ДНК-полимеразы. Образец реакционной смеси

объемом 0,1 мкл смешивали с 4,9 мкл воды и 5 мкл 2x загрузочного буфера, и смесь анализировали в 15% геле с TBE-мочевиной (180 В, 75 мин).

Расщепление рестрикционной эндонуклеазой. 2 мкл образца продукта RCA смешивали с 2 мкл 10x CutSmart, 2 мкл биотинилированного вспомогательного олигонуклеотида (20 мкМ) и 12 мкл воды. Смесь нагревали до 98 °C и медленно охлаждали до комнатной температуры. 1 мкл каждого из BciVI и MlyI добавляли в смесь с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37 °C, затем 20 мин при 80 °C. Образец реакционной смеси объемом 1 мкл смешивали с 4 мкл воды и 5 мкл 2X загрузочного буфера, и смесь анализировали в 15% геле с TBE-мочевиной (180 В, 75 мин).

Необязательную стадию очистки выполняли следующим образом. 1 мкл образца после расщепления рестрикционной эндонуклеазой сохраняли в качестве образца до очистки. Частицы NanoLink beads (Solulink) ресуспендировали путем энергичного перемешивания на вортексе. Аликвоту частиц в 5 мкл добавляли в 1,5 мл пробирку. Буфер для связывания нуклеиновых кислот и промывки (Nucleic Acid Binding and Wash Buffer) или NABWB (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20, pH 8,0) добавляли в пробирку до конечного объема 250 мкл, и пробирку перемешивали для ресуспендирования. Пробирку помещали на магнитную подставку на 2 мин и затем удаляли супернатант. Пробирку снимали с подставки и частицы ресуспендировали с 180 мкл NABWB. 180 мкл ресуспендированных частиц добавляли в 20 мкл реакционной смеси, полученной в результате реакции расщепления рестрикционной эндонуклеазой, и смесь перемешивали на вортексе. Смесь инкубировали в течение 60 мин при 40 °C на шейкере с платформой таким образом, чтобы не происходило осаждение частиц. Пробирку затем помещали на магнитную подставку на 2 мин, и супернатант, содержащий очищенный продукт, переносили в новую пробирку. 10 мкл образца очищенного продукта смешивали с 5 мкл 2x загрузочного буфера и анализировали в 15% геле с TBE-мочевиной (180 В, 75 мин). Концентрацию очищенного продукта RCA измеряли с использованием набора Qubit ssDNA kit.

Альтернативная очистка. В некоторыхтехнологических процессах расщепленные олигонуклеотиды могут быть очищены с использованием HPLC (высокопроизводительной жидкостной хроматографии).

На фигуре 63 показано отделение подвергнутых расщеплению рестрикционным ферментом продуктов амплификации, где каждый одноцепочечный продукт амплификации гибридизирован со вспомогательным олигонуклеотидом, комплементарным продукту амплификации на участках копий адаптера, до расщепления. Также, показаны данные, касающиеся амплификации одноцепочечных нуклеиновых

кислот с использованием замыкающих кольцо зондов «padlock probes» OS_1515, OS_1516, OS_1517, OS_1518, OS_1519 с различными наборам рестрикционных ферментов.

Хотя предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения показаны и описаны в настоящем документе, специалистам в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены лишь в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены возникнут для специалистов в данной области без отступления от изобретения. Должно быть понятно, что различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанным здесь, могут быть использованы при практическом осуществлении изобретения. Подразумевается, что прилагаемая формула определяет объем изобретения и что тем самым охватываются способы и структуры, попадающие в пределы объема этой формулы, и их эквиваленты.

## Формула изобретения

1. Способ генерирования молекулы нуклеиновой кислоты, при этом способ включает следующие стадии:

(a) получение инструкций для синтеза предварительно определенных последовательностей ДНК, каждая из которых имеет последовательность полной длины с длиной по меньшей мере 100 оснований;

(b) синтез множества иммобилизованных на поверхности полинуклеотидов, кодируемых предварительно определенными последовательностями ДНК, причем 70% или более из множества синтезируемых полинуклеотидов кодируют последовательность полной длины по сравнению с предварительно определенными последовательностями ДНК, полученными в инструкциях для синтеза;

(c) высвобождение указанного множества полинуклеотидов; и

(d) обеспечение условий, способствующих:

(i) гибридизации указанных перекрывающихся комплементарных последовательностей с формированием множества гибридизованных полинуклеотидов; и

(ii) удлинению или лигированию указанных гибридизованных полинуклеотидов с получением длинной молекулы нуклеиновой кислоты.

2. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что по меньшей мере 89% синтезируемых полинуклеотидов не содержат ошибок по сравнению с предварительно определенными последовательностями ДНК, полученными в инструкциях для синтеза.

3. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что по меньшей мере 81% множества синтезируемых полинуклеотидов кодируют последовательность полной длины по сравнению с предварительно определенными последовательностями ДНК, полученными в инструкциях для синтеза.

4. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что по меньшей мере 89% множества синтезируемых полинуклеотидов кодируют последовательность полной длины по сравнению с предварительно определенными последовательностями ДНК, полученными в инструкциях для синтеза.

5. Способ по пункту 1, дополнительно включающий выполнение отбора по размеру во множестве полинуклеотидов, причем отбор осуществляют на основе предварительно определенных последовательностей ДНК, полученных в инструкциях для синтеза.

6. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что предварительно определенные

последовательности ДНК представляют собой последовательности кДНК.

7. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что множество полинуклеотидов содержит по меньшей мере 5000 полинуклеотидов.

8. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что множество полинуклеотидов содержит по меньшей мере 10000 полинуклеотидов.

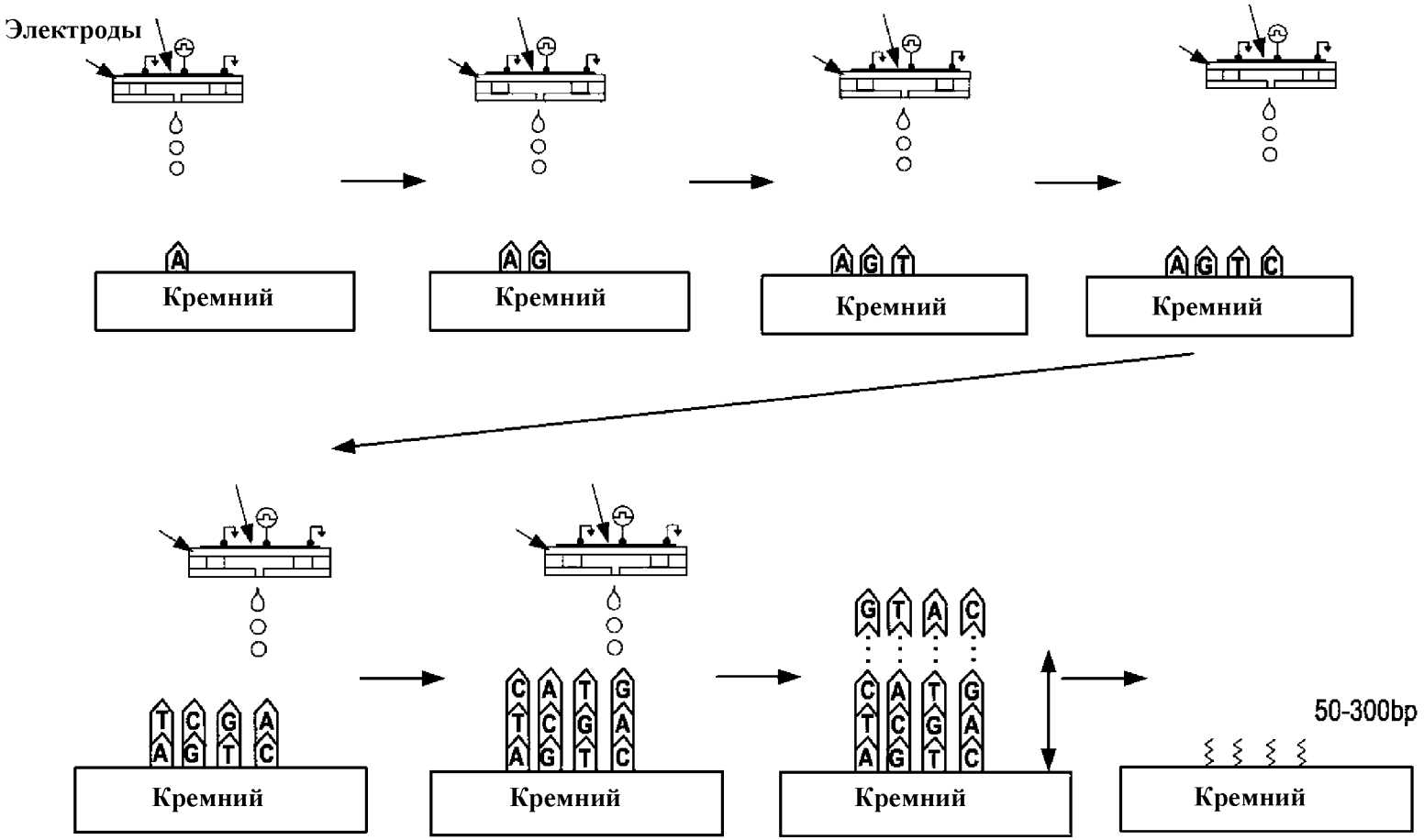
9. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что множество полинуклеотидов содержит по меньшей мере 100000 полинуклеотидов.

10. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что множество полинуклеотидов совместно кодируют по меньшей мере 500 генов.

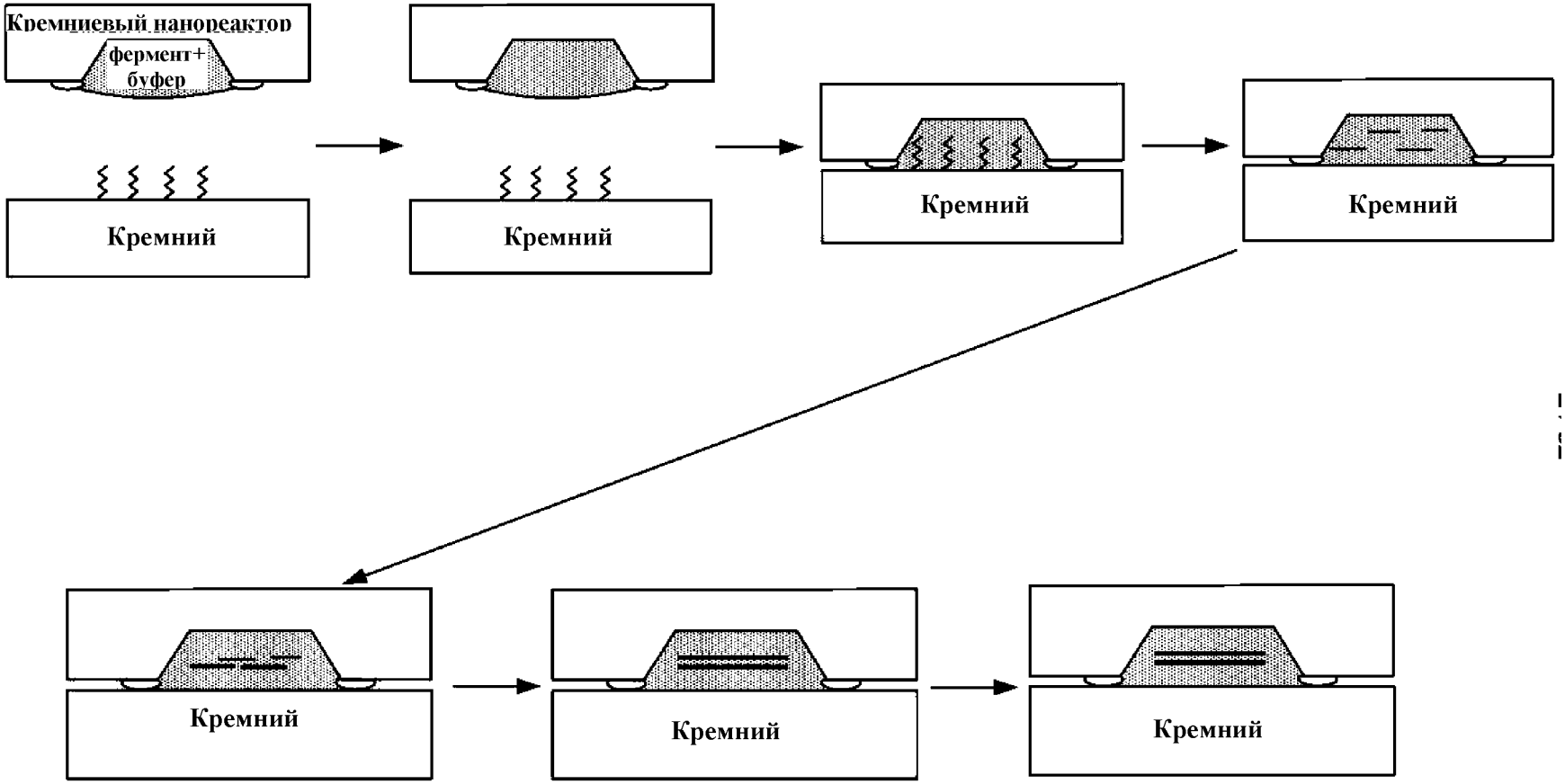
11. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что последовательности ДНК имеют длину от 100 до 200 оснований.

12. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что каждый из полинуклеотидов содержит перекрывающуюся комплементарную последовательность, которая комплементарна другому полинуклеотиду во множестве полинуклеотидов.

13. Библиотека нуклеиновых кислот, сгенерированная в соответствии со способом по любому из пунктов 1-12.


Электроды
A
Кремний
A G
Кремний
A G T
Кремний
A G T C
Кремний
T A
C G
G T
A C
Кремний
C T A
A C G
T G T
G A C
Кремний
G T A C
C T A
A C G
T G T
G A C
Кремний
50-300bp
Кремний

*ФИГ. 1А*

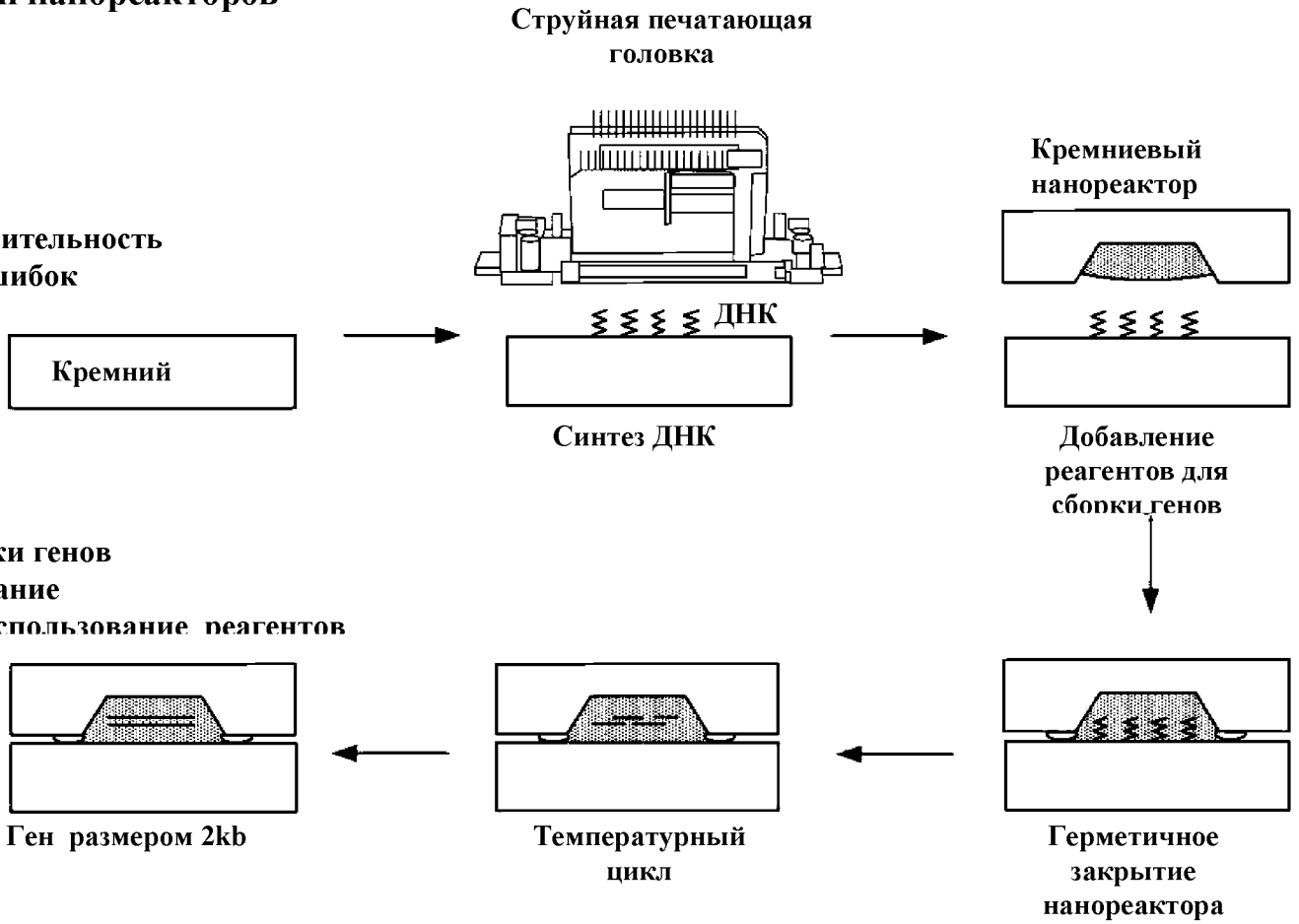

Кремниевый нанореактор
фермент+
буфер
Кремний
Кремний
Кремний
Кремний
Кремний
Кремний
Кремний

*ФИГ. 1В*

**Технология сборки генов с использованием печати и нанореакторов**

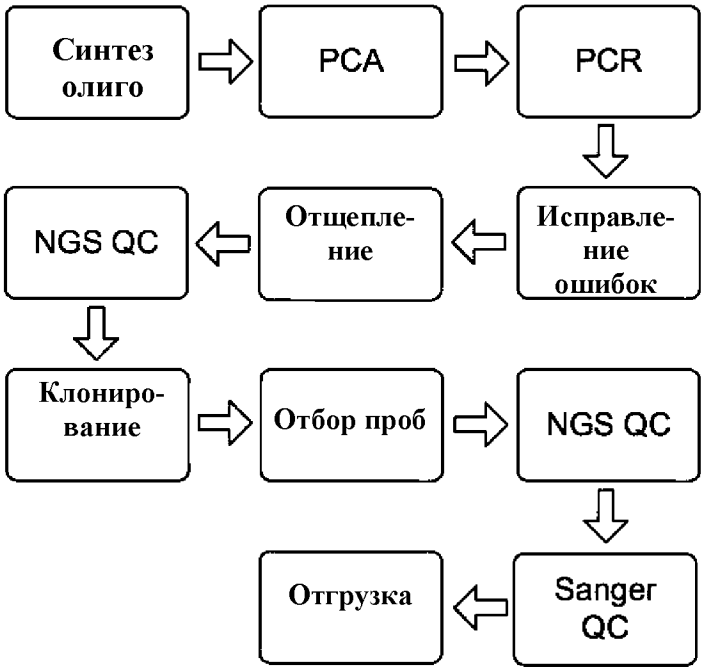
- **Струйная печать ДНК**
  - **Высокая производительность**
  - **Низкая частота ошибок**

- **Si нанореактор для сборки генов**
  - **Точное регулирование**
  - **Незначительное использование реагентов**




*ФИГ. 1С*

## Блок-схема технологического процесса




**Условия правильности последовательности:**

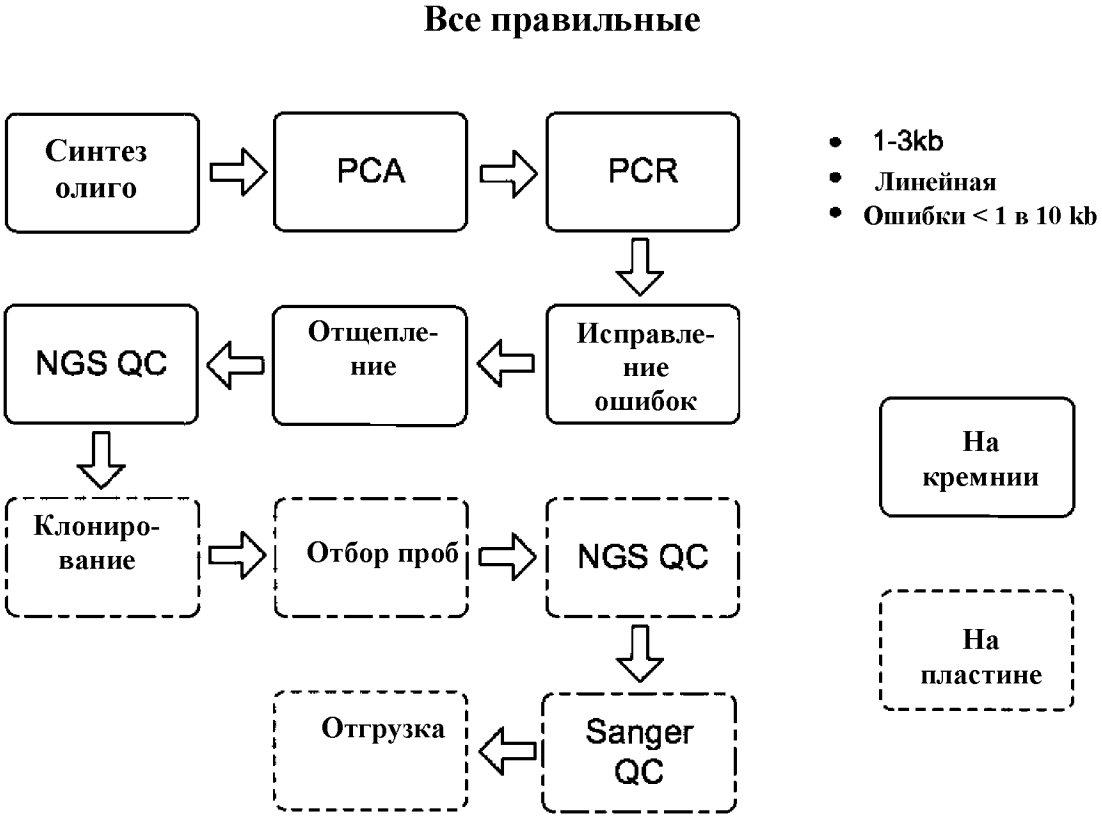
- Все правильные (т.е. возможно присутствие дополнительных связанных вариантов)

→ Клонирование необязательно

- Только правильные (дополнительные варианты отсутствуют)

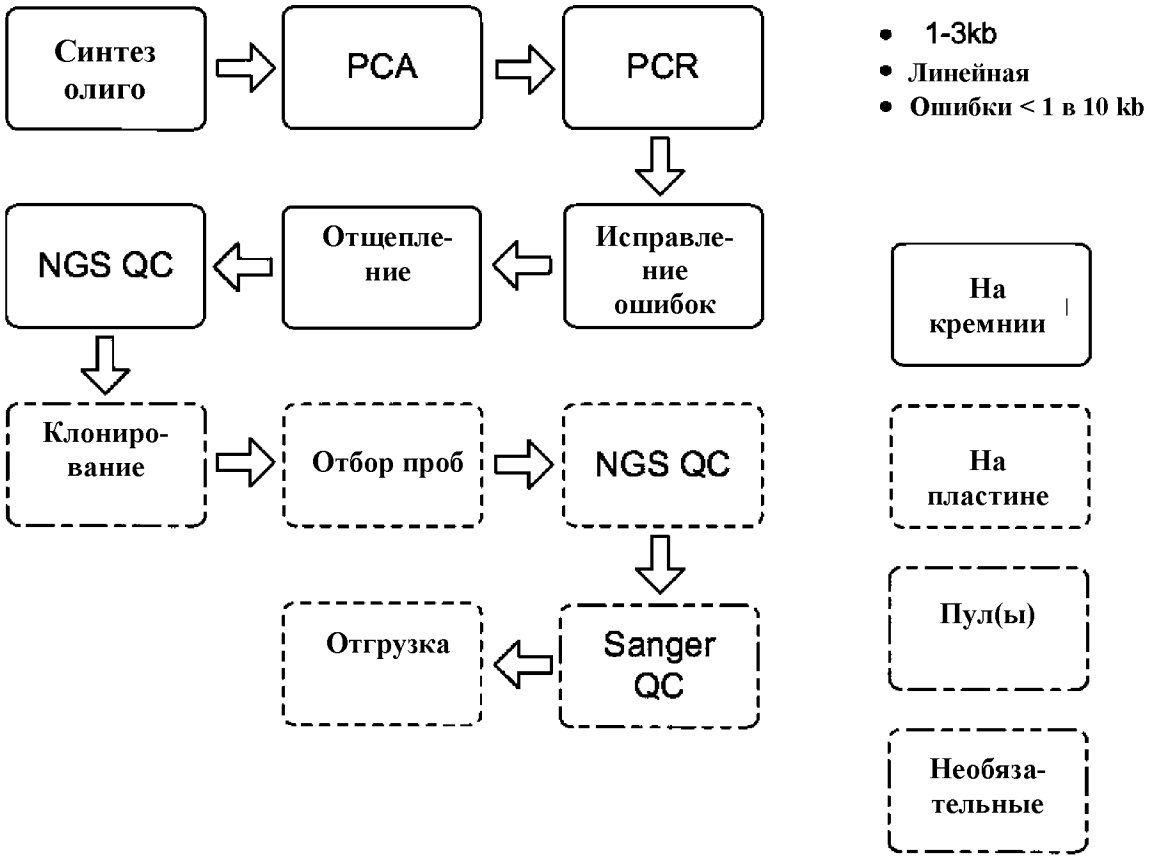
→ Клонирование обязательно

***ФИГ. 2А***


Все правильные
Синтез олиго
PCA
PCR
Исправление ошибок
Отщепление
NGS QC
Клонирование
Отбор проб
NGS QC
Sanger QC
Отгрузка
1-3kb
Линейная
Ошибки < 1 в 10 kb
На кремнии
На пластине

*ФИГ. 2В*

**Только правильные**

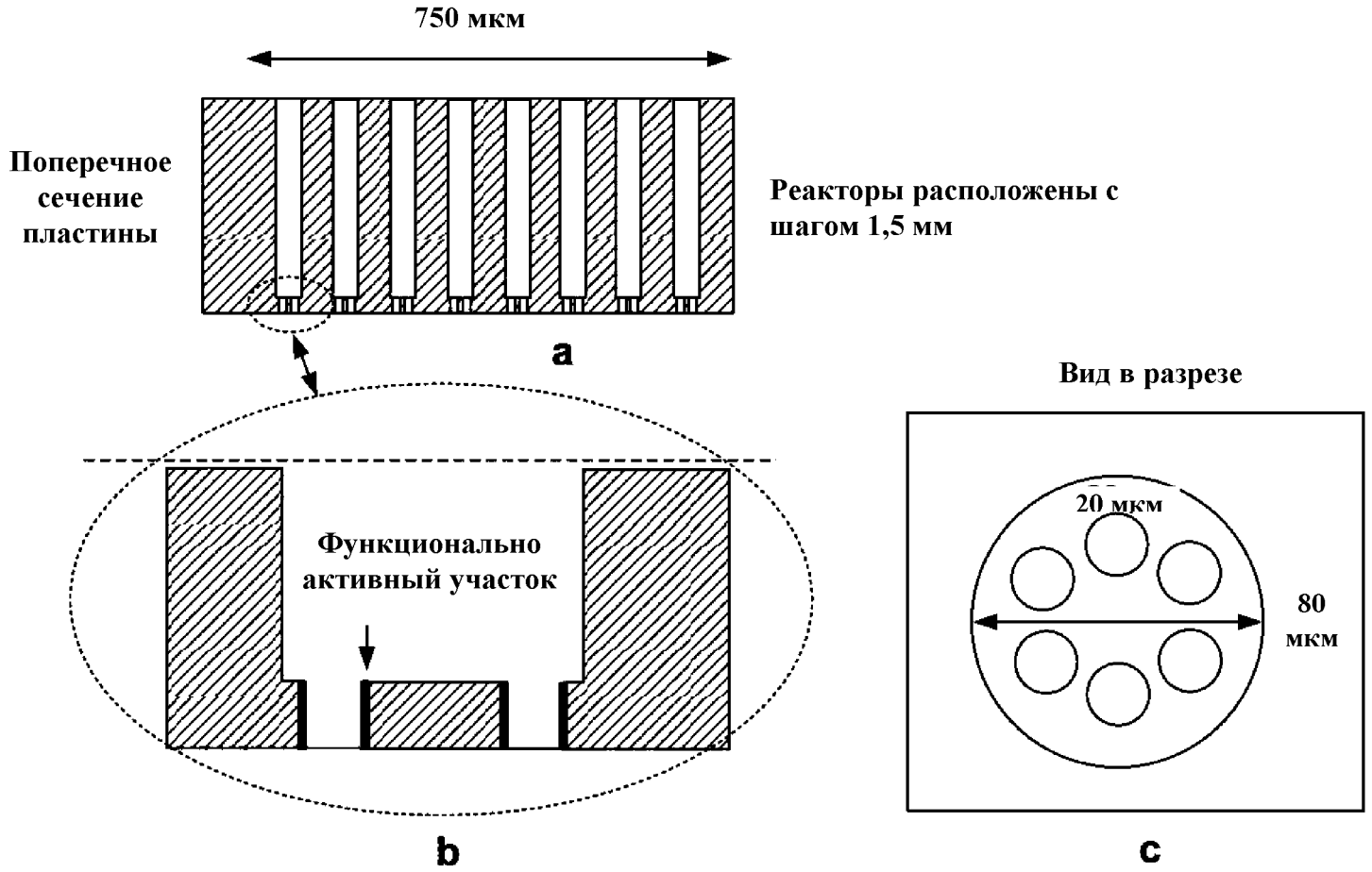



*ФИГ. 2С*


Принтер для синтеза олигонуклеотидов
Ацетонитрил, N2
Отходы
Выпускной манифольд
Контроль перемещения по оси X и Y
Печатающие головки
Контроль перемещения по оси Z
Пластина
Впускной манифольд
Окислитель, деблокирующий агент, ацетонитрил, N2
Отходы

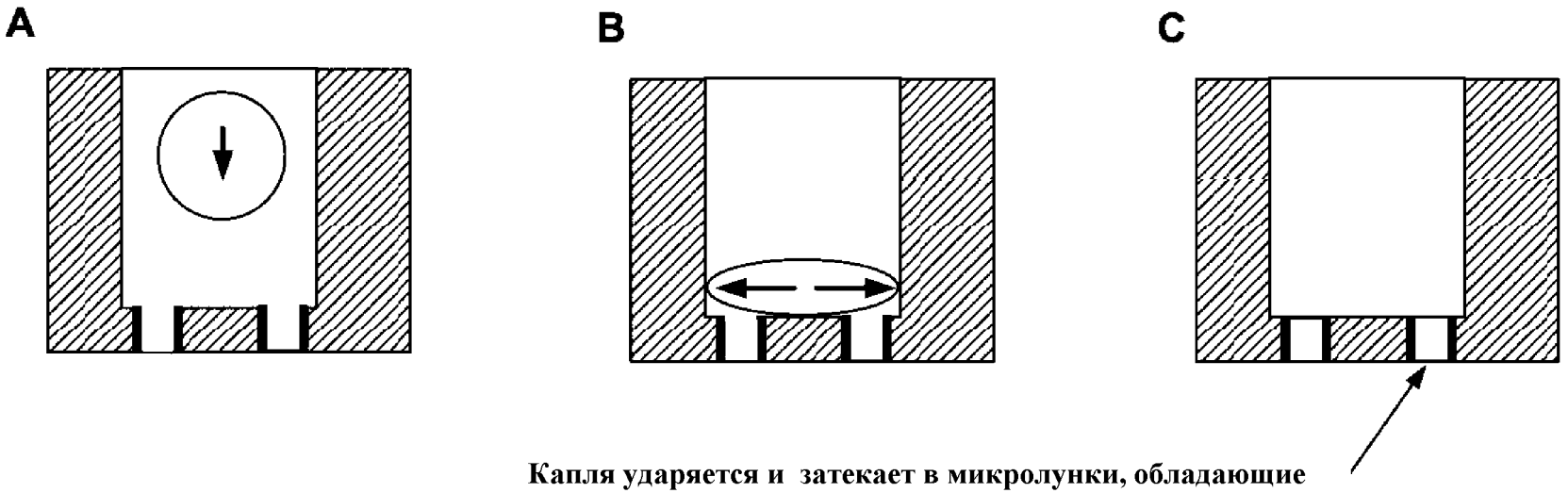
*ФИГ. 3*

**Пластинчатый реактор для синтеза олигонуклеотидов**

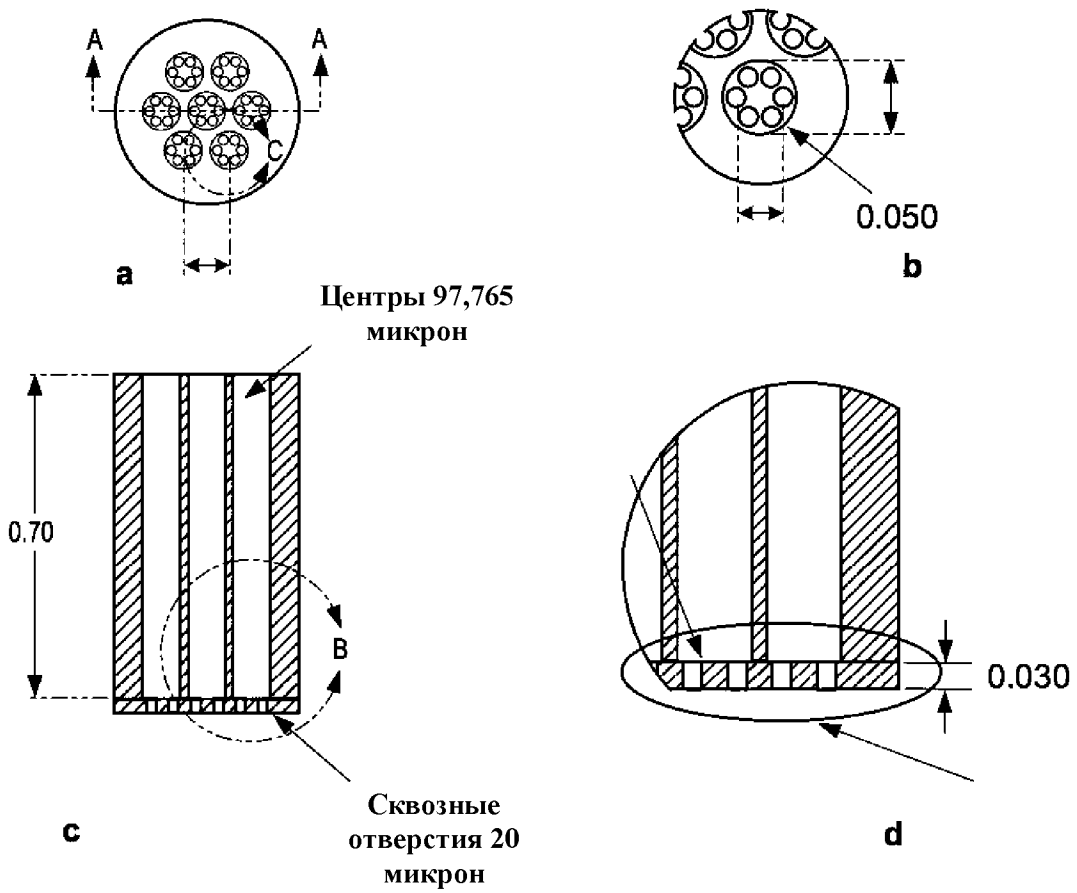



*ФИГ. 4*

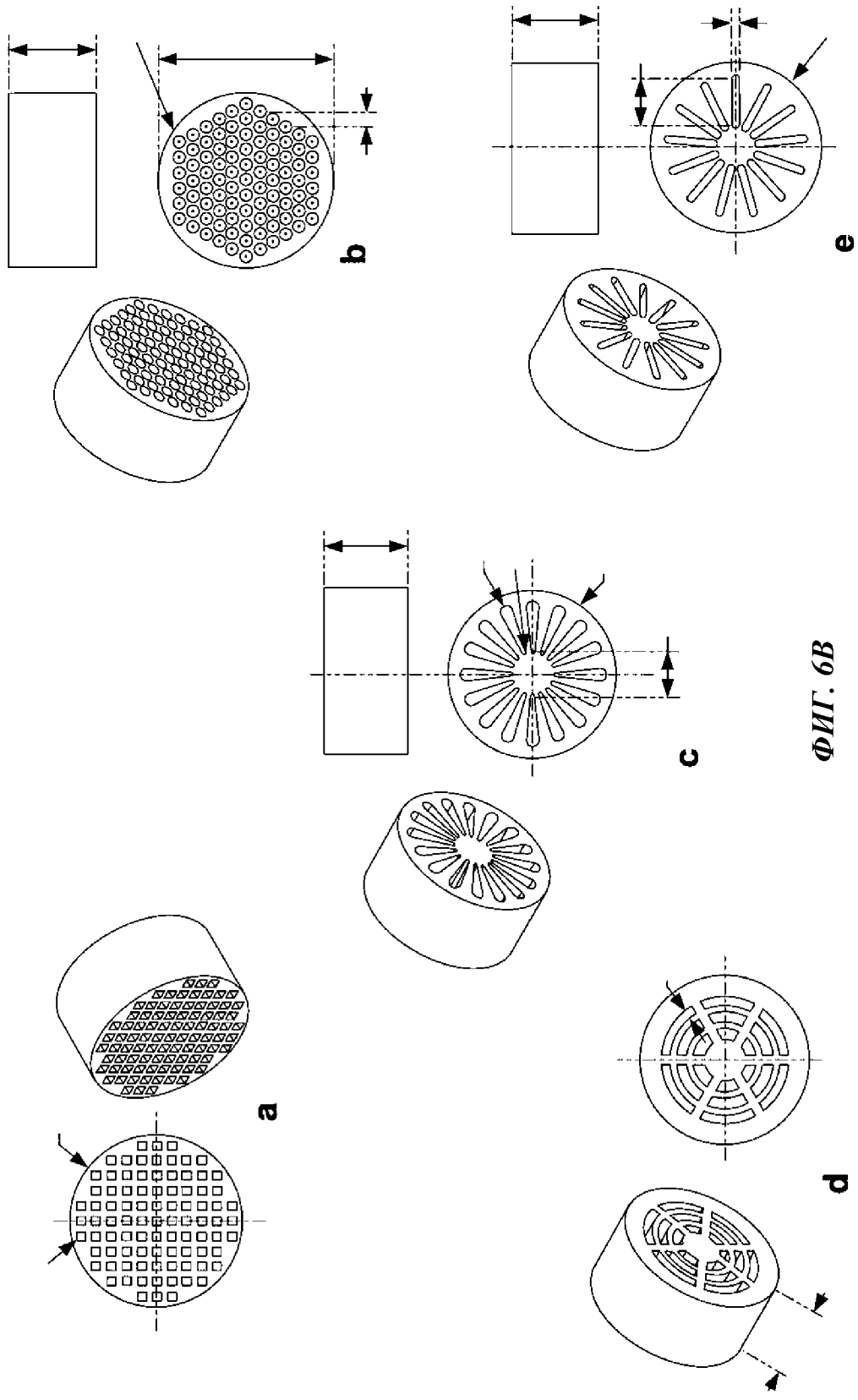
**Осаждение реагентов**




*ФИГ. 5*

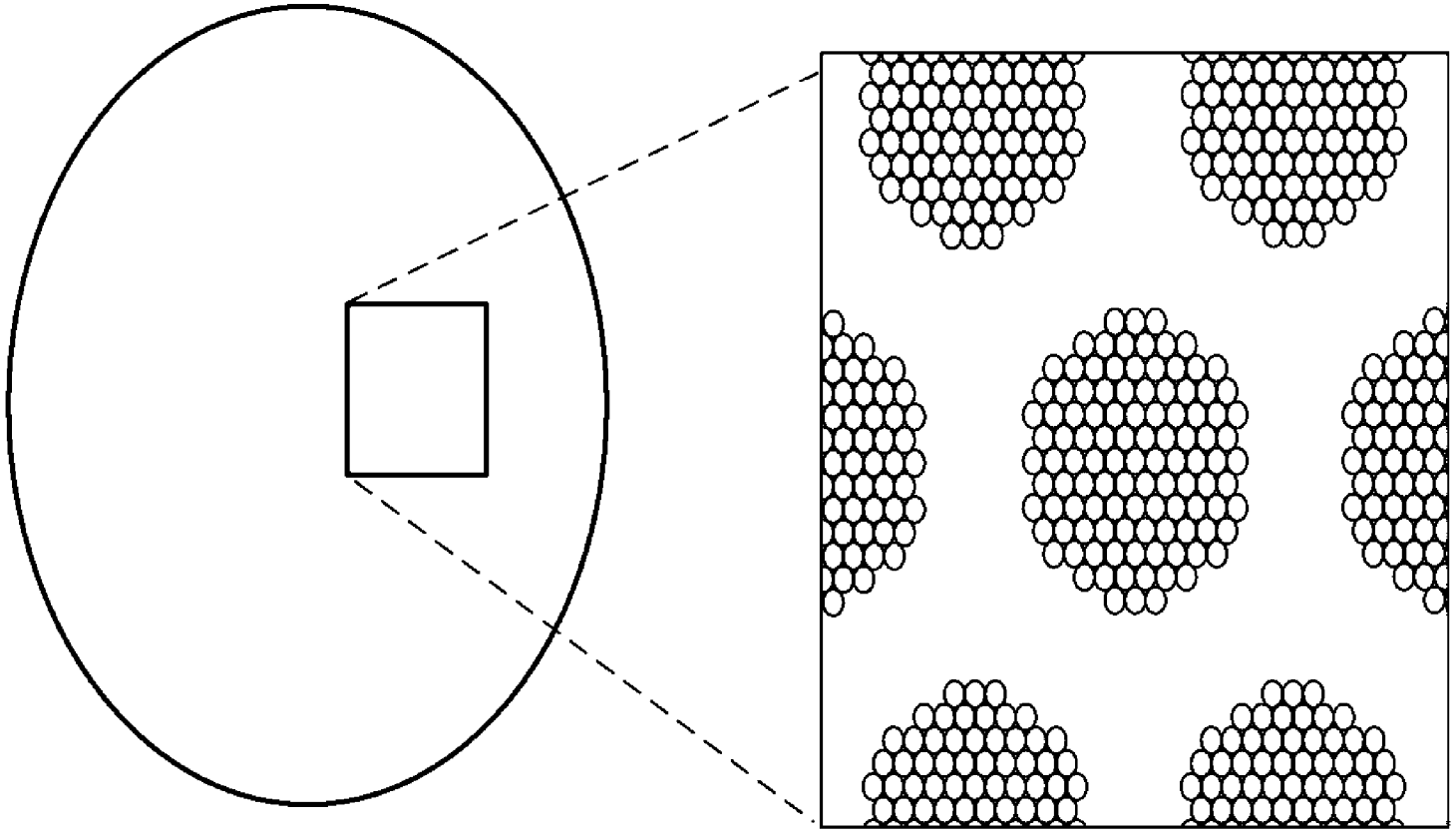

A
A
C
a
0.050
b
Центры 97,765 микрон
0.70
B
c
Сквозные отверстия 20 микрон
0.030
d

*ФИГ. 6A*

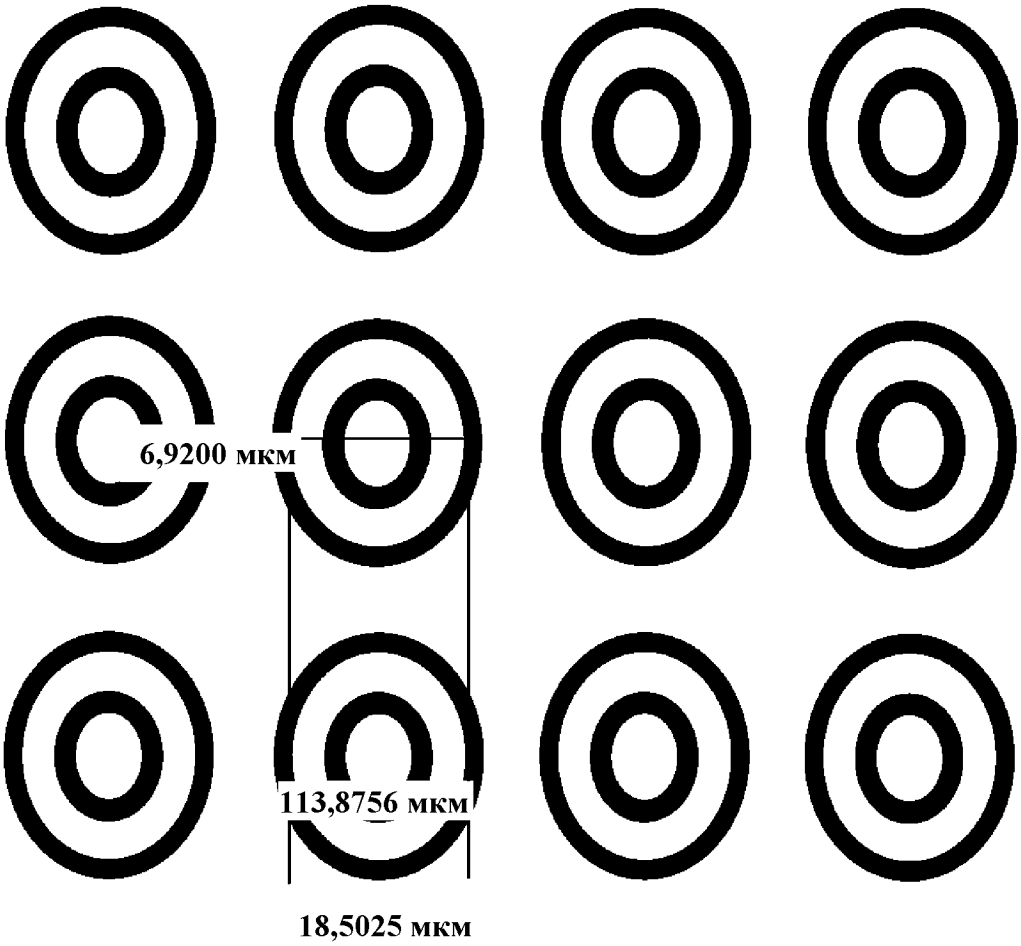



*ФИГ. 6В*

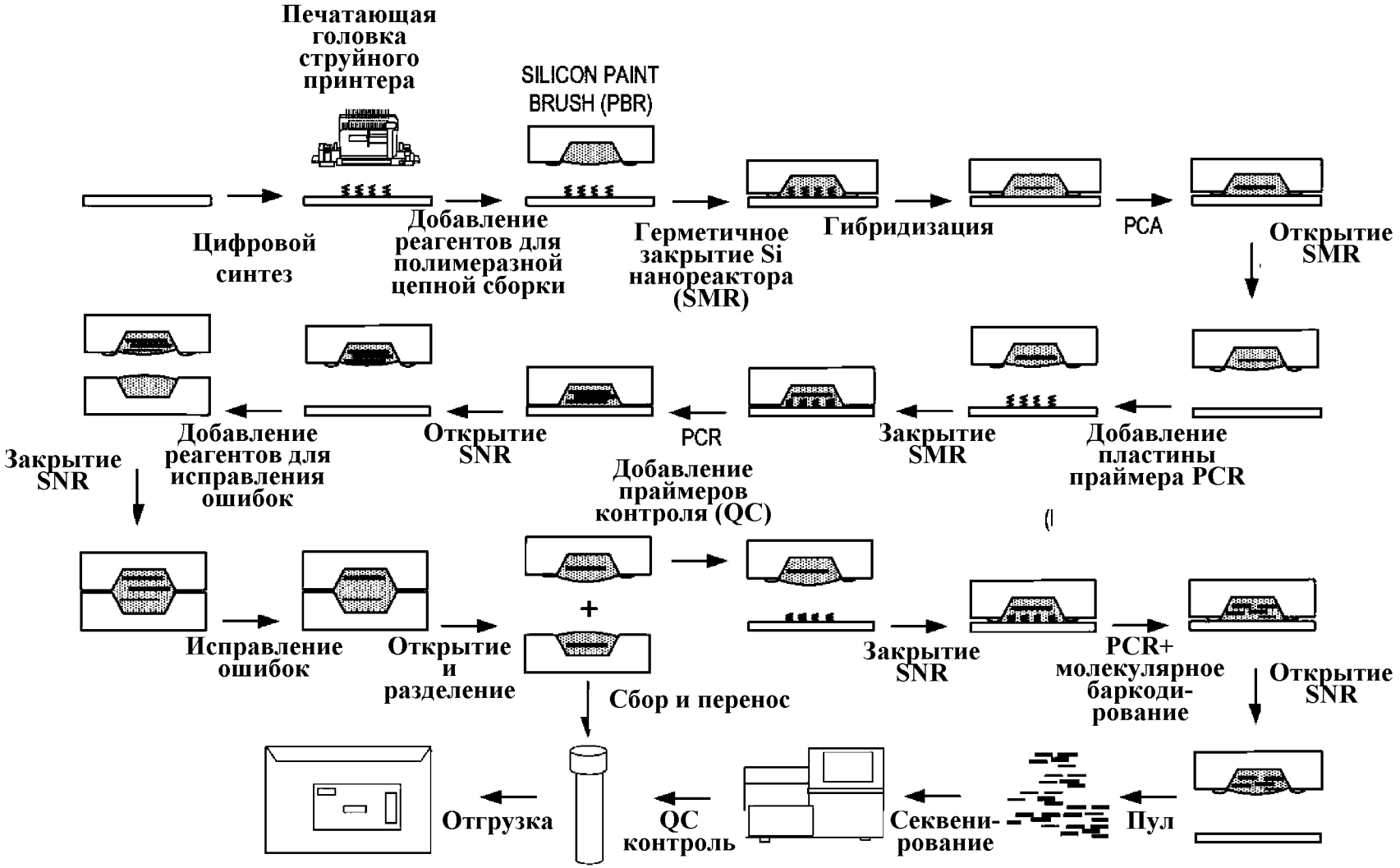
**Схема расположения микроструктур на пластине**



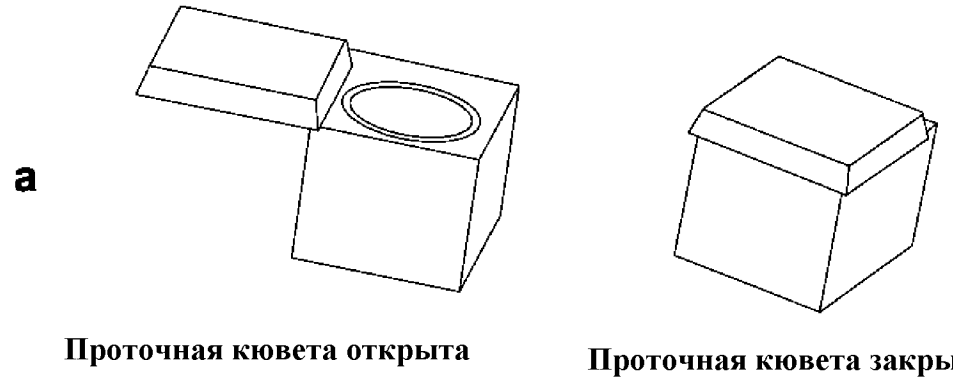
*ФИГ. 6С*

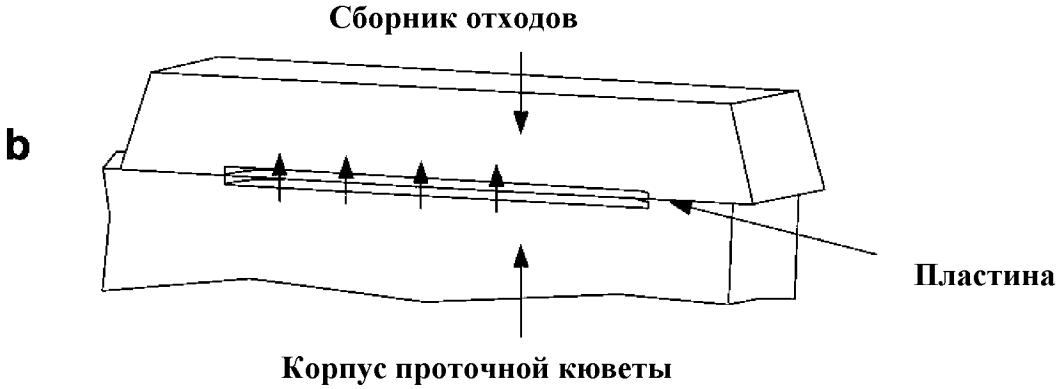



*ФИГ. 7*


Печатающая головка струйного принтера
SILICON PAINT BRUSH (PBR)
Цифровой синтез
Добавление реагентов для полимеразной цепной сборки
Герметичное закрытие Si нанореактора (SMR)
Гибридизация
PCA
Открытие SMR
Добавление пластины праймера PCR
Закрытие SMR
PCR
Открытие SNR
Добавление реагентов для исправления ошибок
Закрытие SNR
Добавление праймеров контроля (QC)
Исправление ошибок
Открытие и разделение
Сбор и перенос
Закрытие SNR
PCR+ молекулярное баркоди-рование
Открытие SNR
Пул
Секвени-рование
QC контроль
Отгрузка

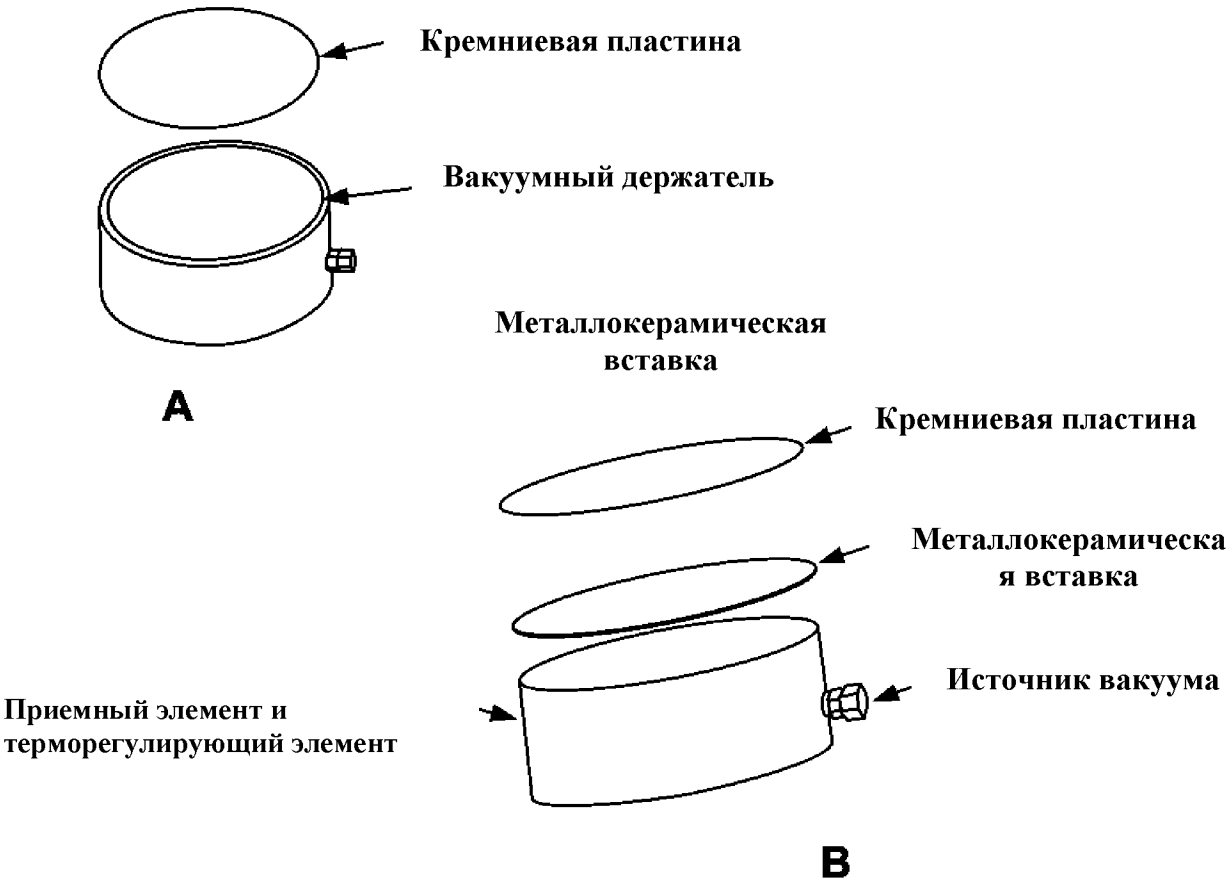
*ФИГ. 8*

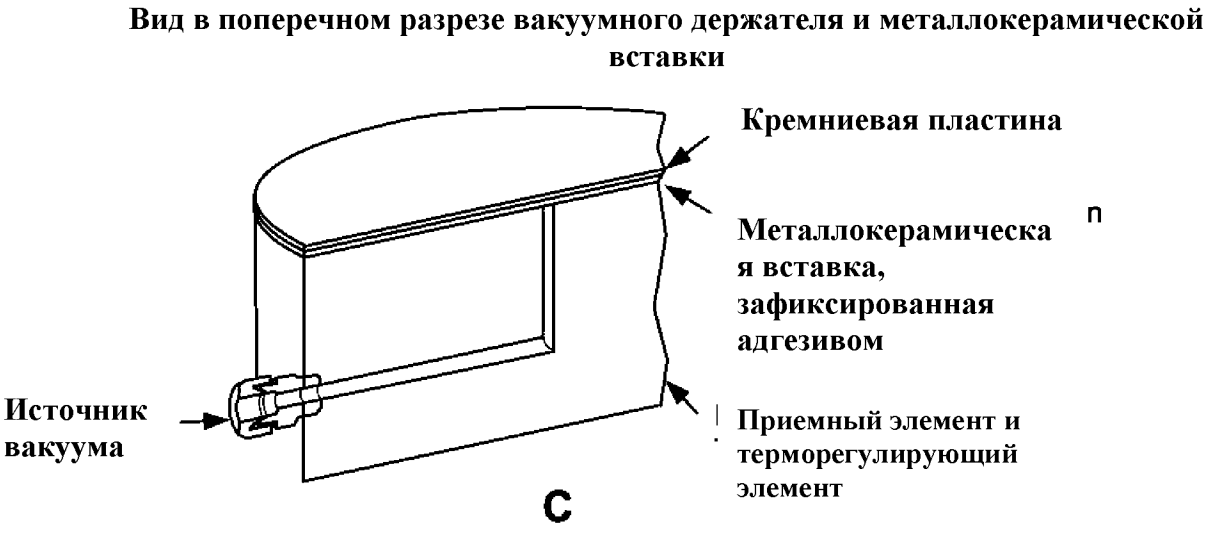

a
Проточная кювета открыта
Проточная кювета закрыта


b
Сборник отходов
Пластина
Корпус проточной кюветы


c
Коллектор отходов
Отверстие для выхода отходов
Входное отверстие
Впускной манифольд
Уплотнение

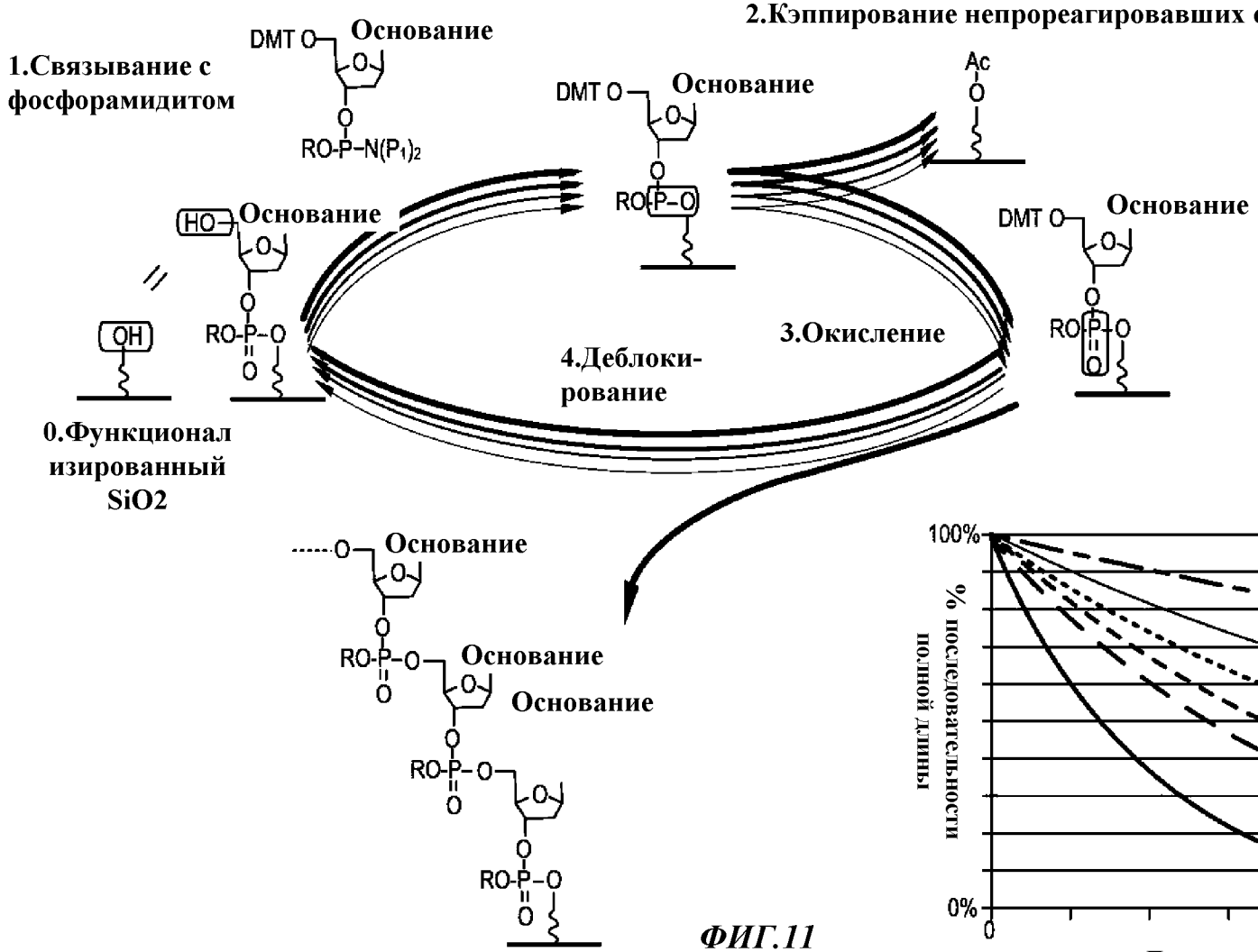
*ФИГ. 9*


Вакуумный держатель с одной канавкой
Кремниевая пластина
Вакуумный держатель
A
Металлокерамическая вставка
Кремниевая пластина
Металлокерамическая вставка
Источник вакуума
Приемный элемент и терморегулирующий элемент
B


Вид в поперечном разрезе вакуумного держателя и металлокерамической вставки
Кремниевая пластина
Металлокерамическая вставка, зафиксированная адгезивом
Источник вакуума
Приемный элемент и терморегулирующий элемент
C

*ФИГ. 10*

## Стандартная фосфорамидитная химия

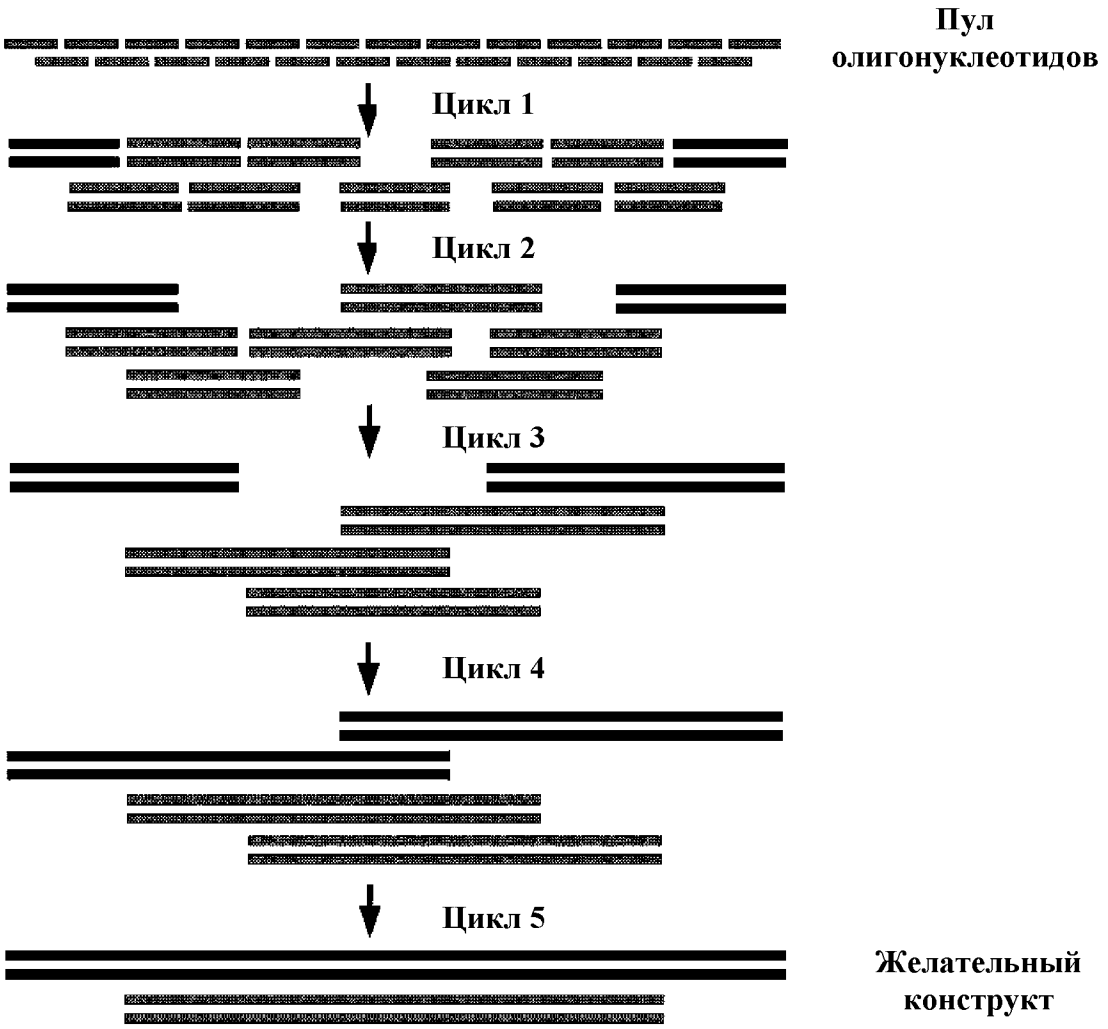






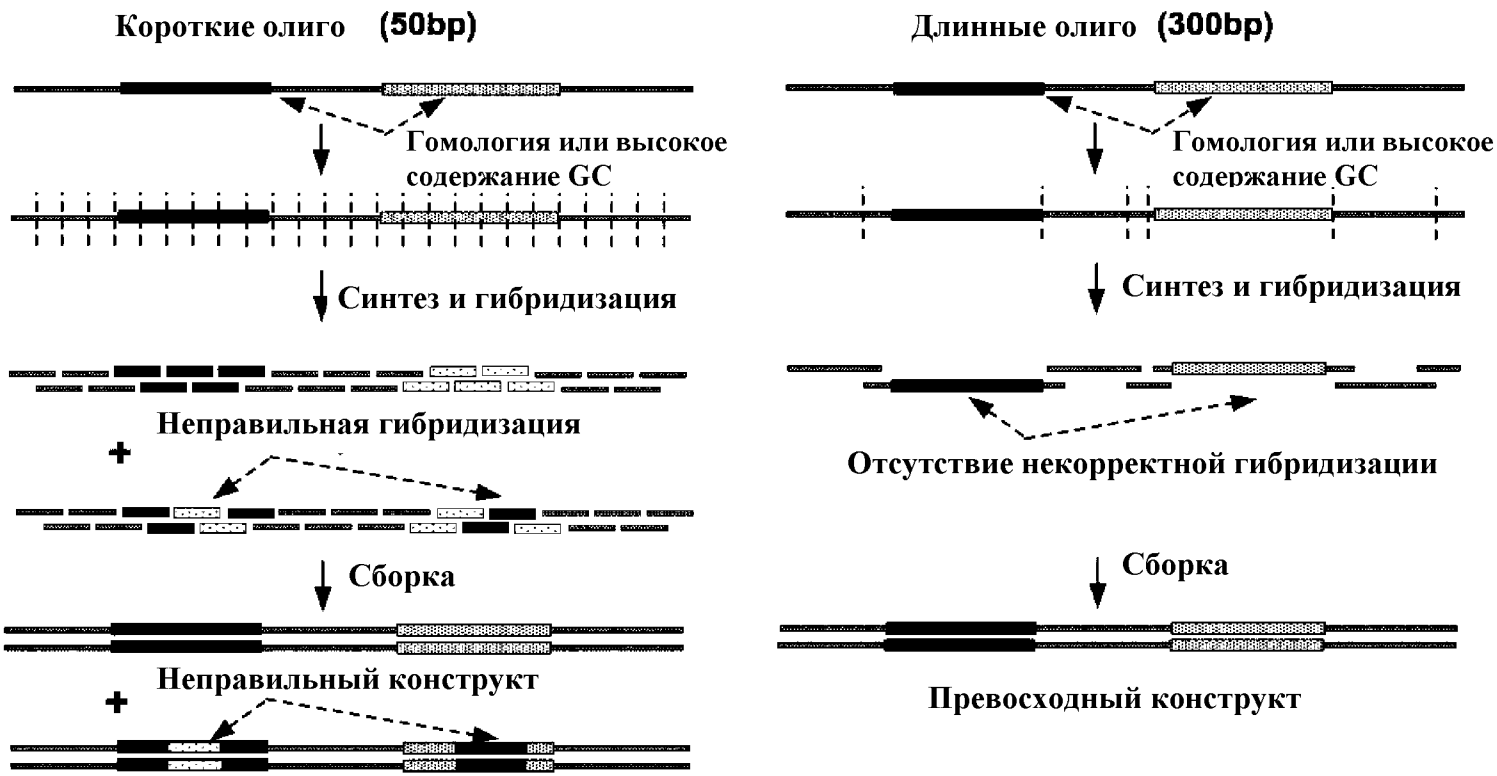
*ФИГ.11*

## Полимеразная цепная сборка



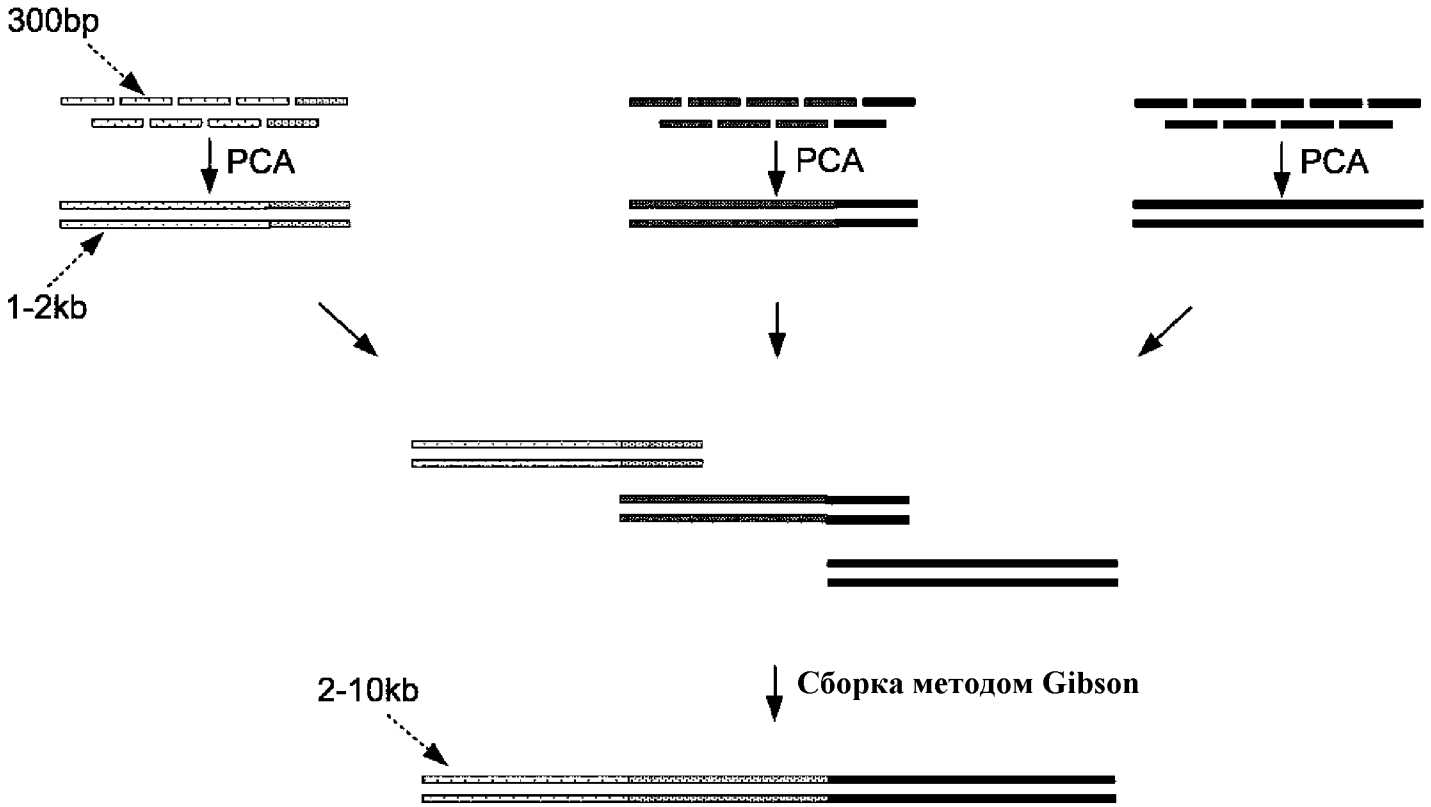

*ФИГ. 12*

## Преимущество длинных олигонуклеотидов



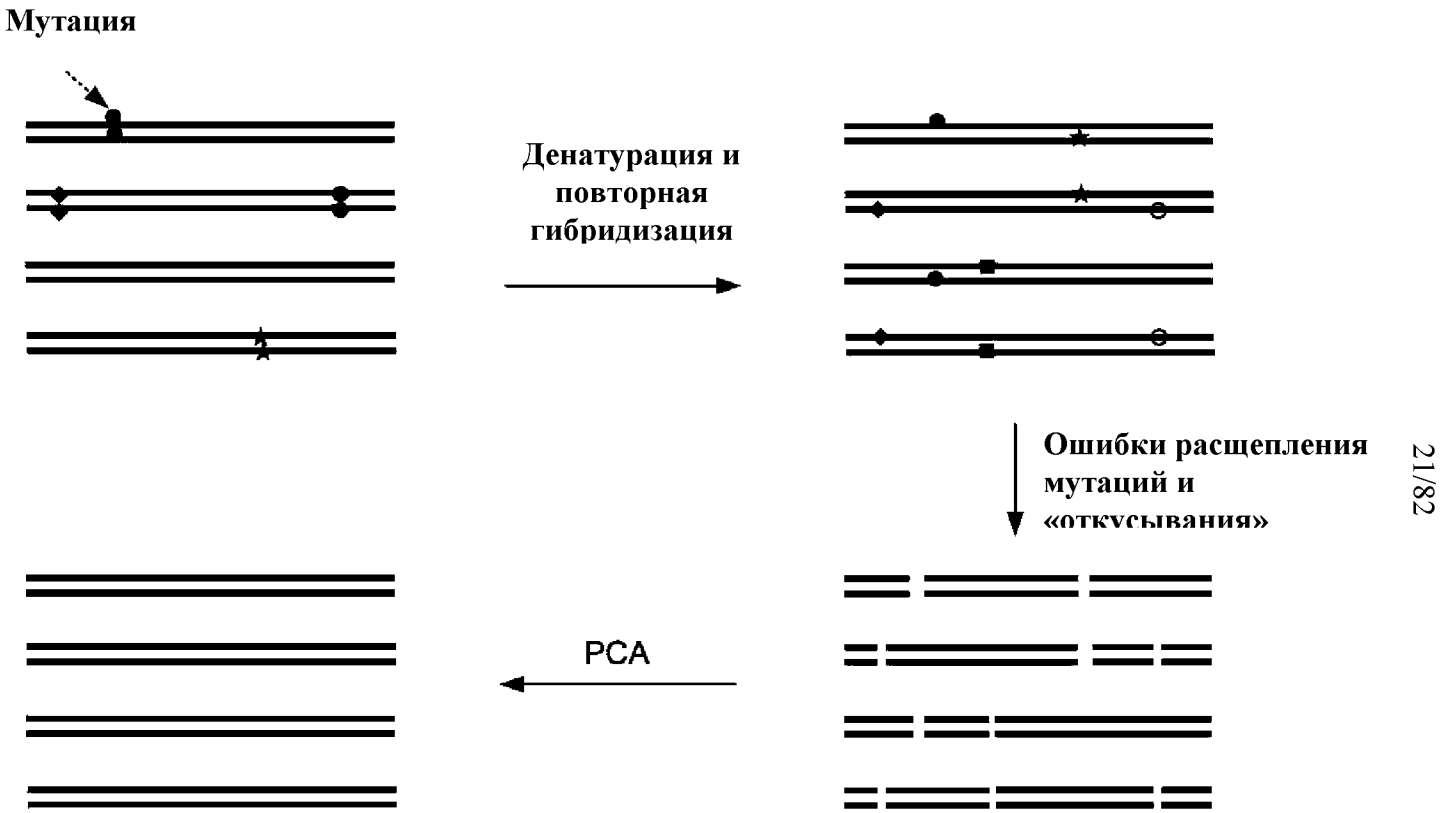

*ФИГ.13*

**Методы PCA + Gibson для сборки олигонуклеотидов в генный продукт длиной 2-10 kb**



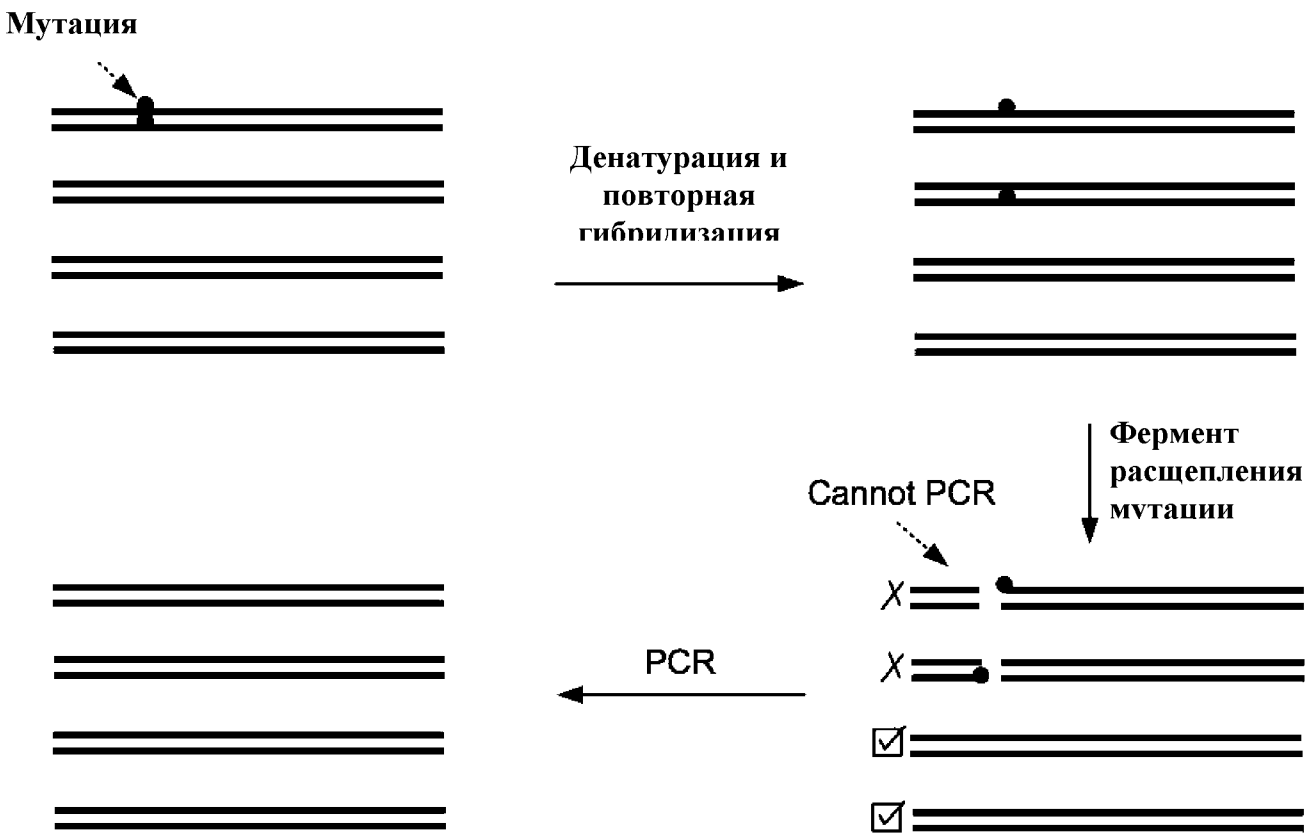

*ФИГ.14*

## Исправление ошибок: Высокая частота ошибок




*ФИГ.15*

**Исправление ошибок: Низкая частота ошибок**

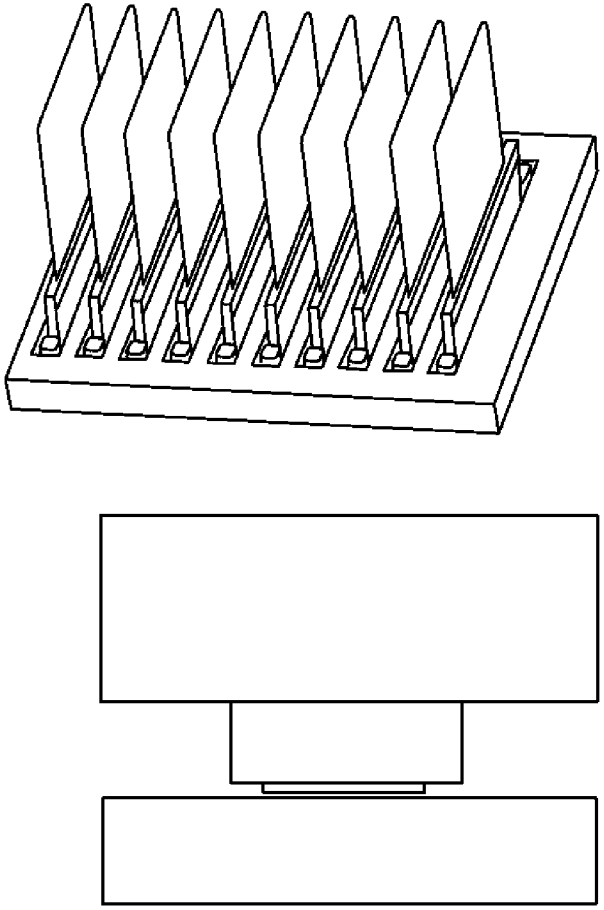



*ФИГ.16*


Молекулярное баркодирование и NGS QC
Конечный ген
Баркод
Гибридизация ген-специфических «padlock» зондов
Полимераза + лигаза
Расщепление гена
Sequencing adaptors
PCR добавление адаптеров для секвенирования
Обработка множества генов параллельно с отдельным баркодом
Пул из всех генов на пластине
Секвенирование MiSeq
Деконволюция по баркоду
Выравнивание
Подтверждение последовательности
Выравнивание
Подтверждение последовательности
Выравнивание
Подтверждение последовательности

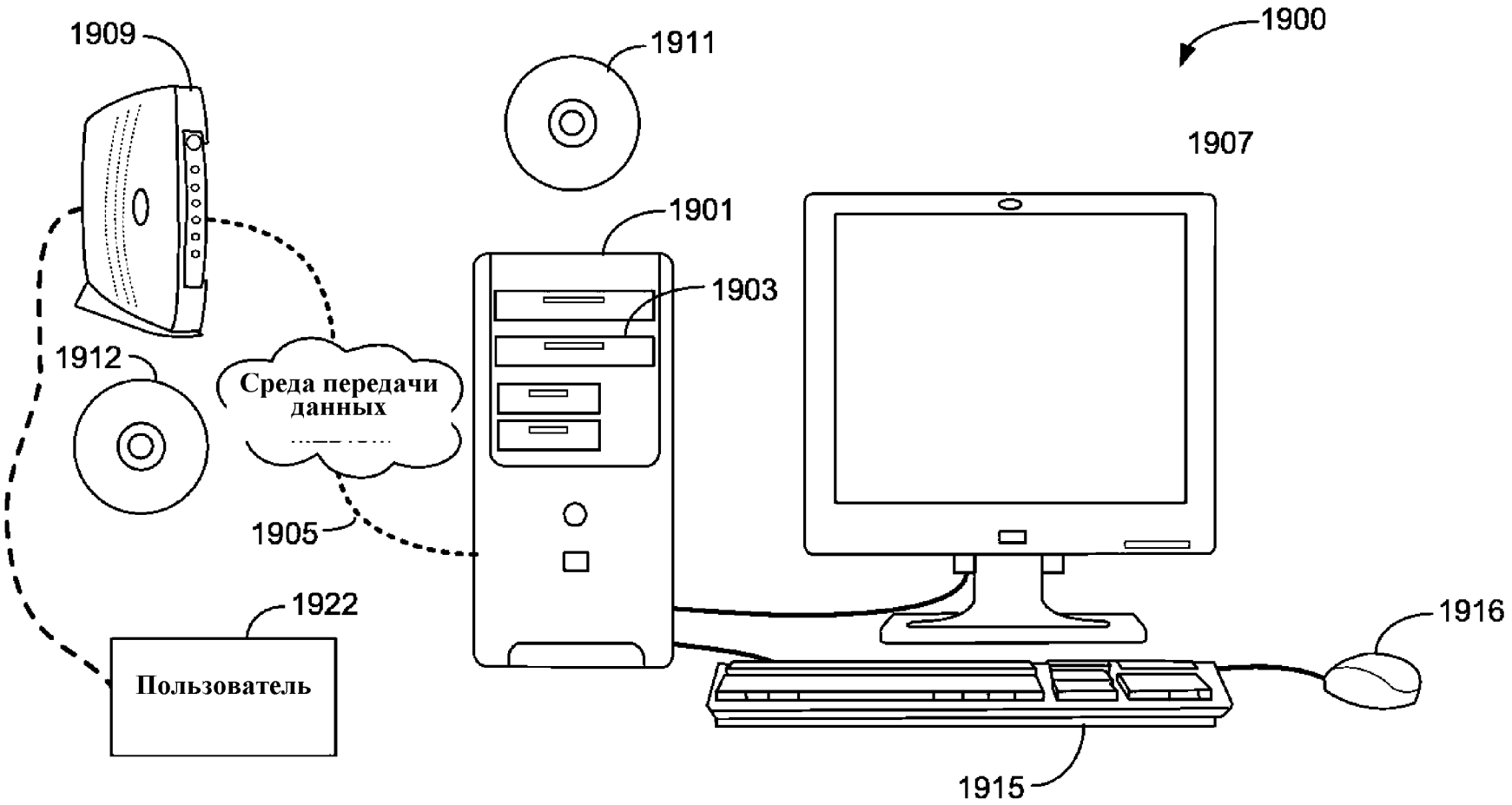
*ФИГ.17*

## Блок струйного устройства

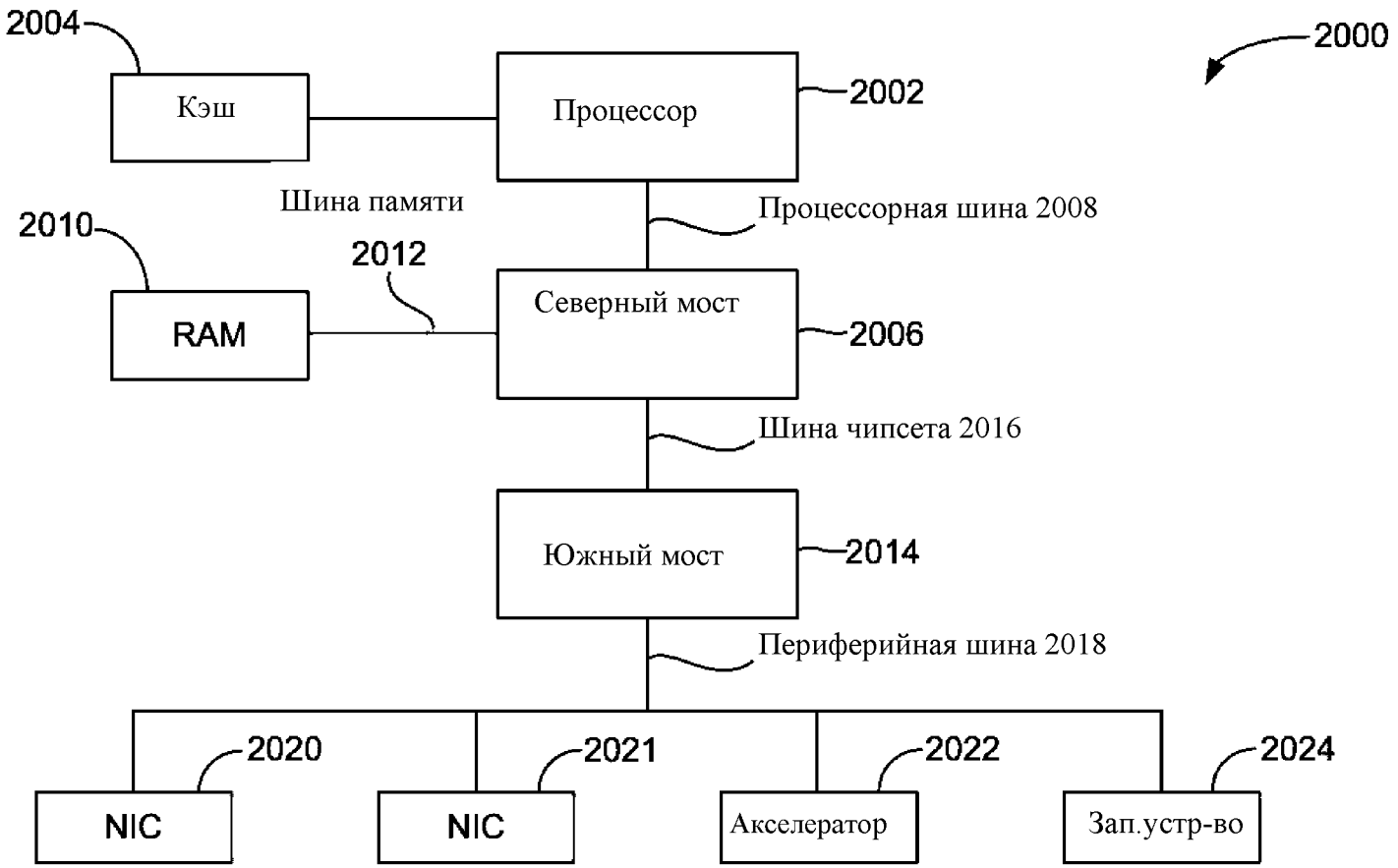


- Блок струйного устройства с 10 головками
- Головки струйного устройства содержат силиконовые пластины с 256 соплами на 254 мкм центрах
- Высота струи 100 микрон
- Каждая головка требует доступа к каждой лунке, которую пересекает

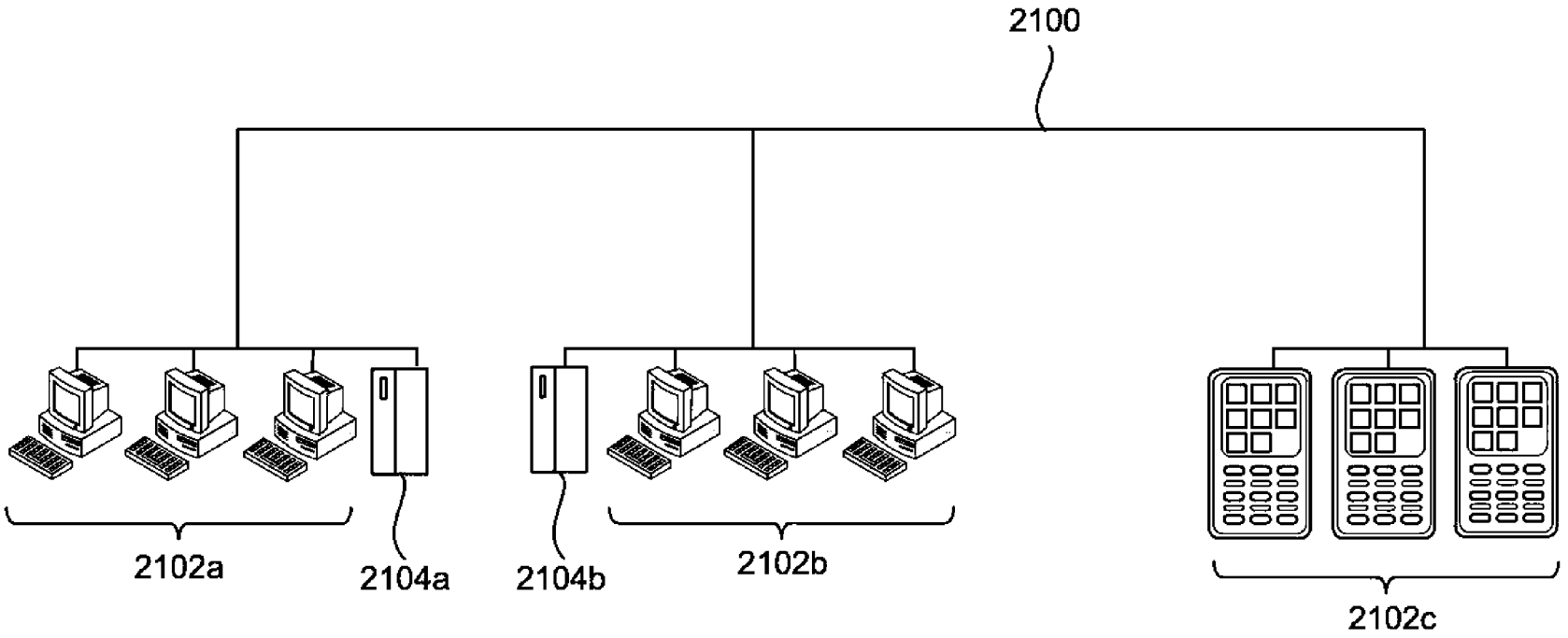
*ФИГ.18*


1909
1911
1900
1907
1901
1903
1912
Среда передачи данных
1905
1922
Пользователь
1916
1915

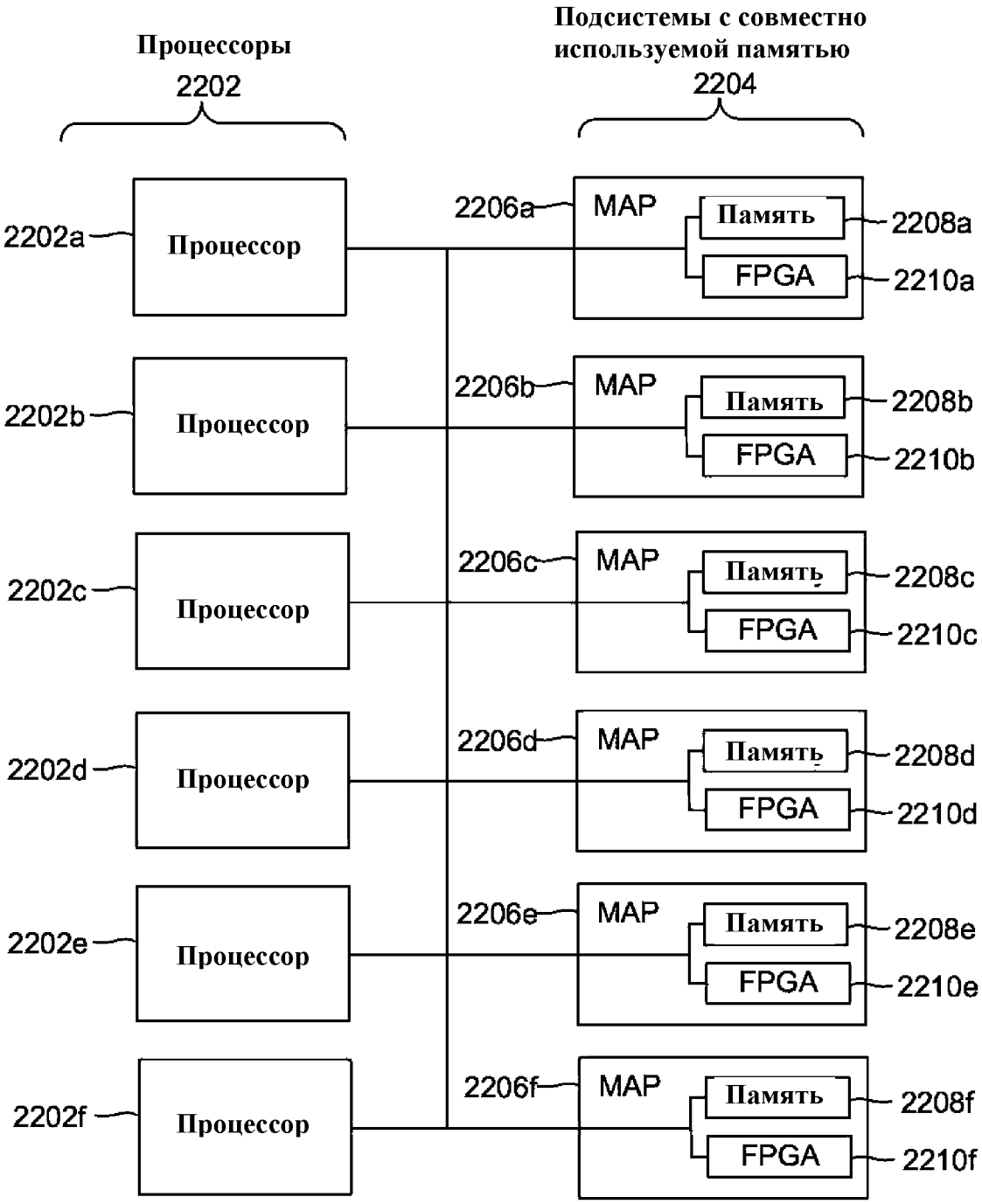
*ФИГ.19*


2004
Кэш
Процессор
2002
2000
Шина памяти
Процессорная шина 2008
2010
2012
RAM
Северный мост
2006
Шина чипсета 2016
Южный мост
2014
Периферийная шина 2018
2020
2021
2022
2024
NIC
NIC
Акселератор
Зап.устр-во

*ФИГ.20*




*ФИГ.21*


Процессоры
2202
Подсистемы с совместно используемой памятью
2204
2202a
Процессор
2206a
MAP
Память
2208a
FPGA
2210a
2202b
Процессор
2206b
MAP
Память
2208b
FPGA
2210b
2202c
Процессор
2206c
MAP
Память
2208c
FPGA
2210c
2202d
Процессор
2206d
MAP
Память
2208d
FPGA
2210d
2202e
Процессор
2206e
MAP
Память
2208e
FPGA
2210e
2202f
Процессор
2206f
MAP
Память
2208f
FPGA
2210f

*ФИГ. 22*

## Предварительная обработка

1. Субстрат SOI со слоем оксида

2. Фотолитография на стороне несущего толстого слоя

3. Глубокое травление RIE на стороне несущего толстого слоя

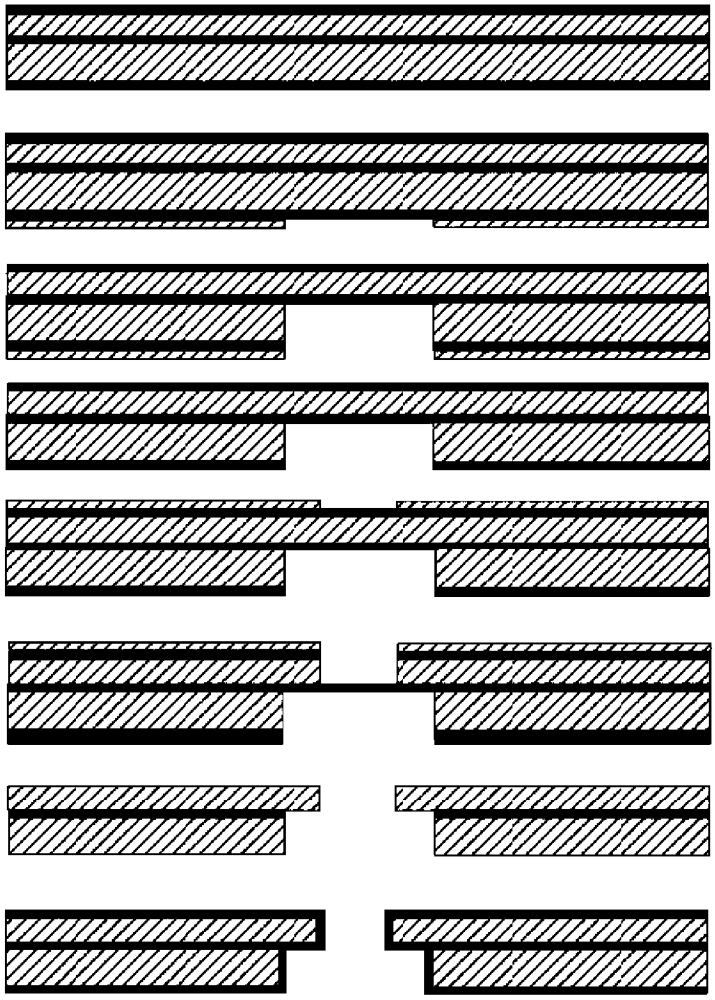
4. Снятие фоторезиста

5. Фотолитография на стороне рабочего тонкого слоя

6. Глубокое травление RIE на стороне рабочего тонкого слоя

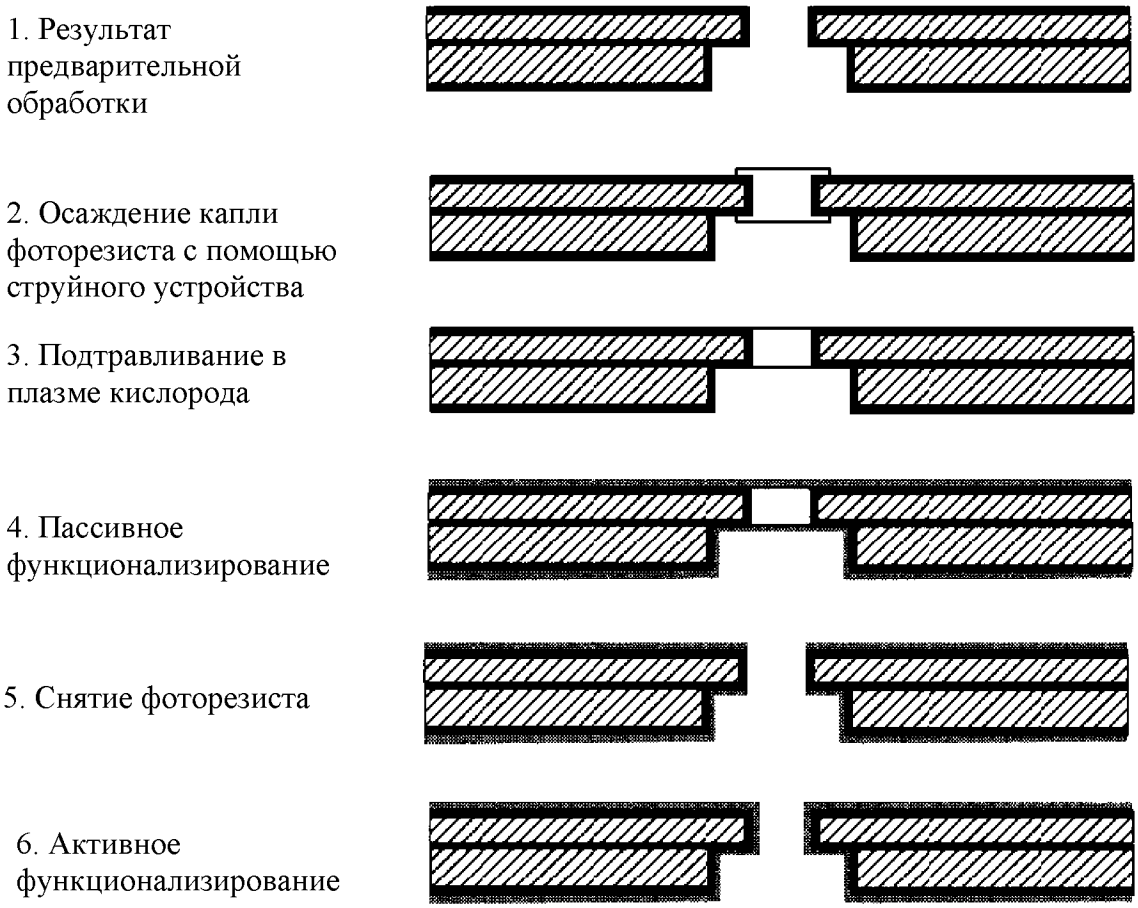
7. Удаление фоторезиста и оксида

8. Нанесение оксида

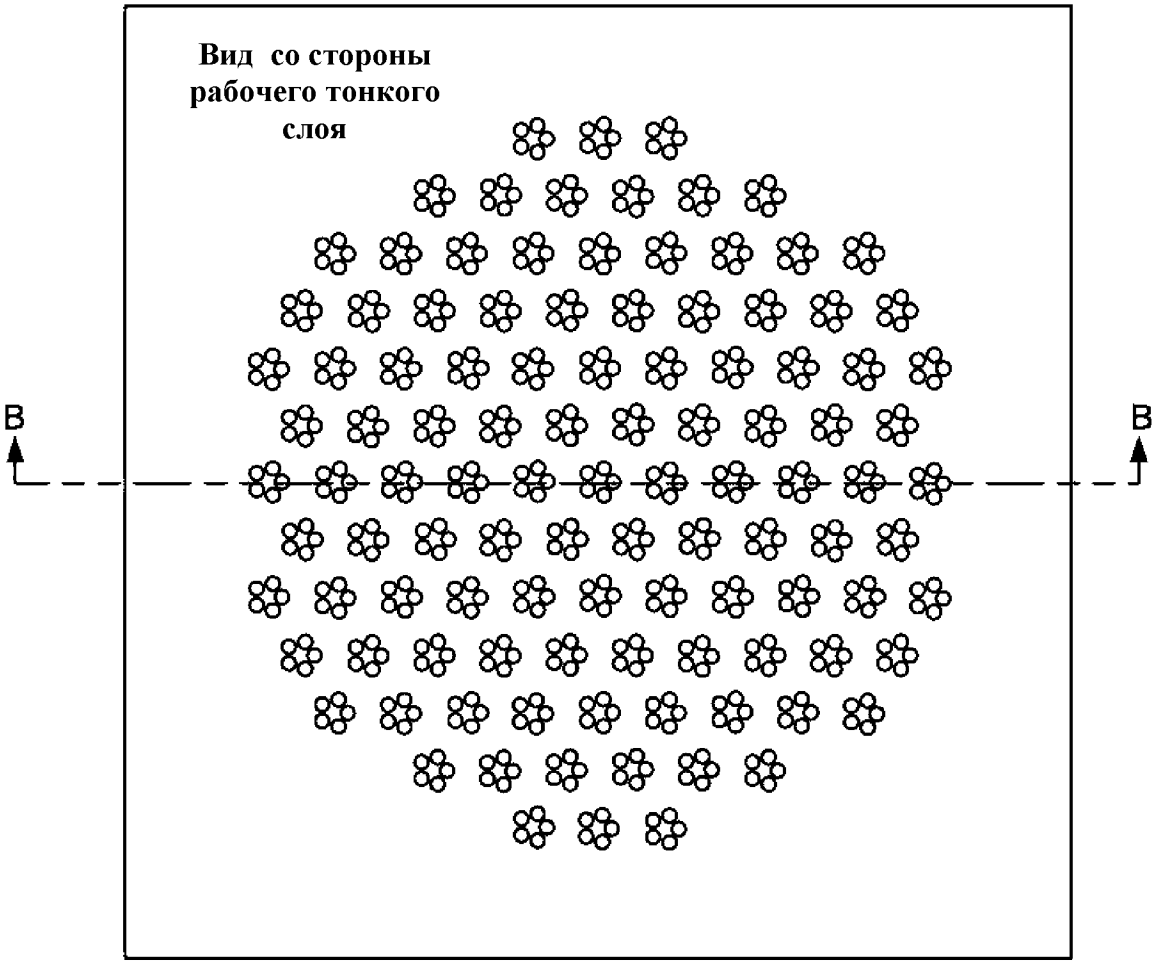


***ФИГ. 23***

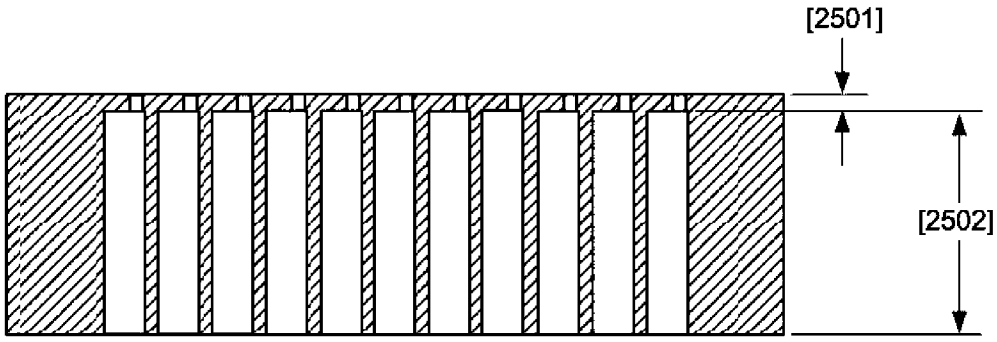
## Окончательная обработка




***ФИГ. 24***

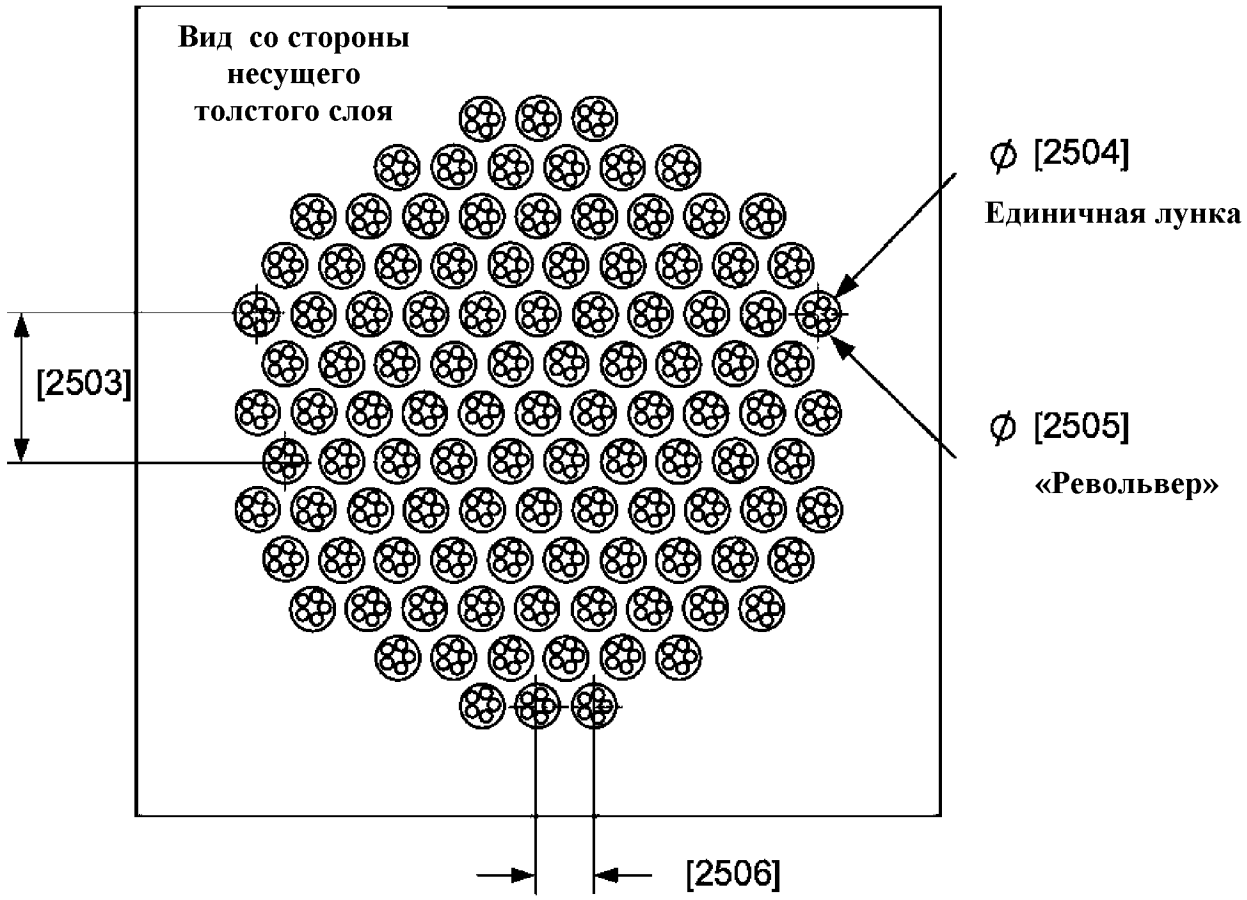



*ФИГ. 25A*

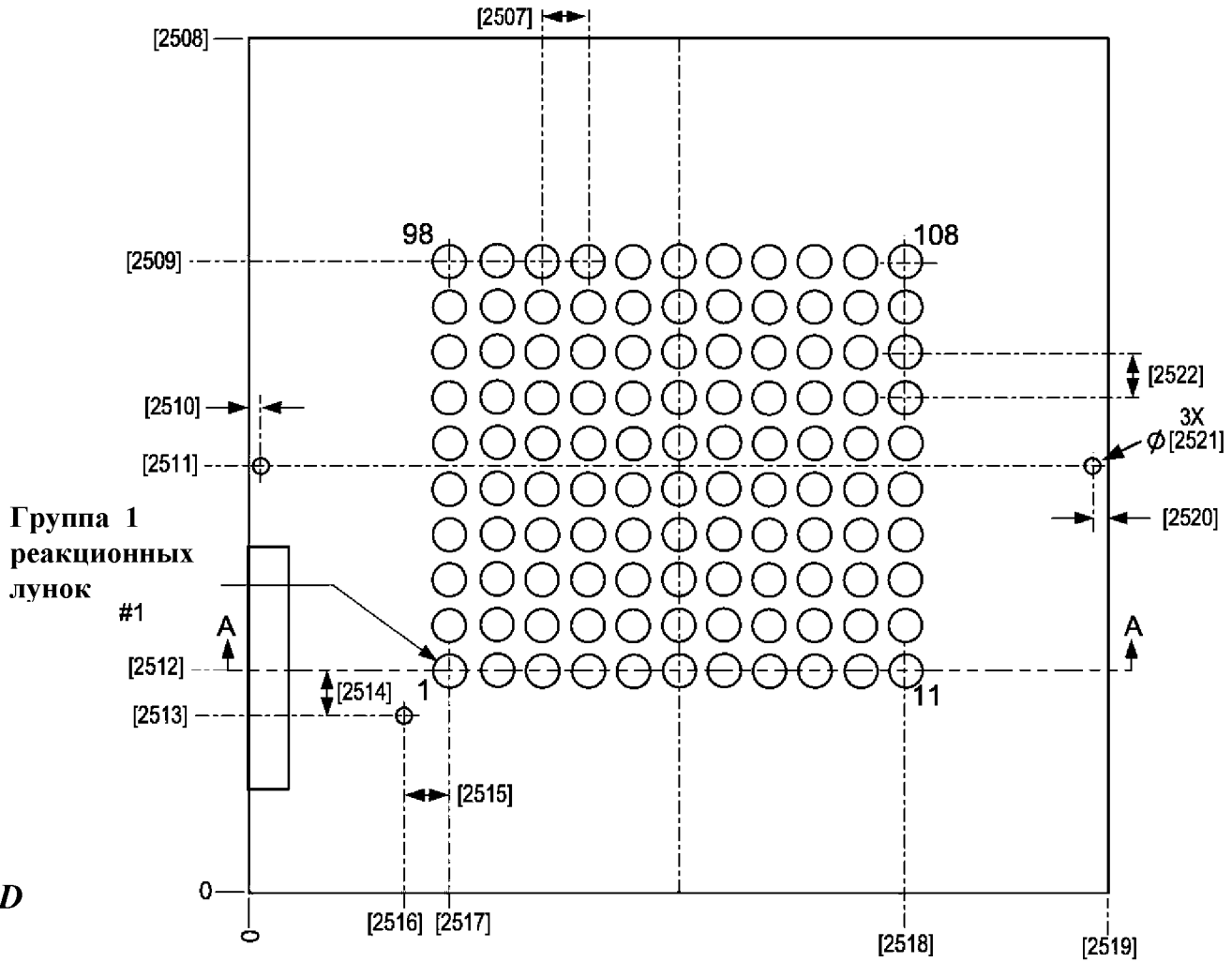



**Поперечное сечение B-B**

***ФИГ. 25B***


Вид со стороны несущего толстого слоя
[2503]
[2504]
Единичная лунка
[2505]
«Револьвер»
[2506]

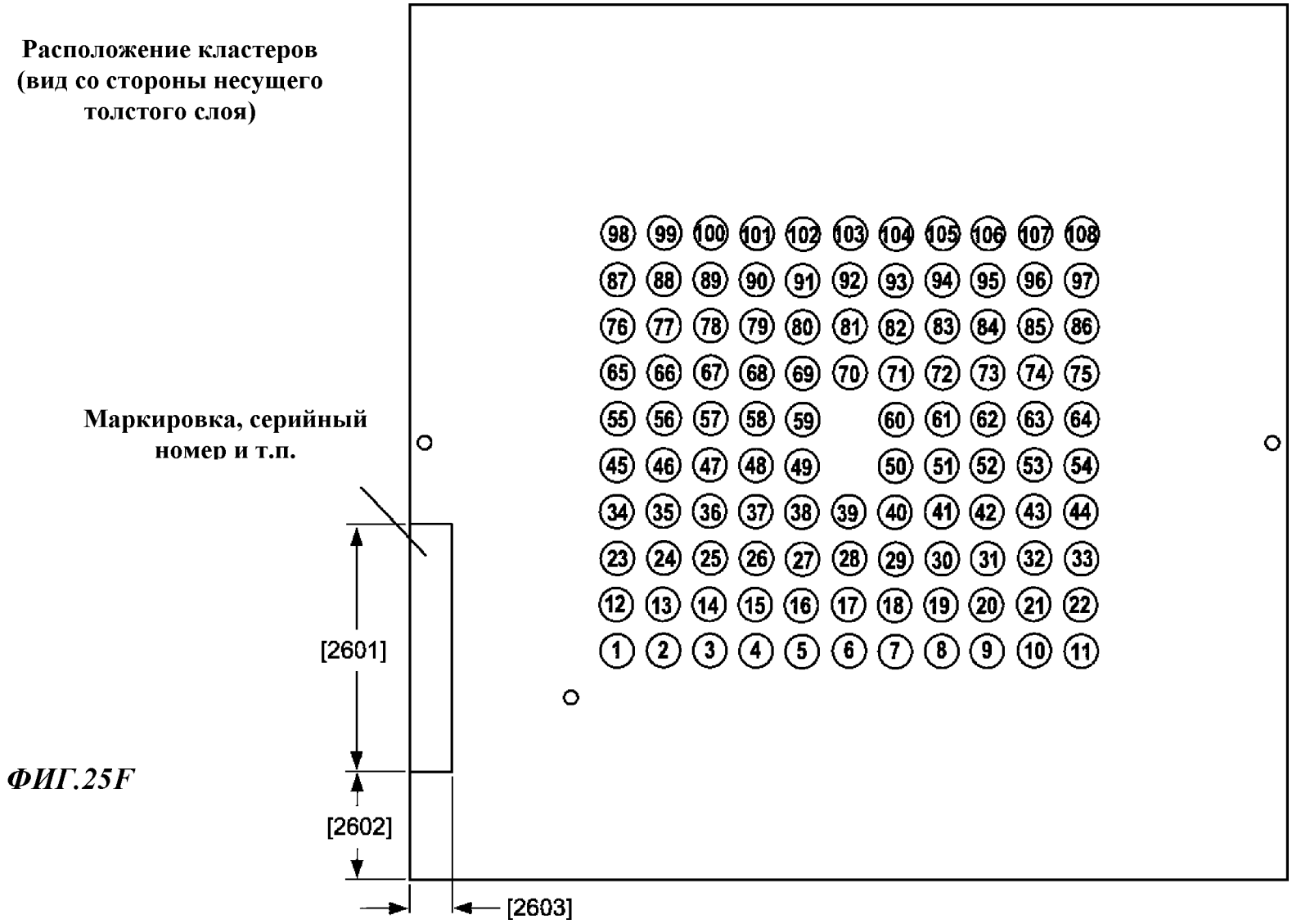
*ФИГ. 25C*


[2507]
[2508]
98
108
[2509]
[2522]
[2510]
3X
Ø[2521]
[2511]
[2520]
Группа 1 реакционных лунок
#1
A
A
[2512]
[2514]
1
11
[2513]
[2515]
0
[2516]
[2517]
[2518]
[2519]

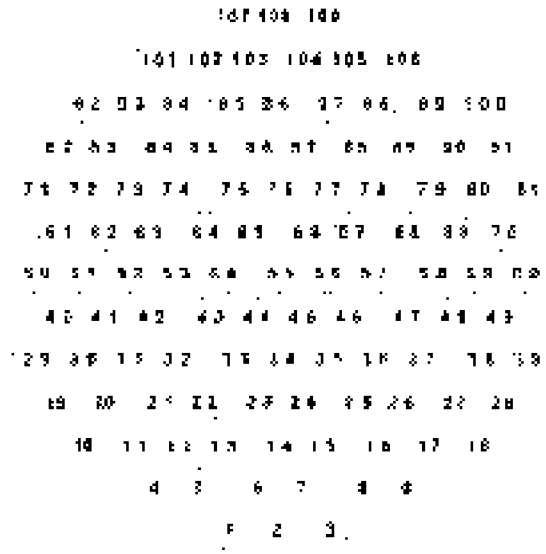
*ФИГ.25D*


Рабочий
тонкий слой
Несущий
толстый
слой
Поперечное сечение A-A
[2523]

*ФИГ.25E*


Расположение кластеров
(вид со стороны несущего
толстого слоя)
Маркировка, серийный
номер и т.п.
[2601]
[2602]
[2603]
98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97
76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86
65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
55 56 57 58 59 60 61 62 63 64
45 46 47 48 49 50 51 52 53 54
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44
23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

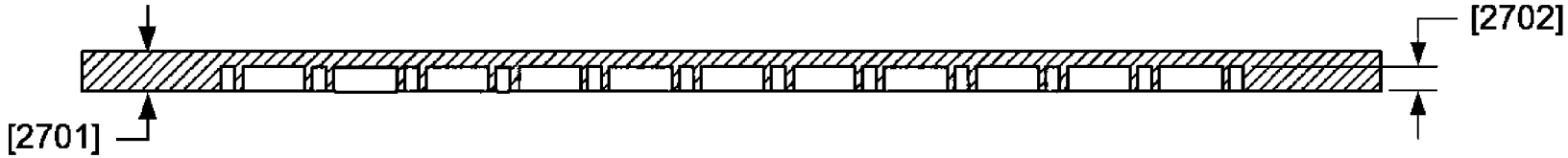
*ФИГ.25F*



**Группа 1 реакционных лунок**

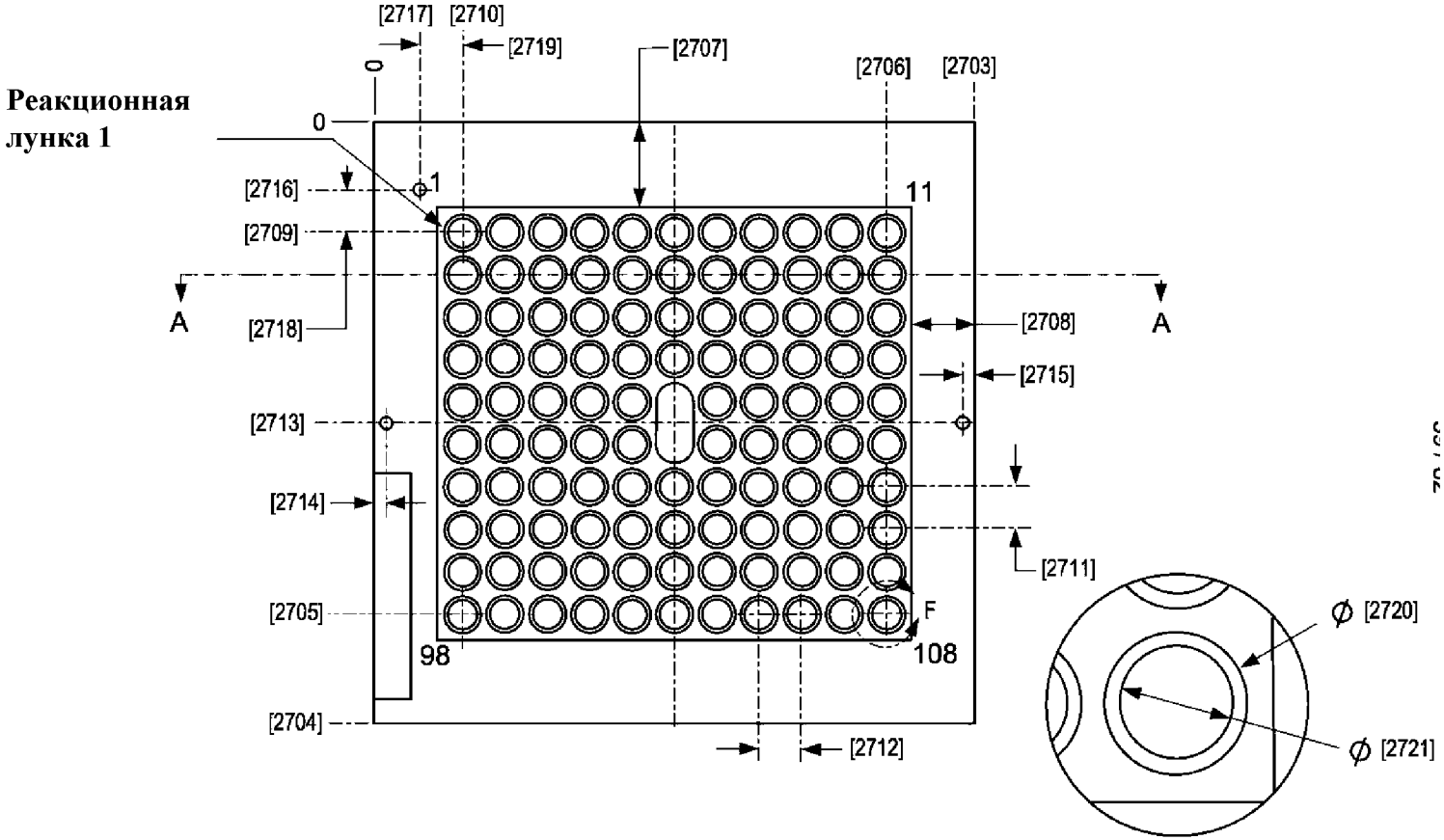
**Расположение лунок в пределах индивидуального кластера (вид со стороны рабочего тонкого слоя**

***ФИГ.25G***

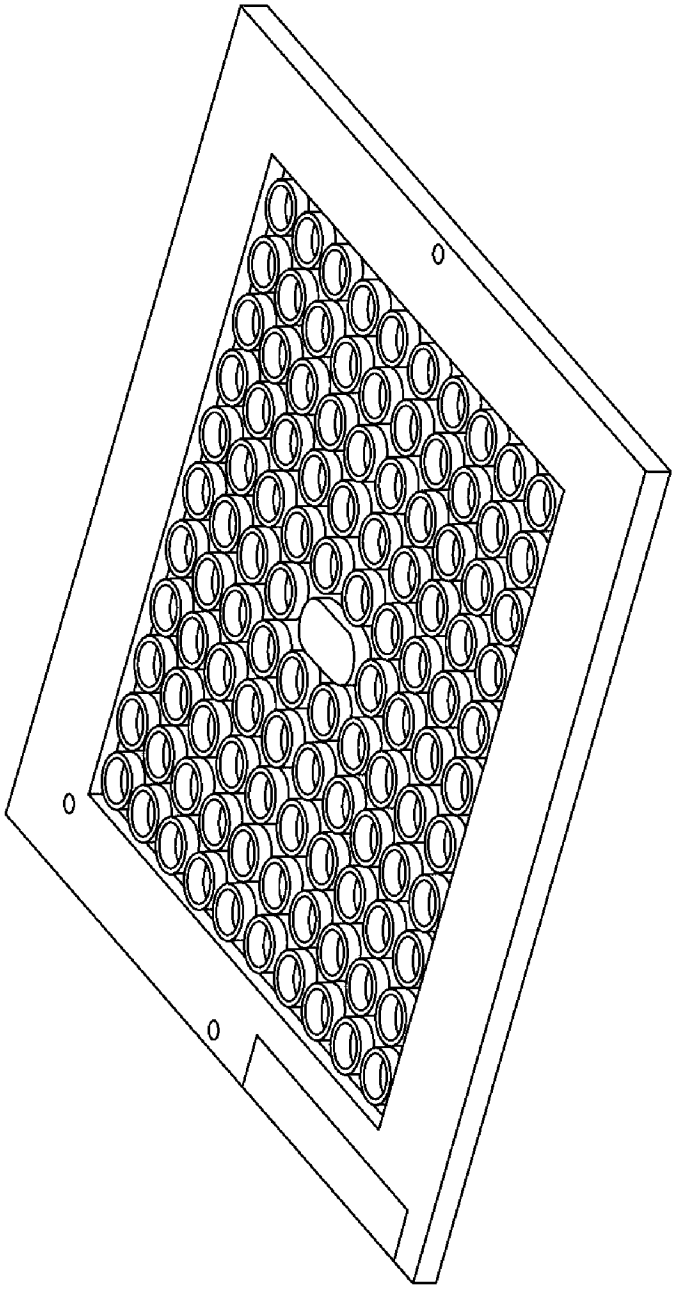



**Поперечное сечение A-A**

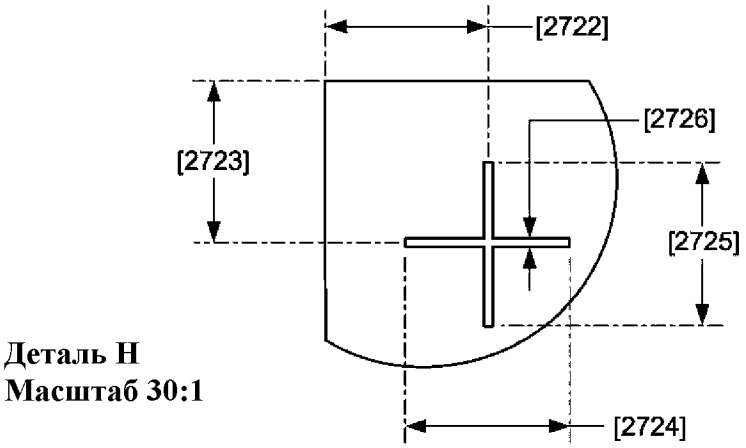
*ФИГ.26A*


Реакционная лунка 1
[2717]
[2710]
[2719]
[2707]
[2706]
[2703]
0
0
1
11
[2716]
[2709]
[2718]
A
A
[2708]
[2715]
[2713]
[2714]
[2711]
[2705]
F
98
108
[2704]
[2712]
ϕ [2720]
ϕ [2721]
Деталь F
Масштаб 25:1

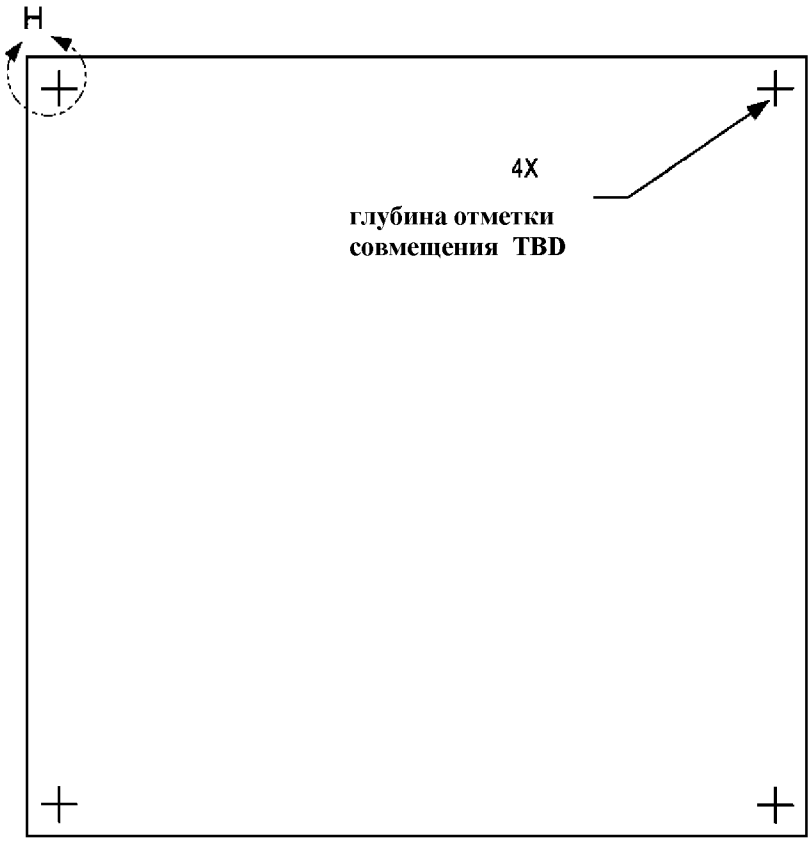
*ФИГ.26B*



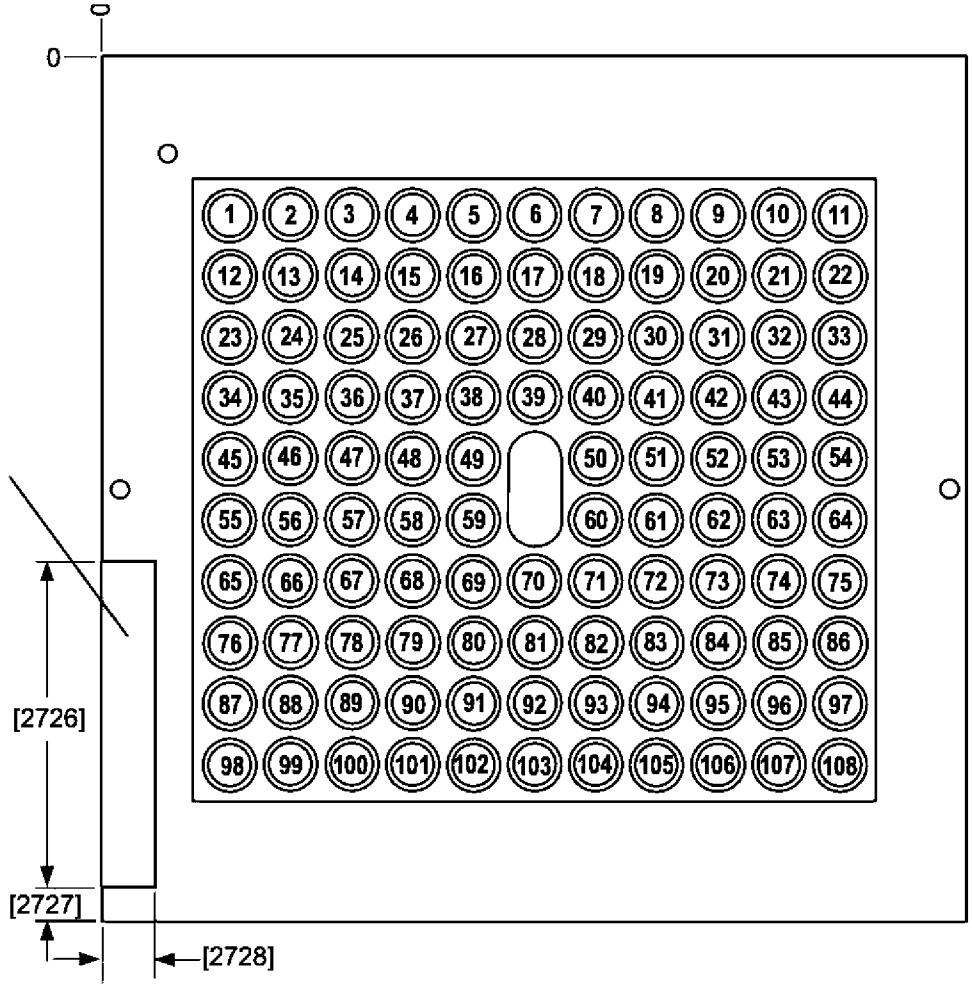
*ФИГ.26С*




**Деталь H**
**Масштаб 30:1**

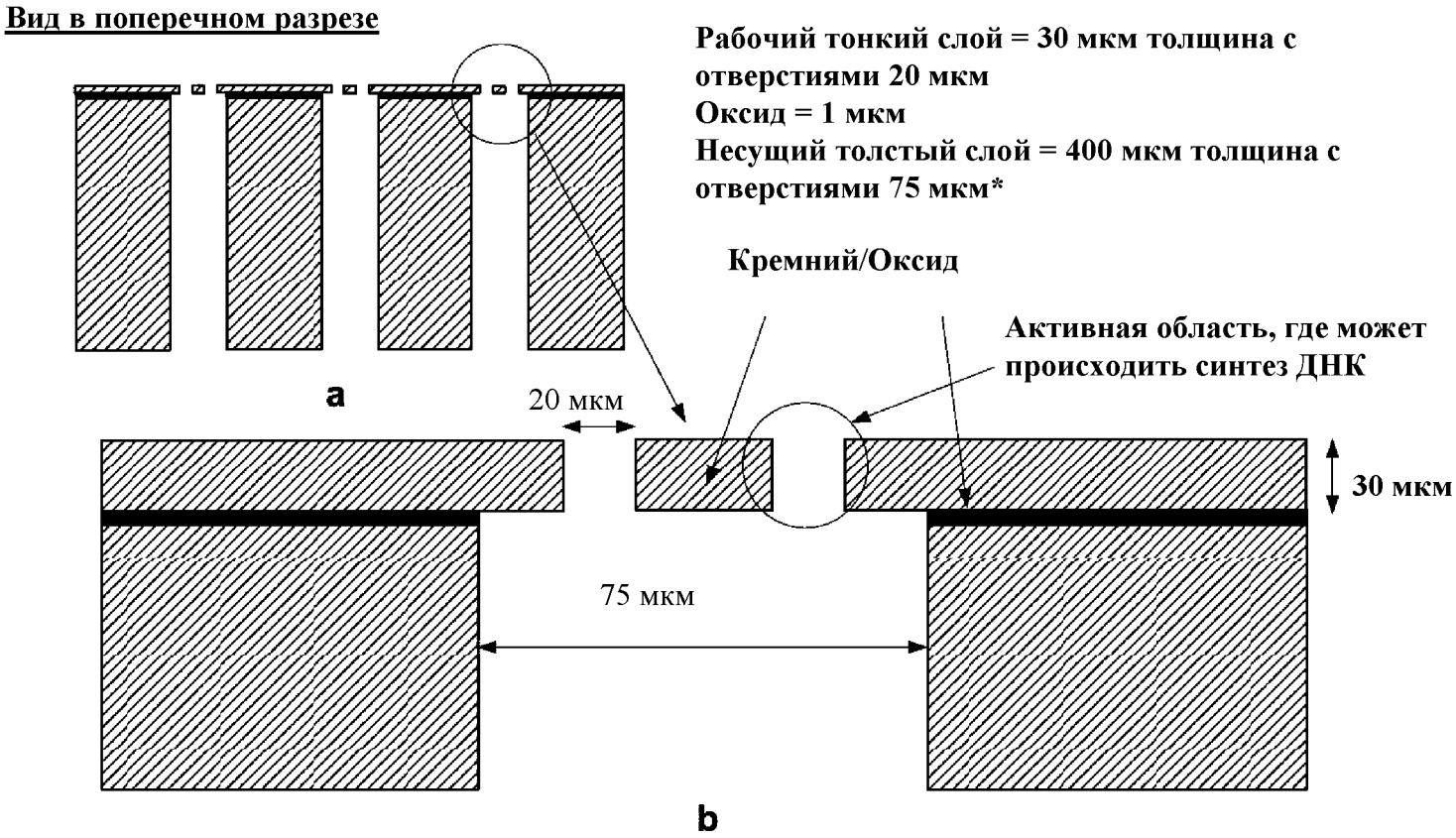



*ФИГ. 26D*




*ФИГ.26E*

**Расположение реакционных лунок**


Вид в поперечном разрезе
Рабочий тонкий слой = 30 мкм толщина с отверстиями 20 мкм
Оксид = 1 мкм
Несущий толстый слой = 400 мкм толщина с отверстиями 75 мкм*
Кремний/Оксид
Активная область, где может происходить синтез ДНК
a
20 мкм
30 мкм
75 мкм
b

*ФИГ.27*

1. Окисление SOI субстрата

2. Фотолитография на стороне рабочего тонкого слоя

3. Глубокое травление RIE на стороне рабочего тонкого слоя

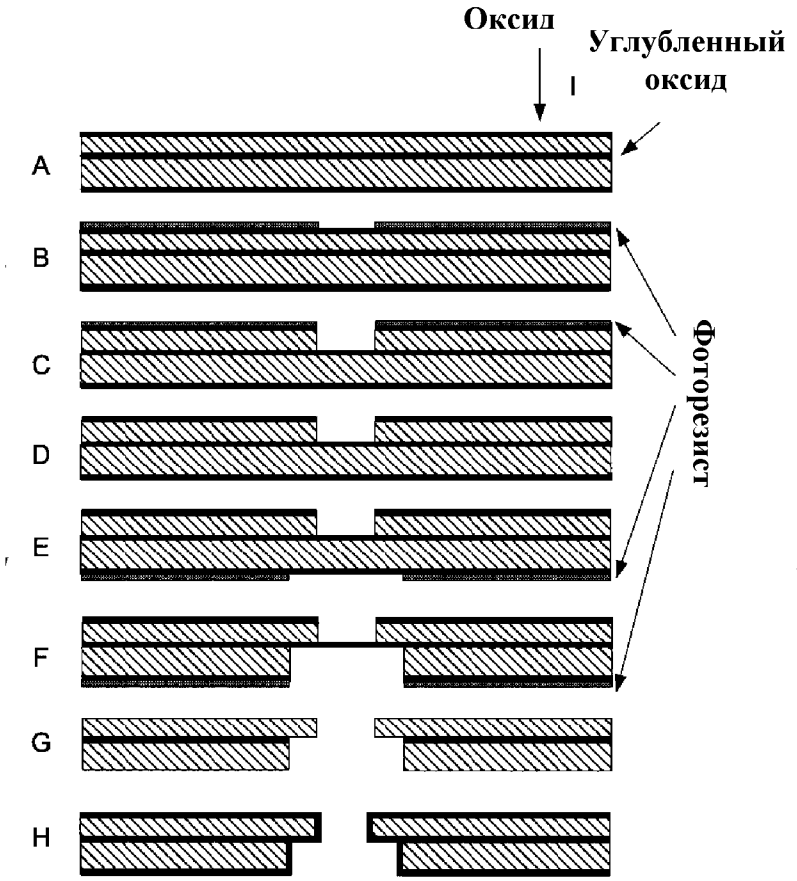
4. Снятие фоторезиста

5. Фотолитография на стороне несущего толстого слоя

6. Глубокое травление RIE на стороне несущего толстого слоя

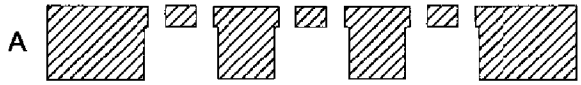
7. Удаление фоторезиста и травление BOX

8.Окисление/снятие/окисление



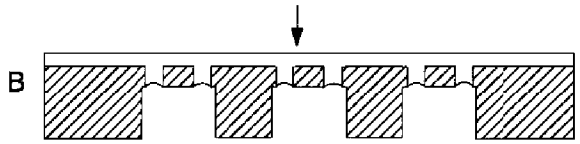

*ФИГ.28*

1. Очистка чипа («пиранья» + $O_2$ плазма)



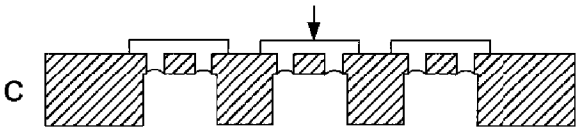

**Фоторезист**

2. Покрытие фоторезистом

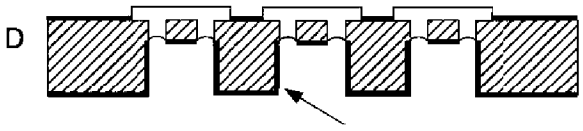



**Фоторезист**

3. Фотолитография + снятие остаточного слоя

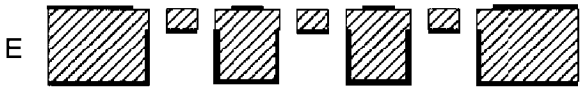



4. Функционализирование, напр., фторсиланом CVD



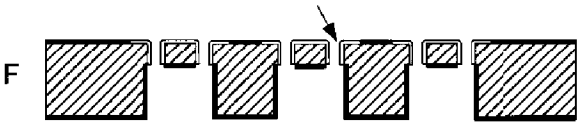

**Силанизированные поверхности, например, пассивное функционализирование**

5. Снятие резиста




**Силанизированные поверхности, например, активное функционализирование**

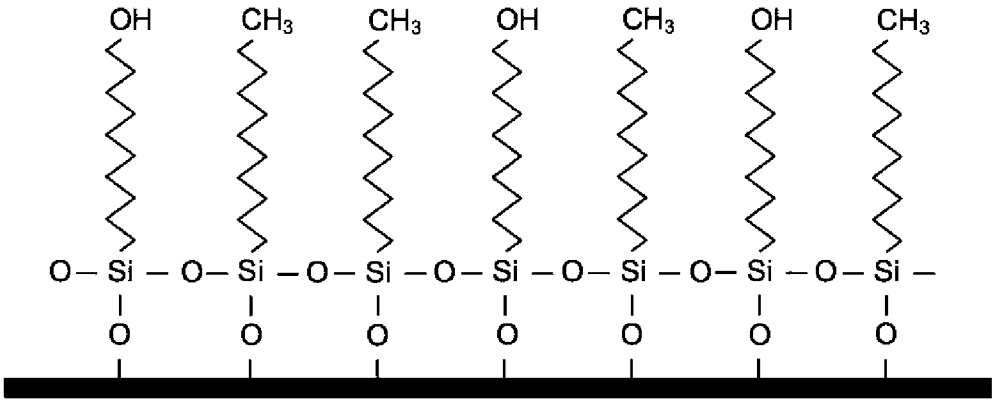
6. Активное функционализирование




***ФИГ. 29***

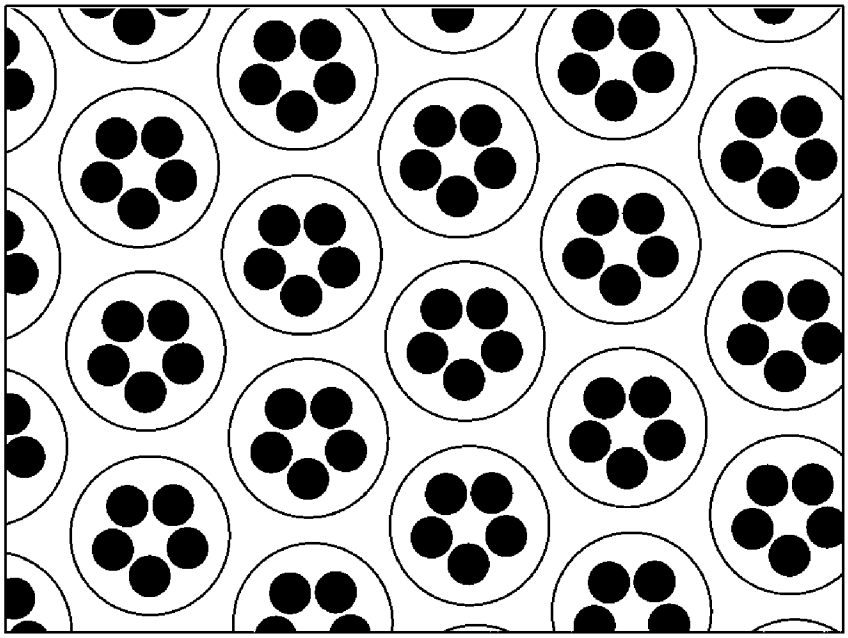
## Активное функционализирование

- **- Уменьшение концентрации гидроксильных групп в огромном количестве пассивных групп путем применения смешанных силанов**

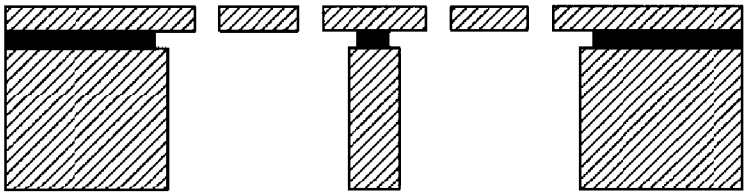



***ФИГ. 30***

A

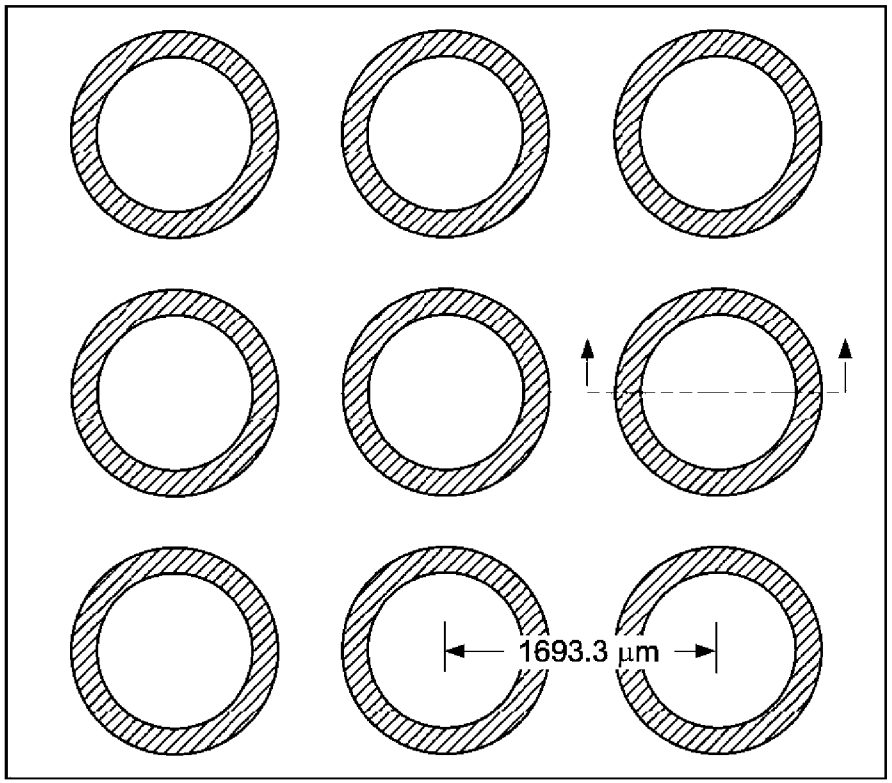


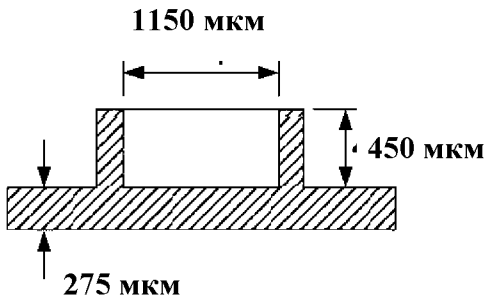
B



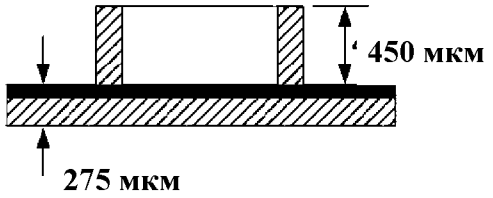
*ФИГ. 31*

**Структура нанолуночного чипа**




**В случае использования пластины SOI**




*ФИГ.32*

1. Окисление субстрата

2. Фотолитография на оборотной стороне

3. Травление на оборотной стороне

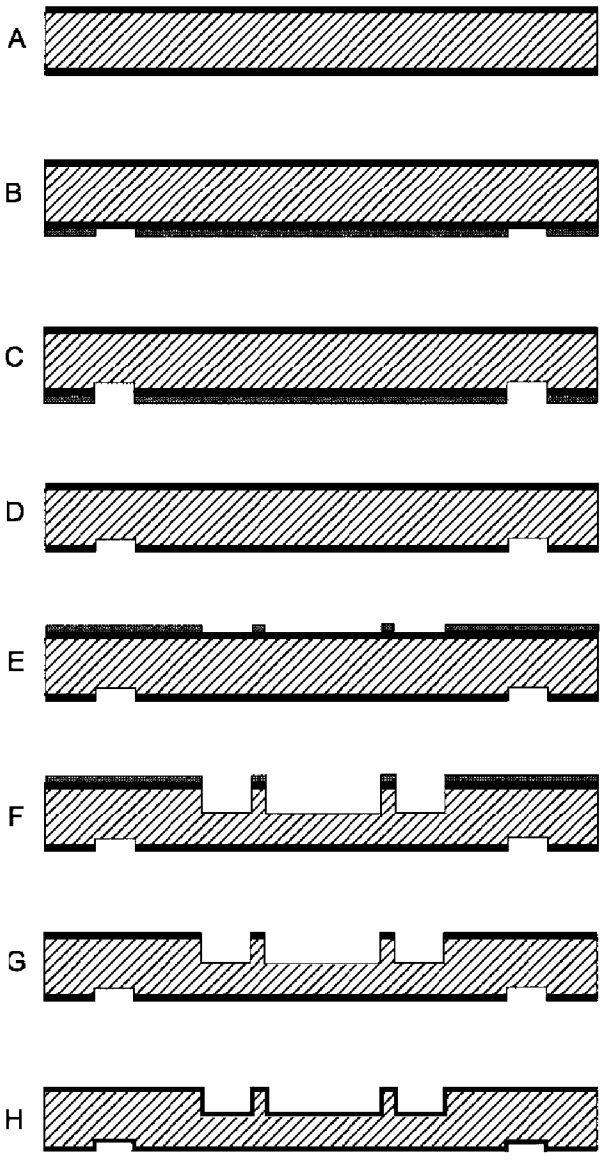
4. Снятие фоторезиста

5. Фотолитография на передней стороне

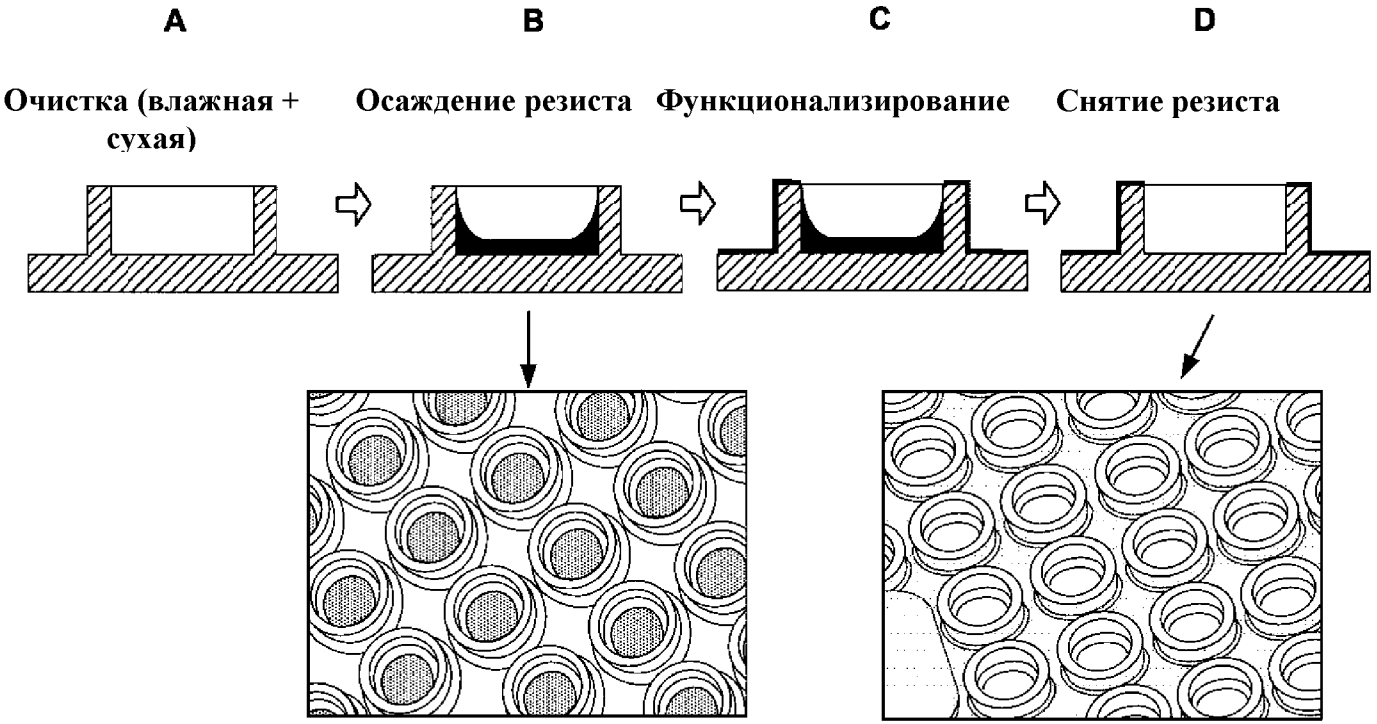
6. DRIE лунок

7. Снятие фоторезиста

8. Нанесение слоя оксида/снятие/окисление

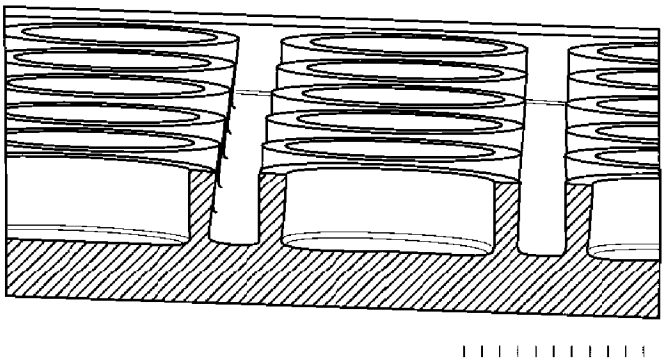



***ФИГ. 33***


A
B
C
D
Очистка (влажная + сухая)
Осаждение резиста
Функционализирование
Снятие резиста

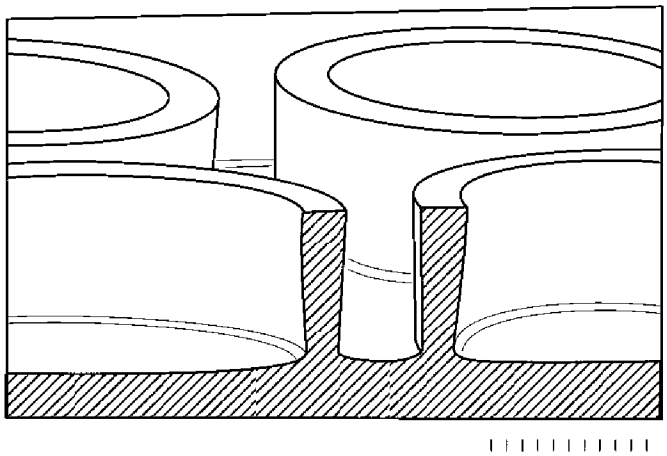
*ФИГ.34*

A



1,00 мм

B



500 мкм

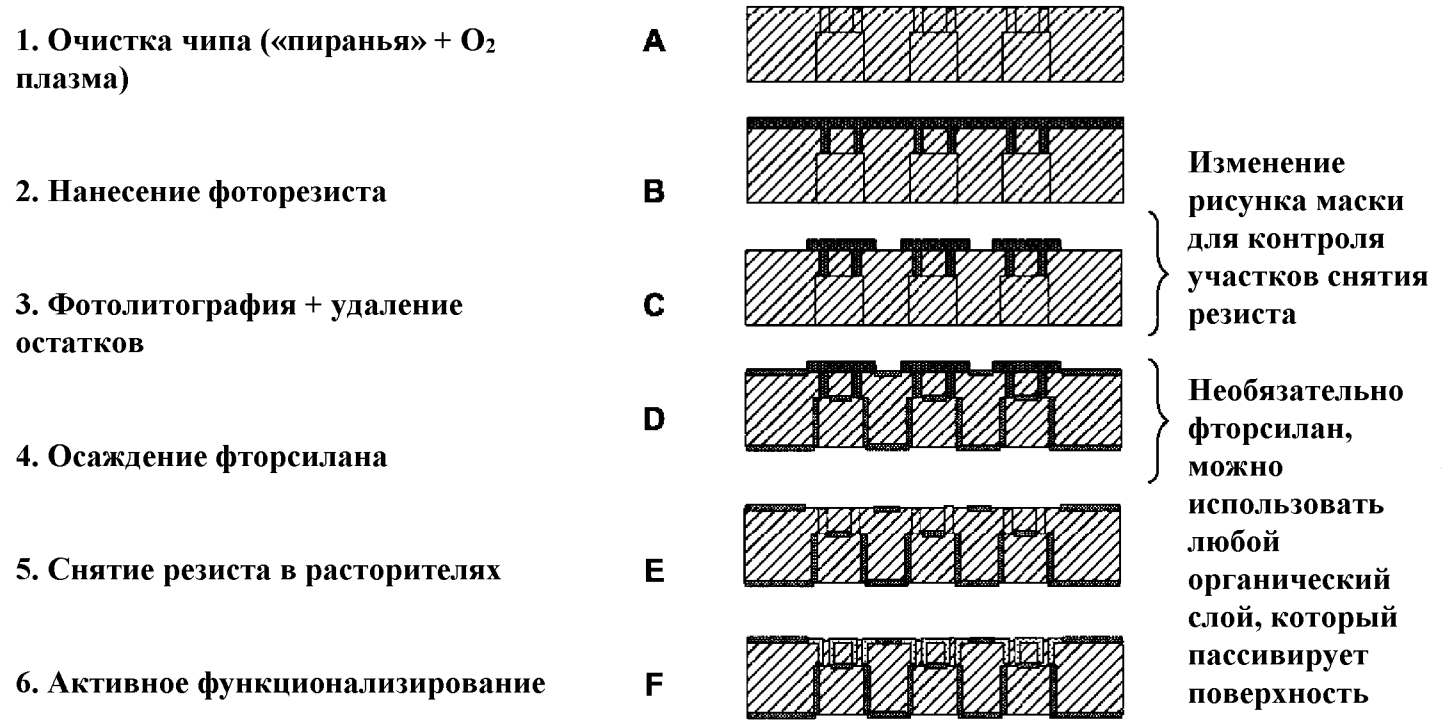
*ФИГ. 35*

## Различные функциональные конфигурации



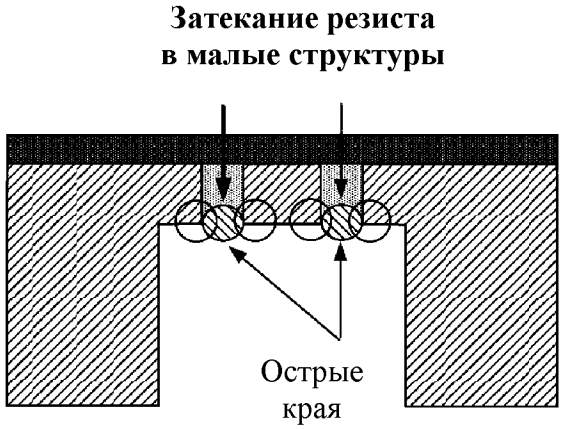

*ФИГ.36*

## Последовательность процесса A (для конфигураций 2-4)



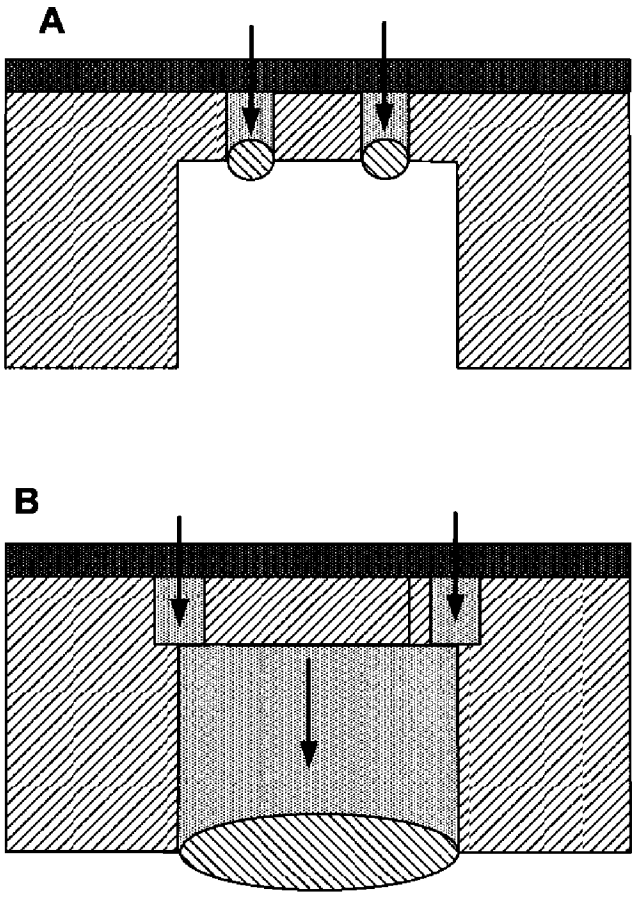

*ФИГ.37*

**Процесс контроля капиллярного затекания резиста**



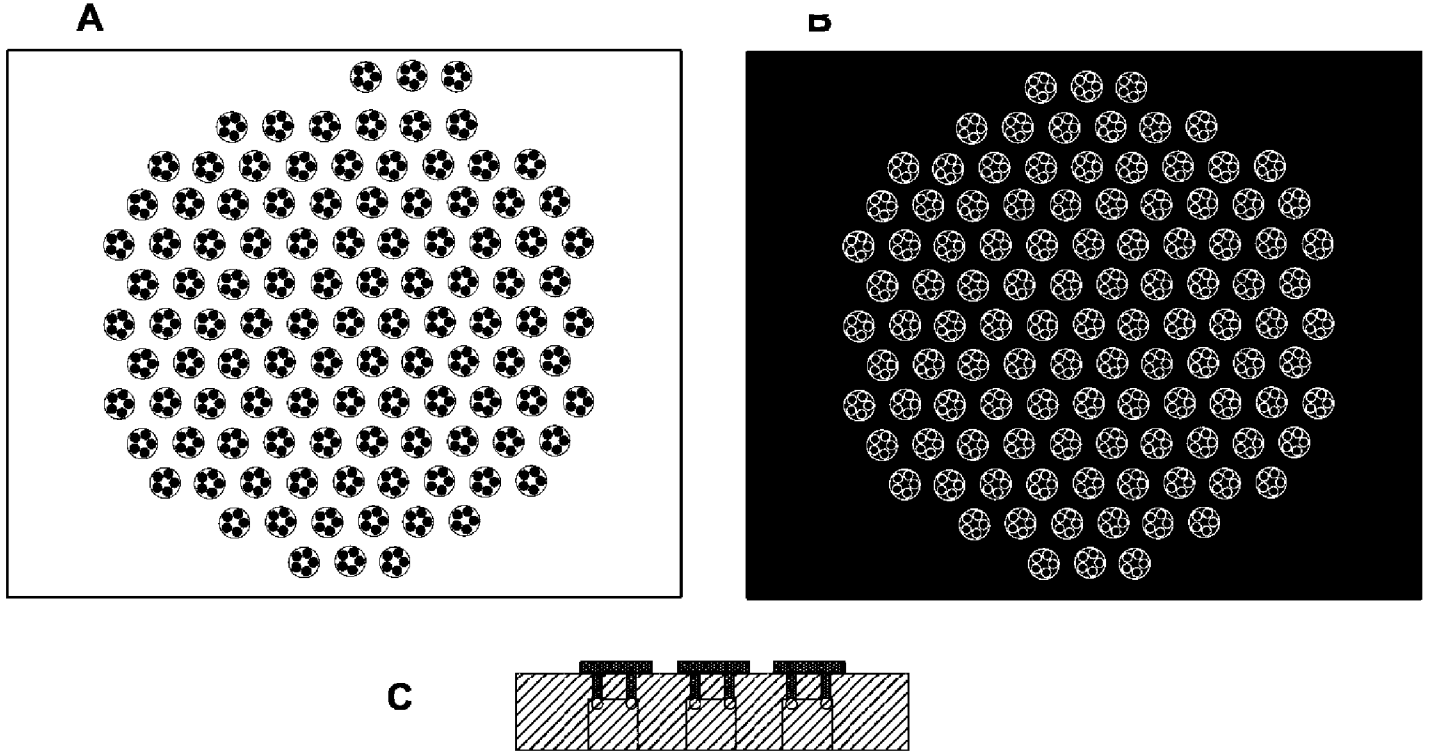

***ФИГ. 38***

**Структуры, контролирующие капиллярное затекание резиста**



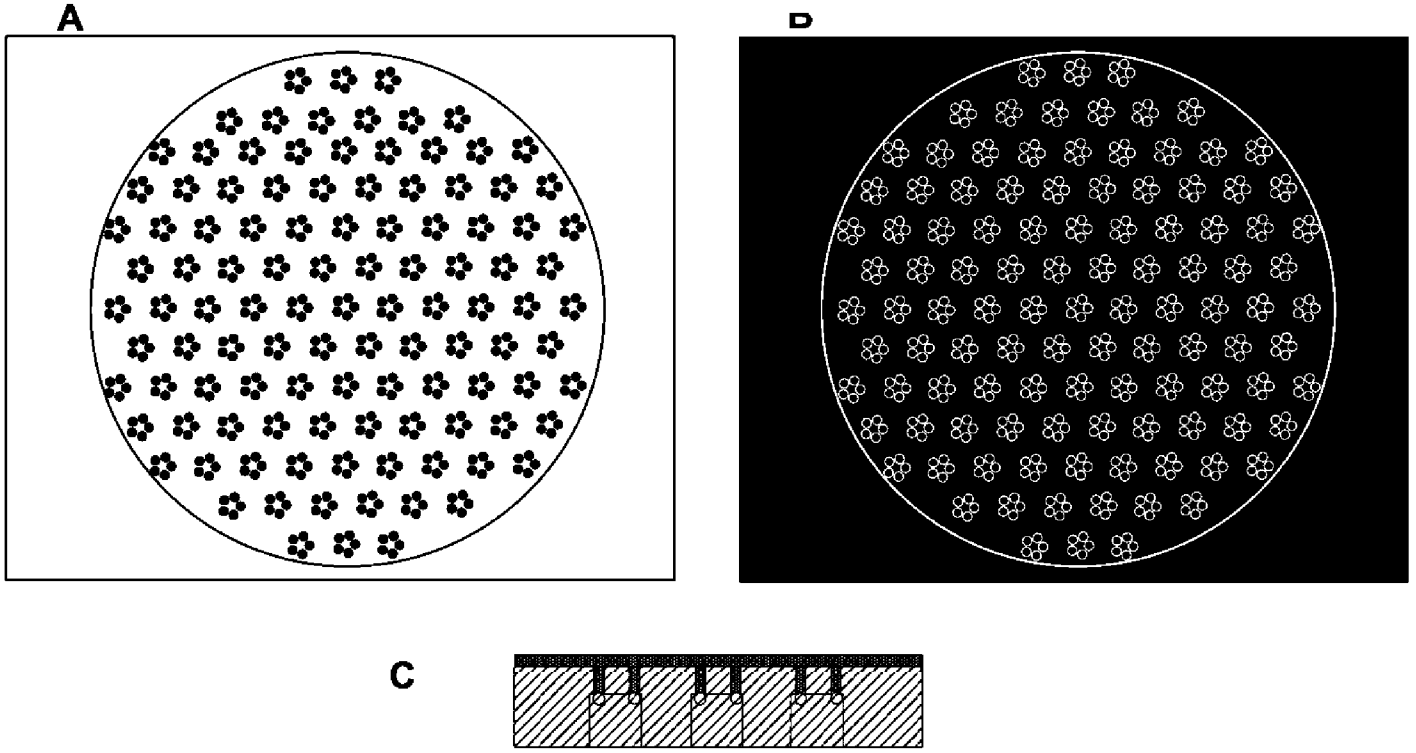

*ФИГ. 39*

**Рисунки резиста после процесса литографии**



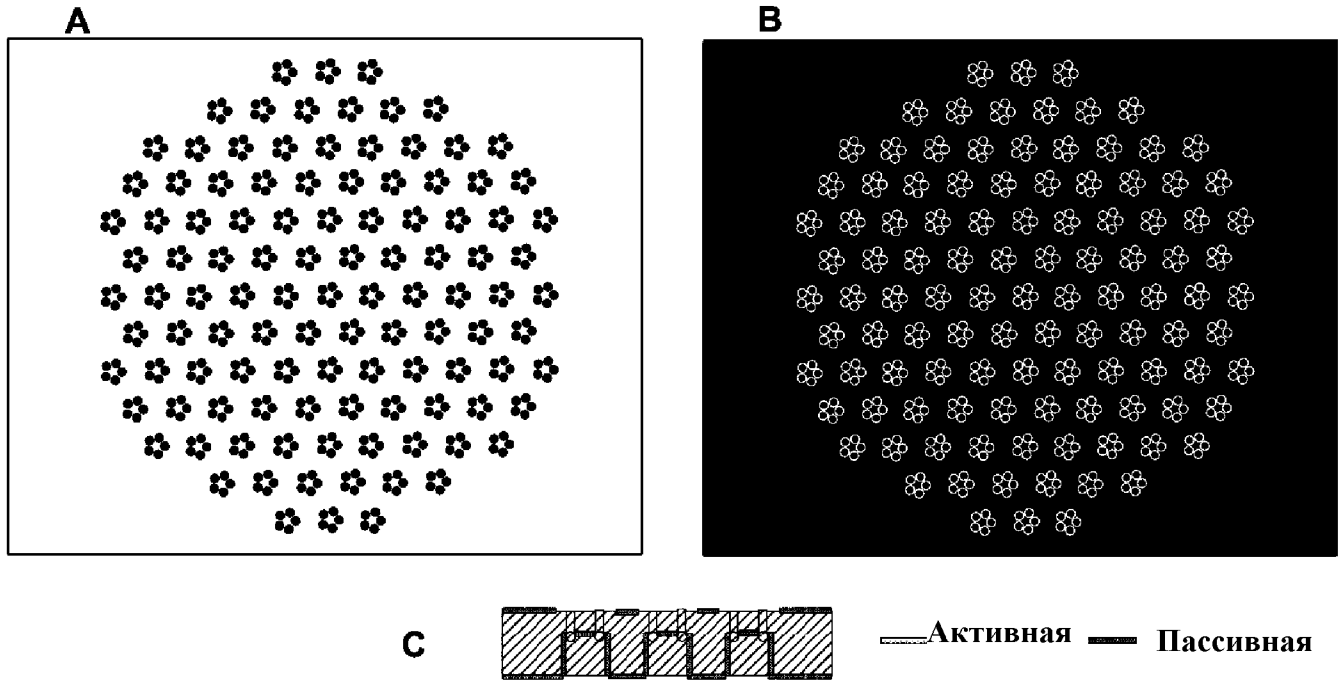

*ФИГ.40*

**Рисунки резиста после процесса литографии**



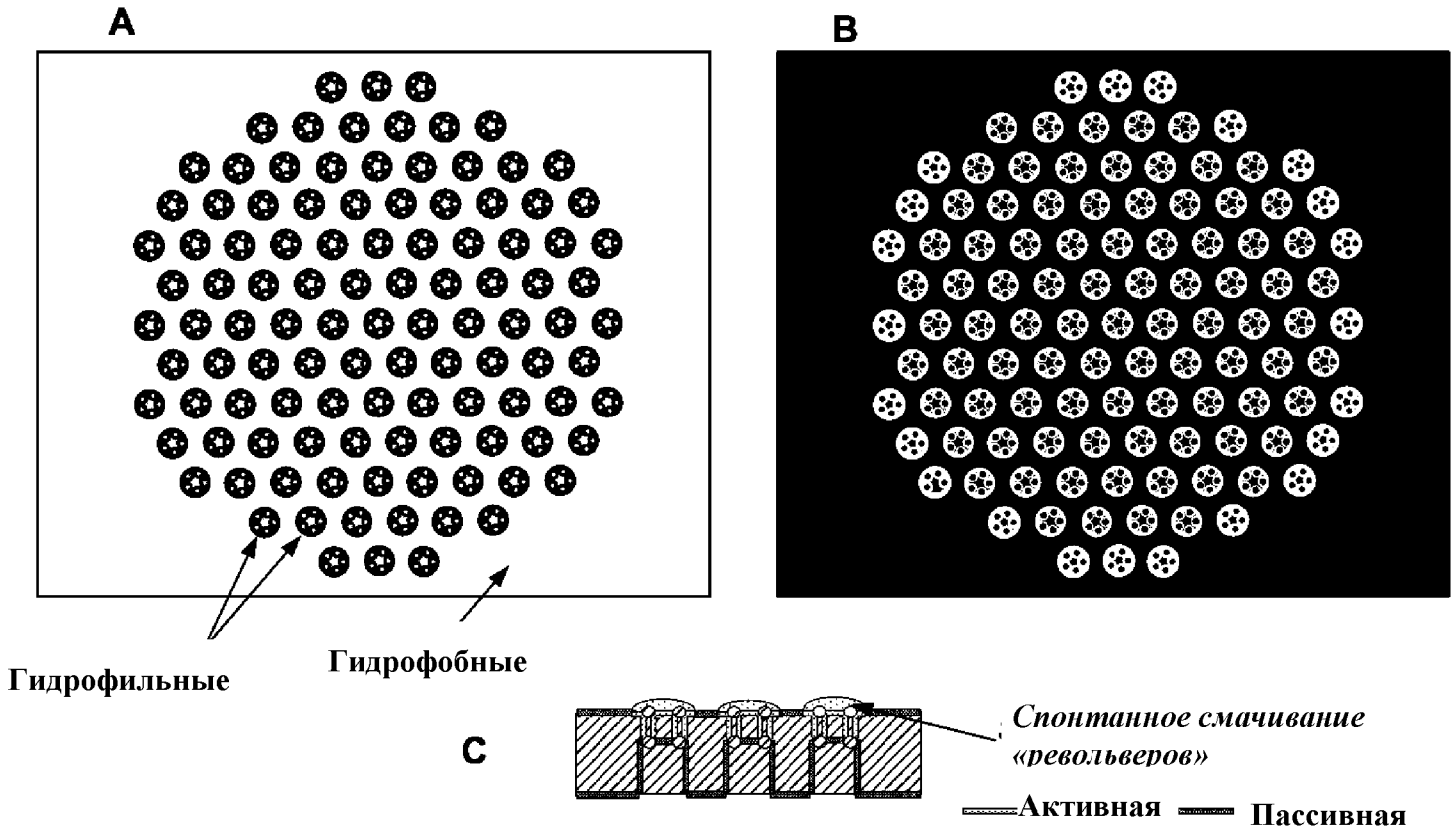

*ФИГ.41*

**Снятие резиста (после функционализирования фторсиланом)**




*ФИГ.42*

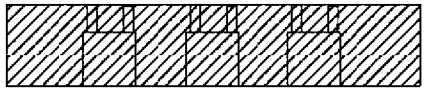
**«Keratin chip», полностью нагруженный DMSO**




*ФИГ.43*

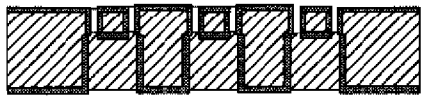
## Последовательность процесса B (для конфигурации 6)

1. **Очистка чипа («пиранья» + $O_2$ плазма**



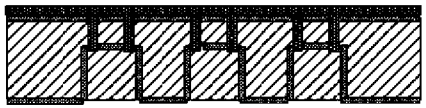
A

2. **Пассивное функционализирование**



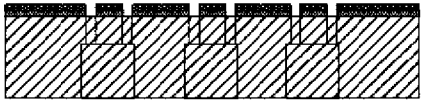
B

3. **Нанесение резиста**



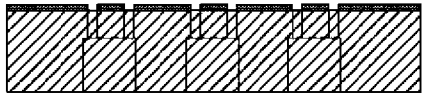
C

4. **Фотолитография + травление**



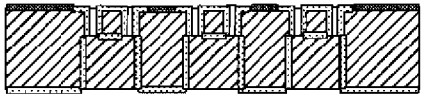
D

5. **Снятие резиста**



E

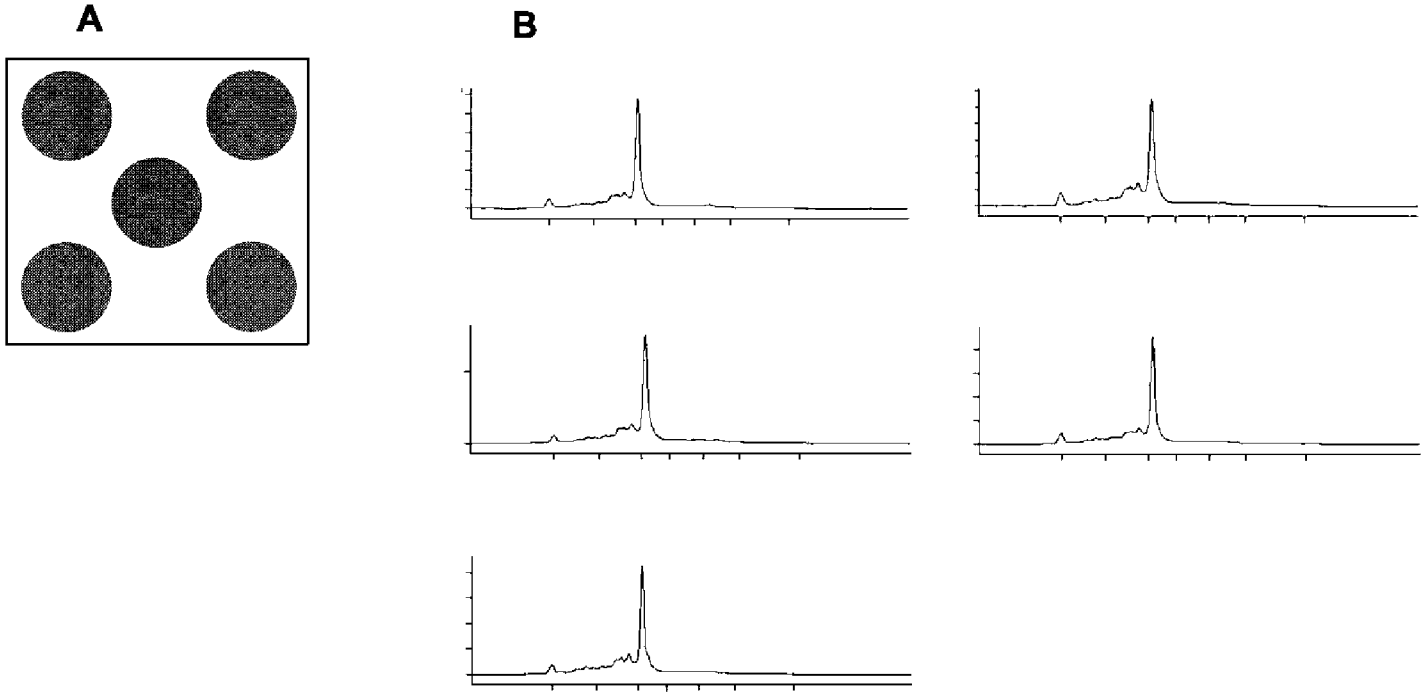
6. **Активное функционализирование**



F

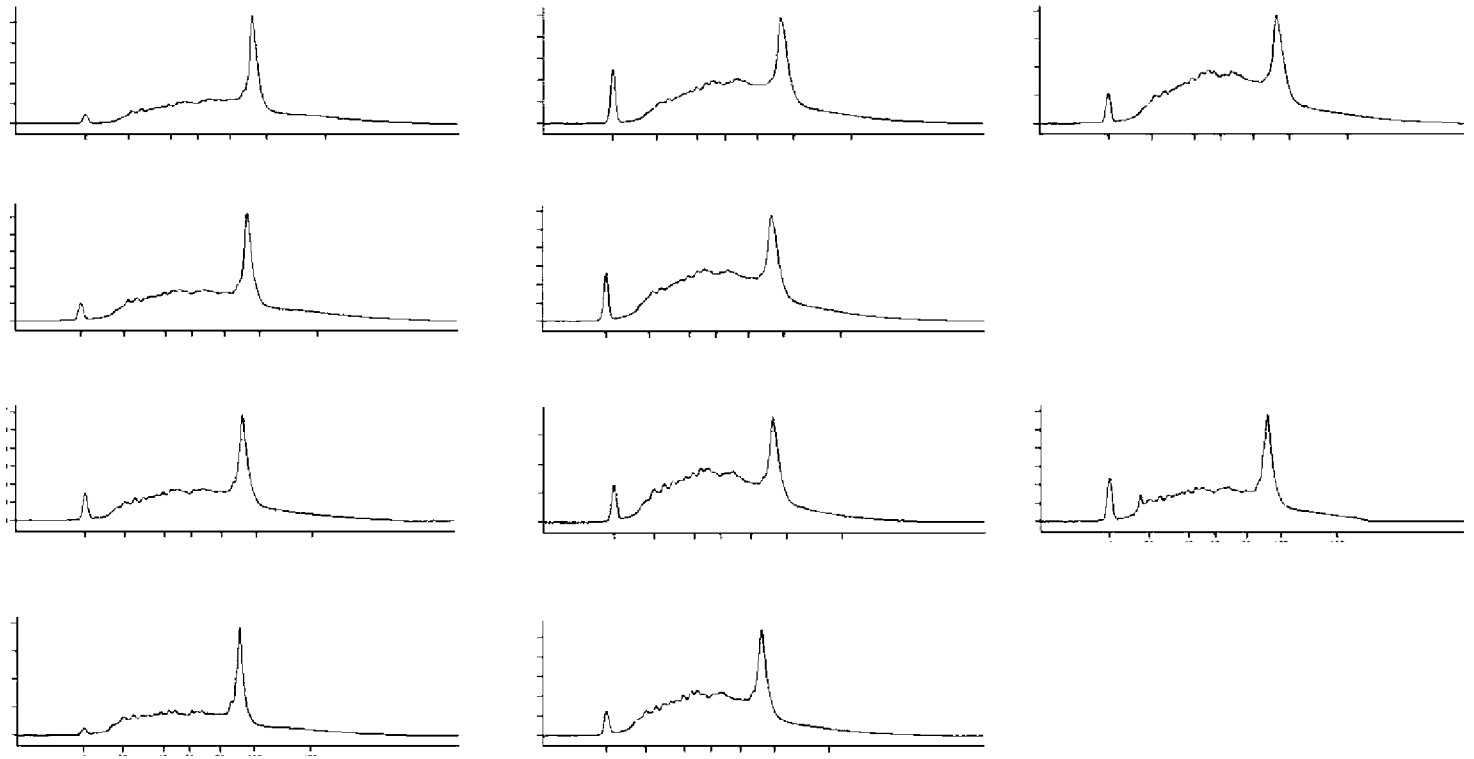
Активная Пассивная

*ФИГ.44*

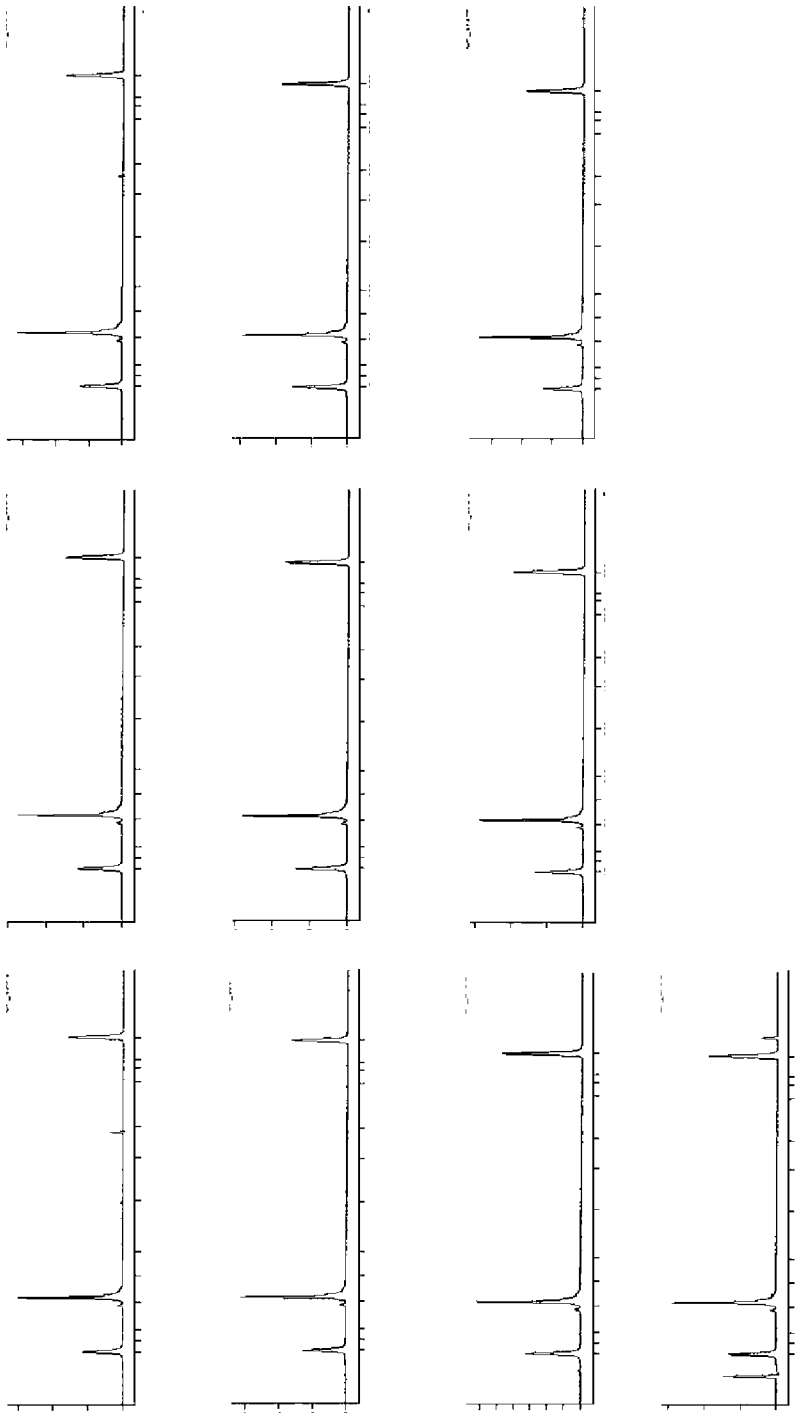



*ФИГ.45*

**Синтез 100-mer последовательности на 2D устройстве олигонуклеотидного синтеза**

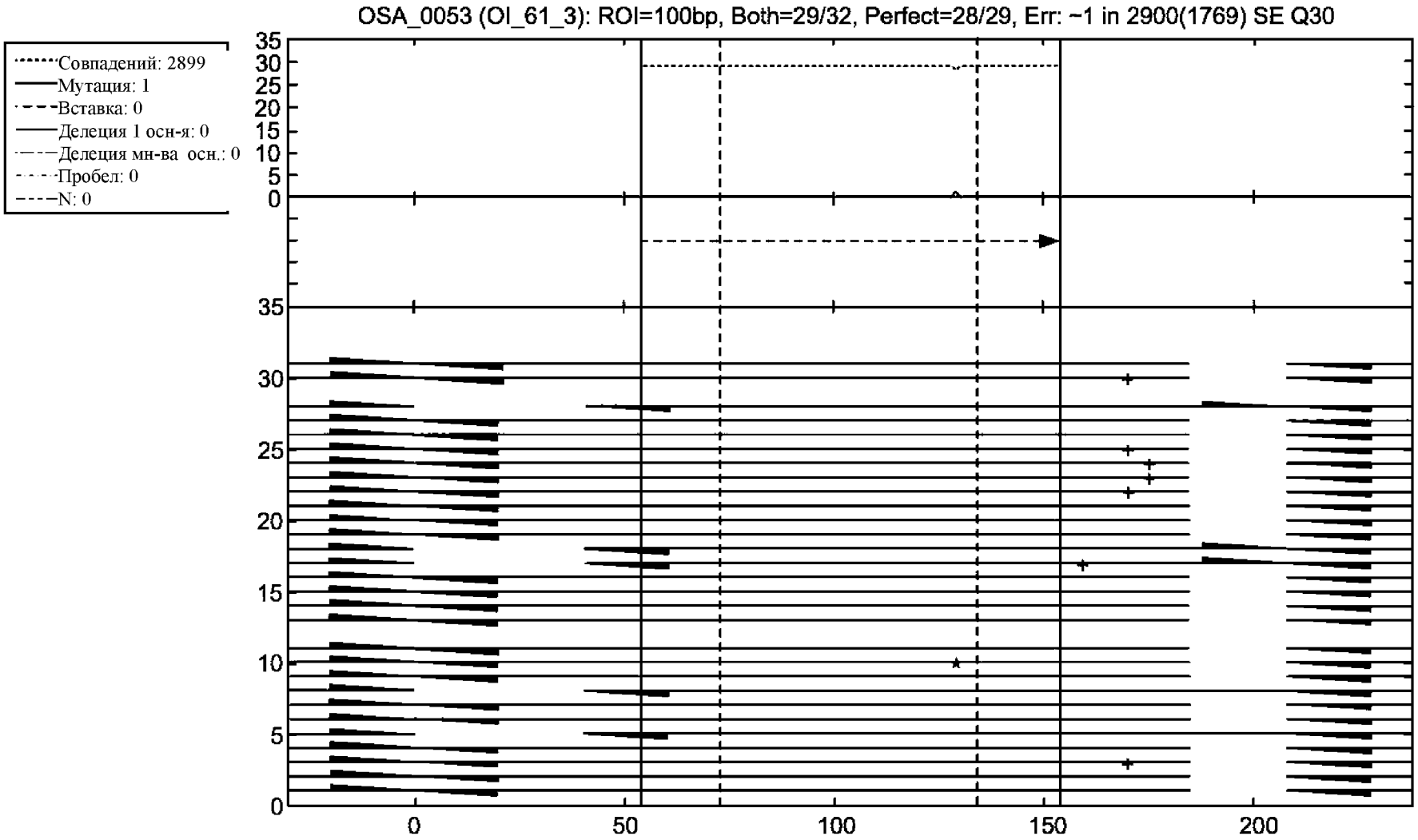


*ФИГ.46*



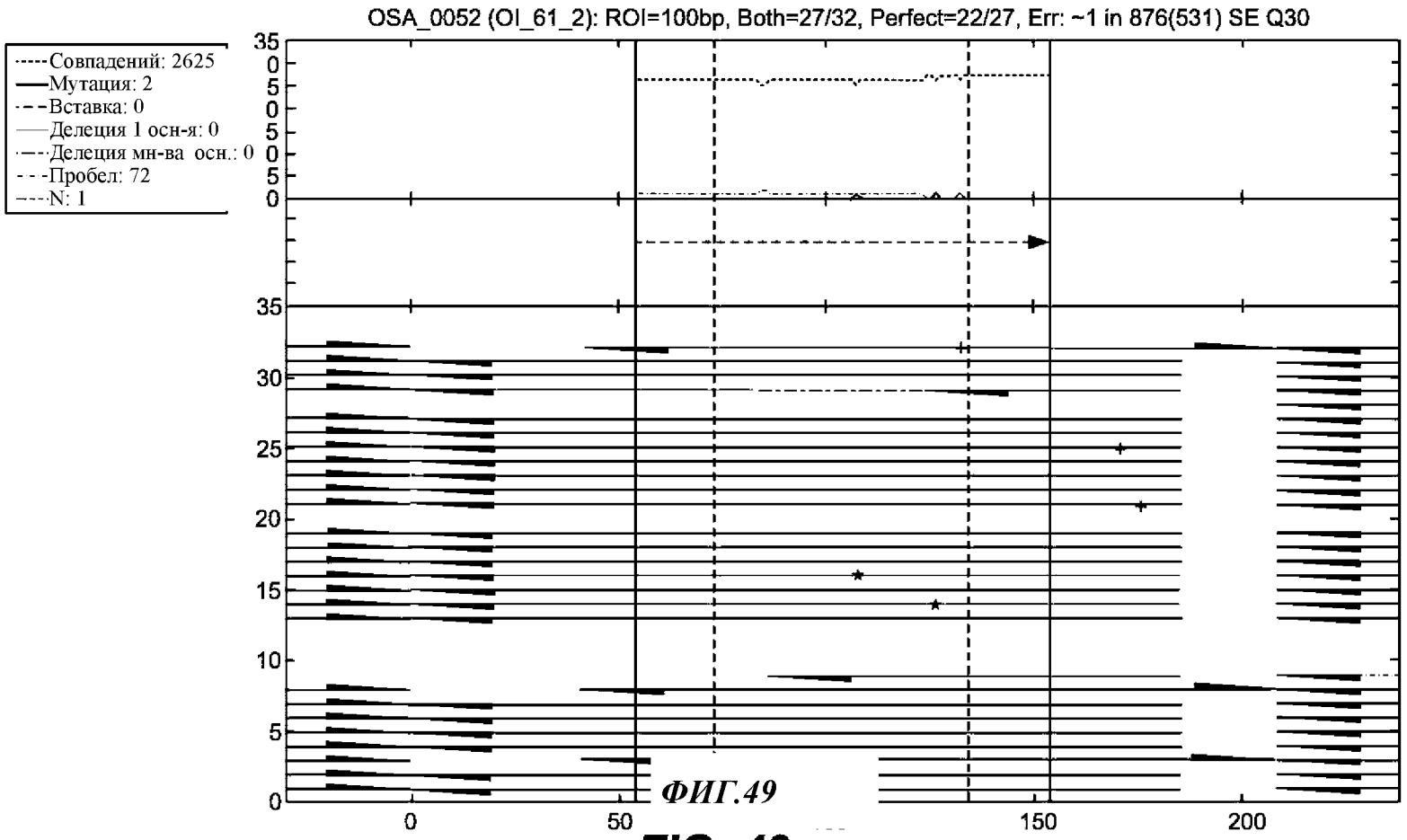
*ФИГ.47*

**Карта выравнивания**



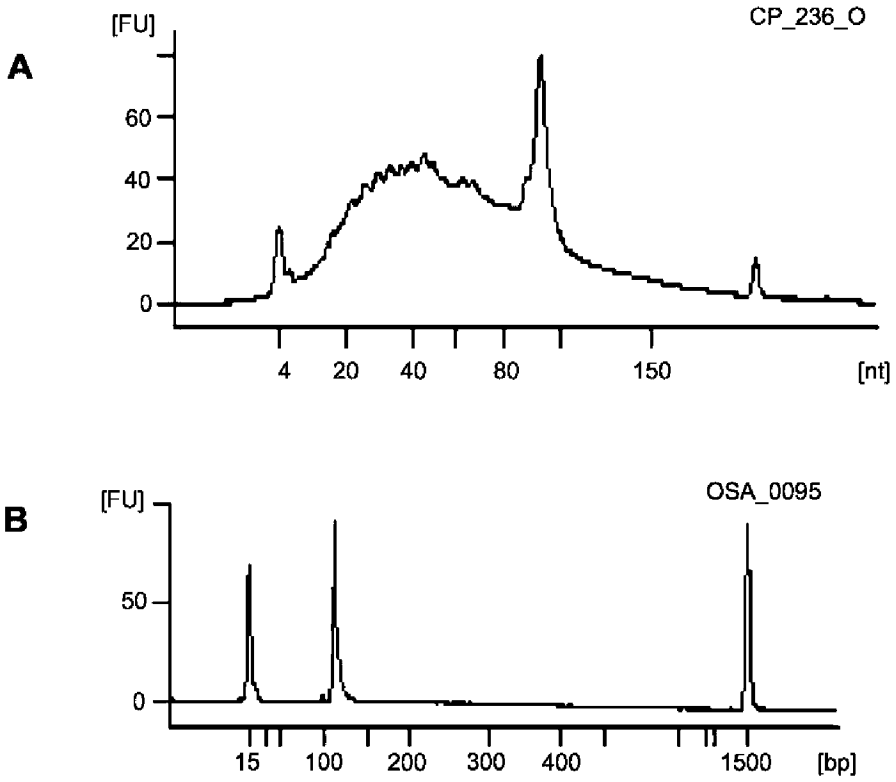

*ФИГ.48*

## Карта выравнивания



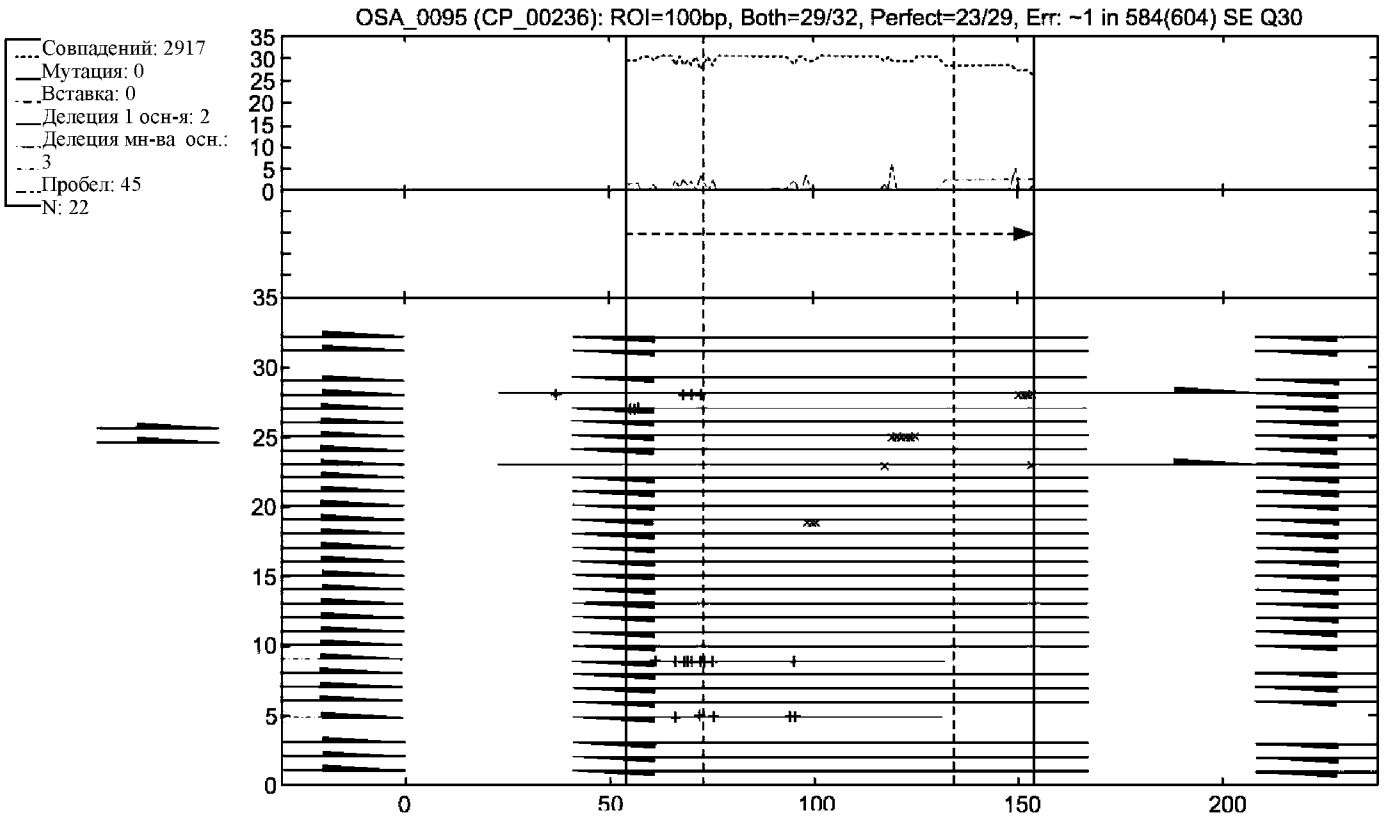

*ФИГ.49*

**FIG. 49**


A
[FU]
CP_236_O
60
40
20
0
4
20
40
80
150
[nt]
B
[FU]
OSA_0095
50
0
15
100
200
300
400
1500
[bp]

*ФИГ. 50*

## Карта выравнивания




*ФИГ.51*

## Исправление ошибок

**Существует три способа ECR:**

- CorrectASE enzyme (Life Technologies)
- Surveyor enzyme (Transgenomic)
- MutSM2B2 beads (USBiological Life Sciences)

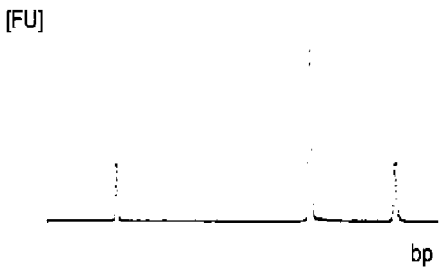
**Выполнено с помощью CorrectASE - частота ошибок меньше, чем 1 ошибка в 5 kb**

**CorrectASE обработка 1 kb**

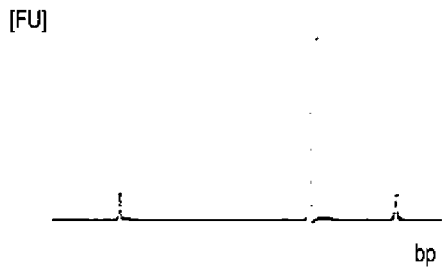



**До исправления ошибок 1 ошибкиа в 789 bp**

**Ген, синтезированный из олигонуклеотидов низкого качества**

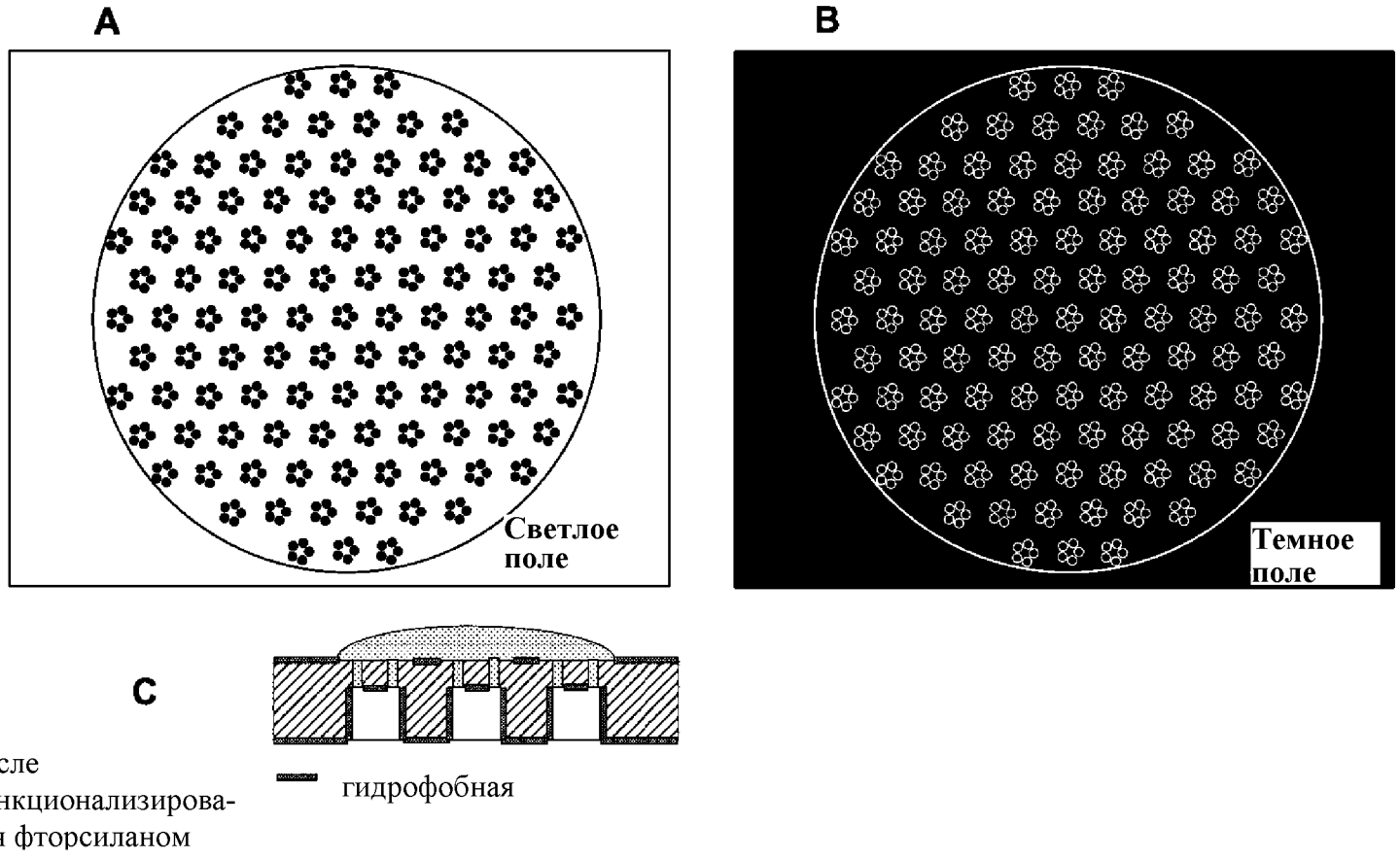



**После 1-ого исправления ошибок 1 ошибка в 5190 bp**

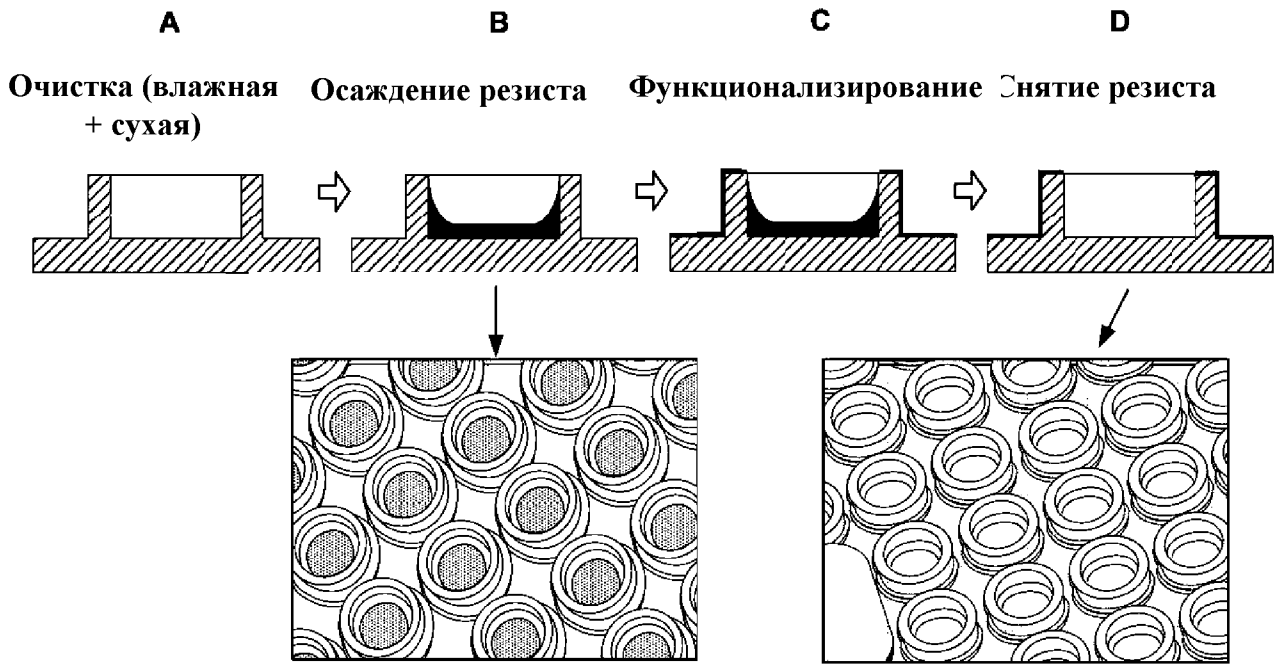



**После 2-ого исправления ошибок 1 ошибка в 6315 bp**

*ФИГ.52*

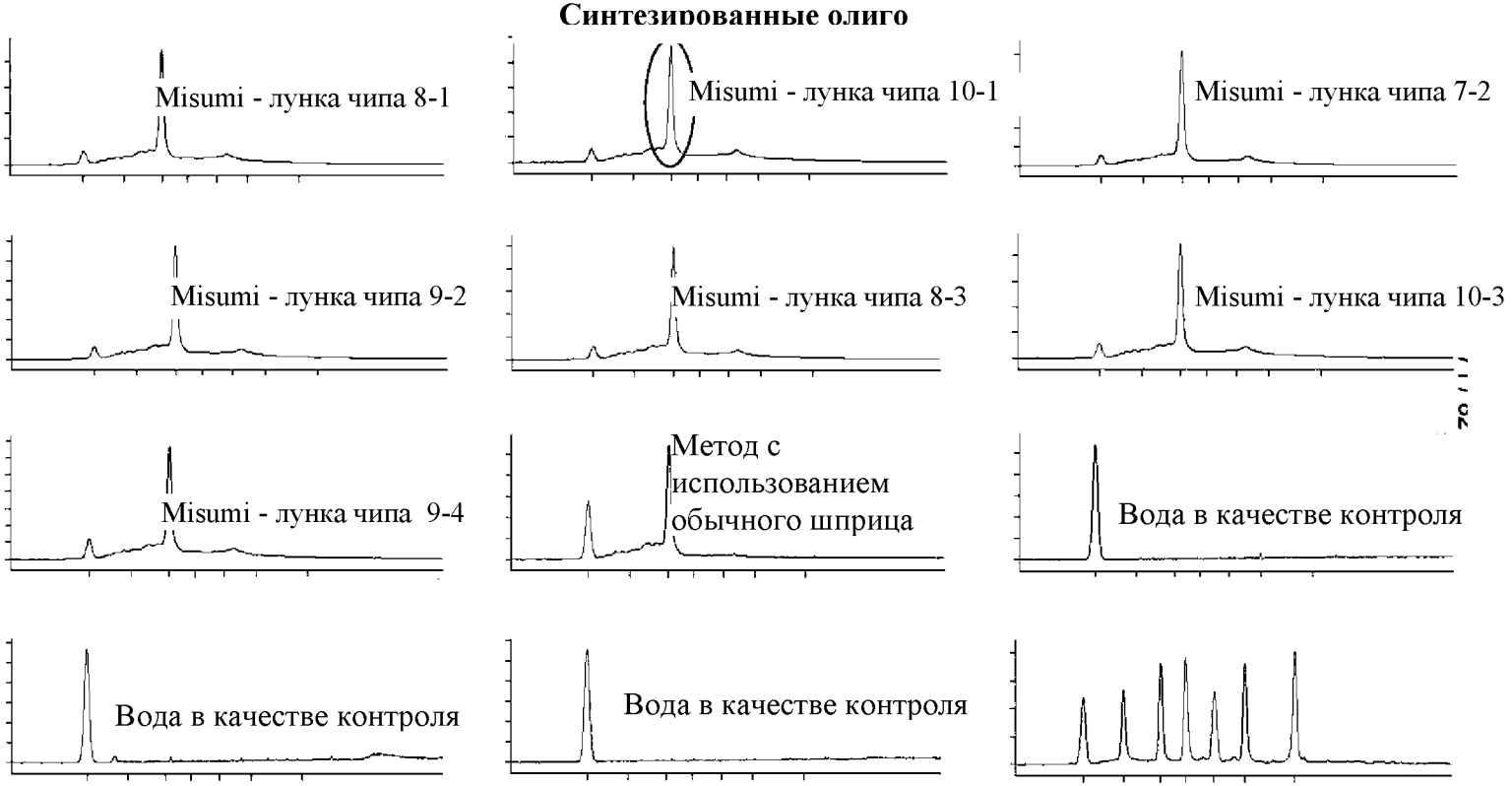

A
Светлое поле
B
Темное поле
C
После функционализирования фторсиланом
гидрофобная

*ФИГ.53*


A
B
C
D
Очистка (влажная + сухая)
Осаждение резиста
Функционализирование
Снятие резиста

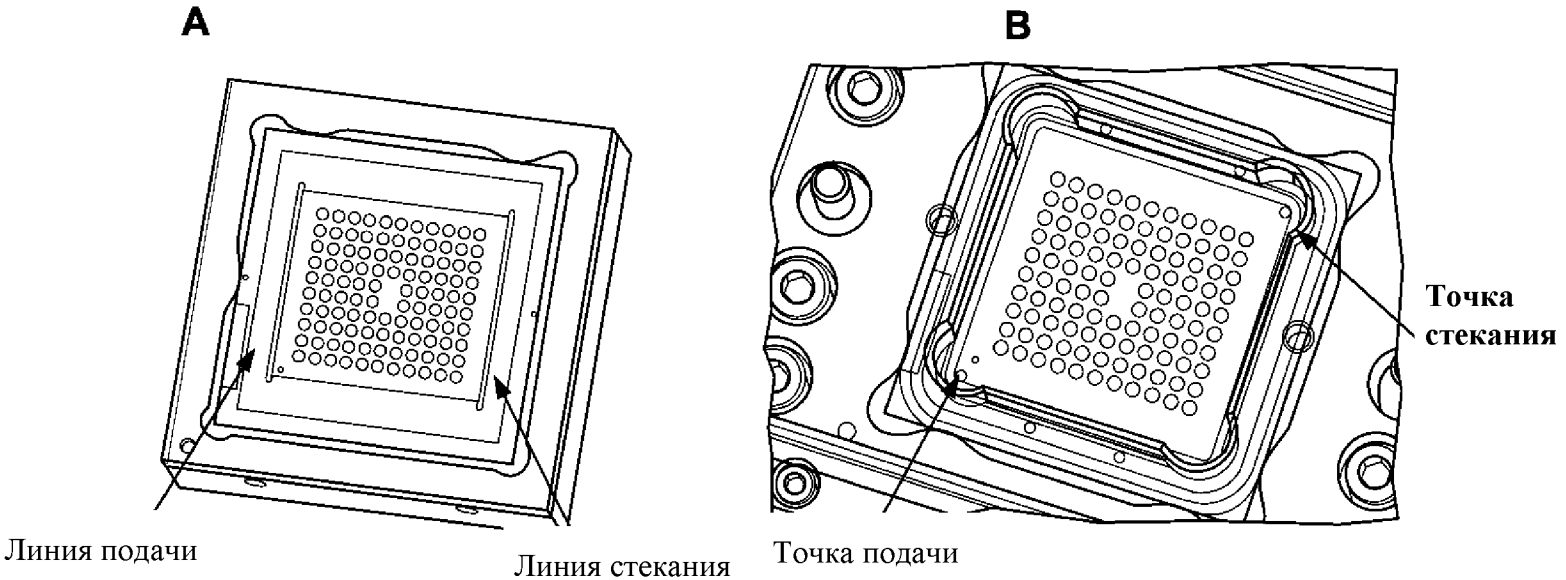
*ФИГ.54*

# Результаты BioAnalyzer




***ФИГ.55***

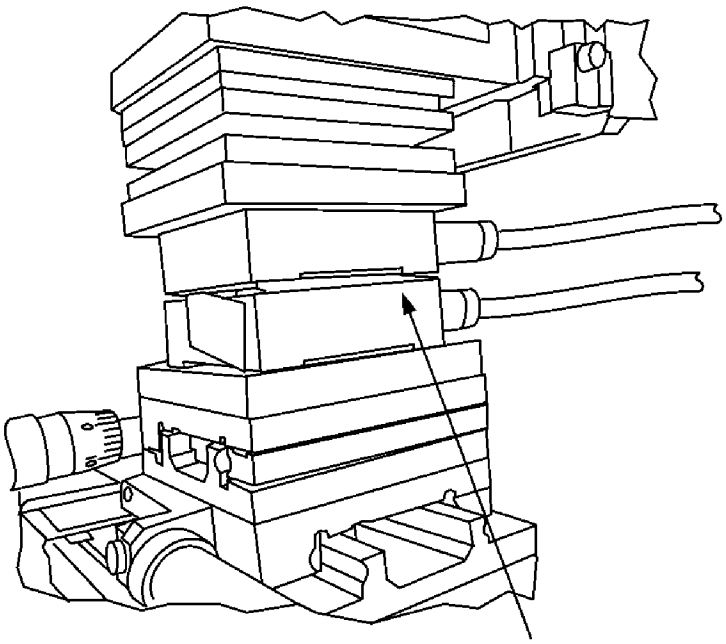
# Линия подачи и линия стекания



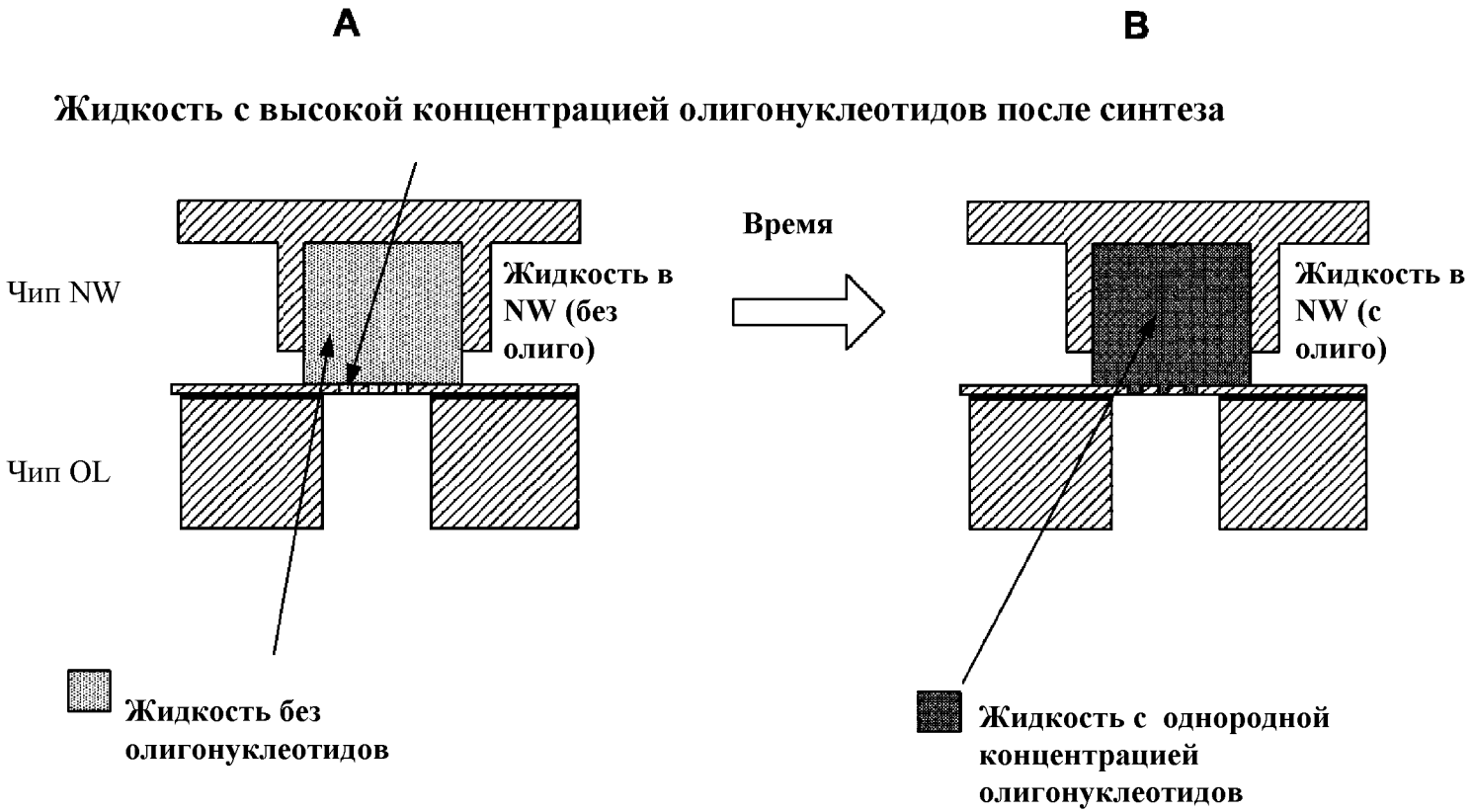

**Старый дизайн проточной кюветы (линия подачи, линия стекания)**

**Новый дизайн проточной кюветы (точка подачи, точка стекания)**

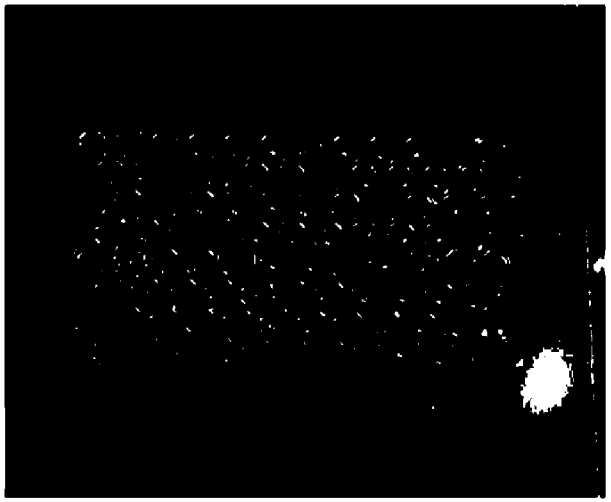
***ФИГ.56***



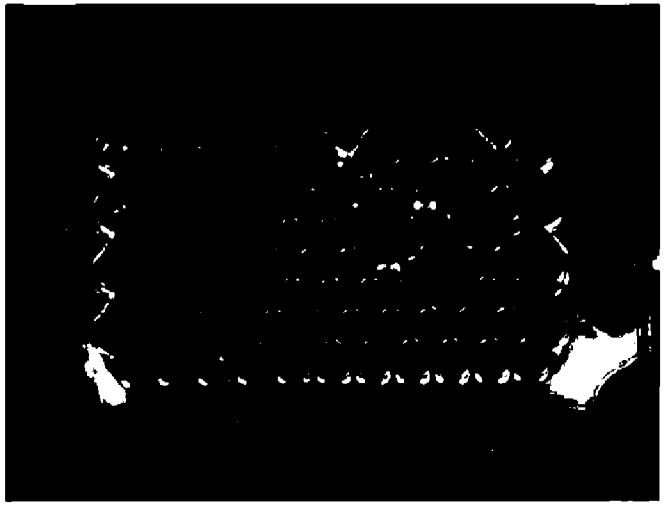

*ФИГ. 57*


A
B
Жидкость с высокой концентрацией олигонуклеотидов после синтеза
Чип NW
Чип OL
Жидкость в NW (без олиго)
Время
Жидкость в NW (с олиго)
Жидкость без олигонуклеотидов
Жидкость с однородной концентрацией олигонуклеотидов

*ФИГ.58*



До PCA

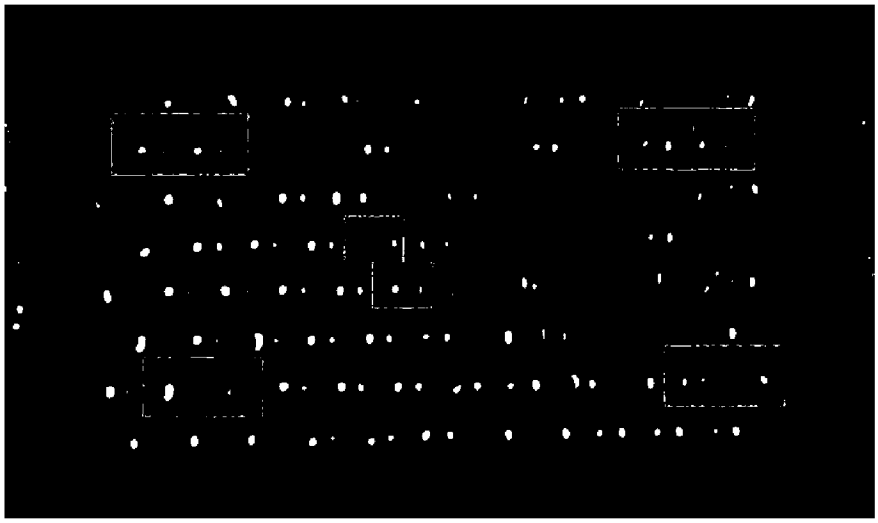


После PCA

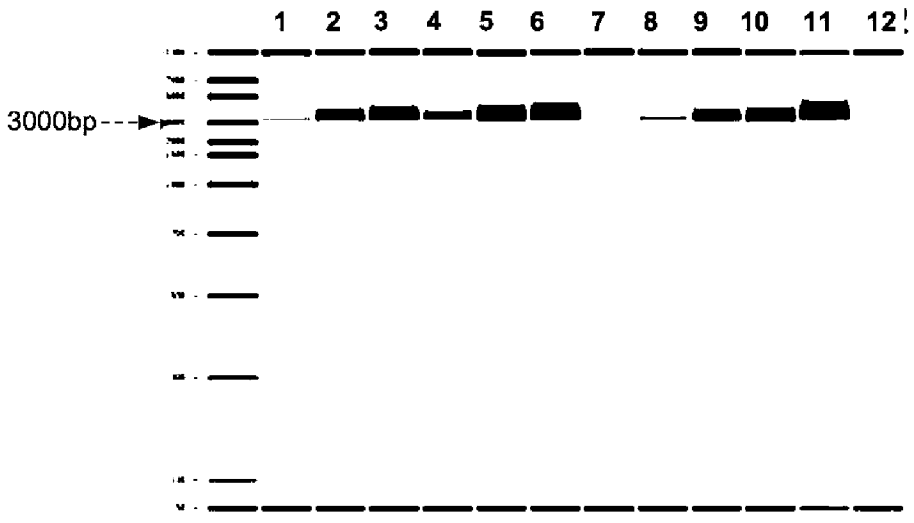
*ФИГ.59*

76 / 82

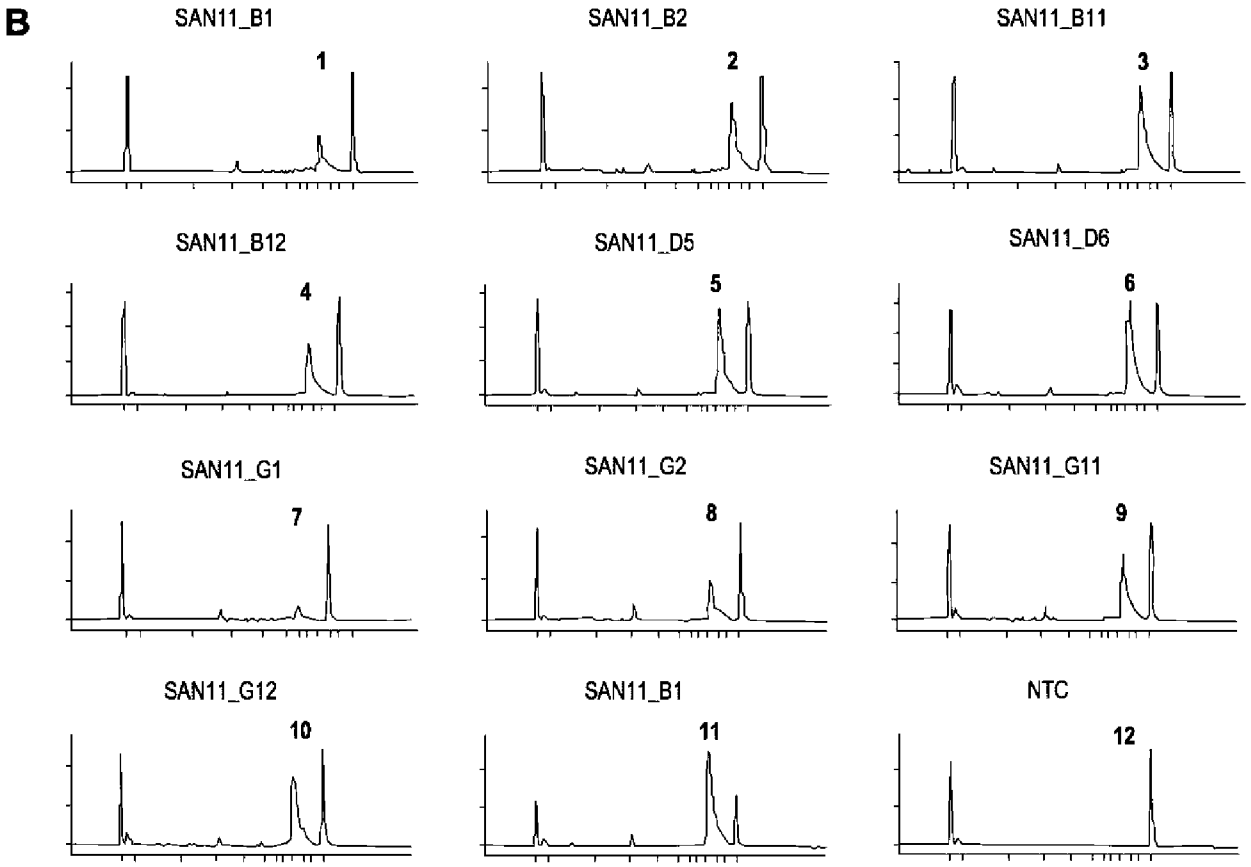
A



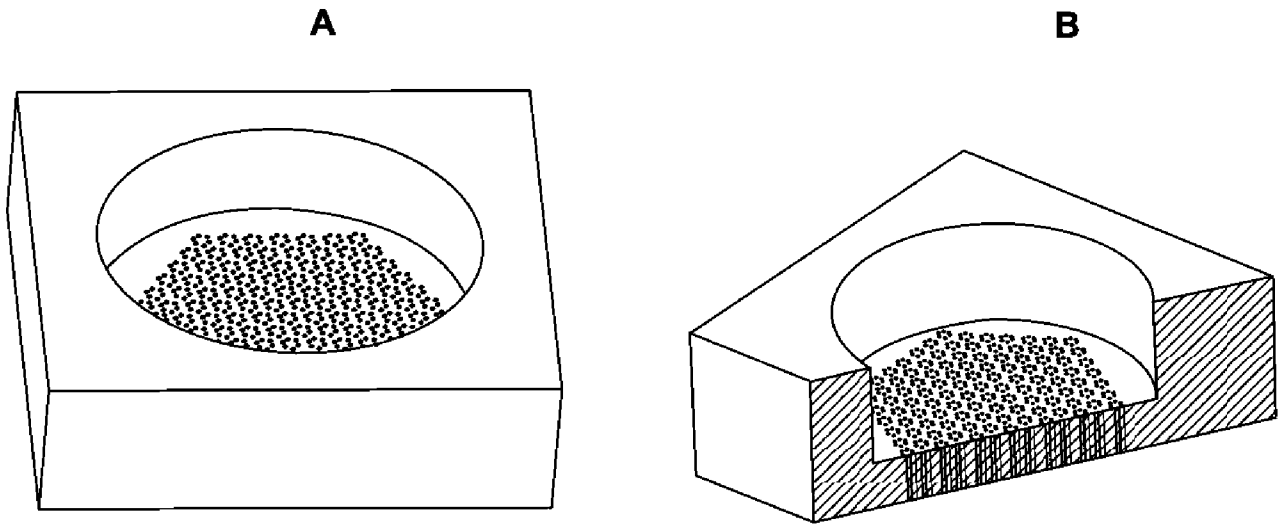
C



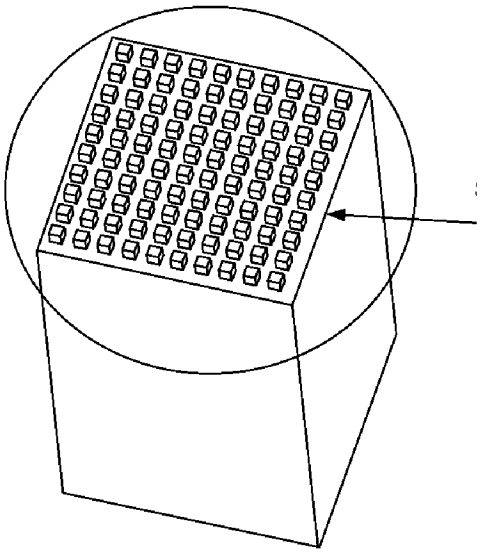

*ФИГ. 60*


B
SAN11_B1
1
SAN11_B2
2
SAN11_B11
3
SAN11_B12
4
SAN11_D5
5
SAN11_D6
6
SAN11_G1
7
SAN11_G2
8
SAN11_G11
9
SAN11_G12
10
SAN11_B1
11
NTC
12

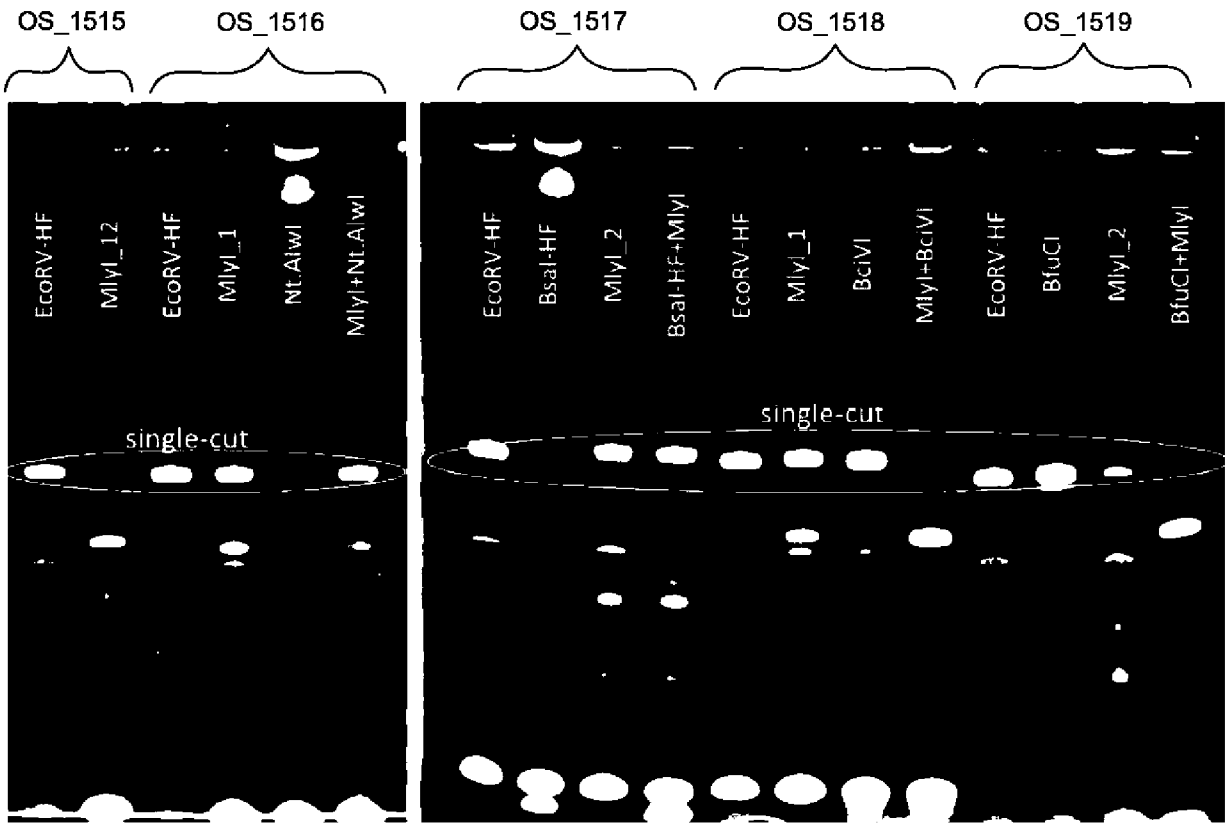
*ФИГ.60*



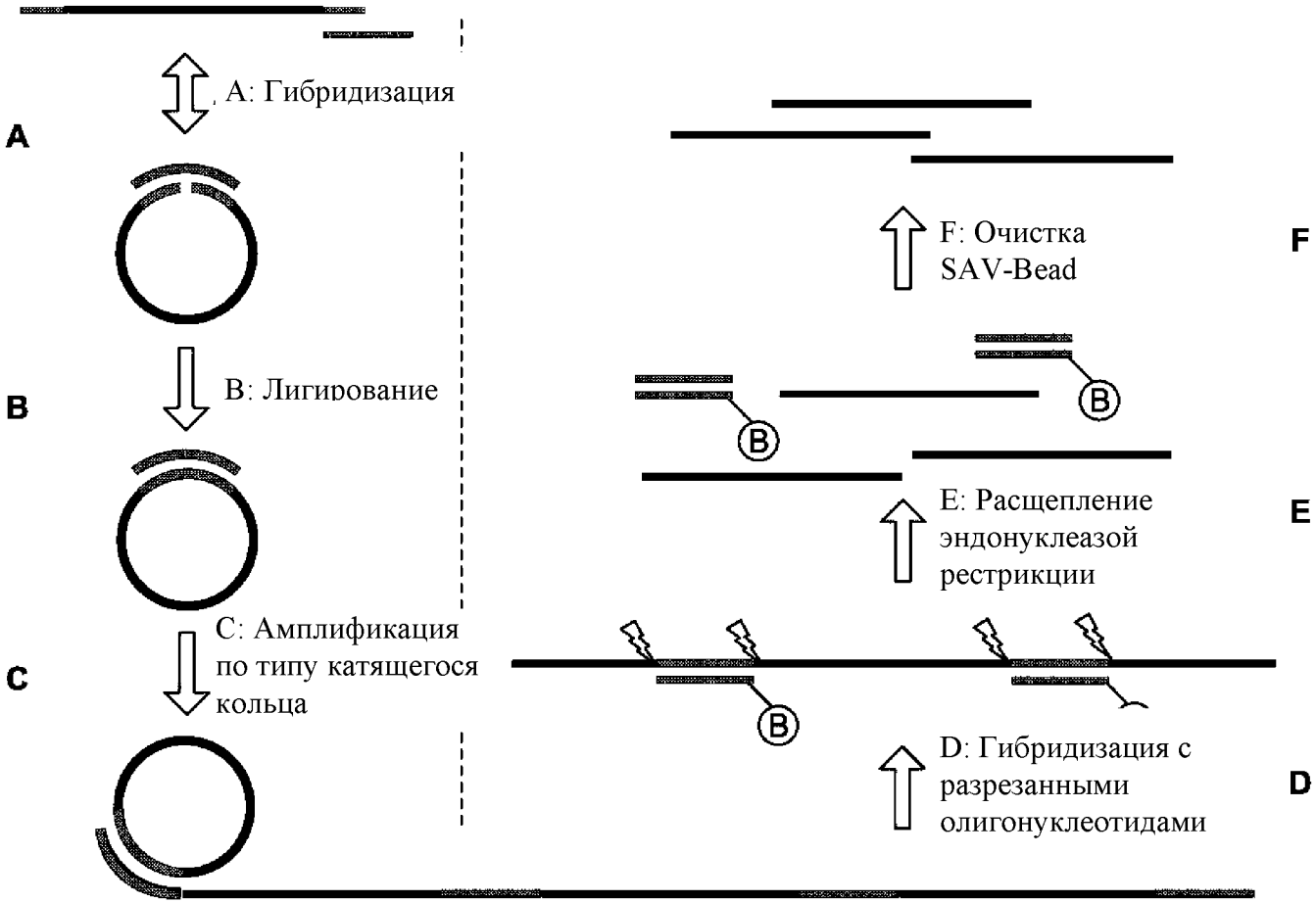

*ФИГ.61*


Малый фрагмент пластины с массивом приподнятых элементов для увеличения площади поверхности

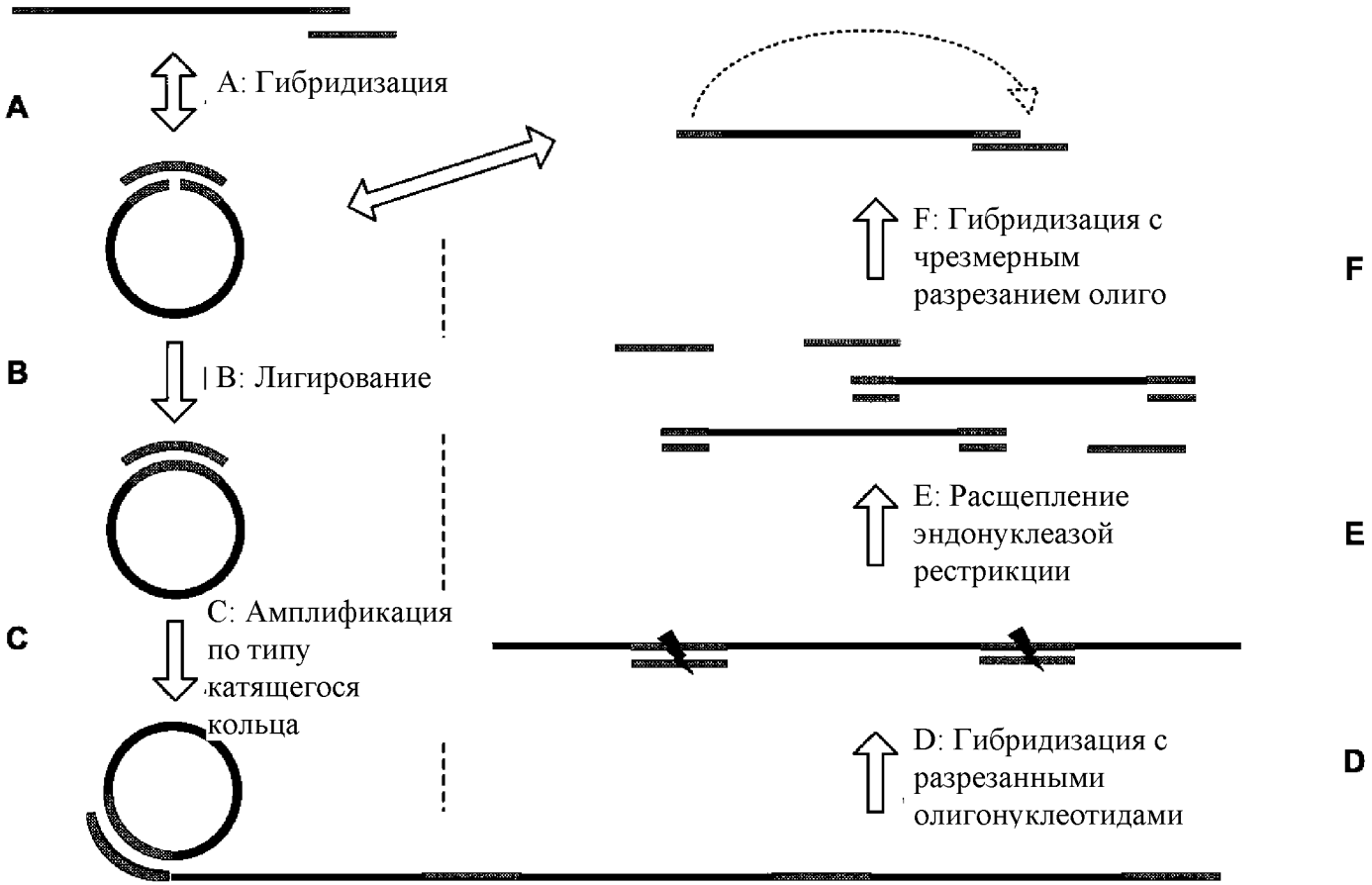
*ФИГ. 62*


OS_1515
OS_1516
OS_1517
OS_1518
OS_1519
EcoRV-HF
MlyI_12
EcoRV-HF
MlyI_1
Nt.AlwI
MlyI+Nt.AlwI
single-cut
EcoRV-HF
BsaI-HF
MlyI_2
BsaI-HF+MlyI
EcoRV-HF
MlyI_1
BciVI
MlyI+BciVI
single-cut
EcoRV-HF
BfuCI
MlyI_2
BfuCI+MlyI

*ФИГ.63*


A
A: Гибридизация
B
B: Лигирование
C
C: Амплификация
по типу катящегося
кольца
D: Гибридизация с
разрезанными
олигонуклеотидами
D
E: Расщепление
эндонуклеазой
рестрикции
E
F: Очистка
SAV-Bead
F
B
B
B

*ФИГ.64*


A
A: Гибридизация
B
B: Лигирование
C
C: Амплификация по типу катящегося кольца
D
D: Гибридизация с разрезанными олигонуклеотидами
E
E: Расщепление эндонуклеазой рестрикции
F
F: Гибридизация с чрезмерным разрезанием олиго

*ФИГ.65*