

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201992861 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.05.22

(51) Int. Cl. C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 15/10 (2006.01)  
B01J 19/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.06.12

(54) СПОСОБЫ БЕСШОВНОЙ СБОРКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

(31) 62/518,496; 62/663,089

(32) 2017.06.12; 2018.04.26

(33) US

(86) PCT/US2018/037161

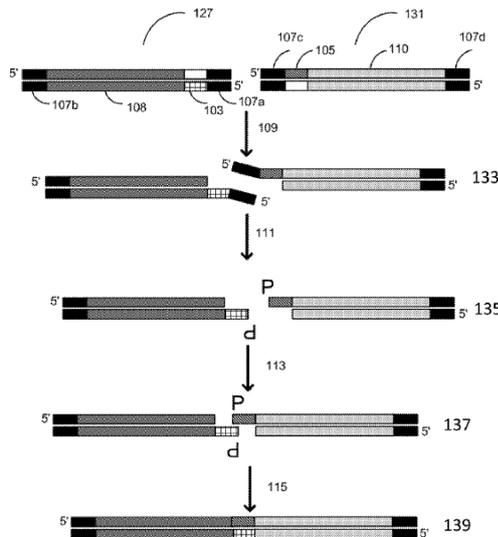
(87) WO 2018/231872 2018.12.20

(71) Заявитель:  
ТВИСТ БАЙОСАЙЕНС  
КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:  
Наджент Ребекка, Чэнь Сьюань, Ли  
Элиан, Рэйнард Натан (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам, системам и композициям для бесшовной сборки нуклеиновых кислот. Способы, системы и композиции, представленные в настоящем документе, обеспечивают эффективную сборку нуклеиновых кислот без удаления праймера. Способы, системы и композиции для бесшовной сборки нуклеиновых кислот включают применение эндонуклеазы или экзонуклеазы необязательно в сочетании с дополнительными ферментами для сборки нуклеиновых кислот или полинуклеотидов.



201992861  
A1

201992861  
A1

## **СПОСОБЫ БЕСШОВНОЙ СБОРКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

[0001] Данная заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 62/663089, поданной 26 апреля 2018; и предварительной заявке на патент США № 62/518,496, поданной 12 июня 2017 года, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен посредством ссылки. Указанная ASCII-копия, созданная 6 июня 2018 года, называется 44854-746\_601\_SL.txt и имеет размер 1585 байт.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Синтез нуклеиновых кислот de novo является эффективным инструментом для фундаментальных биологических исследований и биотехнологических применений. Хотя известны различные способы синтеза относительно коротких фрагментов нуклеиновых кислот в небольшом масштабе, данным способам недостает масштабируемости, автоматизации, скорости, точности и стоимости. Таким образом, остается потребность в эффективных способах бесшовной сборки нуклеиновых кислот.

### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0004] В настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение множества полинуклеотидов; и (b) смешивание множества полинуклеотидов с экзонуклеазой, флэп-эндонуклеазой, полимеразой и лигазой, где множество полинуклеотидов отжигаются в последовательном заранее определенном порядке на основании комплементарной последовательности между смежными полинуклеотидами. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу I, экзонуклеазу I, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладают 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляют собой ДНК-полимеразы. Кроме того, в

настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация флэп-эндонуклеазы I находится в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 1,0 ЕД до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет около 0,1 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет около 0,2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД.

[0005] В настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты; (c) обеспечение третьей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении 5'-3'-порядке: 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, первую последовательность, гомологичную первой двухцепочечной нуклеиновой кислоте, вторую последовательность, гомологичную второй двухцепочечной нуклеиновой кислоте, и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (d) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты и третьей двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, флэп-эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу

1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где количество обеспеченной флэп-эндонуклеазы 1 составляет от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где количество обеспеченной флэп-эндонуклеазы 1 составляет менее чем около 5,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладает 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляет собой ДНК-полимеразу. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где первая гомологичная последовательность или вторая гомологичная последовательность составляет от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где первая гомологичная последовательность и вторая гомологичная последовательность, каждая независимо, составляют от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где первая гомологичная последовательность или вторая гомологичная последовательность составляет от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где первая гомологичная последовательность и вторая гомологичная последовательность, каждая независимо, составляют от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где первая гомологичная последовательность или вторая гомологичная последовательность составляет около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где первая гомологичная последовательность и вторая гомологичная последовательность, каждая независимо, составляют около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 1,0 ЕД до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе

обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы присутствует в количестве от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет от около 0,1 до около 0,2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД. Далее, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы находится в диапазоне от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота, вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота или третья двухцепочечная нуклеиновая кислота, или любая их комбинация представляет собой линейный фрагмент. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (d), представляет собой линейный фрагмент. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы синтеза и сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (d), представляет собой кольцевой фрагмент.

**[0006]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, включающей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, флэп-эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где количество обеспеченной флэп-эндонуклеазы 1 составляет от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых

кислот, где количество обеспеченной флэп-эндонуклеазы I составляет менее чем около 5,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимераза обладает 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимераза представляет собой ДНК-полимеразу. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,5 Е до около 1,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 1,0 ЕД до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе

обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы присутствует в количестве от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет от около 0,1 до около 0,2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы находится в диапазоне от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота или вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота представляет собой линейный фрагмент. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой линейный фрагмент. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой кольцевой фрагмент.

**[0007]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, включающей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, флэп-эндонуклеазу, полимеразу и лигазу при температуре от около 30 °С до около 60 °С. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу I, экзонуклеазу I, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация флэп-эндонуклеазы I находится в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладает 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы

сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляют собой ДНК-полимеразы. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,5 Е до около 1,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 1,0 ЕД до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы

составляет около 0,1 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет около 0,2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы находится в диапазоне от 0,5 Е до около 1,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота или вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота представляет собой линейный фрагмент. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой линейный фрагмент. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой кольцевой фрагмент.

**[0008]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, включающей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующий адаптер, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующий адаптер, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность и (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей флэп-эндонуклеазу, где флэп-эндонуклеаза приводит к появлению 5'-выступа; полимеразу; и лигазу.

**[0009]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, включающей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД экзонуклеазы, от около

0,32 ЕД до около 4,8 ЕД флэп-эндонуклеазы, от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД полимеразы и до около 2,0 лигазы.

**[0010]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (б) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД флэп-эндонуклеазы, от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД полимеразы и до около 2,0 У лигазы.

**[0011]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение множества полинуклеотидов, где каждый из полинуклеотидов не содержит концевую область последовательности, гомологичную другому полинуклеотиду из множества полинуклеотидов; и (б) смешивание множества полинуклеотидов с экзонуклеазой, эндонуклеазой, полимеразой и лигазой, где множество полинуклеотидов отжигаются в последовательном заранее определенном порядке на основе комплементарной последовательности между соседними полинуклеотидами. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация флэп-эндонуклеазы 1 находится в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладают 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляют собой ДНК-полимеразы. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД.

Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет около 0,1 ЕД. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет около 0,01 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД.

**[0012]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты; (c) обеспечение третьей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, первую последовательность, гомологичную первой двухцепочечной нуклеиновой кислоте, вторую последовательность, гомологичную второй двухцепочечной нуклеиновой кислоте, и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота, вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота и третья двухцепочечная нуклеиновая кислота содержат негомологичные последовательности в концевых областях; и (d) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты и третьей двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация обеспеченной флэп-эндонуклеазы 1 составляет от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, обеспеченную в концентрации менее чем около 5,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладает 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляет собой ДНК-полимеразу. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух

нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота, вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота или третья двухцепочечная нуклеиновая кислота, или любая их комбинация представляет собой линейный фрагмент. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (d), представляет собой линейный фрагмент. Далее в настоящем документе обеспечиваются

способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (d), представляет собой кольцевой фрагмент.

**[0013]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация флэп-эндонуклеазы 1 составляет от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация обеспеченной флэп-эндонуклеазы 1 составляет менее чем около 5,0 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразу обладает 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразу представляет собой ДНК-полимеразу. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки

нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, в котором концентрация полимеразы составляет от около 0,01 ЕД до около 0,2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД. Кроме того, в данном документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота или вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота или любая их комбинация представляет собой линейный фрагмент. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой линейный фрагмент. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой кольцевой фрагмент.

**[0014]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (б) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную

последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, эндонуклеазу, полимеразу и лигазу, при температуре от около 30 °С до около 60 °С. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация флэп-эндонуклеазы 1 находится в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладает 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляет собой ДНК-полимеразу. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной

нуклеиновой кислоты составляет около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет около 0,1 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы составляет около 0,01 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД. Кроме того, в данном документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота или вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота или любая их комбинация представляет собой линейный фрагмент. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой линейный фрагмент. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где продукт, следующий за стадией (с), представляет собой кольцевой фрагмент.

**[0015]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, включающей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующий адаптер, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующий адаптер, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей эндонуклеазу, где эндонуклеаза приводит к появлению 5'-выступа; полимеразу; и лигазу.

**[0016]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую

адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД экзонуклеазы, от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД эндонуклеазы, от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД полимеразы и до около 2,0 ЕД лигазы.

**[0017]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД эндонуклеазы, от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД полимеразы и до около 2,0 ЕД лигазы.

**[0018]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей по меньшей мере один фермент, обладающий 3'- или 5'-экзонуклеазной активностью, полимеразу и лигазу, где по меньшей мере один фермент, обладающий 3'- или 5'-экзонуклеазной активностью, удаляет 5'-фланкирующую адаптерную последовательность или 3'-фланкирующую адаптерную последовательность. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где по меньшей мере один фермент, обладающий 3'- или 5'-экзонуклеазной активностью, представляет собой экзонуклеазу III. Кроме того, в

настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладают 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляют собой ДНК-полимеразы. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют около 40 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 10 до около 100 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, каждая независимо, составляют от около 20 до около 80 пар оснований. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД.

**[0019]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (а) обеспечение по меньшей мере 10 различных фрагментов, при этом каждый из по меньшей мере 10 различных фрагментов не содержит концевую область последовательности, гомологичную другому фрагменту из по меньшей мере 10 разных фрагментов; и (b) смешивание по меньшей мере 10 различных фрагментов с множеством

ферментов, где множество ферментов выбрано из эндонуклеазы, экзонуклеазы, полимеразы и лигазы, с образованием нуклеиновой кислоты. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где нуклеиновая кислота присоединяется к векторной последовательности. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где длина нуклеиновой кислоты составляет от 50 оснований до 200 оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где длина нуклеиновой кислоты составляет от 100 оснований до 2000 оснований. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладают 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляют собой ДНК-полимеразы. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот.

**[0020]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие: (a) обеспечение множества полинуклеотидов, где каждый из полинуклеотидов не содержит концевую область последовательности, гомологичную другому полинуклеотиду из множества полинуклеотидов; и (b) смешивание множества полинуклеотидов с 3'-5'-экзонуклеазой, термостабильной эндонуклеазой, высокоточной полимеразой и термостабильной лигазой, где множество полинуклеотидов отжигаются в последовательном заранее определенном порядке, основанном на комплементарности последовательности между соседними полинуклеотидами. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, обеспеченную в концентрации в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. Кроме того, в настоящем

документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы обладают 5'-3'-полимеразной активностью. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где полимеразы представляют собой ДНК-полимеразы. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД. Далее в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД. Кроме того, в настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД.

### **ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ**

[0021] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы для каждой отдельной публикации, патента или заявки на патент было конкретно и индивидуально указано, что она включена посредством ссылки.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[0022] Комплект материалов патента или заявки на патент содержит по меньшей мере один цветной чертеж. Копии данной публикации патента или заявки на патент с цветным чертежом (чертежами) предоставляются Патентным ведомством по предварительной заявке после надлежащей оплаты данной услуги.

[0023] На **фигуре 1** изображена схема опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот.

[0024] На **фигуре 1В** изображена схема опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот с использованием мостиковой сборки.

[0025] На **фигуре 2** изображены системы для полинуклеотидного синтеза и опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот.

[0026] На **фигуре 3** проиллюстрирована компьютерная система.

[0027] На **фигуре 4** изображена блок-схема, иллюстрирующая архитектуру компьютерной системы.

[0028] На **фигуре 5** изображена блок-схема многопроцессорной компьютерной системы с использованием общего виртуального пространства адресной памяти.

[0029] На **фигуре 6** изображена схема, демонстрирующая сеть, сконфигурированную для включения множества компьютерных систем, множества сотовых телефонов и карманных компьютеров и сетевого устройства хранения данных (NAS).

[0030] На **фигуре 7** представлен полученный с помощью BioAnalyzer график с нуклеотидными основаниями по оси x и единицами флуоресценции по оси y.

[0031] На **фигуре 8** представлен полученный с помощью BioAnalyzer с нуклеотидными основаниями по оси x и единицами флуоресценции по оси y.

[0032] На **фигуре 9** представлена гистограмма колониеобразующих единиц (КОЕ) с различными концентрациями EhoIII и Fen1.

[0033] На **фигуре 10** представлена гистограмма колониеобразующих единиц (КОЕ) и процент правильной сборки реакций опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот с различными концентрациями фермента.

[0034] На **фигуре 11** представлена гистограмма колониеобразующих единиц (КОЕ) при сборке 1,8 kb.

[0035] На **фигуре 12** представлена гистограмма опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки с двумя фрагментами ДНК.

[0036] На **фигуре 13** графически представлено количество колониеобразующих единиц (ось y) для нескольких генов (ось x) опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки с многочисленными фрагментами ДНК в ДНК-вектор.

[0037] На **фигуре 14A** графически представлено количество колониеобразующих единиц (ось y) для нескольких генов (ось x) опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки с повышенной концентрацией EhoIII с многочисленными фрагментами ДНК в ДНК-вектор.

[0038] На **фигуре 14B** представлена гистограмма анализа секвенирования следующего поколения собранных генов.

[0039] На **фигуре 14C** представлен график образцов степени сборки.

[0040] На **фигуре 15A** представлена гистограмма средних колониеобразующих единиц (КОЕ) (ось y) опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки с использованием нуклеиновокислотного мостика.

[0041] На **фигуре 15B** графически представлены колониеобразующие единицы (КОЕ) в логарифмическом масштабе (ось y) опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки с использованием нуклеиновокислотного мостика.

[0042] На **фигуре 16A** графически представлены колониеобразующие единицы (КОЕ, ось y) опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки генов (ось x) с использованием 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фрагментов.

[0043] На **фигуре 16В** представлена гистограмма анализа секвенирования следующего поколения популяции секвенированных (ось у, в процентах) и собранных генов (ось х) с использованием 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фрагментов.

[0044] На **фигуре 16С** представлена гистограмма проходного показателя (ось у) для генов (ось х) с использованием 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фрагментов.

[0045] На **фигуре 17** графически представлены колониеобразующие единицы (КОЕ, ось у) опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот с помощью способа 2 и способа 3 для двух генов с использованием 10-минутного и 30-минутного времени инкубации.

[0046] На **фигуре 18** представлен график из показаний BioAnalyzer с нуклеотидными основаниями по оси х и единицами флуоресценции по оси у.

[0047] На **фигуре 18В** графически представлены показания BioAnalyzer с временем инкубации по оси х и единицами флуоресценции по оси у.

[0048] На **фигурах 19А-19В** графически представлены колониеобразующие единицы (ось у) для различного числа фрагментов (ось х) с использованием способа опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способа компаратора 1 и способа компаратора 2.

[0049] На **фигурах 20А-20В** графически представлены ошибки сборки для опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, сборки способом компаратора 1 и сборки способом компаратора 2.

[0050] На **фигуре 20С** представлена гистограмма общего числа сборок (ось у, в процентах), сравнивающая опосредованную эндонуклеазой сборку нуклеиновых кислот, сборку способом компаратора 1 и сборку способом компаратора 2 (ось х).

[0051] На **фигуре 21А** представлен график собранных конструкций до PCR-амплификации и после амплификации для различного числа вставок.

[0052] На **фигуре 21В** представлена гистограмма общего числа сборок (ось у, в процентах) для различного числа фрагментов (ось х) с использованием способа опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способа компаратора 1 и способа компаратора 2.

[0053] На **фигуре 21С** графически представлены КОЕ (в процентах) популяции и результаты NGS с использованием опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот.

[0054] На **фигуре 21D** графически представлен процент распределения правильно собранных конструкций и неправильно собранных или неправильных конструкций.

[0055] На **фигуре 22А** представлен график наблюдаемой частоты на 5400 (ось у) по сравнению с различными категориями GC (ось x) популяции амплифицированных олигонуклеотидов до сборки.

[0056] На **фигуре 22В** представлен график наблюдаемой частоты на 5400 (ось у) по сравнению с различными категориями GC (ось x) популяции олигонуклеотидов, собранных с помощью опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот.

[0057] На **фигуре 23** графически представлены результаты по количеству генов для реакций мультиплексной сборки генов.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

### [0058] Определения

[0059] По всему данному описанию различные варианты осуществления 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, следует считать, что 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.

[0060] Терминология, использованная в настоящем документе, служит для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения любого варианта осуществления. Используемые в настоящем документе формы единственного числа «a», «an» и «the» предназначены также для включения форм множественного числа, если контекст явно не указывает на иное. Далее будет понятно, что термины «содержит» и/или «содержащий» при использовании в данном описании определяют наличие заявленных признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов и/или компонентов, но

не исключают присутствие или добавление одного или нескольких других признаков, целых чисел, стадий, операций, элементов, компонентов и/или их групп. Используемый в настоящем документе термин «и/или» включает в себя любую и все комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов.

**[0061]** Если конкретно не указано или очевидно из контекста, при использовании в настоящем документе термин «нуклеиновые кислоты» включает двух- или трехцепочечные нуклеиновые кислоты, а также одноцепочечные молекулы. В двухцепочечных или трехцепочечных нуклеиновых кислотах цепи нуклеиновых кислот не обязательно должны быть параллельными (то есть двухцепочечная нуклеиновая кислота не должна быть двухцепочечной по всей длине обеих цепей). Последовательности нуклеиновых кислот, если они имеются, перечислены в направлении от 5' до 3', если не указано иное. Способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают получение выделенных нуклеиновых кислот. Способы, описанные в настоящем документе, дополнительно обеспечивают получение выделенных и очищенных нуклеиновых кислот. Термин «нуклеиновая кислота», как указано в настоящем документе, может содержать по меньшей мере 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 или более оснований в длину. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способы синтеза любого количества кодирующих полипептидные сегменты нуклеотидных последовательностей, включая последовательности, кодирующие нерибосомные пептиды (non-ribosomal peptides (NRP)), последовательности, кодирующие модули и синтетические варианты нерибосомальной пептидсинтетазы (non-ribosomal peptide-synthetase (NRPS)), полипептидные сегменты других модульных белков, таких как антитела, полипептидные сегменты из других семейств белков, включая некодирующую ДНК или РНК, такие как регуляторные последовательности, например, промоторы, факторы транскрипции, энхансеры, siRNA, shRNA, RNAi, микроРНК, малая ядрышковая РНК, полученная из микроРНК, или любая интересующая функциональная или структурная единица ДНК или РНК. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, межгенная ДНК, локусы (локус), определенные из анализа сцепления, экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (siRNA), малая/короткая шпилечная РНК (shRNA), микроРНК (miRNA), малая ядрышковая РНК, рибозимы, комплементарная ДНК (кДНК), которая является ДНК-представлением мРНК, обычно получаемым путем обратной транскрипции матричной РНК (мРНК) или путем амплификации; молекулы ДНК, полученные синтетическим путем или путем

амплификации, геномная ДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. кДНК, кодирующая ген или фрагмент гена, упомянутый в настоящем документе, может содержать по меньшей мере одну область, кодирующую экзонную последовательность без промежуточной интронной последовательности в эквивалентной геномной последовательности.

**[0062]** Если специально не указано или не очевидно из контекста, при использовании в данном документе, термин «около» применительно к числу или диапазону чисел означает указанное число и числа на +/- 10% от него, или на 10% ниже нижнего предела в списке и на 10% выше верхнего предела в списке для значений, указанных для диапазона.

**[0063]** Праймеры, называемые в приведенных в настоящем документе примерных рабочих процессах «универсальными праймерами», представляют собой короткие полинуклеотиды, которые распознают сайт связывания праймера, общий для нескольких фрагментов ДНК. Однако, данные рабочие процессы не ограничиваются применением только универсальных праймеров, и специфичные для фрагментов праймеры могут быть включены в дополнение или альтернативно. Кроме того, хотя иллюстративные рабочие процессы, описанные в настоящем документе, относятся к сборке генных фрагментов, они не ограничены как таковые и применимы к сборке более длинных нуклеиновых кислот в целом.

#### **[0064] Бесшовная сборка нуклеиновых кислот**

**[0065]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот с повышенной эффективностью и точностью. Кроме того, в данном документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот в длинные гены. Полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, собраны в более длинные нуклеиновые кислоты с помощью способов сборки, включающих эндонуклеазу или экзонуклеазу, необязательно в сочетании с дополнительными ферментами.

**[0066]** Служащий примером способ сборки нуклеиновых кислот с использованием флэп-эндонуклеазы показан на **ФИГ. 1А**. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот, выполняется с первым генным фрагментом **127** и вторым генным фрагментом **131**. Нижняя цепь первого генного фрагмента **127** сконструирована так, чтобы содержать в направлении от 5' к 3' последовательность **107a** связывания первого универсального праймера, гомологичную последовательность **103**, вставочную последовательность **108** и последовательность **107b** связывания второго универсального праймера. Верхняя цепь второго генного фрагмента **131** предназначена для того, чтобы

содержать в направлении от от 5' к 3' последовательность **107c** связывания первого универсального праймера, гомологичную последовательность **105**, вставочную последовательность **110** и последовательность **107d** связывания второго универсального праймера. Первый генный фрагмент **127** и второй генный фрагмент **131** приводят в контакт с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, флэп-эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. Экзонуклеаза расщепляет 3'-конец у **109** с экспонированием гомологичных сайтов с образованием фрагментов **133**. В некоторых случаях экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Флэп-эндонуклеаза отщепляет **111** 5'-свисающий конец (флэп), в результате чего появляются фрагменты **135**. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1 (FEN-1). Полимераза заполняет пробелы **113** и оставляет одноцепочечный разрыв, в результате чего появляются фрагменты **137**. Затем лигаза лигирует **115** одноцепочечный разрыв, в результате чего появляются фрагменты **139**.

**[0067]** Служащий примером способ сборки нуклеиновых кислот с использованием флэп-эндонуклеазы и способа мостиковой сборки показан на **ФИГ. 1В**. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот выполняется с двухцепочечным нуклеиновокислотным мостиком **151**, первым генным фрагментом **155** и вторым генным фрагментом **157**. Двухцепочечный нуклеиновокислотный мостик **151** содержит первую последовательность **153a** связывания универсального праймера, первую гомологичную последовательность **155a**, гомологичную первому генному фрагменту **155**, вторую гомологичную последовательность **157a**, гомологичную второму генному фрагменту **157**, и последовательность **153b** связывания второго универсального праймера. Двухцепочечный нуклеиновокислотный мостик **151**, первый генный фрагмент **155** и второй генный фрагмент **157** вводят в контакт с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, флэп-эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. Экзонуклеаза расщепляет **159** 3'-конец, чтобы экспонировать гомологичные сайты, в результате чего появляются фрагменты **169**. В некоторых случаях экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III. Полимераза заполняет пробелы **161** и оставляет одноцепочечный разрыв, в результате чего появляются фрагменты **171**. Флэп-эндонуклеаза расщепляет **165** 5'-свисающий конец, в результате чего появляются фрагменты **173**. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1 (FEN-1). Затем лигаза лигирует **167** одноцепочечный разрыв, в результате чего появляются фрагменты **175**. В некоторых случаях лигаза представляет собой амплигазу (ampligase).

**[0068]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот. В некоторых случаях ферментативно опосредованная сборка нуклеиновых кислот содержит добавление гомологичных последовательностей к генным

фрагментам. В некоторых случаях *de novo* синтезированные генные фрагменты уже содержат гомологичные последовательности. В некоторых случаях ферментативно опосредованная сборка нуклеиновых кислот включает использование ферментативной смеси. В некоторых случаях ферментативная смесь содержит эндонуклеазу. В некоторых случаях ферментативная смесь необязательно содержит экзонуклеазу, полимеразу или лигазу. В некоторых случаях ферментативная смесь содержит экзонуклеазу, эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. В некоторых случаях ферментативная смесь содержит эндонуклеазу, полимеразу и лигазу. В некоторых случаях эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. В некоторых случаях ферментативно опосредованная сборка нуклеиновых кислот приводит к повышению эффективности. В некоторых случаях ферментативная смесь содержит ферменты, которые не являются рестрикционными ферментами. В некоторых случаях ферментативная смесь содержит ферменты, которые являются ферментами, специфичными по отношению к структуре. В некоторых случаях ферментативная смесь содержит ферменты, которые являются ферментами, специфичными по отношению к структуре, а не ферментами, специфичными по отношению к последовательности.

**[0069]** В настоящем документе обеспечиваются способы, где сайт-специфические, предназначенные для удаления оснований реагенты, содержащие один или несколько ферментов, используются в качестве расщепляющих агентов, которые расщепляют только одну цепь двухцепочечной ДНК в сайте расщепления. Ряд ферментов репарации пригоден отдельно или в комбинации с другими агентами для образования таких одноцепочечных разрывов. Иллюстративный список ферментов репарации приведен в **таблице 1**. Гомологи или неприродные варианты ферментов репарации, включая те, которые приведены в **таблице 1**, также могут быть использованы в соответствии с различными вариантами осуществления. Любой из ферментов репарации для применения в соответствии со способами и композициями, описанными в настоящем документе, может быть встречающимся в природе, рекомбинантным или синтетическим. В некоторых случаях фермент репарации ДНК представляет собой нативный или созданный *in vitro* химерный белок с одной или несколькими активностями. Расщепляющие агенты в различных вариантах осуществления включают ферментативные активности, включая ферментные смеси, которые включают одну или несколько из никующих эндонуклеаз, АП-эндонуклеаз, гликозилаз и лиаз, участвующих в эксцизионной репарации оснований.

**[0070]** Ферменты репарации обнаружены в прокариотических и эукариотических клетках. Некоторые ферменты, имеющие применимость в настоящем документе, обладают гликозилазной и АП-эндонуклеазной активностью в одной молекуле. АП-эндонуклеазы

классифицируются в зависимости от сайтов их разреза. АП-эндонуклеазы I класса и АП-эндонуклеазы II класса разрезают ДНК по 3'- и 5'-фосфатным группам от лишнего азотистого основания сайта, оставляя 3'-ОН и 5'-фосфатные концы. АП-эндонуклеазы III класса и IV класса также расщепляют ДНК по 3'- и 5'-фосфатным группам от лишнего азотистого основания сайта, но они образуют 3'-фосфат и 5'-ОН. Примеры используемых ферментов расщепления полинуклеотидов включают ферменты репарации ДНК, перечисленные в таблице 1.

**Таблица 1. Ферменты репарации ДНК.**

Название гена	Активность	Номер доступа
UNG	Урацил-ДНК-гликозилаза	NM_080911
SMUG1	Урацил-ДНК-гликозилаза	NM_014311
MBD4	Удаляет U или T напротив G в последовательностях CpG	NM_003925
TDG	Удаляет U, T или ethenoC напротив G	NM_003211
OGG1	Удаляет 8-охоG напротив C	NM_016821
MUTYH (MYH)	Удаляет A напротив 8-охоG	NM_012222
NTHL1 (NTH1)	Удаляет насыщенные кольцами или фрагментированные пиримидины	NM_002528
MPG	Удаляет 3-меA, ethenoA, гипоксантин	NM_002434
NEIL1	Удаляет тимингликоль	NM_024608
NEIL2	Удаляет продукты окисления пиримидинов	NM_145043
XPC	Связывает поврежденную ДНК в виде комплекса с RAD23B, CETN2	NM_004628
RAD23B (HR23B)	Связывает поврежденную ДНК в виде комплекса с XPC, CETN2	NM_002874
CETN2	Связывает поврежденную ДНК в виде комплекса с XPC, RAD23B	NM_004344
RAD23A (HR23A)	Заменяет HR23B	NM_005053
РФА	Связывает поврежденную ДНК в неразрезанном комплексе	NM_000380
RPA1	Связывает ДНК в неразрезанном комплексе	NM_002945
RPA2	Связывает ДНК в неразрезанном комплексе	NM_002946
RPA3	Связывает ДНК в неразрезанном комплексе	NM_002947
ERCC5 (XPG)	3'-разрез	NM_000123

ERCC1	Субъединица 5'-разреза	NM_001983
ERCC4 (XPF)	Субъединица 5'-разреза	NM_005236
LIG1	Соединение ДНК	NM_000234
CKN1 (CSA)	Синдром Коккейна; Необходим для сопряженной с транскрипцией NER	NM_000082
ERCC6 (CSB)	Синдром Коккейна; Необходим для сопряженной с транскрипцией NER	NM_000124
XAB2 (HCNP)	Синдром Коккейна; Необходим для сопряженной с транскрипцией NER	NM_020196
DDB1	Комплекс, неисправный в XP группе E	NM_001923
DDB2	DDB1, DDB2	NM_000107
MMS19L (MMS19)	Транскрипция и NER	NM_022362
FEN1 (ДНКаза IV)	Флэп-эндонуклеаза	NM_004111
SPO11	эндонуклеаза	NM_012444
FLJ35220 (ENDOV)	3'-разрез по гипоксантину и урацилу	NM_173627
FANCA	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_000135
FANCB	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_152633
FANCC	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_000136
FANCD2	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_033084
FANCE	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_021922
FANCF	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_022725
FANCG (XRCC9)	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_004629
FANCL	Задействован в толерантности или репарации сшивок ДНК	NM_018062
DCLRE1A (SNM1)	Репарация сшивок ДНК	NM_014881
DCLRE1B (SNM1B)	Относится к SNM1	NM_022836
NEIL3	Напоминает NEIL1 и NEIL2	NM_018248
ATRIP (TREX1)	ATR-взаимодействующий белок 5'-альтернативная ORF гена TREX1/ATRIP	NM_130384
NTH	Удаляет поврежденные пиримидины	NP_416150.1

NEI	Удаляет поврежденные пиримидины	NP_415242.1
NFI	Дезоксиинозин-3'-эндонуклеаза	NP_418426.1
MUTM	Формаимидопиримидин-ДНК- гликозилаза	NP_418092.1
UNG	Урацил-ДНК-гликозилаза	NP_417075.1
UVRA	Ферментативная система эксцизионной репарации ДНК	NP_418482.1
УФОК	Ферментативная система эксцизионной репарации ДНК	NP_415300.1
UVRC	Ферментативная система эксцизионной репарации ДНК	NP_416423.3
DENV	Пиримидин-димер-гликозилаза	NP_049733.1

**[0071]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, где генные фрагменты или гены для сборки содержат гомологичную последовательность. В некоторых случаях гомологичная последовательность содержит по меньшей мере или около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 пар оснований. В некоторых случаях число пар оснований составляет 40 пар оснований. В некоторых случаях число пар оснований имеет диапазон около от 5 до 100, от 10 до 90, от 20 до 80, от 30 до 70 или от 40 до 60 пар оснований.

**[0072]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, где генные фрагменты или гены для сборки не содержат гомологичную последовательность. В некоторых случаях способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот из de novo синтезированных генных фрагментов без гомологичной последовательности включают в себя сборку с использованием нуклеиновокислотного мостика. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик включает ДНК или РНК. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик включает ДНК. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик является двухцепочечным. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик является одноцепочечным.

**[0073]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот с использованием нуклеиновокислотного мостика, причем нуклеиновокислотный мостик содержит одну или более последовательностей связывания универсального праймера. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик содержит по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более 8 последовательностей, связывающих универсальный праймер. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик дополнительно содержит гомологичную последовательность. В некоторых случаях

гомологичная последовательность гомологична генному фрагменту, синтезированному *de novo*. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик дополнительно содержит одну или несколько гомологичных последовательностей. Например, нуклеиновокислотный мостик содержит одну или несколько гомологичных последовательностей, которые гомологичны различным синтезированным *de novo* генным фрагментам. В некоторых случаях нуклеиновокислотный мостик содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 гомологичных последовательностей. В некоторых случаях гомологичная последовательность содержит по меньшей мере или около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 пар оснований. В некоторых случаях число пар оснований составляет 40 пар оснований. В некоторых случаях число пар оснований составляет 50 пар оснований. В некоторых случаях число пар оснований имеет диапазон около от 5 до 100, от 10 до 90, от 20 до 80, от 30 до 70 или от 40 до 60 пар оснований.

**[0074]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, где двухцепочечная нуклеиновая кислота вступает в контакт с ферментом, обладающим экзонуклеазной активностью. В некоторых случаях экзонуклеаза обладает 3'-экзонуклеазной активностью. Типичные экзонуклеазы, обладающие 3'-экзонуклеазной активностью, включают, но не ограничиваются ими, экзонуклеазу I, экзонуклеазу III, экзонуклеазу V, экзонуклеазу VII и экзонуклеазу T. В некоторых случаях экзонуклеаза обладает 5'-экзонуклеазной активностью. Типичные экзонуклеазы, обладающие 5'-экзонуклеазной активностью, включают, но не ограничиваются ими, экзонуклеазу II, экзонуклеазу IV, экзонуклеазу V, экзонуклеазу VI, экзонуклеазу VII, экзонуклеазу VIII, T5 экзонуклеазу и T7 экзонуклеазу. В некоторых случаях экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III (EcoIII). Экзонуклеазы включают экзонуклеазы дикого типа и их производные, химеры и/или их мутанты. Мутантные экзонуклеазы включают ферменты, содержащие одну или несколько мутаций, вставок, делеций или любую их комбинацию в аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности экзонуклеазы.

**[0075]** В некоторых случаях экзонуклеаза используется при температуре, оптимальной для ферментативной активности, например, при температуре в диапазоне около от 25 до 80 °C, от 25 до 70 °C, от 25 до 60 °C, от 25 до 50 °C или от 25 до 40 °C. В некоторых случаях температура составляет около 37 °C. В некоторых случаях температура составляет около 50 °C. В некоторых случаях температура составляет около 55 °C. В некоторых случаях температура составляет около 65 °C. В некоторых случаях температура составляет по меньшей мере или около 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C или более чем 80 °C.

[0076] В некоторых случаях способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот не содержат использование экзонуклеазы. В некоторых случаях способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот включают использование экзонуклеазы. В некоторых случаях используется одна или более экзонуклеаз. Например, используют по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более 6 экзонуклеаз. В некоторых случаях экзонуклеаза обладает 5'-3'-экзонуклеазной активностью. В некоторых случаях экзонуклеаза обладает 3'-5'-экзонуклеазной активностью. В некоторых случаях способы включают контактирование двухцепочечной ДНК с эндонуклеазой. В некоторых случаях эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. В некоторых случаях способы включают контактирование двухцепочечной ДНК с флэп-эндонуклеазой, лигазой или полимеразой. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1.

[0077] В настоящем документе обеспечиваются способы, в которых двухцепочечная нуклеиновая кислота обрабатывается ферментом, обладающим эндонуклеазной активностью. В некоторых случаях эндонуклеаза обладает 5'-нуклеазной активностью. В некоторых случаях эндонуклеаза обладает 3'-нуклеазной активностью. В некоторых случаях эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза обладает 5'-нуклеазной активностью. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза является членом 5'-нуклеазного семейства ферментов. Типичные 5'-нуклеазные ферменты включают, но не ограничиваются ими, флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, группу комплементации пигментной ксеродермы G (XPG), Dna2 и gar эндонуклеазу 1 (GEN1). В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза обладает 3'-нуклеазной активностью. Типичные флэп-эндонуклеазы с 3'-нуклеазной активностью включают, но не ограничиваются ими, RAG1, RAG2 и MUS81. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза представляет собой архейную, бактериальную, дрожжевую, растительную флэп-эндонуклеазу или флэп-эндонуклеазу млекопитающих. Типичные 5'-нуклеазные и 3'-нуклеазные ферменты представлены в **таблице 2**.

**Таблица 2. Типичные нуклеазные ферменты**

Название	Вид	Номер доступа белка
флэп-эндонуклеаза 1	<i>Homo sapiens</i>	NP_004102.1
флэп-эндонуклеаза 1	<i>Mus musculus</i>	NP_001258544.1
флэп-эндонуклеаза 1	<i>Pyrococcus furiosus</i>	O93634
экзонуклеаза 1	<i>Homo sapiens</i>	AAH07491.1
XPG	<i>Homo sapiens</i>	EAX09071.1
DNA2	<i>Homo sapiens</i>	NP_001073918.2

GEN1	<i>Homo sapiens</i>	NP_001123481.2
RAG1	<i>Homo sapiens</i>	AAH37344.1 GI
RAG2	<i>Homo sapiens</i>	NP_001230715.
MUS81	<i>Homo sapiens</i>	Q96NY9.3

**[0078]** В некоторых случаях эндонуклеаза используется при температуре, оптимальной для ферментативной активности, например, при температуре от 25 до 80 °С, от 25 до 70 °С, от 25 до 60 °С, от 25 до 50 °С или от 25 до 40 °С. В некоторых случаях температура составляет около 50 °С. В некоторых случаях температура составляет около 55 °С. В некоторых случаях температура составляет около 65 °С. В некоторых случаях температура составляет по меньшей мере или около 15 °С, 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С, 40 °С, 45 °С, 50 °С, 55 °С, 60 °С, 65 °С, 70 °С, 75 °С, 80 °С или более чем 80 °С. В некоторых случаях эндонуклеаза является термостабильной эндонуклеазой. Термостабильные эндонуклеазы могут включать в себя эндонуклеазы, которые являются функциональными при температурах, составляющих по меньшей мере или около 60 °С, 65 °С, 70 °С, 75 °С, 80 °С или более чем 80 °С. В некоторых случаях эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. В некоторых случаях флэп-эндонуклеаза является термостабильной флэп-эндонуклеазой.

**[0079]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, где соотношение эндонуклеазы и экзонуклеазы составляет от около 0,1:1 до около 1:5. В некоторых случаях эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. В некоторых случаях соотношение эндонуклеазы и экзонуклеазы составляет по меньшей мере или около 0,2:1, 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или более 1:5. В некоторых случаях соотношение эндонуклеазы и экзонуклеазы составляет по меньшей мере или около 1:1, 1:0,9, 1:0,85, 1:0,8, 1:0,75, 1:0,7, 1:0,65, 1:0,6, 1:0,55, 1:0,5, 1:0,45, 1:0,4, 1:0,35, 1:0,3, 1:0,25, 1:0,2, 1:0,15, 1:0,1 или менее 1:0,1.

**[0080]** В настоящем документе обеспечиваются способы сборки нуклеиновых кислот, включающие экзонуклеазу, где концентрация экзонуклеазы составляет от около 0,1 ЕД до около 20 ЕД или более. Например, концентрация экзонуклеазы составляет по меньшей мере или около 0,1 ЕД, 0,25 ЕД, 0,5 ЕД, 0,75 ЕД, 1 ЕД, 1,6 ЕД, 2 ЕД, 3 ЕД, 4 ЕД, 5 ЕД, 6 ЕД, 7 ЕД, 8 ЕД, 9 ЕД, 10 ЕД, 12 ЕД, 14 ЕД, 16 ЕД, 18 ЕД, 20 ЕД или более 20 ЕД. В некоторых случаях концентрация экзонуклеазы находится в диапазоне от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД. В некоторых случаях концентрация экзонуклеазы составляет от около 1,0 ЕД до около 2,0 ЕД. В некоторых случаях концентрация экзонуклеазы составляет около 1,6 ЕД. В некоторых случаях концентрация экзонуклеазы составляет около 5,0 ЕД. В некоторых случаях концентрация экзонуклеазы находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до 20 ЕД, от

0,25 ЕД до 18 ЕД, от 0,5 ЕД до 16 ЕД, от 0,75 ЕД до 14 ЕД, от 1 ЕД до 12 ЕД, от 2 ЕД до 10 ЕД, от 3 ЕД до 9 ЕД или от 4 ЕД до 8 ЕД.

**[0081]** Способы, описанные в настоящем документе для ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, могут включать эндонуклеазу, где концентрация эндонуклеазы составляет от около 0,25 ЕД до около 12 ЕД или более. В некоторых случаях эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу. Служащие примерами концентрации эндонуклеазы включают, но не ограничиваются ими, по меньшей мере или около 0,25 ЕД, 0,5 ЕД, 0,75 ЕД, 1 ЕД, 2 ЕД, 3 ЕД, 4 ЕД, 5 ЕД, 6 ЕД, 7 ЕД, 8 ЕД, 9 ЕД, 10 ЕД, 11 ЕД, 12 ЕД или более 12 ЕД. В некоторых случаях концентрация эндонуклеазы составляет 0,32 ЕД. В некоторых случаях концентрация эндонуклеазы составляет 1,6 ЕД. В некоторых случаях концентрация эндонуклеазы находится в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД. В некоторых случаях концентрация эндонуклеазы находится в диапазоне от около 0,25 ЕД до 12 ЕД, от 0,5 ЕД до 11 ЕД, от 0,75 ЕД до 10 ЕД, от 1 ЕД до 9 ЕД, от 2 ЕД до 8 ЕД, от 3 ЕД до 7 ЕД или от 4 ЕД до 6 ЕД.

**[0082]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, где двухцепочечная нуклеиновая кислота смешивается с полимеразой. В некоторых случаях полимеразы представляют собой ДНК-полимеразы. В некоторых случаях полимеразы являются высокоточной полимеразой. Высокоточная полимеразы может включать полимеразы, которые приводят к точной репликации или амплификации матричной нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях ДНК-полимераза представляет собой термостабильную ДНК-полимеразу. ДНК-полимераза может быть из любого семейства ДНК-полимераз, включая, но не ограничиваясь ими, полимеразу семейства А, полимеразу семейства В, полимеразу семейства С, полимеразу семейства D, полимеразу семейства Х и полимеразу семейства Y. В некоторых случаях ДНК-полимераза принадлежит к роду, включающему, но без ограничения, *Thermus*, *Bacillus*, *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Aeropyrum*, *Aquifex*, *Sulfolobus*, *Pyrolobus* или *Methanopyrus*.

**[0083]** Полимеразы, описанные в настоящем документе для применения в реакции амплификации, могут содержать различные ферментативные активности. Полимеразы применяются в способах по изобретению, например, для удлинения праймеров для получения продуктов удлинения. В некоторых случаях ДНК-полимераза обладает 5'-3'-полимеразной активностью. В некоторых случаях ДНК-полимераза обладает 3'-5'-эксонуклеазной активностью. В некоторых случаях ДНК-полимераза обладает корректирующей активностью. Типичные полимеразы включают, но не ограничиваются ими, ДНК-полимеразу (I, II или III), ДНК-полимеразу T4, ДНК-полимеразу T7, ДНК-полимеразу Bst, полимеразу Bca, ДНК-полимеразу Vent, ДНК-полимеразу Pfu и ДНК-

полимеразу Taq. Неограничивающие примеры термостабильных ДНК-полимераз включают, но не ограничиваются ими, Taq, ДНК-полимеразу Phusion®, ДНК-полимеразу Q5® High Fidelity, ДНК-полимеразу LongAmp®, полимеразу Expand High Fidelity, полимеразу HotTub, полимеразу Pwo, полимеразу Tfl, полимеразу Tli, полимеразу Ultima, полимеразу Pfu, ДНК-полимеразу KOD, ДНК-полимеразу JDF-3, ДНК-полимеразу PGB-D, ДНК-полимеразу Tgo, ДНК-полимеразу *Pyrolobus furmarius*, полимеразу Vent и полимеразу Deep Vent.

**[0084]** В настоящем документе описаны способы, включающие ДНК-полимеразу, в которых концентрация ДНК-полимеразы составляет от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД или более чем 2 ЕД. В некоторых случаях концентрация ДНК-полимеразы составляет около 0,1 ЕД. В некоторых случаях концентрация ДНК-полимеразы составляет около 0,2 ЕД. В некоторых случаях концентрация ДНК-полимеразы составляет около 0,01 ЕД. В некоторых случаях концентрация ДНК-полимеразы находится в диапазоне по меньшей мере или около от 0,005 ЕД до 2 ЕД, от 0,005 ЕД до 1 ЕД, от 0,005 ЕД до 0,5 ЕД, от 0,01 ЕД до 1 ЕД, от 0,1 ЕД до 0,5 ЕД, от 0,1 ЕД до 0,5 ЕД, от 0,1 ЕД до 1 ЕД, от 0,1 ЕД до 1,5 ЕД, от 0,1 ЕД до 2 ЕД, от 0,5 ЕД до 1,0 ЕД, от 0,5 ЕД до 1,5 ЕД, от 0,5 ЕД до 2 ЕД, от 1 ЕД до 1,5 ЕД, от 1,0 ЕД до 2,0 ЕД или от 1,5 ЕД до 2 ЕД.

**[0085]** ДНК-полимераза для применения в способах, описанных в настоящем документе, используется при температуре, оптимальной для ферментативной активности, например, при температуре от 25 до 80 °С, от 25 до 70 °С, от 25 до 60 °С, от 25 до 50 °С или от 25 до 40 °С. В некоторых случаях температура составляет около 50 °С. В некоторых случаях температура составляет около 55 °С. В некоторых случаях температура составляет около 65 °С. В некоторых случаях температура составляет по меньшей мере или около 15 °С, 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С, 40 °С, 45 °С, 50 °С, 55 °С, 60 °С, 65 °С, 70 °С, 75 °С, 80 °С или более 80 °С.

**[0086]** Способы, описанные в настоящем документе для ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, могут содержать реакции амплификации, где реакция амплификации содержит последовательность связывания универсального праймера. В некоторых случаях последовательность связывания универсального праймера способна связывать один и тот же 5'- или 3'-праймер. В некоторых случаях последовательность связывания универсального праймера является общей для множества нуклеиновых кислот-мишеней в реакции амплификации.

**[0087]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, где двухцепочечная нуклеиновая кислота обрабатывается лигазой. Описанные в настоящем документе лигазы могут функционировать с целью

соединения фрагментов нуклеиновой кислоты. Например, лигаза функционирует с тем, чтобы соединить соседние 3'-гидроксилированные и 5'-фосфорилированные концы ДНК. Лигазы включают, но не ограничиваются ими, лигазу *E. coli*, лигазу T4, лигазы млекопитающих (например, ДНК-лигаза I, ДНК-лигаза II, ДНК-лигаза III, ДНК-лигаза IV), термостабильные лигазы и быстрые лигазы. В некоторых случаях лигаза является термостабильной лигазой. В некоторых случаях лигаза представляет собой амплигазу (Ampligase).

**[0088]** Концентрация лигазы может варьироваться. В некоторых случаях концентрация лигазы находится в диапазоне от около 0 ЕД до около 2 ЕД. Примерная концентрация лигазы составляет около 0,5 ЕД. В некоторых случаях концентрация лигазы составляет около 1,0 ЕД. В некоторых случаях концентрация лигазы составляет около 5,0 ЕД. В некоторых случаях концентрация лигазы находится в диапазоне по меньшей мере или около от 0 ЕД до 0,25 ЕД, от 0 ЕД до 0,5 ЕД, от 0 ЕД до 1 ЕД, от 0 ЕД до 1,5 ЕД, от 0 ЕД до 2 ЕД, от 0,25 ЕД до 0,5 ЕД, от 0,25 ЕД до 1,0 ЕД, от 0,25 ЕД до 1,5 ЕД, от 0,25 ЕД до 2,0 ЕД, от 0,5 ЕД до 1,0 ЕД, от 0,5 ЕД до 1,5 ЕД, от 0,5 ЕД до 2,0 ЕД, от 1,0 ЕД до 1,5 ЕД, от 1,0 ЕД до 2,0 ЕД, от 1,5 ЕД до 2,0 ЕД, от 2,0 ЕД до 4,0 ЕД, от 4,0 ЕД до 6,0 ЕД, от 4,0 ЕД до 8,0 ЕД, от 6,0 ЕД до 10,0 ЕД.

**[0089]** В некоторых случаях лигазы используется при температуре, оптимальной для ферментативной активности, например, при температуре от 25 до 80 °С, от 25 до 70 °С, от 25 до 60 °С, от 25 до 50 °С или от 25 до 40 °С. В некоторых случаях температура составляет около 50 °С. В некоторых случаях температура составляет около 55 °С. В некоторых случаях температура составляет около 65 °С. В некоторых случаях температура составляет по меньшей мере или около 15 °С, 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С, 40 °С, 45 °С, 50 °С, 55 °С, 60 °С, 65 °С, 70 °С, 75 °С, 80 °С или более чем 80 °С.

**[0090]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, где собраны несколько генных фрагментов. В некоторых случаях генные фрагменты собраны процессивно или последовательно. В некоторых случаях генные фрагменты собраны в вектор. В некоторых случаях генные фрагменты собраны для сборки длинных линейных генов. В некоторых случаях число генных фрагментов составляет по меньшей мере или около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 генных фрагментов. В некоторых случаях число генных фрагментов составляет по меньшей мере или около 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более 20 генных фрагментов. В некоторых случаях число генных фрагментов находится в диапазоне около от 1 до 2, от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 1 до 6, от 1 до 7, от 1 до 8, от 1 до 9, от 1 до 10, от 2 до 3, от 2 до 4, от 2 до 5, от 2 до 6, от 2 до 7, от 2 до 8, от 2 до 9, от 2 до 10, от 3 до 4, от 3

до 5, от 3 до 6, от 3 до 7, от 3 до 8, от 3 до 9, от 3 до 10, от 4 до 5, от 4 до 6, от 4 до 7, от 4 до 8, от 4 до 9, от 4 до 10, от 5 до 6, от 5 до 7, от 5 до 8, от 5 до 9, от 5 до 10, от 6 до 7, от 6 до 8, от 6 до 9, от 6 до 10, от 7 до 8, от 7 до 9, от 7 до 10, от 8 до 9, от 8 до 10 или от 9 до 10. В некоторых случаях число генных фрагментов составляет от около 1 до около 20, от около 2 до около 18, от около 3 до около 17, от около 4 до около 16, от около 6 до около 14 или от около 8 до около 12.

**[0091]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, где соотношение собранных генных фрагментов составляет около 0,2:1, 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1:1,5, 1:2 1:3, 1:4, 1:5 или более 1:5. Например, если собраны два генных фрагмента, соотношение первого генного фрагмента и второго генного фрагмента составляет 1:1. В некоторых случаях соотношение первого генного фрагмента и второго генного фрагмента составляет по меньшей мере или около 1:1, 1:0,9, 1:0,85, 1:0,8, 1:0,75, 1:0,7, 1:0,65, 1:0,6, 1:0,55, 1:0,5, 1:0,45, 1:0,4, 1:0,35, 1:0,3, 1:0,25, 1:0,2, 1:0,15, 1:0,1 или менее чем 1:0,1.

**[0092]** Способы, описанные в настоящем документе для ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, могут содержать сборку одного или более генных фрагментов в вектор, где соотношение одного или более генных фрагментов и вектора изменяется. В некоторых случаях соотношение одного или более генных фрагментов и вектора составляет по меньшей мере или около 0,2:1, 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или более 1:5. В некоторых случаях соотношение одного или более генных фрагментов и вектора составляет по меньшей мере или около 1:1, 1:0,9, 1:0,85, 1:0,8, 1:0,75, 1:0,7, 1:0,65, 1:0,6, 1:0,55, 1:0,5, 1:0,45, 1:0,4, 1:0,35, 1:0,3, 1:0,25, 1:0,2, 1:0,15, 1:0,1 или менее чем 1:0,1.

**[0093]** Способы, описанные в настоящем документе для ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, могут включать сборку популяций олигонуклеотидов для сборки в вектор. В некоторых случаях для сборки популяций олигонуклеотидов выполняется PCR с перекрывающимися праймерами. В некоторых случаях популяция олигонуклеотидов включает по меньшей мере или около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 или более 200 олигонуклеотидов. В некоторых случаях популяция олигонуклеотидов собирается для получения длинной нуклеиновой кислоты, включающей по меньшей мере или около 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 2000, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или более чем 10000 оснований.

**[0094]** Способы, описанные в настоящем документе для ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот, могут включать мультиплексную сборку генов. В некоторых

случаях многочисленные последовательности собираются в одной реакции. В некоторых случаях по меньшей мере или около 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 или более 200 последовательностей собираются в одной реакции. Последовательности, собранные с помощью мультиплексной сборки генов, в некоторых случаях вставляются в вектор.

**[0095]** Способы ферментативно опосредованной сборки нуклеиновых кислот могут включать сборку одного или более генных фрагментов с использованием нуклеиновокислотного мостика, причем соотношение одного или более генных фрагментов и нуклеиновокислотного мостика изменяется. В некоторых случаях соотношение одного или более генных фрагментов и нуклеиновокислотного мостика составляет по меньшей мере или около 0,2:1, 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 или более 1:5. В некоторых случаях соотношение одного или более генных фрагментов и нуклеиновокислотного мостика составляет по меньшей мере или около 1:1, 1:0,9, 1:0,85, 1:0,8, 1:0,75, 1:0,7, 1:0,65, 1:0,6, 1:0,55, 1:0,5, 1:0,45, 1:0,4, 1:0,35, 1:0,3, 1:0,25, 1:0,2, 1:0,15, 1:0,1 или менее 1:0,1.

**[0096]** В настоящем документе обеспечиваются способы ферментативно опосредованной нуклеиновокислотной сборки генных фрагментов, где общий размер числа генных фрагментов, которые собраны, составляет по меньшей мере или около 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 2000, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 или более 10000 оснований. В некоторых случаях общий размер числа генных фрагментов, которые собраны, находится в диапазоне около от 300 до 1000, от 300 до 2000, от 300 до 3000, от 300 до 4000, от 300 до 5000, от 300 до 6000, от 300 до 7000, от 300 до 8000, от 300 до 9000, от 300 до 10000, от 1000 до 2000, от 1000 до 3000, от 1000 до 4000, от 1000 до 5000, от 1000 до 6000, от 1000 до 7000, от 1000 до 8000, от 1000 до 9000, от 1000 до 10000, от 2000 до 3000, от 2000 до 4000, от 2000 до 5000, от 2000 до 6000, от 2000 до 7000, от 2000 до 8000, от 2000 до 9000, от 2000 до 10000, от 3000 до 4000, от 3000 до 5000, от 3000 до 6000, от 3000 до 7000, от 3000 до 8000, от 3000 до 9000, от 3000 до 10000, от 4000 до 5000, от 4000 до 6000, от 4000 до 7000, от 4000 до 8000, от 4000 до 9000, от 4000 до 10000, от 5000 до 6000, от 5000 до 7000, от 5000 до 8000, от 5000 до 9000, от 5000 до 10000, от 6000 до 7000, от 6000 до 8000, от 6000 до 9000, от 6000 до 10000, от 7000 до 8000, от 7000 до 9000, от 7000 до 10000, от 8000 до 9000, от 8000 до 10000 или от 9000 до 10000 оснований.

**[0097]** Способы, описанные в настоящем документе, включающие ферментативно опосредованную сборку нуклеиновой кислоты, приводят к высокому проценту правильной сборки. В некоторых случаях процент правильной сборки составляет по меньшей мере или

около 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более 99%. В некоторых случаях процент средней правильной сборки составляет по меньшей мере или около 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или более 99%. В некоторых случаях процент правильной сборки составляет 100%.

**[0098]** Способы, описанные в настоящем документе, включающие ферментативно опосредованную сборку нуклеиновой кислоты, приводят к низкому проценту неправильной сборки. В некоторых случаях степень неправильной сборки в процентах составляет не более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60%. В некоторых случаях степень неправильной сборки в процентах составляет от около 1% до около 25 %, от около 5% до около 20 % или от около 10% до около 15%. В некоторых случаях степень неправильной сборки в среднем составляет не более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или 60%. В некоторых случаях степень неправильной сборки в среднем составляет от около 1% до около 25%, от около 5% до около 20% или от около 10% до около 15%.

**[0099]** Способы, описанные в настоящем документе, включающие ферментативно опосредованную сборку нуклеиновой кислоты, приводят в результате к повышению эффективности. В некоторых случаях эффективность измеряется числом колониеобразующих единиц. В некоторых случаях описанные в настоящем документе способы в результате дают в результате по меньшей мере или около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 12000, 14000, 16000, 18000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000 или более 100000 колониеобразующих единиц.

#### **[00100] Системы для синтеза нуклеиновых кислот и бесшовной сборки**

##### **[00101] Синтез полинуклеотидов**

**[00102]** В настоящем документе обеспечиваются способы бесшовной сборки нуклеиновых кислот после получения полинуклеотидов *de novo* синтезом способами, описанными в данном документе. Типичное выполнение способа показано на **ФИГ. 2**. Получают считываемый компьютером входной файл, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты. Компьютер обрабатывает последовательность нуклеиновой кислоты для генерации инструкций по синтезу полинуклеотидной последовательности или множества полинуклеотидных последовательностей, совместно кодирующих последовательность нуклеиновой кислоты. Инструкции передаются на устройство **203** осаждения материала для синтеза множества полинуклеотидов на основе множества последовательностей нуклеиновых кислот. Устройство **203** осаждения материала, такое как синтезатор полинуклеотидных кислот, предназначено для поэтапного высвобождения реагентов таким

образом, что множественные полинуклеотиды вытягиваются параллельно по одному остатку за раз, образуя олигомеры с заранее определенной последовательностью нуклеиновой кислоты. Устройство **203** осаждения материала генерирует олигомеры в массиве **205**, который включает в себя несколько кластеров **207** локусов для синтеза и удлинения полинуклеотидной кислоты. Однако, не требуется, чтобы массив имел локусы, организованные в кластеры. Например, локусы могут быть равномерно распределены по всему массиву. De novo полинуклеотиды синтезируются и удаляются из планшета, и в сборочной камере **209** начинается реакция сборки, после чего образуется популяция более длинных полинуклеотидов **211**. Сборочная камера может содержать многослойную поверхность (например, верхнюю и нижнюю поверхность) или лунку или канал, в котором содержится перенесенный материал с поверхности синтеза. De novo полинуклеотиды также могут быть синтезированы и удалены из планшета для образования популяции более длинных полинуклеотидов **211**. Популяция более длинных полинуклеотидов **211** затем может быть разделена на капли или подвергнута PCR. Популяция более длинных полинуклеотидов **211** затем подвергается нуклеиновокислотной сборке посредством опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки **213**.

**[00103]** В настоящем документе обеспечиваются системы для бесшовной сборки нуклеиновых кислот после получения полинуклеотидов путем de novo синтеза способами, описанными в данном документе. В некоторых случаях система содержит компьютер, устройство осаждения материала, поверхность и поверхность для сборки нуклеиновых кислот. В некоторых случаях компьютер содержит читаемый входной файл с последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях компьютер обрабатывает последовательность нуклеиновой кислоты, чтобы генерировать инструкции для синтеза полинуклеотидной последовательности или множества полинуклеотидных последовательностей, совместно кодирующих последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях компьютер предоставляет инструкции устройству осаждения материала для синтеза множества последовательностей полинуклеотидных кислот. В некоторых случаях устройство осаждения материала наносит нуклеозиды на поверхность для реакции удлинения. В некоторых случаях поверхность содержит локус для реакции удлинения. В некоторых случаях локус представляет собой пятно, лунку, микролунку, канал или столбик. В некоторых случаях множество последовательностей полинуклеотидных кислот синтезируется после реакции удлинения. В некоторых случаях множество последовательностей полинуклеотидных кислот удаляется с поверхности и готовится для сборки нуклеиновых кислот. В некоторых случаях сборка нуклеиновых кислот содержит опосредованную флэп-эндонуклеазой сборку нуклеиновых кислот.

**[00104]** В настоящем документе обеспечиваются способы синтеза полинуклеотидов, включающие фосфорамидитную химию. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает реакцию сочетания основания с фосфорамидитом. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает связывание основания путем осаждения фосфорамидита в условиях сочетания, где одно и то же основание необязательно осаждается с фосфорамидитом более одного раза, то есть происходит двойное сочетание. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает кэппирование непрореагировавших сайтов. В некоторых случаях кэппирование не является обязательным. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает окисление. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает деблокирование или детритилирование. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает сульфурирование. В некоторых случаях синтез полинуклеотидов включает окисление или сульфурирование. В некоторых случаях между одной или каждой стадией во время реакции синтеза полинуклеотидов подложку промывают, например, с использованием тетразола или ацетонитрила. Временные рамки для любой одной стадии в способе синтеза с помощью фосфорамидитов включают менее чем около 2 мин, 1 мин, 50 сек, 40 сек, 30 сек, 20 сек или 10 сек.

**[00105]** Синтез полинуклеотидов с использованием фосфорамидитного способа включает последующее добавление фосфорамидитного строительного блока (например, фосфорамидита нуклеозида) к растущей полинуклеотидной цепи для образования фосфитной триэфирной связи. Синтез фосфорамидитных полинуклеотидов происходит в направлении от 3' до 5'. Синтез фосфорамидитных полинуклеотидов обеспечивает контролируемое добавление одного нуклеотида к растущей цепи нуклеиновой кислоты за один цикл синтеза. В некоторых случаях каждый цикл синтеза содержит стадию сочетания. Фосфорамидитное сочетание включает образование фосфитной триэфирной связи между активированным фосфорамидитом нуклеозида и нуклеозидом, связанным с подложкой, например, через линкер. В некоторых случаях фосфорамидит нуклеозида подается на активированную подложку. В некоторых случаях фосфорамидит нуклеозида подается на подложку с активатором. В некоторых случаях фосфорамидиты нуклеозида подаются на подложку 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 нуклеозидами, связанными с подложкой. В некоторых случаях добавление фосфорамидита нуклеозида проводят в безводной среде, например, в безводном ацетонитриле. После добавления фосфорамидита нуклеозида подложку необязательно промывают. В некоторых случаях стадию сочетания повторяют один или несколько дополнительных раз, необязательно со стадией промывки между добавками фосфорамидита нуклеозида к подложке. В некоторых случаях способ

синтеза полинуклеотидов, используемый в настоящем документе, включает 1, 2, 3 или более последовательные стадии сочетания. До сочетания, во многих случаях, с нуклеозида, связанного с подложкой, снимается защита путем удаления защитной группы, где защитная группа функционирует для предотвращения полимеризации. Обычной защитной группой является 4,4'-диметокситритил (DMT).

**[00106]** После сочетания способы фосфорамидитного синтеза полинуклеотидов необязательно включают стадию кэппирования. На стадии кэппирования растущий полинуклеотид обрабатывают кэппирующим агентом. Стадия кэппирования применяется для блокирования непрореагировавших, связанных с субстратом 5'-ОН-групп после сочетания от дальнейшей элонгации цепи для предотвращения образования полинуклеотидов с делециями внутреннего основания. Кроме того, фосфорамидиты, активированные 1Н-тетразолом, могут взаимодействовать в незначительной степени с Об положением гуанозина. Без привязки к теории полагают, что при окислении I<sub>2</sub>/водой данный побочный продукт, возможно, посредством миграции Об-N7, может подвергаться депуринации. Апуриновые сайты могут обрываться, отщепляясь в ходе конечного удаления защитных групп с полинуклеотида, таким образом, уменьшая выход полноразмерного продукта. Модификации Об могут быть удалены путем обработки кэппирующим реагентом до окисления I<sub>2</sub>/водой. В некоторых случаях включение стадии кэппирования во время синтеза полинуклеотидов снижает частоту ошибок по сравнению с синтезом без кэппирования. В качестве примера, стадия кэппирования включает обработку связанного с субстратом полинуклеотида смесью уксусного ангидрида и 1-метилимидазола. После стадии кэппирования подложку необязательно промывают.

**[00107]** В некоторых случаях после добавления нуклеозидфосфорамидита и, возможно, после стадии кэппирования и одной или нескольких стадий промывки растущая нуклеиновая кислота, связанная с подложкой, окисляется. Стадия окисления включает окисление фосфитного триэфира в тетраординированный фосфатный триэфир, защищенный предшественник природной межнуклеозидной фосфодиэфирной связи. В некоторых случаях окисление растущего полинуклеотида достигается обработкой йодом и водой, необязательно в присутствии слабого основания (например, пиридина, лутидина, коллидина). Окисление может быть проведено в безводных условиях с использованием, например, трет-бутилгидропероксида или (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил)-оксазиридина (CSO). В некоторых способах стадия кэппирования выполняется после окисления. Вторая стадия кэппирования позволяет высушить субстрат, поскольку остаточная вода от окисления, которая может сохраняться, может ингибировать последующее сочетание. После окисления подложку и растущий полинуклеотид необязательно

промывают. В некоторых случаях стадия окисления заменяется стадией сульфурирования для получения полинуклеотидфосфоритоатов, где после сульфирования могут быть выполнены любые стадии кэппирования. Многие реагенты способны эффективно переносить серу, включая, но не ограничиваясь этим, 3-(диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тион, ДДТТ, 3Н-1,2-бензодитиол-3-он 1,1-диоксид, также известный как реагент Бокажа (Beaucage), и N,N,N'N'-тетраэтилтиурам дисульфид (TETD).

**[00108]** Для того, чтобы последующий цикл включения нуклеозидов произошел посредством сочетания, защищенный 5'-конец связанного с подложкой растущего полинуклеотида удаляется таким образом, что первичная гидроксильная группа может вступать в реакцию с следующим нуклеозид-фосфорамидитом. В некоторых случаях защитной группой является DMT, и деблокирование происходит с трихлоруксусной кислотой в дихлорметане. Проведение детритилирования в течение продолжительного времени или с более сильными, чем рекомендуемые, растворами кислот, может привести к усилению депурикации полинуклеотидов, связанных с твердой подложкой, и, таким образом, снижает выход желаемого полноразмерного продукта. Способы и композиции по изобретению, описанные в настоящем документе, обеспечивают условия контролируемого деблокирования, ограничивающие нежелательные реакции депурикации. В некоторых случаях связанный с подложкой полинуклеотид промывают после деблокирования. В некоторых случаях эффективная промывка после деблокирования способствует получению синтезированных полинуклеотидов с низкой частотой ошибок.

**[00109]** Способы синтеза полинуклеотидов обычно включают повторяющуюся последовательность следующих стадий: нанесение защищенного мономера на активно функционализированную поверхность (например, локус) для связи либо с активированной поверхностью, линкером, либо с мономером, у которого была ранее снята защита; снятие защиты с нанесенного мономера так, что он вступает в реакцию с последующим нанесенным защищенным мономером; и нанесение другого защищенного мономера для связывания. Одна или более промежуточных стадий включают окисление или сульфурование. В некоторых случаях одна или более стадий промывки предшествуют или следуют одной или всем стадиям.

**[00110]** Способы синтеза полинуклеотидов на основе фосфорамидитов, включают ряд химических стадий. В некоторых случаях одна или более стадий способа синтеза включают циклическое использование реагентов, где одна или более стадий способа включают нанесение на подложку реагента, применяемого для стадии. Например, реагенты циклически проходят через последовательность стадий осаждения жидкости и вакуумной сушки. Для субстратов, содержащих трехмерные элементы, такие как лунки, микролунки,

каналы и тому подобное, реагенты необязательно пропускают через один или несколько участков подложки через лунки и/или каналы.

**[00111]** Полинуклеотиды, синтезированные с использованием способов и/или подложек, описанных в настоящем документе, содержат по меньшей мере около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 500 или более оснований в длину. В некоторых случаях по меньшей мере около 1 пмоль, 10 пмоль, 20 пмоль, 30 пмоль, 40 пмоль, 50 пмоль, 60 пмоль, 70 пмоль, 80 пмоль, 90 пмоль, 100 пмоль, 150 пмоль, 200 пмоль, 300 пмоль, 400 пмоль, 400 пмол, 500 пмоль, 600 пмоль, 700 пмоль, 800 пмоль, 900 пмоль, 1 нмоль, 5 нмоль, 10 нмоль, 100 нмоль или более полинуклеотида синтезируется в локусе. Способы синтеза полинуклеотидов на поверхности, представленные в настоящем документе, позволяют синтезировать с высокой скоростью. В качестве примера, синтезируются 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. Нуклеотиды включают адениновые, гуаниновые, тиминные, цитозинные, уридинные строительные блоки или их аналоги/модифицированные варианты. В некоторых случаях полинуклеотидные библиотеки синтезируются параллельно на подложке. Например, подложка, содержащая около или по меньшей мере около 100; 1000; 10000; 100000; 1000000; 2000000; 3000000; 4000000; или 5000000 выделенных локусов, способен поддерживать синтез, по меньшей мере, одного и того же числа различных полинуклеотидов, причем полинуклеотид, кодирующий определенную последовательность, синтезируется на выделенном локусе.

**[00112]** Известны различные подходящие способы получения полинуклеотидных массивов высокой плотности. В служащем примером рабочем процессе обеспечен слой поверхности подложки. В данном примере химический состав поверхности изменен с целью улучшения процесса синтеза полинуклеотидов. Области с низкой поверхностной энергией создаются для отталкивания жидкостей, в то время как области с высокой поверхностной энергией создаются для притяжения жидкостей. Сама поверхность может быть в форме плоской поверхности или содержать изменения в форме, такие как выступы или микролунки, которые увеличивают площадь поверхности. В примере рабочего процесса выбранные молекулы с высокой поверхностной энергией выполняют двойную функцию поддержки химии ДНК, как раскрыто в публикации международной патентной заявки WO/2015/021080, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

**[00113]** *In situ* получение полинуклеотидных массивов происходит на твердой подложке и использует способ удлинения на один нуклеотид, чтобы удлинить несколько олигомеров параллельно. Устройство для осаждения, такое как синтезатор полинуклеотидов,

предназначено для поэтапного высвобождения реагентов таким образом, что многочисленные полинуклеотиды удлиняются параллельно на один остаток за один раз, образуя олигомеры с заранее определенной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях полинуклеотиды отщепляются от поверхности на данной стадии. Отщепление включает отщепление газом, например, аммиаком или метиламином.

**[00114]** *Подложки*

**[00115]** Устройства, используемые в качестве поверхности для синтеза полинуклеотидов, могут быть в виде подложек, которые включают в себя, без ограничения, поверхности однородных массивов, поверхности с паттерном массивов, каналы, шарики, гели и тому подобное. В настоящем документе обеспечиваются подложки, содержащие множество кластеров, где каждый кластер включает в себя множество локусов, которые поддерживают прикрепление и синтез полинуклеотидов. Используемый в настоящем документе термин «локус» относится к дискретной области на структуре, которая обеспечивает поддержку для полинуклеотидов, кодирующих одну предварительно определенную последовательность, для ее удлинения по направлению от поверхности. В некоторых случаях локус находится на двумерной поверхности, например, на по существу плоской поверхности. В некоторых случаях локус находится на трехмерной поверхности, например, в лунке, микролунке, канале или столбике. В некоторых случаях поверхность локуса содержит материал, который активно функционализирован, чтобы присоединить по меньшей мере один нуклеотид для полинуклеотидного синтеза, или, предпочтительно, популяцию идентичных нуклеотидов для синтеза популяции полинуклеотидов. В некоторых случаях полинуклеотид относится к популяции полинуклеотидов, кодирующих одну и ту же последовательность нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях поверхность подложки включает в себя одну или множество поверхностей подложки. Средние частоты ошибок для полинуклеотидов, синтезированных в описанной в настоящем документе библиотеке с использованием обеспеченных систем и способов, часто составляют менее чем 1 на 1000, менее чем около 1 на 2000, менее чем около 1 на 3000 или менее, часто без исправления ошибок.

**[00116]** В настоящем документе обеспечиваются поверхности, которые поддерживают параллельный синтез множества полинуклеотидов, имеющих различные заранее определенные последовательности, в адресуемых местах на общей подложке. В некоторых случаях подложка обеспечивает поддержку для синтеза более чем 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000; 5000; 10000; 20000; 50000; 100000; 200000; 300000; 400000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; 1000000; 1200000; 1400000; 1600000; 1800000; 2000000; 2500000; 3000000; 3500000; 4000000; 4500000; 5000000; 100000000 или

более неидентичных полинуклеотидов. В некоторых случаях поверхности обеспечивают поддержку для синтеза более чем 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000; 5000; 10000; 20000; 50000; 100000; 200000; 300000; 400000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; 1000000; 1200000; 1400000; 1600000; 1800000; 2000000; 2500000; 3000000; 3500000; 4000000; 4500000; 5000000; 100000000 или более полинуклеотидов, кодирующих различные последовательности. В некоторых случаях, по меньшей мере, часть полинуклеотидов имеет идентичную последовательность или сконфигурирована для синтеза с идентичной последовательностью. В некоторых случаях подложка обеспечивает поверхностное окружение для роста полинуклеотидов, имеющих по меньшей мере 80, 90, 100, 120, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 оснований или более.

**[00117]** В настоящем документе обеспечиваются способы синтеза полинуклеотидов на отдельных локусах подложки, где каждый локус поддерживает синтез популяции полинуклеотидов. В некоторых случаях каждый локус поддерживает синтез популяции полинуклеотидов, имеющих последовательность, отличную от популяции полинуклеотидов, выращенной на другом локусе. В некоторых случаях каждая полинуклеотидная последовательность синтезируется с избыточностью в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более в разных локусах внутри одного и того же кластера локусов на поверхности для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях локусы подложки расположены в пределах множества кластеров. В некоторых случаях подложка содержит по меньшей мере 10, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000 или более кластеров. В некоторых случаях подложка содержит более 2000; 5000; 10000; 100000; 200000; 300000; 400000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; 1000000; 1100000; 1200000; 1300000; 1400000; 1500000; 1600000; 1700000; 1800000; 1900000; 2000000; 300000; 400000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; 1000000; 1200000; 1400000; 1600000; 1800000; 2000000; 2500000; 3000000; 3500000; 4000000; 4500000; 5000000; или 10000000 или более отдельных локусов. В некоторых случаях подложка содержит около 10000 различных локусов. Количество локусов в одном кластере варьируется в разных случаях. В некоторых случаях каждый кластер включает в себя 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 150, 200, 300, 400, 500 или более локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает в себя около от 50 до 500 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает в себя около от 100 до 200 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает в себя около от 100 до 150 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает в себя около 109,

121, 130 или 137 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает в себя около 19, 20, 61, 64 или более локусов.

**[00118]** В некоторых случаях число отдельных полинуклеотидов, синтезированных на подложке, зависит от количества отдельных локусов, доступных на подложке. В некоторых случаях плотность локусов внутри кластера подложки составляет по меньшей мере или около 1, 10, 25, 50, 65, 75, 100, 130, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 1000 или более локусов на  $\text{мм}^2$ . В некоторых случаях подложка содержит от 10 до 500, от 25 до 400, от 50 до 500, от 100 до 500, от 150 до 500, от 10 до 250, от 50 до 250, от 10 до 200 или от 50 до 200  $\text{мм}^2$ . В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних локусов в кластере составляет от 10 до 500, от 10 до 200 или от 10 до 100 мкм. В некоторых случаях расстояние между двумя центрами соседних локусов составляет более чем 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних локусов составляет менее чем около 200, 150, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях каждый локус независимо имеет ширину около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мкм. В некоторых случаях каждый локус независимо друг от друга имеет ширину около от 0,5 до 100, от 0,5 до 50, от 10 до 75 или от 0,5 до 50 мкм.

**[00119]** В некоторых случаях плотность кластеров внутри подложки составляет по меньшей мере или около 1 кластер на  $100 \text{ мм}^2$ , 1 кластер на  $10 \text{ мм}^2$ , 1 кластер на  $5 \text{ мм}^2$ , 1 кластер на  $4 \text{ мм}^2$ , 1 кластер на  $3 \text{ мм}^2$ , 1 кластер на  $2 \text{ мм}^2$ , 1 кластер на  $1 \text{ мм}^2$ , 2 кластера на  $1 \text{ мм}^2$ , 3 кластера на  $1 \text{ мм}^2$ , 4 кластера на  $1 \text{ мм}^2$ , 5 кластеров на  $1 \text{ мм}^2$ , 10 кластеров на  $1 \text{ мм}^2$ , 50 кластеров на  $1 \text{ мм}^2$  или более. В некоторых случаях подложка содержит от около 1 кластера на  $10 \text{ мм}^2$  до около 10 кластеров на  $1 \text{ мм}^2$ . В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров составляет по меньшей мере или около 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 или 5000 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров составляет около от 50 до 100, от 50 до 200, от 50 до 300, от 50 до 500 или от 100 до 2000 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух соседних кластеров находится в пределах около от 0,05 до 50, от 0,05 до 10, от 0,05 до 5, от 0,05 до 4, от 0,05 до 3, от 0,05 до 2, от 0,1 до 10, от 0,2 до 10, от 0,3 до 10, от 0,4 до 10, от 0,5 до 10, от 0,5 до 5 или от 0,5 до 2 мм. В некоторых случаях каждый кластер независимо имеет поперечное сечение от около 0,5 до 2, от около 0,5 до 1 или от около 1 до 2 мм. В некоторых случаях каждый кластер независимо имеет поперечное сечение около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 мм. В некоторых случаях каждый кластер независимо имеет внутреннее поперечное сечение около 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,15, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2 мм.

**[00120]** В некоторых случаях подложка имеет размер, приблизительно равный размеру стандартного 96-луночного планшета, например, от около 100 до около 200 мм на от около 50 до около 150 мм. В некоторых случаях подложка имеет диаметр, меньший или равный около 1000, 500, 450, 400, 300, 250, 200, 150, 100 или 50 мм. В некоторых случаях диаметр подложки составляет около от 25 до 1000, от 25 до 800, от 25 до 600, 25 до 500, от 25 до 400, от 25 до 300 или от 25 до 200 мм. В некоторых случаях подложка имеет плоскую площадь поверхности, составляющую по меньшей мере около 100; 200; 500; 1000; 2000; 5000; 10000; 12000; 15000; 20000; 30000; 40000; 50000 мм<sup>2</sup> или более. В некоторых случаях толщина подложки составляет около от 50 до 2000, 50 до 1000, 100 до 1000, 200 до 1000 или от 250 до 1000 мм.

**[00121]** *Поверхностные материалы.*

**[00122]** Подложки, устройства и реакторы, обеспеченные в данном документе, изготовлены из различных материалов, подходящих для способов, композиций и систем, описанных в настоящем документе. В некоторых случаях материалы подложки изготовлены так, что они проявляют низкий уровень связывания с нуклеотидами. В некоторых случаях материалы подложки модифицированы с целью создания различных поверхностей, которые проявляют высокий уровень связывания с нуклеотидами. В некоторых случаях материалы подложки прозрачны для видимого и/или ультрафиолетового света. В некоторых случаях материалы подложки обладают достаточной проводимостью, например, способны образовывать однородные электрические поля по всей или по части подложки. В некоторых случаях проводящие материалы соединены с электрическим заземлением. В некоторых случаях подложка является теплопроводящей или изолирующей. В некоторых случаях материалы являются химически устойчивыми и термостойкими для содействия химическим или биохимическим реакциям, таким как процессы реакции синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях подложка содержит эластичные материалы. В отношении эластичных материалов, материалы могут включать, без ограничения: нейлон, как модифицированный, так и немодифицированный, нитроцеллюлозу, полипропилен и тому подобное. В некоторых случаях подложка содержит жесткие материалы. В отношении твердых материалов, материалы могут включать, без ограничения: стекло; плавкий кремнезем; кремний, пластмассы (например, политетрафторэтилен, полипропилен, полистирол, поликарбонат и их смеси и тому подобное); металлы (например, золото, платина и тому подобное). Подложка, твердая подложка или реакторы могут быть изготовлены из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, целлюлозных полимеров, полиакриламидов, полидиметилсилоксана (PDMS) и стекла. Подложка/твердые подложки или содержащиеся

в них микроструктуры и реакторы могут быть изготовлены из комбинации материалов, перечисленных в настоящем документе, или из любого другого подходящего материала, известного в данной области техники.

**[00123]** *Поверхностная архитектура.*

**[00124]** В настоящем документе обеспечены подложки для способов, композиций и систем, описанных в данном документе, причем подложки имеют поверхностную архитектуру, подходящую для способов, композиций и систем, описанных в данном документе. В некоторых случаях подложка содержит приподнятые и/или пониженные элементы. Одним из преимуществ наличия таких элементов является увеличение площади поверхности для поддержки синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях подложка, имеющая приподнятые и/или пониженные элементы, называется трехмерной подложкой. В некоторых случаях трехмерная подложка содержит один или несколько каналов. В некоторых случаях один или несколько локусов содержат канал. В некоторых случаях каналы доступны для осаждения реагента через устройство для осаждения, такое как синтезатор полинуклеотидов. В некоторых случаях реагенты и/или жидкости собираются в более крупной лунке, находящейся в жидкостном взаимодействии с одним или несколькими каналами. Например, подложка содержит множество каналов, соответствующих множеству локусов в кластере, и множество каналов находятся в жидкостном взаимодействии с одной лункой кластера. В некоторых способах библиотека полинуклеотидов синтезируется во множестве локусов кластера.

**[00125]** В настоящем документе обеспечены подложки для способов, композиций и систем, описанных в данном документе, где подложки сконфигурированы для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях структура сконфигурирована для обеспечения контролируемых потоков и путей массопереноса для синтеза полинуклеотидов на поверхности. В некоторых случаях конфигурация подложки обеспечивает контролируемое и равномерное распределение путей массопереноса, времен химического воздействия и/или эффективности промывки во время синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях конфигурация подложки позволяет повысить эффективность вытеснения, например, путем обеспечения достаточного объема для выращивания полинуклеотида так, чтобы исключенный объем растущего полинуклеотида не занимал более 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% или менее от первоначально доступного объема, который доступен или пригоден для выращивания полинуклеотида. В некоторых случаях трехмерная структура позволяет управлять потоком жидкости для обеспечения быстрого обмена химическими веществами.

**[00126]** В настоящем документе обеспечены подложки для способов, композиций и систем, относящихся к ферментативно опосредованной сборке нуклеиновых кислот и синтезу полинуклеотидов, описанных в данном документе, где подложки содержат структуры, сконфигурированные для проведения ферментативных реакций, описанных в данном документе. В некоторых случаях сегрегация достигается за счет физической структуры. В некоторых случаях сегрегация достигается путем избирательного функционализования поверхности с образованием активных или пассивных областей для полинуклеотидного синтеза. В некоторых случаях избирательное функционализование достигается за счет попеременного изменения 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 и перекрестное загрязнение индивидуальных участков синтеза полинуклеотидов реагентами из соседних элементов. В некоторых случаях устройство, такое как полинуклеотидный синтезатор, используется для осаждения реагентов в различных местах полинуклеотидного синтеза. Подложки, имеющие трехмерные элементы, сконфигурированы таким образом, что позволяют синтезировать большое количество полинуклеотидов (например, более чем около 10000) с низкой частотой ошибок (например, менее чем около 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000; 1:3000; 1:5000 или 1:10000). В некоторых случаях подложка содержит элементы с плотностью около или более чем около 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 или 500 элементов на мм<sup>2</sup>.

**[00127]** Лунка подложки может иметь такую же или другую ширину, высоту и/или объем, что и другая лунка подложки. Канал подложки может иметь такую же или другую ширину, высоту и/или объем, что и другой канал подложки. В некоторых случаях диаметр кластера или диаметр лунки, содержащей кластер, или обоих составляет около от 0,05 до 500, от 05 до 10, от 0,05 до 5, от 0,05 до 4, от 0,05 до 3, от 0,05 до 2, от 0,05 до 1, от 0,05 до 0,5, от 0,05 до 0,1, от 0,1 до 10, от 0,2 до 10, от 0,3 до 10, от 0,4 до 10, от 0,5 до 10, от 0,5 до 5 или от 0,5 до 2 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или лунки, или обоих оставляет менее чем или около 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06 или 0,05 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или лунки или обоих составляет от около 1,0 до около 1,3 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или лунки или обоих составляет около 1,150 мм. В некоторых случаях диаметр кластера или лунки или обоих составляет около 0,08 мм. Диаметр кластера относится к кластерам в двумерной или трехмерной подложке.

**[00128]** В некоторых случаях высота лунки составляет от около 20 до 1000, от 50 до 1000, от 100 до 1000, от 200 до 1000, от 300 до 1000, от 400 до 1000 или от 500 до 1000 мкм. В некоторых случаях высота лунки составляет менее 1000, 900, 800, 700 или 600 мкм.

**[00129]** В некоторых случаях подложка включает в себя множество каналов, соответствующих множеству локусов в кластере, в котором высота или глубина канала составляет от 5 до 500, от 5 до 400, от 5 до 300, от 5 до 200, от 5 до 100, от 5 до 50 или 10 до 50 мкм. В некоторых случаях высота канала составляет менее 100, 80, 60, 40 или 20 мкм.

**[00130]** В некоторых случаях диаметр канала, локуса (например, в по существу плоской подложке) или как канала, так и локуса (например, в трехмерной подложке, где локус соответствует каналу) составляет около от 1 до 1000, от 1 до 500, от 1 до 200, от 1 до 100, от 5 до 100 или от 10 до 100 мкм, например, около 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях диаметр канала, локуса или как канала, так и локуса составляет менее чем около 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 или 10 мкм. В некоторых случаях расстояние между центром двух соседних каналов, локусов или как каналов, так и локусов составляет около от 1 до 500, от 1 до 200, от 1 до 100, от 5 до 200, от 5 до 100, от 5 до 50 или от 5 до 30, например, около 20 мкм.

**[00131]** *Модификации поверхности*

**[00132]** В настоящем документе обеспечиваются способы синтеза полинуклеотидов на поверхности, где поверхность включает различные модификации поверхности. В некоторых случаях данные модификации поверхности используются для химического и/или физического изменения поверхности путем аддитивного или субтрактивного процесса, с тем чтобы изменить одно или несколько химических и/или физических свойств поверхности подложки или выбранное место или участок поверхности подложки. Например, модификации поверхности включают, без ограничения, (1) изменение смачивающих свойств поверхности, (2) функционализацию поверхности, то есть предоставление, модификацию или замену поверхностных функциональных групп, (3) дефункционализацию поверхности, то есть удаление поверхностных функциональных групп, (4) иное изменение химического состава поверхности, например, путем травления, (5) увеличение или уменьшение шероховатости поверхности, (6) нанесение покрытия на поверхность, например, покрытия, которое проявляет смачивающие свойства, которые отличаются от смачивающих свойств поверхности и/или (7) осаждение твердых частиц на поверхности.

**[00133]** В некоторых случаях добавление химического слоя поверх поверхности (называемого промотором адгезии) облегчает структурированное размещение локусов на поверхности подложки. Примеры поверхностей для применения улучшенной адгезии

включают, без ограничения, стекло, кремний, диоксид кремния и нитрид кремния. В некоторых случаях усилитель адгезии представляет собой химическое вещество с высокой поверхностной энергией. В некоторых случаях второй химический слой наносится на поверхность подложки. В некоторых случаях второй химический слой имеет низкую поверхностную энергию. В некоторых случаях поверхностная энергия химического слоя, нанесенного на поверхность, поддерживает локализацию капель на поверхности. В зависимости от выбранного структурного расположения, близость локусов и/или площадь контакта жидкости с локусами изменяются.

**[00134]** В некоторых случаях поверхность подложки или выделенные локусы, на которые осаждают нуклеиновые кислоты или другие фрагменты, например, для синтеза полинуклеотидов, являются гладкими или по существу плоскими (например, двумерными) или имеют неровности, такие как приподнятые или пониженные элементы (например, трехмерные элементы). В некоторых случаях поверхность подложки модифицирована одним или несколькими различными слоями соединений. Такие представляющие интерес модифицирующие слои включают, без ограничения, неорганические и органические слои, такие как металлы, оксиды металлов, полимеры, небольшие органические молекулы и тому подобное.

**[00135]** В некоторых случаях выделенные локусы подложки функционализованы одним или несколькими фрагментами, которые повышают и/или понижают поверхностную энергию. В некоторых случаях фрагмент является химически инертным. В некоторых случаях фрагмент сконфигурирован для содействия желательной химической реакции, например, одного или нескольких процессов в реакции синтеза полинуклеотидных кислот. Поверхностная энергия или гидрофобность поверхности является фактором, определяющим аффинность нуклеотида к закреплению на поверхности. В некоторых случаях способ функционализования подложки включает в себя: (а) обеспечение подложки, имеющей поверхность, которая содержит диоксид кремния; и (б) силанирование поверхности с использованием подходящего агента для силанирования, описанного в настоящем документе или известного в данной области техники, например, органофункциональной молекулы алкоксисилана. Способы и функционализирующие агенты описаны в патенте США № 5474796, который включен в настоящее описание полностью посредством ссылки.

**[00136]** В некоторых случаях поверхность подложки функционализируют путем контакта с дериватирующей композицией, которая содержит смесь силанов, в условиях реакции, эффективных для связывания силанов с поверхностью подложки, обычно посредством реакционноспособных гидрофильных фрагментов, присутствующих на поверхности

подложки. Силанирование обычно охватывает поверхность посредством самосборки с органофункциональными молекулами алкоксисилана. Дополнительно, могут быть использованы разнообразные силоксановые функционализирующие реагенты, как в настоящее время известно в уровне техники, например, для понижения или повышения поверхностной энергии. Органофункциональные алкоксисиланы классифицируются в соответствии с их органическими функциями.

**[00137]** *Компьютерные системы*

**[00138]** Любая из систем, описанных в данном документе, может быть функционально связана с компьютером и может быть автоматизирована через компьютер локально или удаленно. В некоторых случаях способы и системы по изобретению дополнительно содержат 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 устройства осаждения материала, действия дозатора и активации вакуума, находятся в объеме изобретения. Компьютерные системы могут быть запрограммированы для связывания между заданной пользователем последовательностью основания и положением устройства осаждения материала для доставки правильных реагентов в заданные области подложки.

**[00139]** Компьютерная система **300**, представленная на **ФИГ. 3**, может рассматриваться как логический аппарат, который может считывать инструкции с носителя **311** и/или сетевого порта **305**, который может быть необязательно соединен с сервером **309**, содержащим жесткий диск **312**. Система, такая, как показано на **ФИГ. 3**, может включать CPU **301**, дисководы **303**, необязательно устройства для ввода данных, такие как клавиатура **315** и/или мышь **316** и необязательно монитор **307**. Передача данных может быть достигнута посредством указанной среды передачи данных на сервер, расположенный локально или удаленно. Среда передачи информации может включать любые средства 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 **322**, как показано на **ФИГ. 3**.

**[00140]** На **ФИГ. 4** изображена блок-схема, иллюстрирующая архитектуру компьютерной системы **400**, которая может быть использована в сочетании с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения. Как показано на **ФИГ. 4**,

иллюстративная компьютерная система может включать процессор **402** для обработки инструкций. Неограничивающие примеры процессоров включают: процессор Intel<sup>®</sup> Xeon<sup>®</sup>, процессор AMD Opteron<sup>™</sup>, процессор Samsung 32-bit RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0, процессор ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100, процессор ARM Cortex-A8 Apple A4, процессор Marvell PXA 930 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.

**[00141]** Как показано на **ФИГ. 4**, высокоскоростной кэш **404** может быть соединен или встроен в процессор **402** для обеспечения быстродействующего запоминающего устройства для инструкций или данных, которые недавно или часто использовались процессором **402**. Процессор **402** соединен с северным мостом **406** с помощью процессорной шины **408**. Северный мост **406** соединен с запоминающим устройством с произвольной выборкой (RAM) **410** с помощью шины запоминающего устройства **412** и контролирует доступ к RAM **410** с помощью процессора **402**. Северный мост **406** также соединен с южным мостом **414** с помощью шины чипсета **416**. В свою очередь, южный мост **414** соединен с периферийной шиной **418**. 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 **418**. В некоторых альтернативных архитектурах функциональность северного моста может быть встроена в процессор вместо использования отдельного чипа северного моста. В некоторых случаях система **400** может включать плату акселератора **422**, присоединенную к периферийной шине **418**. 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 расширенного набора данных.

**[00142]** Программное обеспечение и данные хранятся на внешнем запоминающем устройстве **424** и могут быть загружены в RAM **410** и/или в кэш **404** для использования процессором. Система **400** включает операционную систему для управления системными ресурсами; неограничивающие примеры операционных систем включают: Linux, Windows<sup>™</sup>, MACOS<sup>™</sup>, BlackBerry OS<sup>™</sup>, iOS<sup>™</sup> 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 данном примере система **400** также включает сетевые интерфейсные карты (NIC) **420** и **421**, 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.

[00143] На **ФИГ. 5** показана блок-схема многопроцессорной вычислительной системы, в которой используется совместное адресное пространство виртуальной памяти в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. Система включает множество процессоров **502a-f**, которые имеют доступ к подсистеме **504** с совместно используемой памятью. Система включает множество алгоритмических процессоров (Memory algorithm processor, MAP) программируемого аппаратного обеспечения **506a-f** в подсистеме **504** памяти. Каждый MAP **506a-f** может содержать память **508a-f** и одну или несколько программируемых пользователем вентильных матриц (Field programmable gate arrays, FPGA) **510a-f**. MAP обеспечивает конфигурируемый функциональный блок и, в частности, алгоритмы или части алгоритмов могут быть обеспечены для FPGA **510a-f** для обработки в тесной координации с соответствующим процессором. Например, MAP могут быть использованы для оценки алгебраических выражений, касающихся модели данных и для выполнения адаптивной реструктуризации данных в иллюстративных вариантах осуществления. В данном 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 **508a-f**, позволяя ей выполнять задачи независимо и асинхронно от соответствующего микропроцессора **502a-f**. В данной конфигурации MAP может направлять результаты напрямую в другой MAP для конвейерной обработки и параллельного выполнения алгоритмов.

[00144] На **Фиг. 6** представлена схема, на которой показана сеть со множеством компьютерных систем **602a** и **602b**, множество мобильных телефонов и карманных компьютеров **602c** и сетевое устройство хранения данных (Network Attached Storage, NAS) **604a** и **604b**. В иллюстративных вариантах осуществления системы **602a**, **602b** и **602c** могут контролировать хранение данных и оптимизировать доступ к данным, хранящимся в сетевом устройстве хранения данных (NAS) **604a** и **604b**. Математическая модель может быть использована для данных и вычисляться с использованием распределенной

параллельной обработки на компьютерных системах **602a** и **602b** и системах **602c** мобильных телефонов и карманных компьютеров. Компьютерные системы **602a** и **602b** и системы **602c** мобильных телефонов и карманных компьютеров могут также обеспечивать параллельную обработку для адаптивной реструктуризации данных, хранящихся в сетевом устройстве хранения данных (NAS) **604a** и **604b**. На **ФИГ. 6** 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 случаях 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.

**[00145]** Любая из систем, описанных в данном документе, могут содержать информацию о последовательности, хранящейся на машиночитаемых носителях, предназначенных для долговременного хранения информации. В некоторых случаях любая из систем, описанных в данном документе, содержит файл ввода для компьютера. В некоторых случаях файл ввода для компьютера содержит информацию о последовательности. В некоторых случаях файл ввода для компьютера содержит инструкции по синтезу множества полинуклеотидных последовательностей. В некоторых случаях инструкции принимаются компьютером. В некоторых случаях инструкции обрабатываются компьютером. В некоторых случаях инструкции передаются на устройство осаждения материала. В некоторых случаях машиночитаемый носитель, предназначенный для долговременного хранения информации, закодирован программой, включающей инструкции, выполняемые операционной системой необязательно сетевого цифрового устройства обработки. В некоторых случаях машиночитаемый носитель данных является материальным компонентом устройства цифровой обработки. В некоторых случаях машиночитаемый носитель может быть необязательно съемным с устройства цифровой обработки. В некоторых случаях машиночитаемый носитель включает, в качестве неограничивающих примеров, CD-ROM, DVD-диски, устройства флэш-памяти, твердотельную память, накопители на магнитных дисках, накопители на магнитных лентах,

накопители на оптических дисках, облачные вычислительные системы и службы и тому подобное. В некоторых случаях программа и инструкции постоянно, по существу постоянно, полупостоянно или нетранзитивно кодируются на носителе.

### ПРИМЕРЫ

**[00146]** Следующие примеры приведены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления изобретения и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Настоящие примеры вместе со способами, описанными в данном документе, в настоящее время представляют предпочтительные варианты осуществления, служат примерами и не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения в нем и другие виды применения, которые охватываются в рамках сущности изобретения, как определено объемом формулы изобретения, будут иметь место для специалистов в данной области техники.

#### **[00147] Пример 1: Функционализация поверхности подложки**

**[00148]** Подложку функционализировали для того, чтобы поддерживать прикрепление и синтез библиотеки полинуклеотидов. Поверхность подложки сначала подвергали мокрой очистке с использованием раствора «пираньи», содержащего 90%  $H_2SO_4$  и 10%  $H_2O_2$ , в течение 20 минут. Подложку промывали в нескольких стаканах с деионизированной водой, выдерживали в течение 5 минут под гибким краном в деионизированной воде и сушили с  $N_2$ . Затем подложку замачивали в  $NH_4OH$  (1:100; 3 мл:300 мл) в течение 5 минут, ополаскивали деионизированной водой с помощью ручного дозаторного пистолета, пропитывали последовательно в трех стаканах деионизированной водой по 1 мин в каждом и затем снова промывали деионизированной водой с помощью ручного дозаторного пистолета. Затем проводили плазменную очистку подложки, подвергая поверхность подложки воздействию  $O_2$ . Прибор SAMCO PC-300 использовали для плазменного травления  $O_2$  при 250 Вт в течение 1 мин в режиме нисходящего потока.

**[00149]** Очищенную поверхность подложки подвергали активному функционализированию раствором, содержащим N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксибутирамид, с использованием системы печи парофазного осаждения YES-1224P со следующими параметрами: от 0,5 до 1 торр, 60 мин, 70 °C, 135 °C испаритель. Поверхность подложки покрывали резистом с помощью установки для нанесения покрытий методом центрифугирования Brewer Science 200X. Фоторезист SPR™ 3612 наносили центрифугированием на подложку при 2500 об/мин в течение 40 сек. Подложку предварительно прокаливали в течение 30 мин при 90 °C на горячей плите Brewer. Подложку подвергали фотолитографии с использованием Karl Suss MA6 установки

совмещения с маской (фотошаблоном). Подложку экспонировали в течение 2,2 с и проявляли в течение 1 мин в MSF 26A. Оставшийся проявитель промывали ручным дозаторным пистолетом и подложку замачивали в воде в течение 5 мин. Подложку прокачивали в течение 30 мин при 100 °С в печи с последующей визуальной проверкой дефектов литографии с помощью Nikon L200. Процесс очистки был использован для удаления остаточного резиста с использованием установки SAMCO PC-300 для плазменного травления O<sub>2</sub> при 250 Вт в течение 1 мин.

**[00150]** Поверхность подложки подвергали пассивному функционализированию 100 мкл раствора перфтороктилтрихлорсилана, смешанного с 10 мкл легкого минерального масла. Подложку помещали в камеру, прокачивали в течение 10 мин, а затем клапан к насосу закрывали и оставляли стоять в течение 10 мин. Камера вентилировалась воздухом. Резист удаляли («отрывали») с подложки, выполняя два погружения в течение 5 минут в 500 мл NMP при 70 °С с ультразвуком при максимальной мощности (9 на системе Crest). Затем подложку замачивали в течение 5 минут в 500 мл изопропанола при комнатной температуре с ультразвуком при максимальной мощности. Подложку погружали в 300 мл этанола 200 proof и продували N<sub>2</sub>. Функционализированная поверхность была активирована для поддержки синтеза полинуклеотидов.

**[00151] Пример 2: Синтез 50-mer последовательности на устройстве для синтеза олигонуклеотидов**

**[00152]** Двумерное устройство для синтеза олигонуклеотидов собирали в проточной кювете, при этом устройство является соединенным с проточной кюветой (Applied Biosystems («ABI394 DNA Synthesizer»)). Двумерное устройство для синтеза олигонуклеотидов, равномерно функционализированное N-(3-TRIEHOXYSILYLPROPYL)-4-HYDROXYBUTYRAMIDE (Gelest), использовали для синтеза иллюстративного олигонуклеотида длиной 50 bp (пар оснований) ("полинуклеотида 50-mer") с использованием описанных здесь способов синтеза.

**[00153]** Последовательность 50-mer представляет собой такую, как описано в SEQ ID NO.:1. 5'AGACAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTTAGACTTCGGCAT##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.

**[00154]** Синтез проводили с использованием стандартной химии синтеза ДНК (связывание, кэппирование, окисление и деблокирование) в соответствии с протоколом, представленным в **таблице 3**, и синтезатора ДНК ABI394.

Таблица 3. Протокол синтеза

<b>Таблица 3</b>		
<b>Общий процесс синтеза ДНК, наименование</b>	<b>Стадия процесса</b>	<b>Время (сек)</b>
<b>ПРОМЫВКА</b> (промывка потоком ацетонитрила)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную кювету	23
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
<b>ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ ДНК</b> (Фосфорамидит + поток активатора)	Промывка манифольда активатора	2
	Активатор в проточную кювету	6
	Активатор + фосфорамидит в проточную кювету	6
	Активатор в проточную кювету	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
	<b>ПРОМЫВКА</b> (Промывка потоком ацетонитрила)	Промывка системы ацетонитрилом
Ацетонитрил в проточную кювету		15
Промывка системы N2		4
Промывка системы ацетонитрилом		4
<b>ДОБАВЛЕНИЕ ОСНОВАНИЯ ДНК</b> (Фосфорамидит + поток активатора)	Промывка манифольда активатора	2
	Активатор в проточную кювету	5
	Активатор + фосфорамидит в проточную кювету	18

<b>Таблица 3</b>		
<b>Общий процесс синтеза ДНК, наименование</b>	<b>Стадия процесса</b>	<b>Время (сек)</b>
	Инкубация в течение 25 сек	25
<b>ПРОМЫВКА</b> (Промывка потоком ацетонитрила)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную кювету	15
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
<b>КЭПИРОВАНИЕ</b> (Кэп А+В, 1:1, поток)	Кэп А+В в проточную кювету	15
<b>ПРОМЫВКА</b> (Промывка потоком ацетонитрила)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную кювету	15
	Промывка системы ацетонитрилом	4
<b>ОКИСЛЕНИЕ</b> (поток окислителя)	Окислитель в проточную кювету	18
<b>ПРОМЫВКА</b> (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
	<b>ДЕБЛОКИРОВАНИЕ</b> (поток деблокирующего агента)	Деблокирующий агент в проточную кювету
<b>ПРОМЫВКА</b> (Промывка потоком ацетонитрила)	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Промывка системы N2	4
	Промывка системы ацетонитрилом	4
	Ацетонитрил в проточную кювету	18

<b>Таблица 3</b>		
<b>Общий процесс синтеза ДНК, наименование</b>	<b>Стадия процесса</b>	<b>Время (сек)</b>
	Промывка системы N2	4,13
	Промывка системы ацетонитрилом	4,13
	Ацетонитрил в проточную кювету	15

[00155] Комбинацию фосфорамидит/активатор доставляли аналогично доставке массы реагентов через проточную кювету. Стадии сушки не выполняли, так как среда оставалась "влажной" с реагентом в течение всего периода времени.

[00156] Ограничитель потока удаляли из синтезатора ДНК ABI394 для обеспечения более высокой скорости потока. Без ограничителя потока показатели скорости потока для амидитов (0,1 М в ACN), активатора (0,25 М бензоилтиотетразола («ВТТ»; 30-3070-xx от фирмы GlenResearch) в ACN) и Ох (0,02 М I2 в 20% пиридине, 10 % воды и 70% THF) составляли около ~ 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), около ~ 200 мкл/сек, и для деблокирующего агента (3%-ный раствор дихлоруксусной кислоты в толуоле), около ~ 300 мкл/сек (по сравнению с ~ 50 мкл/сек для всех реагентов с ограничителем потока). Фиксировали время полного вытеснения окислителя, соответственно регулировали по времени химические потоки и дополнительную промывку ацетонитрилом ACN вводили между различными химическими соединениями. После синтеза полинуклеотидов снимали защиту с чипа в газообразном аммиаке в течение ночи при 75 psi. На поверхность наносили пять капель воды для извлечения полинуклеотидов. Извлеченные полинуклеотиды затем подвергали анализу на BioAnalyzer small RNA chip (данные не показаны).

**[00157] Пример 3: Синтез 100-мер последовательности на устройстве для синтеза олигонуклеотидов**

[00158] Такой же процесс, как описано в примере 2 для синтеза последовательности 50-мер последовательности использовали для синтеза 100-мер олигонуклеотида («100-мер олигонуклеотид»);

5'CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTC  
ATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAACCCCGCAT##TTTTTTTTTTT3',

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-TRIETHOXYSILYLPROPYL)-4-HYDROXYBUTYRAMIDE, и второй функционализирован смесью 5/95 11-ацетоксиундецилтриэтоксисиланом и н-децилтриэтоксисиланом, и полинуклеотиды, снятые с поверхности, анализировали на биоанализаторе BioAnalyzer (данные не показаны).

**[00159]** Все десять образцов из двух чипов дополнительно 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 мМ прямого праймера, 2,5 мкл 10 мМ обратного праймера, 1 мкл полинуклеотида, снятого с поверхности, и до 50 мкл воды) с использованием следующего циклического температурного режима:

98 °C, 30 сек

98 °C, 10 сек; 63 °C, 10 сек; 72 °C, 10 сек; 12 повторных циклов

72 °C, 2 мин

**[00160]** Продукты PCR также анализировали на биоанализаторе BioAnalyzer (данные не показаны), которые показали острые пики в положении 100-мер. Затем PCR-амплифицированные образцы клонировали и подвергали секвенированию по Сенгеру. В **таблице 4** 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. Результаты секвенирования**

Пятно	Коэффициент ошибок	Эффективность цикла
1	1/763 п.н.	99,87%
2	1/824 п.н.	99,88%
3	1/780 п.н.	99,87%
4	1/429 п.н.	99,77%
5	1/1525 п.н.	99,93%
6	1/1615 п.н.	99,94%
7	1/531 п.н.	99,81%
8	1/1769 п.н.	99,94%
9	1/854 п.н.	99,88%
10	1/1451 п.н.	99,93%

**[00161]** Таким образом, высокое качество и однородность синтезированных полинуклеотидов повторялись на двух чипах с различной химией поверхности. Всего 89% последовательностей, соответствующих 233 из 262 секвенированных 100-мер последовательностей, оказались превосходными и не содержали ошибок. В **таблице 5**

приведены обобщенные ключевые характеристики ошибок для последовательностей, полученных из образцов полинуклеотидов из точек от 1 до 10.

**Таблица 5. Характеристики ошибок**

Образец ID/Точка №	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_0055/10
Всего последовательностей	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
Качество секвенирования	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
Олиго качество	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 Подсчет совпадений	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
Мутация ROI	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
ROI Удаление многих оснований	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI Небольшая вставка	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Удаление одного основания ROI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Большое количество удалений	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 Подсчет ошибок	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1
Частота ошибок ROI	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 минус праймер частота ошибок	MP Ошибка: ~ 1 в 763	MP Ошибка: ~ 1 в 824	MP Ошибка: ~ 1 в 780	MP Ошибка: ~ 1 в 429	MP Ошибка: ~ 1 в 1525	MP Ошибка: ~ 1 в 1615	MP Ошибка: ~ 1 из 531	MP Ошибка: ~ 1 в 1769	MP Ошибка: ~ 1 в 854	MP Ошибка: ~ 1 в 1451

**[00162] Пример 4. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот**

**[00163] Реакция опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот**

**[00164]** Подготавливали реакцию опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот. Воду, дНТФ (New England Biolabs), Ampligase буфер (Epicenter), ExoIII (New England Biolabs), Phusion (New England Biolabs), амплигазу (Epicenter) и Fen1 (New England Biolabs) в соответствии с концентрациями в **Таблице 6**, приведенной ниже, объединяли и аликвотировали в 96-луночные планшеты. ДНК и вектор добавляли в концентрациях, указанных в таблице 6. Планшеты закрывали, перемешивали в течение 30 секунд при 1000 об/мин и кратковременно центрифугировали. Планшеты инкубировали при 50 °С с крышкой, нагретой до 105 °С, в течение 30 мин и затем охлаждали до 4 °С. Реакционные смеси разбавляли 1:5 в 40 мкл холодного буфера.

**Таблица 6. Концентрации реакционных смесей**

Реагент	Конечная концентрация
---------	-----------------------

Вектор	4 нМ
Генный фрагмент 1	4 нМ
дНТФ	0,2 мМ
10X Ampligase буфер	1X
ЕхоIII	10 ЕД
Phusion	0.2 ЕД
Ampligase	1 ЕД
FenI	3,2 ЕД
Вода	Оставшаяся вода до 10 мкл

**[00165]** *Анализ PCR in vitro*

**[00166]** После проведения реакции опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот проводили PCR-амплификацию. Реакцию PCR объемом 25 мкл проводили в соответствии с реакционными условиями, приведенными ниже в **таблице 7**, и амплифицировали с использованием циклического температурного режима в соответствии с **таблицей 8**. PCR-продукты анализировали на биоанализаторе BioAnalyzer (Agilent) (**ФИГ. 7**). Детектировали неопределенную фоновую полосу **701**, кольцевой вектор **703** и собранную ДНК, вставленную в вектор **705**.

**Таблица 7. Условия реакции PCR**

Реагент	Объем реакционной смеси (мкл)
Вода	16,5
10X Thermopol буфер	2,5
10 мМ dNTP	0,5
PCR Праймер 1 100 мкМ	0,125
PCR Праймер 2 100 мкМ	0,125
Разбавленный продукт реакции	5
Taq-полимераза	0,25
<b>Общий объем</b>	<b>25</b>

**Таблица 8. Условия циклического температурного режима**

Температура	Время	Количество циклов с
95 °С	30 секунд	1
95 °С	20 секунд	25
55 °С	20 секунд	

68 °C	3 минуты	
68 °C	5 минут	1
4 °C	Неопределенное	

**[00167]** Трансформация

**[00168]** После проведения реакции PCR 2 мкл разбавленных реакционных смесей электропорировали в 20 мкл электрокомпетентных клеток 10G (Lucigen). Клетки извлекали с помощью 600 мкл предварительно подогретой среды для извлечения Lucigen. Образцы серийно разводили 1:2 в среду для извлечения Lucigen и 7 мкл наносили на планшет Lennox + Carb. Планшеты выращивали в течение ночи (около 16 часов) при 37 °C. Эффективность реакции определяли путем подсчета колоний для определения числа колониеобразующих единиц (КОЕ), используя формулу КОЕ: (число колоний\*общий объем реакционной смеси)/(объем, взятый для посева\*коэффициент разведения).

**[00169]** Подсчеты колоний-трансформантов *E. coli* представлены в **таблице 9**. Кратность изменения определяли по числу колоний со вставкой (однократное разведение) по сравнению с числом колоний без вставки.

**Таблица 9. Подсчеты колоний**

Реакция	Число колоний без вставки	Число колоний со вставкой (однократное разведение)	Число колоний со вставкой (10-кратное разведение)	Кратность изменения
50 °C - Eho	19	23		1,2
50 °C 10 ЕД EhoIII	58	929	100	16
65 °C 10 ЕД EhoIII	25	33		1,3

**[00170]** Наблюдалась корреляция между *in vitro* PCR-анализом (**ФИГ. 7**) и числом трансформантов *E. coli* как мерой собранных конструкций (**таблица 10**). В частности, линейризованный вектор был собран с одной вставкой ДНК, содержащей 40 пар гомологичных друг другу оснований. Образование колоний в *E. coli* коррелирует с рециркуляризацией вектора после сборки со вставкой. Размер пика в анализе PCR *in vitro* коррелировал с числом колоний *E. coli* после трансформации. Образцы отрицательного контроля не содержали вставки ДНК и показали низкие уровни фоновых колоний.

**[00171]** **Пример 5. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот с тремя генными фрагментами**

[00172] Реакцию опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично описанному в примере 4. Три фрагмента ДНК были вставлены в вектор. После проведения реакции опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот проводили амплификацию методом PCR аналогично примеру 4. PCR-продукты анализировали на биоанализаторе BioAnalyzer (Agilent) (ФИГ. 8). Детектировали рециркулированный расщепленный вектор 801 и собранную ДНК, вставленную в вектор 803.

**[00173] Пример 6. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот с изменяющимися концентрациями Fen1 и EhoIII**

[00174] Реакцию опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично описанному в примере 4. Были протестированы различные условия, как показано в таблице 10.

**Таблица 10. Реакционные условия**

Образец	Условие реакции
1	Исходный уровень
2	Ampligase отсутствует
3	Phusion отсутствует
4	Fen1 отсутствует
5	2X Fen1 (6,4 ЕД Fen1)
6	0,5X Fen1 (1,7 ЕД Fen1)
7	2X Fen1 (6,4 ЕД Fen1) 2X EhoIII (20 ЕД EhoIII)
8	0,5X Fen1 (1,7 ЕД Fen1) 0,5 X EhoIII (5 ЕД EhoIII)
9	0,25X Fen1 (0,8 ЕД Fen1) 0,25X EhoIII (2,5 ЕД EhoIII)
10	Реакционные условия из <i>in vitro</i> рекомбинационного клонирования

[00175] Число колоний подсчитывали для каждого образца, как видно на ФИГ. 9. Данные показали, что число колоний с титрованными Fen1 и EhoIII было значительно выше исходного уровня и коррелировало с продуктами более высокой степени амплификации в анализе PCR *in vitro*.

[00176] Колонии выделяли, и сборки анализировали с помощью PCR колоний (colony PCR). Реакции проводили на анализаторе фрагментов (электрофорез в капиллярном геле). Правильные сборки определялись по размеру PCR-продукта (данные не показаны).

[00177] Выделенные колонии выращивали в течение ночи и подготавливали для выделения собранной векторной ДНК. Образцы анализировали секвенированием следующего поколения (NGS). Различные концентрации Fen1 и EhoIII давали в результате различные количества правильно собранных конструкций, как показано в таблице 11. Все

фланкирующие последовательности универсального праймера были удалены в образцах, прошедших анализ. В 7 из 10 образцах, которые имели надлежащий размер в анализе PCR колоний (colony PCR), все 7 прошли NGS на гомологичных участках.

**Таблица 11. Данные по колониям**

Реакция	Выбранные колонии	% Правильный размер по PCR колоний	% Пройденный NGS анализ
Исходный уровень - вставка	1	0	0
Исходный уровень + вставка	7	0	0
2X Fen1 (6,4 ЕД Fen1)	10	70	70
2X Fen1 (6,4 ЕД Fen1) 2X EcoIII (20 ЕД EcoIII)	10	0	0
0,5X Fen1 (1,7 ЕД Fen1) 0,5X EcoIII (5 ЕД EcoIII)	10	50	от 30 до 50
0,25X Fen1 (0,8 ЕД Fen1) 0,25X EcoIII (2,5 ЕД EcoIII)	10	20	20

**[00178] Пример 7. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот с различными концентрациями ферментов**

**[00179]** Реакцию опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично описанному в примере 4. Три генных фрагмента были вставлены в вектор. Эксперименты проводились с использованием реакционных условий в соответствии с приведенными ниже в **таблице 12** исходными условиями и с вариаций концентраций Phusion, Ampligase, EcoIII и Fen1. Используемые концентрации Phusion, Ampligase, EcoIII и Fen1 указаны в **таблице 13**.

**Таблица 12. Реакционные условия**

Реагент	Конечная концентрация
Вектор	4 нМ
Генный фрагмент	4 нМ
дНТФ	0,2 мМ
10X Ampligase буфер	1X
EcoIII	1 ЕД
Phusion	0,2 ЕД или 0,1 ЕД
Ampligase	1 ЕД
Fen1	0,32 ЕД
Вода	Оставшаяся вода до 10 мкл

**Таблица 13. Концентрации ферментов**

	Условие реакции
1	0,32 ЕД Fen1 1 ЕД EcoIII 0,2 ЕД Phusion

	1 ЕД Ampligase
2	0,32 ЕД Fen I 1 ЕД ExoIII 0,1 ЕД Phusion 0,5 ЕД Ampligase
3	0,32 ЕД Fen I 1 ЕД ExoIII 0,1 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
4	0,32 ЕД Fen I 1 ЕД ExoIII 0,05 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
5	0,32 ЕД Fen I 1,5 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
6	4,8 ЕД Fen I 1,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
7	0,32 ЕД Fen I 0,5 ЕД ExoIII 0,05 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
8	0,32 ЕД Fen I 1,0 ЕД ExoIII 0,1 ЕД Phusion 0,1 ЕД Ampligase
9	0,32 ЕД Fen I 1,0 ЕД ExoIII 0,1 ЕД Phusion 0,25 ЕД Ampligase
10	0,32 ЕД Fen I 1,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 0,5 ЕД Ampligase
11	0,32 ЕД Fen I 1,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 0,25 ЕД Ampligase
12	0,32 ЕД Fen I 0,5 ЕД ExoIII 0,1 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
13	3,2 ЕД Fen I 1,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
14	0,32 ЕД Fen I 0,5 ЕД ExoIII

	0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
15	0,32 ЕД FenI 1,5 ЕД ExoIII 0,1 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
16	0,32 ЕД FenI 1,5 ЕД ExoIII 0,05 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
17	3,2 ЕД FenI 0,5 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 0,5 ЕД Ampligase
18	3,2 ЕД FenI 1,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 0,5 ЕД Ampligase
19	3,2 ЕД FenI 1,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion Ampligase 0 ЕД
20	4,8 ЕД FenI 0,5 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
21	0,32 ЕД FenI 1,5 ЕД ExoIII 0,5 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
22	3,2 ЕД FenI 0,5 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
23	0,32 ЕД FenI 1,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 0,1 ЕД Ampligase
24	0,32 ЕД FenI 0,5 ЕД ExoIII 0,5 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
25	0,32 ЕД FenI 1,0 ЕД ExoIII 0,5 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
26	3,2 ЕД FenI 1 0,0 ЕД ExoIII 0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
27	3,2 ЕД FenI

	5,0 ЕД EcoIII 0,2 ЕД Phusion 1,0 ЕД Ampligase
--	---

**[00180]** Как показано на **ФИГ. 10**, среднее число колониеобразующих единиц (КОЕ) (серые столбцы) было измерено для каждого из различных соотношений ферментов. Измеряли также процент правильной сборки (черные кружки), как было определено с помощью анализа PCR колоний (сPCR). Представленные данные являются усредненными результатами.

**[00181]** Используя различные соотношения ферментов, были увеличены числа КОЕ и улучшен процент правильной сборки (**ФИГ. 10**). Реакционные условия, включающие 0,32 ЕД Fen1, 1 ЕД EcoIII, 0,2 ЕД Phusion и 1 ЕД Ampligase, приводили к наибольшему увеличению числа КОЕ по сравнению с другими реакционными условиями и проценту правильной сборки более чем 85%.

**[00182] Пример 8. Опосредованная флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотная сборка фрагмента в 1,8 kb**

**[00183]** Реакцию опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично описанному в примере 4. Реакции опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот проводили с использованием концентраций ферментов, равных 1 ЕД EcoIII, 0,2 ЕД Phusion, 1 ЕД Ampligase и 0,32 ЕД Fen1 с вставкой (белые столбики) и без вставки (заштрихованные столбики, третий столбик слева). Реакции опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот были также протестированы с использованием концентраций ферментов, равных 1 ЕД EcoIII, 0,1 ЕД Phusion, 1 ЕД Ampligase и 0,32 ЕД Fen1 с вставкой (черные столбики) и без вставки (заштрихованные столбики, четвертый слева). Затем измеряли (ось y) число колониеобразующих единиц с планшетов с точками. Как показано на **ФИГ. 11**, число КОЕ увеличивалось в реакциях, включающих вставку, по сравнению с реакциями без вставки.

**[00184] Пример 9 Опосредованная флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотная сборка двух фрагментов ДНК**

**[00185]** Реакцию опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот проводили аналогично описанному в примере 4. Были проанализированы различные количества введенной ДНК или линейаризованного вектора в связи с колониеобразующими единицами (КОЕ). Количество протестированной введенной ДНК составляло 2 нМ или 4 нМ линейаризованного вектора. Как показано на **ФИГ. 12**, были собраны два фрагмента ДНК, и наблюдалась положительная корреляция между количеством исходного материала и числом колониеобразующих единиц.

**[00186] Пример 10. Сборка ДНК из нескольких частей в вектор ДНК**

**[00187]** Опосредованную флэп-эндонуклеазой реакцию сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично примеру 4. Эксперименты проводили с использованием реакционных концентраций реагентов, как показано в **таблице 14**. Реакционные смеси подготавливали на льду, и после добавления различных реагентов реакционные смеси инкубировали при 50 °С в течение 30 минут. Реакционные смеси затем разводили 1:5 и трансформировали в *E. coli*.

**Таблица 14. Способ 1 Реакционные концентрации**

Реагент	5 мкл реакционной смеси	Конечная концентрация
дНТФ (10 мМ)	0,1	,2 мМ
10x Ampligase буфер	0,5	1X
ЕхоIII (100 ЕД/мкл)	0,005	0,1 ЕД/мкл
Phusion (2 ЕД/мкл)	0,05	0,02 ЕД/мкл
Ampligase (5 ЕД/мкл)	0,1	0,1 ЕД/мкл
Fen1 (32 ЕД/мкл)	0,005	0,032 ЕД/мкл
Вектор ДНК		20 фмоль
Вставка ДНК		40 фмоль/вставка
Вода *	До 5 мкл	

**[00188]** Затем измеряли число колониеобразующих единиц (КОЕ). Как видно на **ФИГ. 13**, число колониеобразующих единиц (ось у) измеряли для различных протестированных генов (ось х). Исходя из данных, опосредованная флэп-эндонуклеазой реакция сборки нуклеиновых кислот в соответствии с описанными реакционными условиями привела к высоким КОЕ и показателям точности сборки.

**[00189] Пример 11. Сборка ДНК из нескольких частей в вектор ДНК с использованием большого количества ЕхоIII**

**[00190]** Опосредованную флэп-эндонуклеазой реакцию сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично примеру 4 и примеру 10. Концентрация ЕхоIII была увеличена в 16 раз по сравнению с примером 10. Реакционные концентрации показаны в **таблице 15**. Реакционные смеси подготавливали на льду, и после добавления различных реагентов реакционные смеси инкубировали при 65 °С в течение 30 минут. Реакционные смеси затем разводили 1:5 и трансформировали в *E. coli*.

**Таблица 15. Способ 2 Реакционные концентрации**

<b>Реагент</b>	<b>5 мкл реакционной смеси</b>	<b>Конечная концентрация</b>
дНТФ (10 мМ)	0,1	0,2 мМ
10x Ampligase буфер	0,5	1x
ЕхoIII 100 ЕД/мкл	0,08	1,6 ЕД/мкл
Phusion 2 ЕД/мкл	0,05	0,02 ЕД/мкл
Ampligase 5 ЕД/мкл	0,1	0,1 ЕД/мкл
Fen1 32 ЕД/мкл	0,005	0,032 ЕД/мкл
Вектор ДНК		20 фмоль
Вставка ДНК		40 фмоль/вставка
Вода *	До 5 мкл	

[00191] Затем измеряли число колониеобразующих единиц (КОЕ). Как видно на **ФИГ. 14**, число колониеобразующих единиц (ось y) измеряли для различных протестированных генов (ось x) с использованием реакционных концентраций в соответствии со способом 1 (**таблица 14**) и реакционных концентраций в соответствии со способом 2 (**таблица 15**). Результаты из **ФИГ. 14А** показывают более высокие КОЕ и улучшенную точность сборки при использовании способа 2.

[00192] Также было выполнено секвенирование следующего поколения (NGS). Как видно на **ФИГ. 14В**, отсутствие или низкое покрытие (белые столбики), неправильная сборка (пунктирные столбики), проходящие клоны (горизонтальные столбики) и SNP (черные столбики) были измерены после опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот с использованием реакционных концентраций в соответствии со способом 1 (**таблица 14**). и реакционных концентраций в соответствии со способом 2 (**таблица 15**). Результаты NGS показали результаты, аналогичные **ФИГ. 14А** в том, что более высокие КОЕ и улучшенная точность сборки наблюдались с использованием способа 2. На **ФИГ. 14С** видно, что скорость сборки (ось y) сравнивалась с использованием способа 1 и способа 2 (ось x). Показатели точности сборки были улучшены с использованием способа 2 по сравнению со способом 1.

[00193] Пример показывает, что опосредованная флэп-эндонуклеазой реакция сборки нуклеиновых кислот с использованием описанных реакционных условий привела к более высоким числам колониеобразующих единиц и улучшенной точности сборки.

**[00194] Пример 12: Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот с использованием способа мостиковой сборки**

**[00195]** Опосредованную флэп-эндонуклеазой реакцию сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично примеру 4 и примеру 10. Реакционные условия приведены в **таблице 14**. Кроме того, использовали 40 фмоль ДНК-мостика.

**[00196]** Различные образцы включали сборку без мостика (отрицательный контроль), фрагменты, включающие гомологичную последовательность из 40 пар оснований (положительный контроль), двухцепочечный ДНК-мостик, включающий последовательность из 40 пар гомологичных оснований для каждого фрагмента, и двухцепочечный ДНК-мостик, включающий последовательность из 50 пар гомологичных оснований для каждого фрагмента. Подготовленные реакционные смеси трансформировали в *E. coli*. Число правильных сборок и процент правильных сборок затем были определены и рассматриваются в **таблице 16**.

**Таблица 16. Способ мостиковой сборки**

Описание образца	Протестированные клоны	Правильные сборки	% правильных сборок
Отрицательный контроль (без мостика)	12	0	0
Положительный контроль (фрагменты имеют гомологию 40 п.н.)	12	12	100
дцDNA мостик с гомологией 40 п.н. для каждой вставки.	12	12	100
дцDNA мостик с гомологией 50 п.н. для каждой вставки	12	12	100

**[00197]** Как видно из **таблицы 16**, опосредованная флэп-эндонуклеазой реакция сборки нуклеиновых кислот с использованием мостика двухцепочечной ДНК (дцДНК) из 40 пар оснований и 50 пар оснований привела к более чем 90% правильных сборок. Кроме того, как видно на **ФИГ. 15А**, сборка с использованием мостика дцДНК из 40 пар оснований и 50 пар оснований привела к более высоким уровням сборки по сравнению с отрицательным контролем.

**[00198]** Были измерены КОЕ с использованием способа мостиковой сборки. Как видно на **ФИГ. 15В**, число колониеобразующих единиц из сборки с одноцепочечной ДНК (оцДНК) при различном количестве вставки (40 фмоль, 225 фмоль или 500 фмоль) было выше, чем

отрицательный контроль (контроль). В качестве положительного контроля оцДНК амплифицировали с помощью PCR для создания двухцепочечной ДНК (дцДНК) и осуществляли сборку.

**[00199]** Данные указывают на то, что сборка оцДНК путем опосредованной флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотной сборки с использованием мостиковой нуклеиновой кислоты приводит к более высокому проценту правильных сборок и большему числу колониеобразующих единиц.

**[00200] Пример 13: Опосредованная флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотная сборка двенадцати фрагментов**

**[00201]** Опосредованную флэп-эндонуклеазой реакцию сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично примеру 4 и примеру 10. Несколько фрагментов были собраны в вектор, включающий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 фрагментов. Каждый фрагмент ДНК составлял 500 пар оснований. После реакций сборки реакционные смеси трансформировали в *E. coli* и измеряли колониеобразующие единицы. **ФИГ. 16А** графически иллюстрирует число колониеобразующих единиц для сборки 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 фрагментов.

**[00202]** Также было выполнено секвенирование следующего поколения (NGS). Как видно на **ФИГ. 16 В**, отсутствие или низкое покрытие (белые столбики), неправильная сборка (пунктирные полосы), проходящие клоны (горизонтальные полосы), и SNP (черные полосы) были измерены после опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот. Измеряли также проходные показатели, как видно на **ФИГ. 16С**. Данные показывают, что сборка 12 фрагментов приводит к успешному клонированию и высоким проходным показателям.

**[00203] Пример 14: Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот с использованием небольшого количества полимеразы**

**[00204]** Опосредованную флэп-эндонуклеазой реакцию сборки нуклеиновых кислот подготавливали аналогично примеру 4 и примеру 10. Концентрация полимеразы Phusion была снижена в 10 раз по сравнению с примером 10. Реакционные концентрации приведены в **таблице 17**. Реакционные смеси подготавливали на льду, и после добавления различных реагентов реакционные смеси инкубировали при 65 °С в течение от 10 до 30 минут. Реакционные смеси, включающие три фрагмента, клонировали в плазмиду и трансформировали в *E. coli*. Колониеобразующие единицы измеряли после 10-минутной инкубации и 30-минутной инкубации, как видно на **ФИГ. 17**. Число КОЕ увеличилось с использованием уменьшения количества полимеразы Phusion в соответствии с реакционными концентрациями в **таблице 17** по сравнению с реакционными

концентрациями, описанными в примере 11 (Способ 2). Аналогичные КОЕ измеряли после 10-минутной или 30-минутной инкубации. Данные показывают, что эффективность клонирования была улучшена с использованием уменьшенного количества полимеразы.

**Таблица 17. Способ 3 Реакционные условия**

<b>Мастер Микс</b>	<b>5 мкл реакционной смеси</b>	<b>Конечная концентрация</b>
дНТФ	0,1	.4 мМ
10x Ampligase буфер (Epicenter)	0,5	2x
ЕхoIII 100 ЕД/мкл (NEB)	0,08	1,6 ЕД/мкл
Phusion 2 ЕД/МКЛ (NEB)	0,005	0,002 ЕД/мкл
Ampligase 5 ЕД/мкл (Epicenter)	0,1	0,1 ЕД/мкл
Fen1 32 ЕД/мкл (NEB)	0,005	0,032 ЕД/мкл
Вода *	1,695	

**[00205] Пример 15: Опосредованная флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотная сборка неклональных фрагментов**

**[00206]** Определяли эффективность реакции сборки неклональных фрагментов. Реакции подготавливали для сборки 2 фрагментов ДНК с использованием способа 2, как показано в **таблице 15**, и способа 3, как показано в **таблице 17**. Реакционные смеси затем инкубировали при 65 °С в течение от 10 до 30 минут. PCR-продукты сборки анализировали на биоанализаторе BioAnalyzer (**ФИГ. 18 А**) с правильно собранными фрагментами, имевшими 3000 пар оснований. На **ФИГ. 18** показано, что **1801** представляет собой несобранные генные фрагменты и **1803** представляет собой собранные генные фрагменты, полученные с помощью способа 2 (красная линия, **1805**) и способа 3 (синяя линия, **1807**).

**[00207]** Определяли также неклональную сборку. На **ФИГ. 18В** показано, что единицы флуоресценции (ось у) измеряли в течение 10 минут, 20 минут или 30 минут инкубации,

используя реакционные условия способа 2 или способа 3 для гена 1 и гена 2. Было отмечено увеличение единиц флуоресценции при 10-минутной, 20-минутной или 30-минутной инкубации с использованием способа 3 по сравнению со способом 2. Данные показывают улучшенную сборку неклональных фрагментов с использованием способа 3.

**[00208] Пример 16: Улучшение сборки с помощью опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот**

**[00209]** Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот с использованием реакционных условий, аналогичных описанным в примере 14, сравнивалась со сборкой различными компараторами. Было получено двенадцать последовательностей по 500 bp (пар оснований) и была сконструирована серия конструкций для сборки от одного до десяти фрагментов ДНК в вектор. ДНК собирали с гомологичными концами, используя способ опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способ компаратора 1 и способ компаратора 2. Сборка компаратора 1 основана на гомологии на концах конструкции, которая быстро вводится с помощью PCR или посредством синтеза ДНК. Каждый фрагмент в сборке способом компаратора 1 требует отдельной пары праймеров для PCR. Способ компаратора 2 представляет собой способ сборки фрагментов нуклеиновых кислот с различными перекрывающимися участками. Были определены зависимости от варьирования длины гомологичных участков и времен инкубации.

**[00210]** Опосредованную флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотную сборку проводили при 65 °C. При 65 °C большинство вторичных конструкций было исключено, и точность сборки была значительно улучшена (данные не показаны).

**[00211]** Определяли эффективность и точность сборки, используя способ опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способ компаратора 1 и способ компаратора 2. Эффективность определялась по колониеобразующим единицам (КОЕ), и точность определялась секвенированием следующего поколения (NGS).

**[00212]** Эффективность с использованием способа опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способа компаратора 1 и способа компаратора 2 определяли для неклональных фрагментов двухцепочечной ДНК (дцДНК), содержащих адаптерные последовательности. Адаптерные последовательности действовали как универсальные пары праймеров. дцДНК, содержащую гомологичные концы, получали путем амплификации фрагментов дцДНК с праймерами, специфичными для каждой конструкции («отключенные адаптеры», «adaptors-off»). Каждый фрагмент содержал 40 или 25 перекрывающихся пар оснований, гомологичных целевым участкам. От одного до десяти фрагментов дцДНК собирали в линейризованную плазмиду и трансформировали

реакционную смесь в *E. coli*. При сборках с одним фрагментом, способ опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способ компаратора 1 и способ компаратора 2 привели в результате к образованию устойчивых колониеобразующих единиц. Способ опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот привел в результате к повышению числа колониеобразующих единиц, независимо от времени реакции, длины гомологии и числа собранных частей (**ФИГ. 19А**). Способ опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот дал в результате число колониеобразующих единиц, превышающее фон, в случае сборок фрагментов для 6 или более фрагментов (**ФИГ. 19А**). Когда число фрагментов увеличивали, способ опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот был более эффективным с 30-минутной реакцией по сравнению с 10-минутной реакцией (**ФИГ. 19А**). Длина гомологии в 25 bp также была испытана с использованием способа опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способа компаратора 1 и способа компаратора 2, и для всех трех способов сборка двух или более фрагментов была неудачной.

**[00213]** Эффективность для ДНК с встроенными гомологичными последовательностями («включенные адаптеры», «adaptors-on») определяли, используя способ опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, способ компаратора 1 и способ компаратора 2. Было сконструирован участок с 40 парами гомологичных оснований, встроенный на расстоянии ~ 23 bp от конца фрагмента ДНК. Все способы дали КОЕ значительно выше, чем их соответствующие фоны (**ФИГ. 19В**). На **ФИГ. 19В** видно, что опосредованная флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотная сборка одного фрагмента с десятиминутной инкубацией привела в результате к 9-кратному увеличению числа колоний, по сравнению со сборками с использованием способа компаратора 1, и 568-кратному увеличению числа колоний, по сравнению со сборками с использованием компаратора 2. Когда число вставок было увеличено, способ компаратора 1 и способ компаратора 2 не дали колоний выше фоновых уровней с четырьмя фрагментами (**ФИГ. 19В**). Опосредованная флэп-эндонуклеазой нуклеиновокислотная сборка десяти фрагментов в вектор приводила к 642-кратному увеличению по сравнению с фоном (**ФИГ. 19В**). Сборка ДНК с концевыми гомологичными последовательностями и внедренными гомологичными последовательностями приводила к более эффективным сборкам с использованием опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот по сравнению со сборкой с использованием способа компаратора 1 или способа компаратора 2.

**[00214]** Секвенирование следующего поколения проводили с использованием плазмид, выделенных из 8 колоний на реакцию. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка

нуклеиновых кислот и способ компаратора 2 дали в результате степени правильной сборки, равные 84% и 86%, соответственно. Каждый способ показал 8% неправильно собранных образцов. Сборки с использованием способа компаратора 1 дали 10%-ную степень правильной сборки и 25%-ную степень образования SNP, в результате чего общая степень правильной сборки составила 65%. Анализ степени успехов и отказов в зависимости от количества собранных вставок показал, что способ компаратора 1 приводил к потере точности при 10 вставках. Большинство ошибок было сгруппировано в пределах 25 bp соединений фрагментов для сборки способом компаратора 1 и сборки способом компаратора 2 (**ФИГ. 20А-20С**).

**[00215]** Следующее поколение секвенирования использовали для определения наличия адаптера из 23 bp. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот приводила к более высоким степеням правильной сборки, чем способы компаратора 1 и компаратора 2. Во всех реакциях сборки средняя степень правильной сборки составила 72% для реакций опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, по сравнению с 4,5% для сборок способом компаратора 1 и 31% для сборок способом компаратора 2. Адаптерная последовательность никогда не присутствовала в образцах опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот. Напротив, для полноразмерных конструкций, 59% сборок способом компаратора 1 и 23% сборок способом компаратора 2 содержат частичные или полноразмерные адаптерные последовательности. Конструкции, собранные сборкой способом компаратора 1, чаще характеризовались неправильной сборкой, с общей степенью неправильной сборки в 63% по сравнению с 7% для опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот и 6% для способа компаратора 2. Степень неправильной сборки возрастала с увеличением числа фрагментов в сборках способом компаратора 2. Кроме того, сборка способом компаратора 1 имела высокие КОЕ в реакциях отрицательного контроля. Секвенирование 24 образцов отрицательного контроля способа компаратора 1 (вектор без вставок) показало, что каждая конструкция была вектором, рекомбинированным с самим собой в различных участках остова. См. **ФИГ. 20С** и **ФИГ. 21В**. **ФИГ. 20С** графически показывает низкое покрытие (белые столбики), неправильную сборку (черные столбики), SNP в гене (горизонтальные заштрихованные столбики), правильную сборку (вертикальные заштрихованные столбики) и универсальный (уни) хвост (клетчатые столбики). **Таблица 18** показывает данные из **ФИГ. 20С**. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот приводила к более эффективной и точной сборке по сравнению с другими способами сборки. **ФИГ. 21В** графически показывает низкое покрытие (белые столбики), неправильную сборку (черные столбики), SNP в гене (горизонтальные заштрихованные столбики), правильную сборку

(вертикальные заштрихованные столбики) и универсальный (уни) хвост (клетчатые столбики).

**Таблица 18. Данные секвенирования**

	Компаратор 1		FLAP Сборка		Компаратор 2	
	Адаптер выключен	Адаптер включен	Адаптер выключен	Адаптер включен	Адаптер выключен	Адаптер включен
<b>Низкое покрытие</b>	Нет данных	9,09%	3,57%	11,25%	4,17%	34,38%
<b>Неправильная сборка</b>	45,45%	63,64%	23,21%	7,5%	6,25%	6,25%
<b>SNP в гене</b>	13,64%	Нет данных	5,36%	8,75%	4,17%	6,25%
<b>Идеально</b>	40,91%	4,55%	67,86%	75,20%	85,42%	31,25%
<b>Уни хвост (Uni Tail)</b>	Нет данных	21,59%	Нет данных	Нет данных	Нет данных	21,88%

**[00216] Пример 17: Улучшенная гибкость при опосредованной флэп-эндонуклеазой сборке нуклеиновых кислот**

**[00217] Бесшовная *in vitro* сборка**

**[00218]** Сборку фрагментов ДНК определяли с использованием опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот. Опосредованную флэп-эндонуклеазой реакцию сборки нуклеиновых кислот с использованием реакционных условий, аналогичных описанным в примере 14, использовали для сборки 2, 3, и 4 линейных дцДНК фрагментов вместе. В реакциях, включающих ферментативный коктейль опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, были обнаружены невстроенный исходный материал, частичные и полноразмерные конструкции (ФИГ. 21А, дорожки 1-3, 7-9). В отсутствие ферментативного коктейля опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, после инкубации при температуре 65 °С в течение 30 минут, имелся исходный материал, но не полностью собранные конструкции. С целью обогащения полноразмерными конструкциями реакционные смеси амплифицировали с помощью PCR с использованием концевых участков праймеров, специфичных к полноразмерным конструкциям. В отсутствие ферментативного коктейля опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот, после PCR-амплификации не наблюдали полноразмерных конструкций (ФИГ. 21А, дорожки 4-6). Были замечены продукты подходящей длины, соответствующие полноразмерным конструкциям (ФИГ. 21А, дорожки 10-12). Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот давала в результате правильно собранные фрагменты *in vitro*.

**[00219]** Комбинаторная сборка *One Pot*

**[00220]** Определяли специфичность опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот. Использовали девять линейных фрагментов ДНК, содержащих одинаковые хвосты универсальных праймеров. Были сконструированы сайты гомологии из сорока пар оснований, предназначенные для направленной сборки трех различных конструкции из 3-х частей в один и тот же вектор. Были определены индивидуальные эффективности клонирования для каждой конструкции с тем, чтобы провести скрининг на токсичность и установить исходный уровень для сборки. Все девять фрагментов ДНК и вектор назначения затем использовали в одной реакции *in vitro* сборки. После клонирования реакционной смеси в *E. coli*, 192 колонии были выбраны для миниприготовления с последующим анализом NGS. На **ФИГ. 21А, 21С и 21D** показано, что ожидаемые медианные распределения, основанные на клонировании отдельных конструкций, составляли  $31\% \pm 3\%$  для каждой конструкции.

**[00221]** На **ФИГ. 21С** показано, что средний КОЕ был определен для сборок, включающих фрагменты 1-3 (квадраты), фрагменты 7-9 (треугольники), фрагменты 10-12 (круги) и неправильную сборку (крест). После комбинаторной сборки разброс увеличился до  $\pm 5\%$  (**ФИГ. 21С**). 96,5% протестированных конструкций содержали правильно собранные конструкции (**ФИГ. 21D**). Неудачные сборки состояли из полноразмерных генов фрагментов 7-8, фрагментов 7-12, фрагментов 9-12. Опосредованная флэп-эндонуклеазой сборка нуклеиновых кислот приводила в результате к специфичной, направленной сборке.

**[00222]** Пример 18. Клонирование популяций амплифицированных олигонуклеотидов

**[00223]** Множественные фрагменты были собраны в гены. Клонирование популяций амплифицированных олигонуклеотидов проводили аналогично примеру 17. PCR с перекрывающимися праймерами выполняли для получения двухцепочечных фрагментов ДНК (дцДНК) более чем 200 пар оснований для сборки в вектор. Реакции проводили при 55 °С в течение 30 минут и подготавливали в соответствии со способом опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот (способ 4), как показано в **таблице 19**.

**Таблица 19. Реакционные условия (способ 4)**

Мастер Микс	50 мкл реакционной смеси	Конечная концентрация (для 2x ММ)
ЕхоIII 100 ЕД/мкл	0,05	0,2 ЕД/мкл
Phusion 2 ЕД/мкл	0,05	0,004 ЕД/мкл
Fen1 32 ЕД/мкл	0,05	0,064 ЕД/мкл
дНТФ	1	.4 мМ

Ampligase 5 ЕД/мкл	1	0,2 ЕД/мкл
10x Ampligase буфер	5	2x
Вода *		

**[00224]** Секвенирование следующего поколения (NGS) проводили на популяции амплифицированных олигонуклеотидов до сборки (**ФИГ. 22А**) и после опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот (**ФИГ. 22В**). **ФИГ. 22А-22В** показывают, что после опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот не было выпадения последовательностей и что образцы были собраны без внесения значительного смещения образца по сравнению с популяцией амплифицированных олигонуклеотидов перед сборкой.

**[00225] Пример 19. Мультиплексная генная сборка**

**[00226]** Мультиплексную генную сборку осуществляли с использованием способа опосредованной флэп-эндонуклеазой сборки нуклеиновых кислот. Несколько последовательностей были собраны в 1 лунку. Последовательности содержали две части двухцепочечной ДНК (дцДНК), которые были получены в результате PCR с перекрывающимися праймерами. Реакции подготавливали в соответствии со способом 4, как описано в **таблице 19**, и проводили при 55 °С в течение 30 минут. Образцы были собраны и затем клонированы в векторе. Были собраны три популяции: популяция 11, популяция 927 и популяция 942. Каждая группа состояла из 96 отдельных клонов, которые подвергали секвенированию по Сэнгеру для определения того, какой ген присутствовал. Качество исходного материала ДНК определяли путем измерения идеальных последовательностей, последовательностей с SNPS, усеченного материала или последовательностей с блочными делециями. Как видно на **ФИГ. 23**, точность сборки была идеальной (без химерных генов), и однородность/распределение были хорошими.

**[00227]** Несмотря на то, что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в данном документе, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в данной области техники ясно, что многочисленные вариации, изменения и замены возможны без отступления от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в данном документе, могут быть использованы при практическом применении изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет

объем изобретения и что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данной формулы изобретения и ее эквивалентов.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
  - (a) обеспечение множества полинуклеотидов, где каждый из полинуклеотидов не содержит концевую область последовательности, гомологичную другому полинуклеотиду из множества полинуклеотидов; и
  - (b) смешивание множества полинуклеотидов с экзонуклеазой, эндонуклеазой, полимеразой и лигазой, где множество полинуклеотидов отжигаются в заранее определенном порядке на основании комплементарной последовательности между смежными полинуклеотидами.
2. Способ по п. 1, в котором экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III.
3. Способ по п. 1, в котором эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу.
4. Способ по п. 3, в котором флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу I, экзонуклеазу I, XPG, DNA2 или Gen1.
5. Способ по п. 1, в котором полимеразы включает 5'-3' полимеразную активность.
6. Способ по п. 1, в котором полимеразы представляет собой ДНК-полимеразу.
7. Способ по п. 1, в котором лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот.
8. Способ по п. 4, в котором концентрация флэп-эндонуклеазы I находится в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД.
9. Способ по п. 2, в котором концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД.
10. Способ по п. 5, в котором концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД.
11. Способ по п. 7, в котором концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД.
12. Способ по п. 7, в котором концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД.
13. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
  - (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты;
  - (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты;
  - (c) обеспечение третьей двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, первую последовательность, гомологичную первой двухцепочечной нуклеиновой кислоте, вторую последовательность, гомологичную второй двухцепочечной нуклеиновой кислоте, и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность, где первая двухцепочечная нуклеиновая кислота, вторая

двухцепочечная нуклеиновая кислота и третья двухцепочечная нуклеиновая кислота содержат негомологичные последовательности в концевых областях;  
и

- (d) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты и третьей двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, эндонуклеазу, полимеразу и лигазу.
14. Способ по п. 13, в котором экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III.
  15. Способ по п. 13, в котором эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу.
  16. Способ по п. 15, в котором флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1.
  17. Способ по п. 13, в котором полимераза включает 5'-3'-полимеразную активность.
  18. Способ по п. 13, в котором полимераза представляет собой ДНК-полимеразу.
  19. Способ по п. 13, в котором лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот.
  20. Способ по п. 13, в котором гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований.
  21. Способ по п. 16, в котором концентрация обеспечиваемой флэп-эндонуклеазы 1 составляет от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД.
  22. 16, Способ по п.16, в котором концентрация обеспечиваемой флэп-эндонуклеазы 1 составляет менее чем около 5,0 ЕД.
  23. Способ по п. 14, в котором концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД.
  24. Способ по п. 17, в котором концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД.
  25. Способ по п. 19, в котором концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД.
  26. 19. Способ по п.19, в котором концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД.
  27. Способ по п. 13, в котором первая двухцепочечная нуклеиновая кислота, вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота или третья двухцепочечная нуклеиновая кислота, или любая их комбинация представляет собой линейный фрагмент.
  28. Способ по п. 13, в котором продукт, следующий за стадией (d), представляет собой линейный фрагмент.

29. Способ по п. 13, в котором продукт, следующий за стадией (d), представляет собой кольцевой фрагмент.
30. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
- (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность;
  - (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и
  - (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, эндонуклеазу, полимеразу и лигазу.
31. Способ по п. 30, в котором экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III.
32. Способ по п. 30, в котором эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу.
33. Способ по п. 32, в котором флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1.
34. Способ по п. 30, в котором полимеразу включает 5'-3'-полимеразную активность.
35. Способ по п. 30, в котором полимеразу представляет собой ДНК-полимеразу.
36. Способ по п. 30, в котором лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот.
37. Способ по п. 30, в котором гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований.
38. Способ по п. 33, в котором концентрация обеспечиваемой флэп-эндонуклеазы 1 составляет от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД.
39. Способ по п. 33, в котором концентрация обеспечиваемой флэп-эндонуклеазы 1 составляет менее чем около 5,0 ЕД.
40. Способ по п. 31, в котором концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД.
41. Способ по п. 34, в котором концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 2 ЕД.

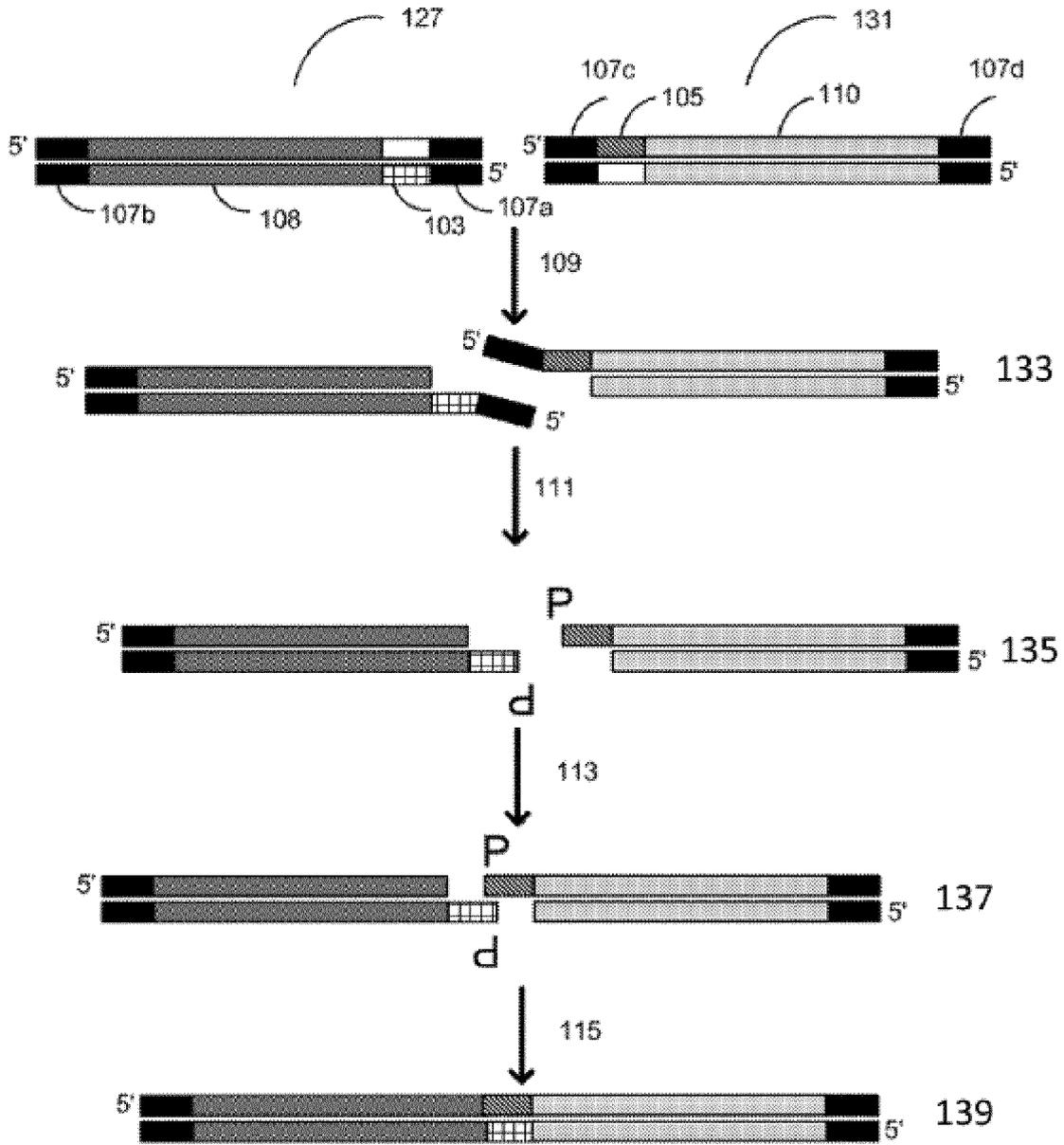
42. Способ по п. 34, в котором концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 ЕД до около 0,2 ЕД.
43. Способ по п. 36, в котором концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД.
44. Способ по п. 36, в котором концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД.
45. Способ по п. 30, в котором первая двухцепочечная нуклеиновая кислота или вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота или любая их комбинация представляет собой линейный фрагмент.
46. Способ по п.30, в котором продукт, следующий за стадией (с), представляет собой линейный фрагмент.
47. Способ по п. 30, в котором продукт, следующий за стадией (с), представляет собой кольцевой фрагмент.
48. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
  - (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность;
  - (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и
  - (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей экзонуклеазу, эндонуклеазу, полимеразу и лигазу при температуре от около 30 °С до около 60 °С.
49. Способ по п. 48, в котором экзонуклеаза представляет собой экзонуклеазу III.
50. Способ по п. 48, в котором эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу.
51. Способ по п. 50, в котором флэп-эндонуклеаза представляет собой флэп-эндонуклеазу 1, экзонуклеазу 1, XPG, Dna2 или GEN1.
52. Способ по п. 48, в котором полимеразы включает 5'-3'-полимеразную активность.
53. Способ по п. 48, в котором полимеразы представляет собой ДНК-полимеразу.
54. Способ по п. 48, в котором лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот.
55. Способ по п. 48, в котором гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность

второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований.

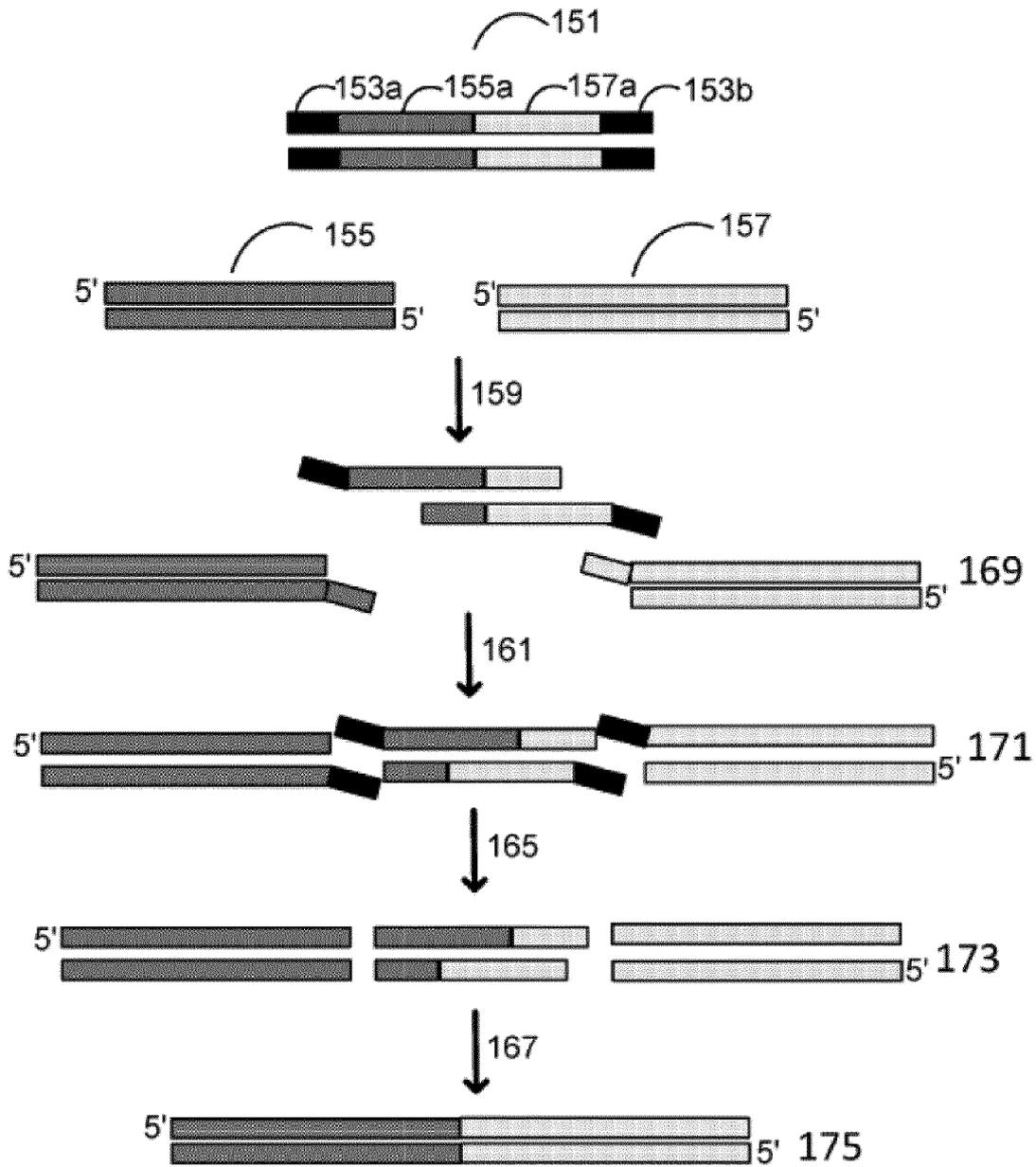
56. Способ по п. 51, в котором концентрация флэп-эндонуклеазы I находится в диапазоне от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД.
57. Способ по п. 49, в котором концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД.
58. Способ по п. 52, в котором концентрация полимеразы находится в диапазоне от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД.
59. Способ по п. 54, в котором концентрация лигазы составляет до около 2,0 ЕД.
60. Способ по п. 54, в котором концентрация лигазы находится в диапазоне от около 4,0 ЕД до около 8,0 ЕД.
61. Способ по п. 48, в котором первая двухцепочечная нуклеиновая кислота или вторая двухцепочечная нуклеиновая кислота или любая их комбинация представляет собой линейный фрагмент.
62. Способ по п. 48, в котором продукт, следующий за стадией (с), представляет собой линейный фрагмент.
63. Способ по п. 48, в котором продукт, следующий за стадией (с), представляет собой кольцевой фрагмент.
64. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
  - (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующий адаптер, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность;
  - (б) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующий адаптер, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и
  - (с) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей эндонуклеазу, где эндонуклеаза приводит к появлению 5'-выступа; полимеразу; и лигазу.
65. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
  - (а) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, включающей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность,

- гомологичную последовательность, вставочную последовательность, и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность;
- (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и
- (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей от около 0,32 ЕД до около 4,8 ЕД эндонуклеазы, от около 0,01 ЕД до около 2 ЕД полимеразы и до около 2,0 ЕД лигазы.
66. Способ по п. 65, в котором реакционная смесь дополнительно содержит от около 0,5 ЕД до около 1,0 ЕД экзонуклеазы.
67. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
- (a) обеспечение первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность;
- (b) обеспечение второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащей в направлении от 5' к 3': 5'-фланкирующую адаптерную последовательность, гомологичную последовательность, вставочную последовательность и 3'-фланкирующую адаптерную последовательность; и
- (c) смешивание первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты и второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты с реакционной смесью, содержащей по меньшей мере один фермент, обладающий 3'- или 5'-экзонуклеазной активностью, полимеразу и лигазу, где по меньшей мере один фермент, обладающий 3'- или 5'-экзонуклеазной активностью, удаляет 5' фланкирующую адаптерную последовательность или 3'-фланкирующую адаптерную последовательность.
68. Способ по п. 67, в котором по меньшей мере один фермент, обладающий 3'- или 5'-экзонуклеазной активностью, представляет собой экзонуклеазу III.
69. Способ по п. 67, в котором полимеразы обладает 5'-3'-полимеразной активностью.
70. Способ по п. 67, в котором полимеразы представляет собой ДНК-полимеразу.
71. Способ по п. 67, в котором лигаза катализирует соединение по меньшей мере двух нуклеиновых кислот.

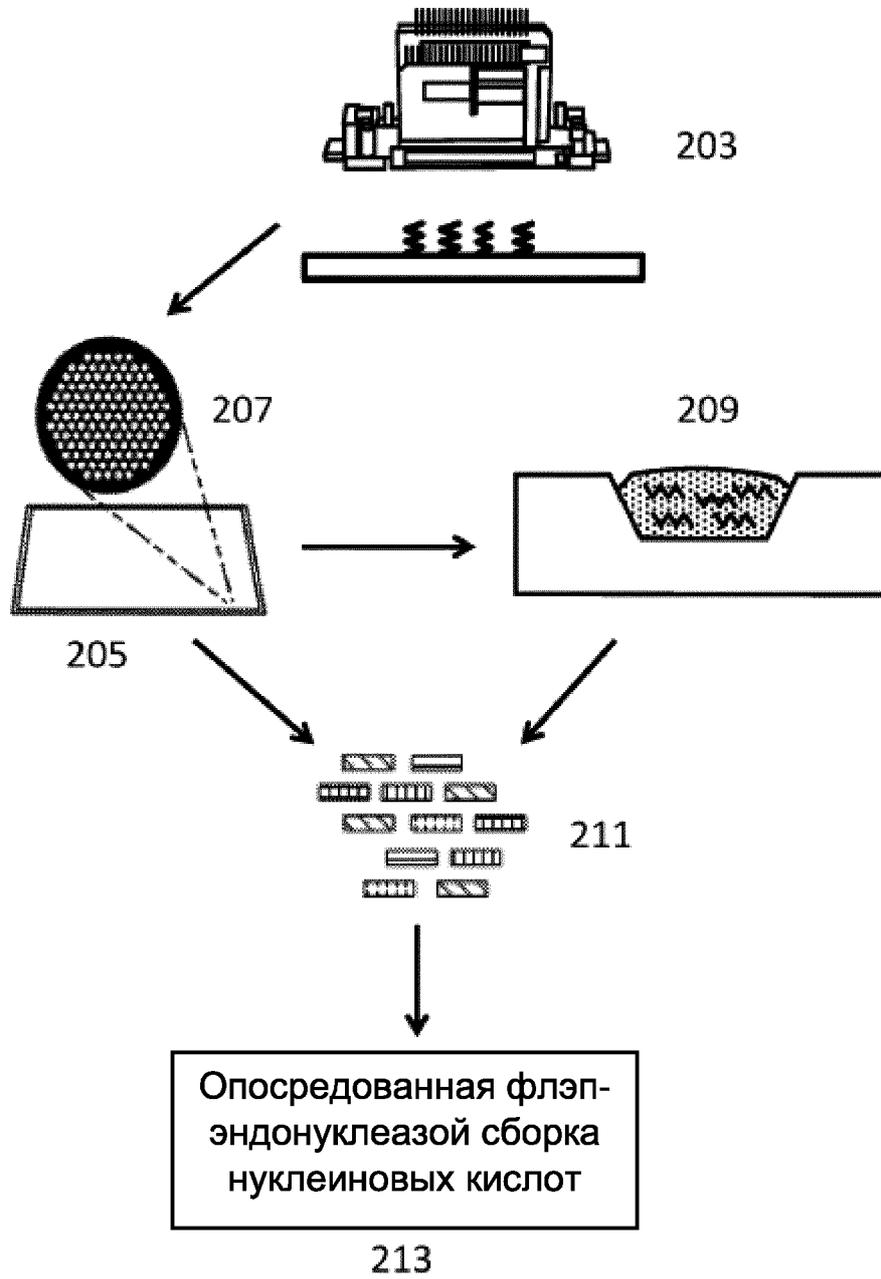
72. Способ по п. 67, в котором гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет около 40 пар оснований.
73. Способ по п. 67, в котором гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 10 до около 100 пар оснований.
74. Способ по п. 67, в котором гомологичная последовательность первой двухцепочечной нуклеиновой кислоты или гомологичная последовательность второй двухцепочечной нуклеиновой кислоты составляет от около 20 до около 80 пар оснований.
75. Способ по п. 67, в котором концентрация экзонуклеазы III находится в диапазоне от около 0,1 ЕД до около 10 ЕД.
76. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
- (а) обеспечение по меньшей мере 10 различных фрагментов, причем каждый из по меньшей мере 10 различных фрагментов не содержит концевую область последовательности, гомологичную другому фрагменту из по меньшей мере 10 различных фрагментов; и
  - (б) смешивание по меньшей мере 10 различных фрагментов с множеством ферментов, где множество ферментов выбрано из эндонуклеазы, экзонуклеазы, полимеразы и лигазы, с образованием нуклеиновой кислоты.
77. Способ сборки нуклеиновых кислот, включающий:
- (а) обеспечение множества полинуклеотидов, где каждый из полинуклеотидов не содержит концевую область последовательности, гомологичную другому полинуклеотиду из множества полинуклеотидов; и
  - (б) смешивание множества полинуклеотидов с 3'-5'-эксонуклеазой, термостабильной эндонуклеазой, высокоточной полимеразой и термостабильной лигазой, где множество полинуклеотидов отжигаются в последовательном заранее определенном порядке на основании комплементарной последовательности между смежными полинуклеотидами.



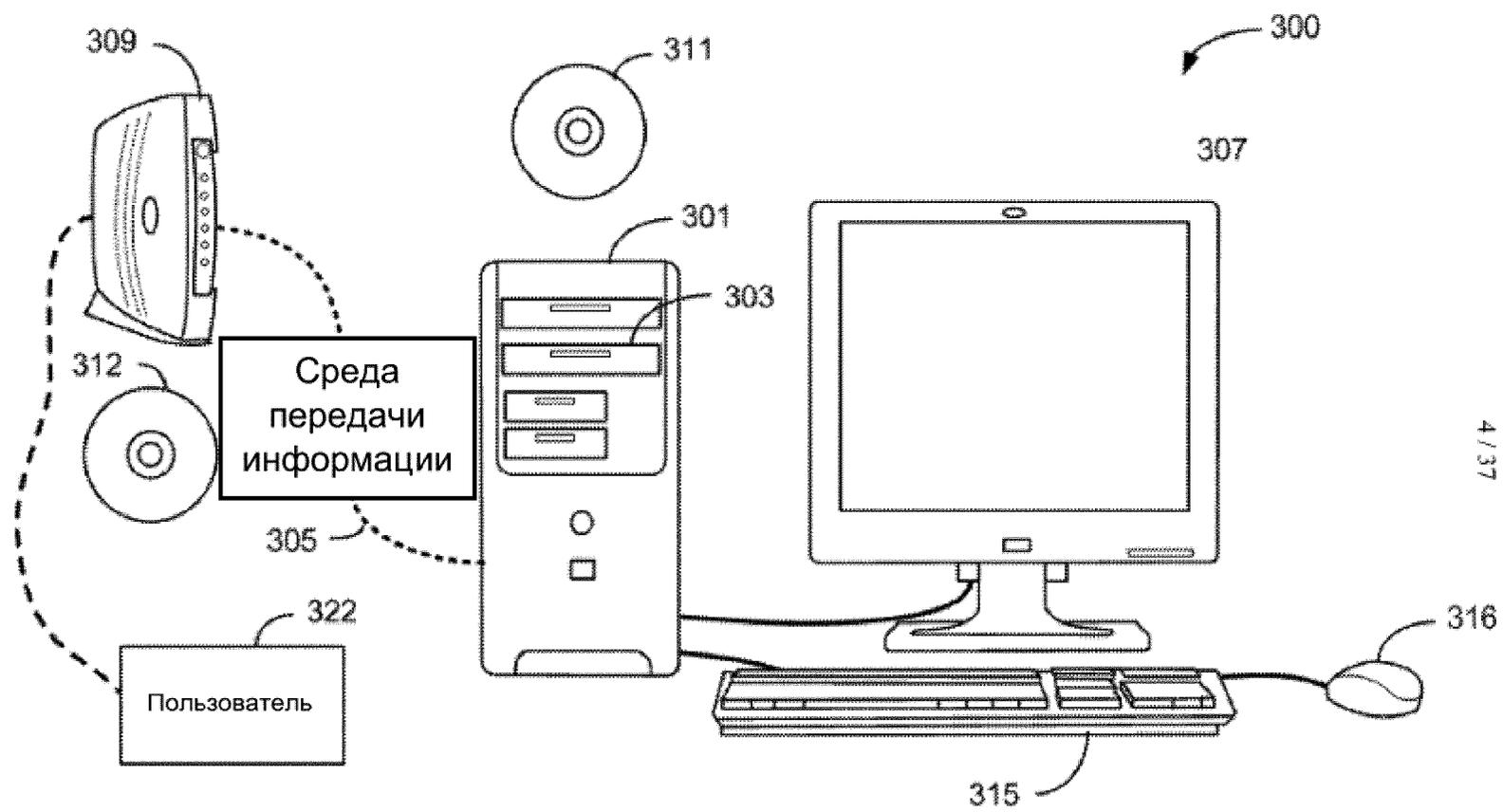
ФИГ. 1А



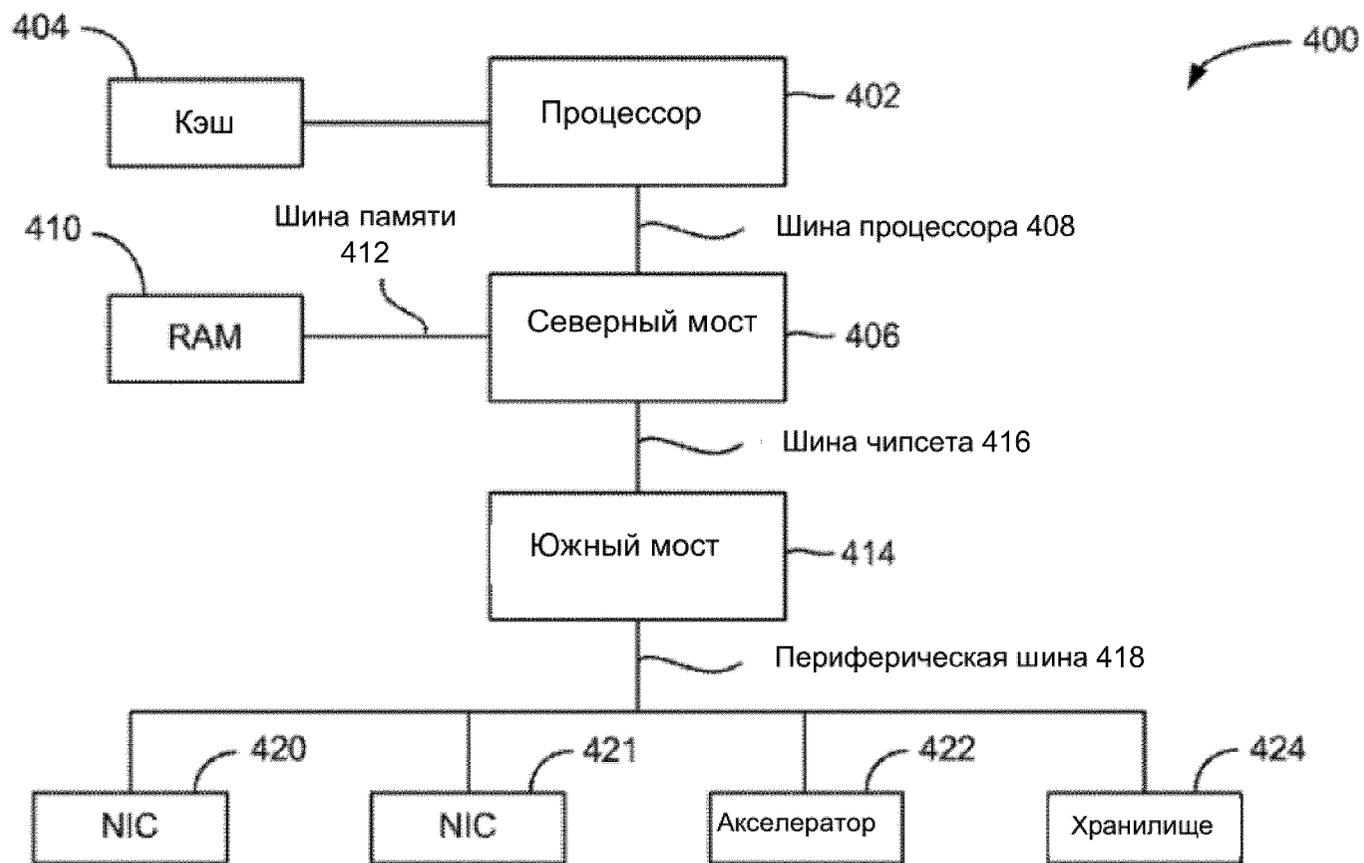
ФИГ. 1В



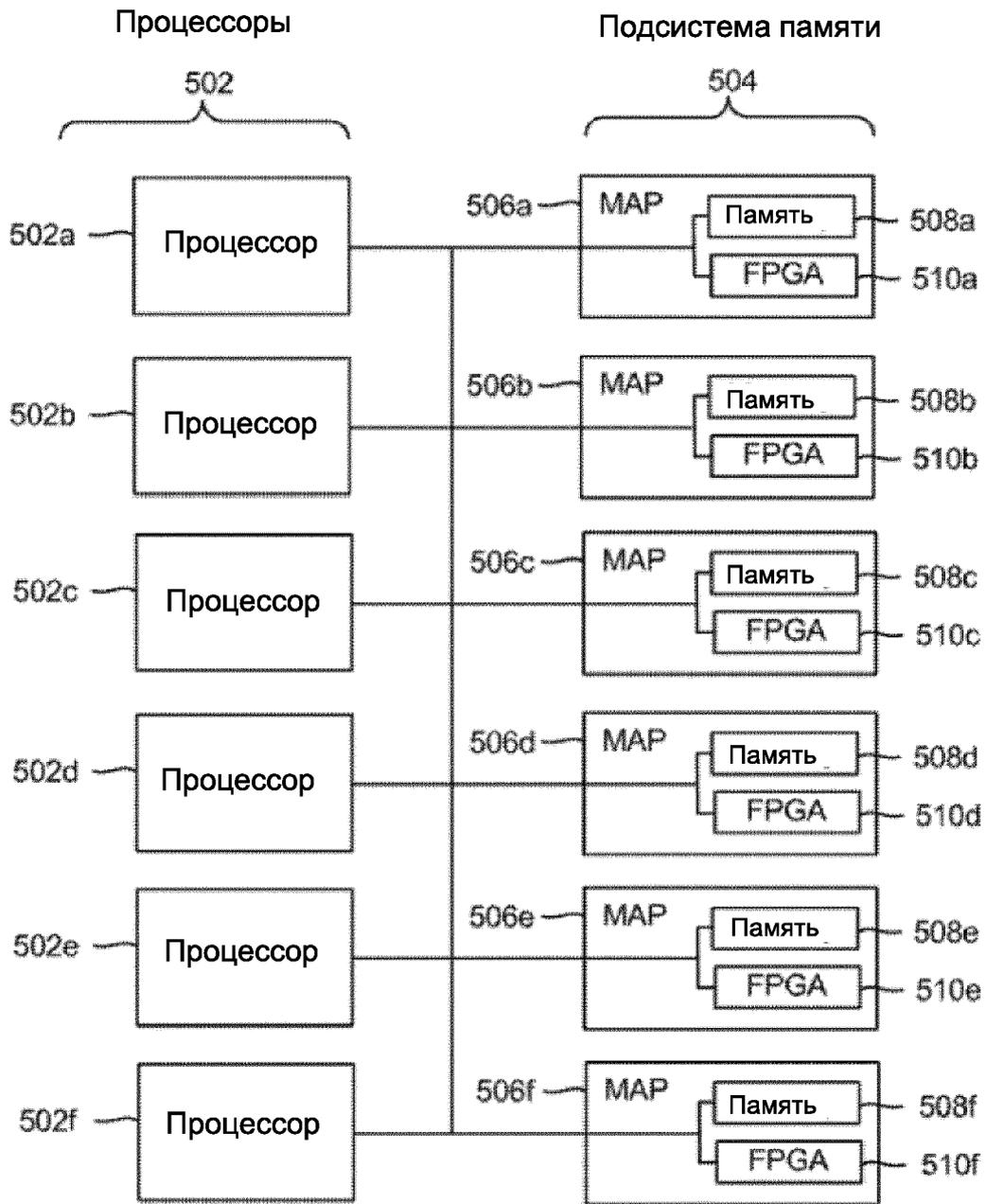
ФИГ. 2



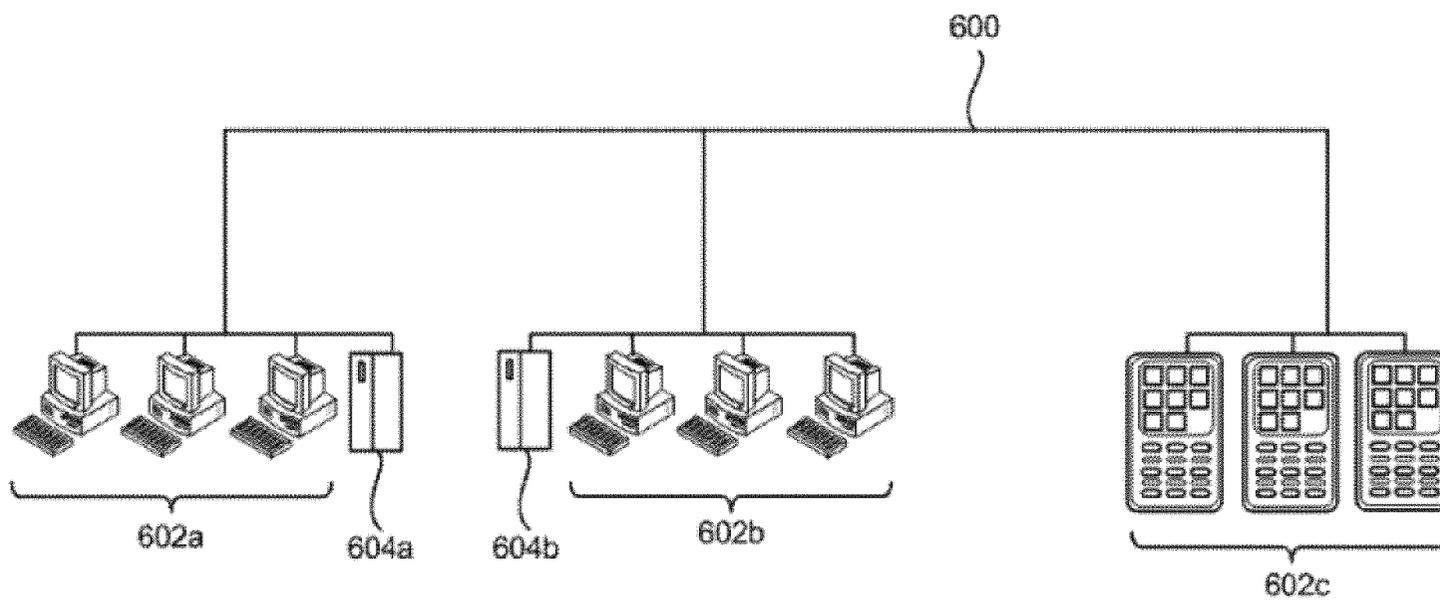
ФИГ. 3



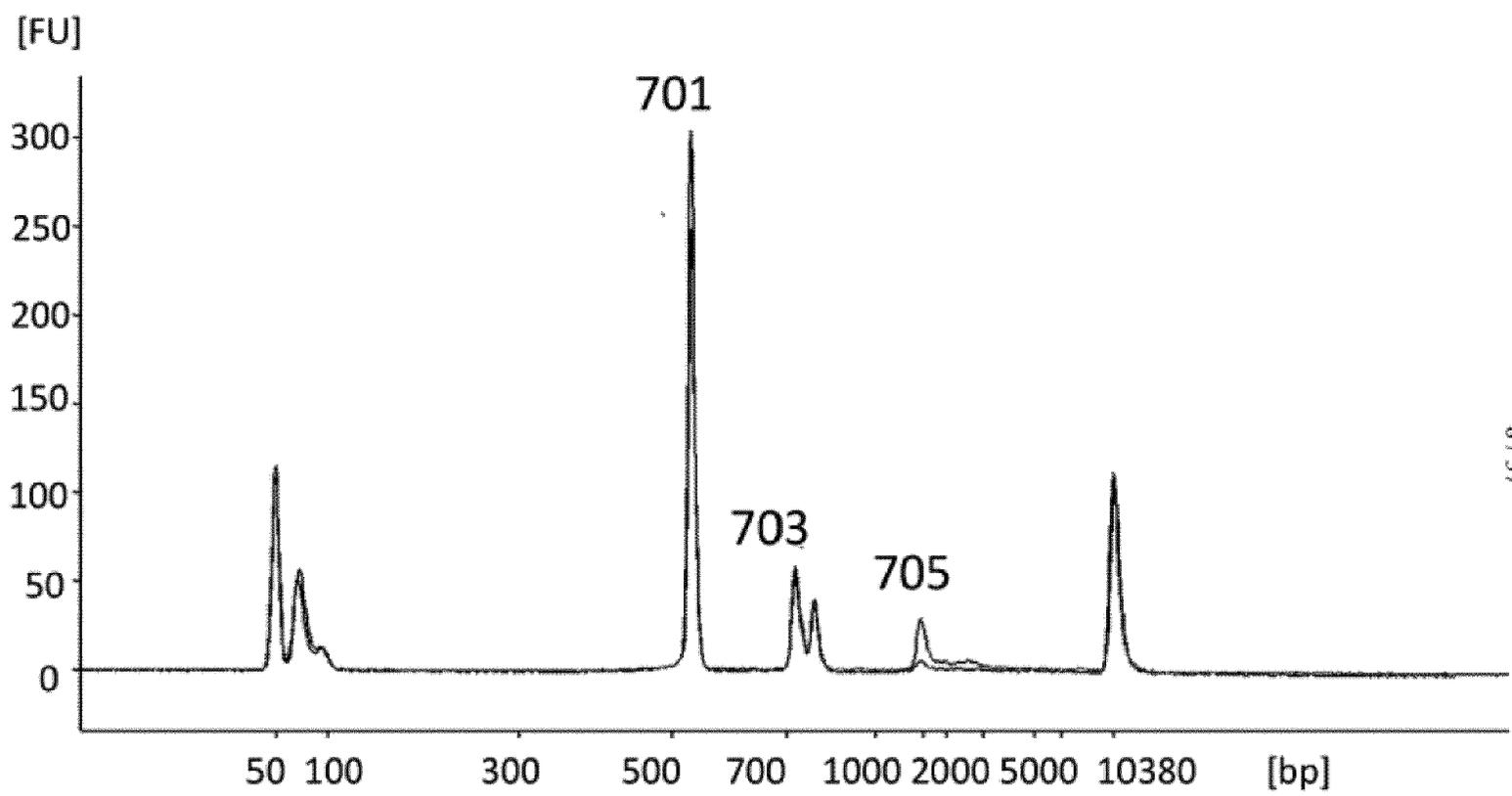
ФИГ. 4



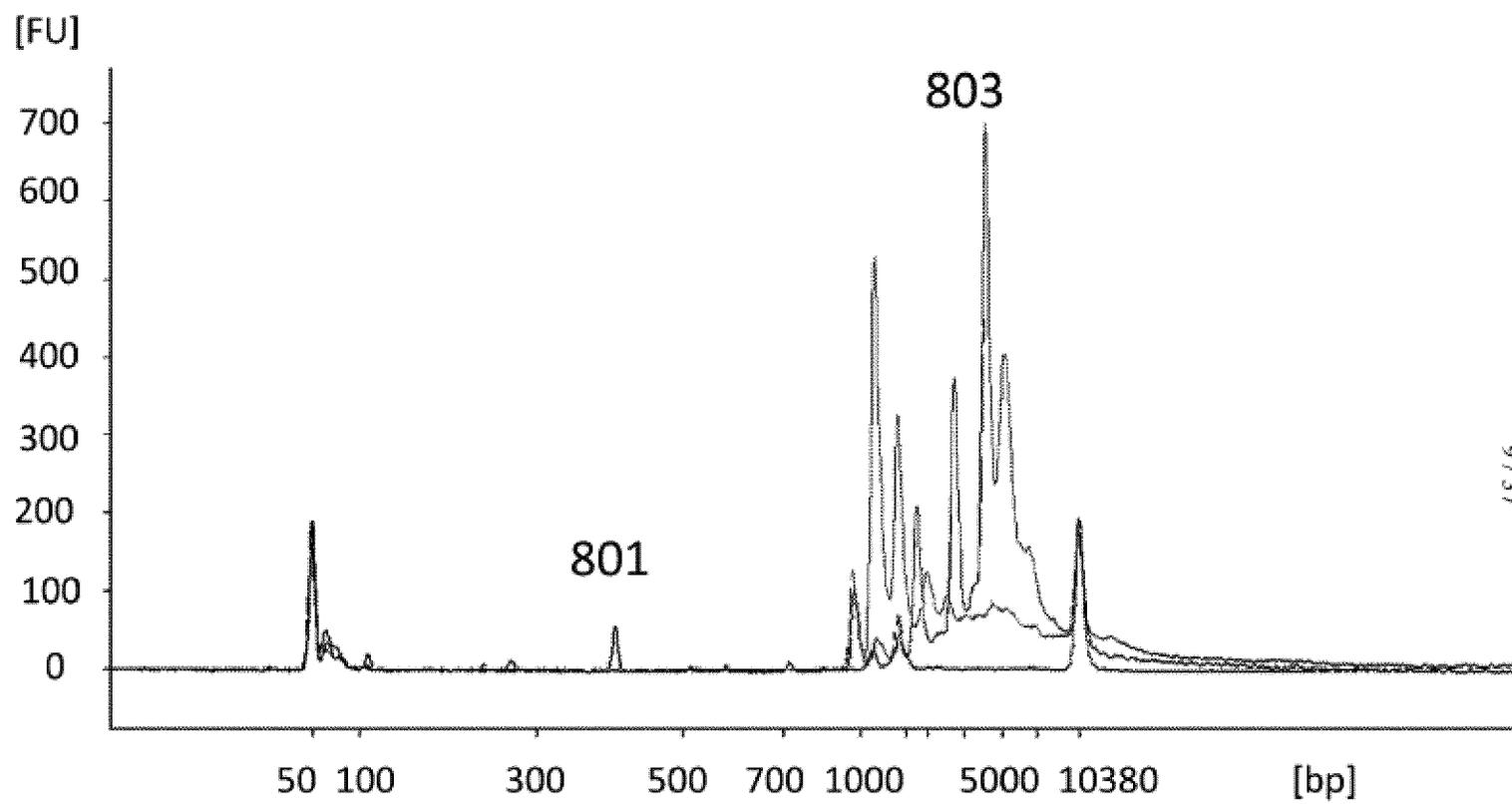
ФИГ. 5



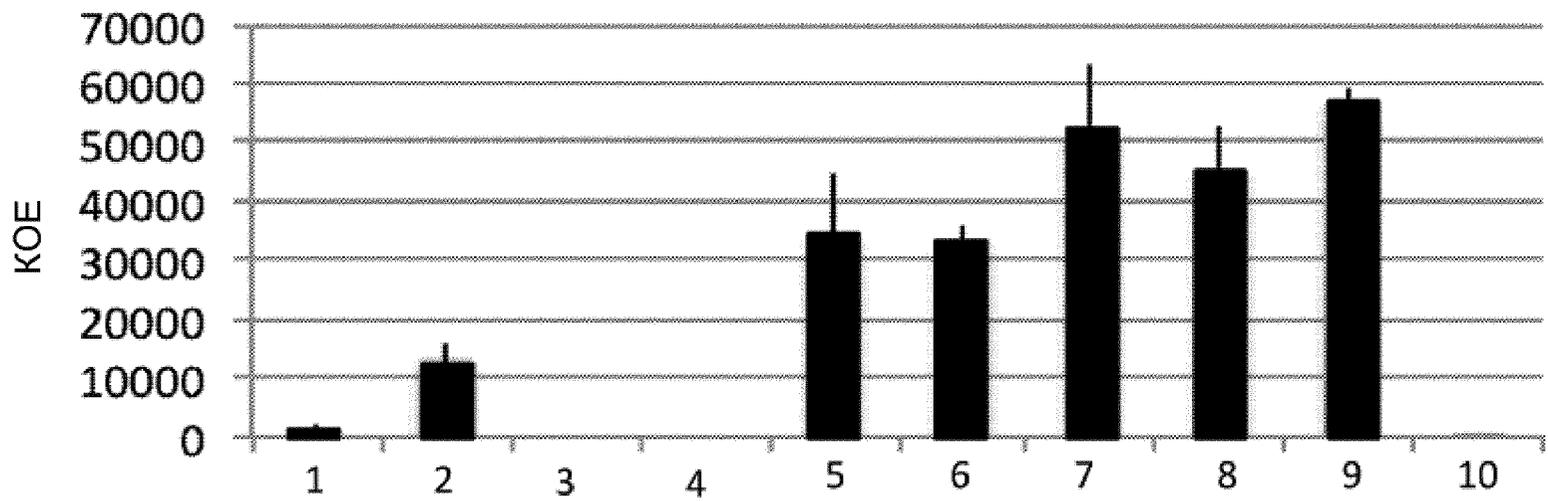
ФИГ. 6



ФИГ. 7

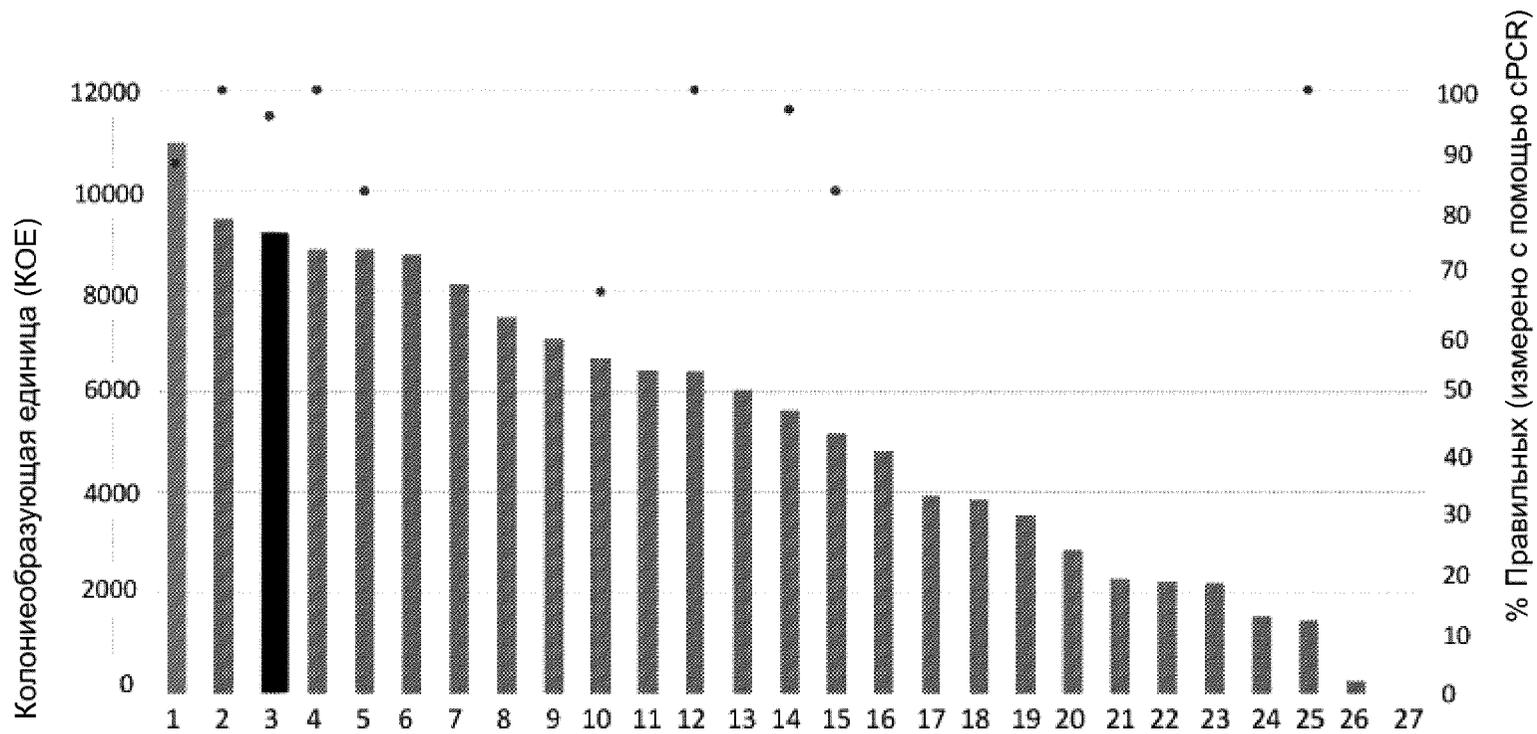


ФИГ. 8

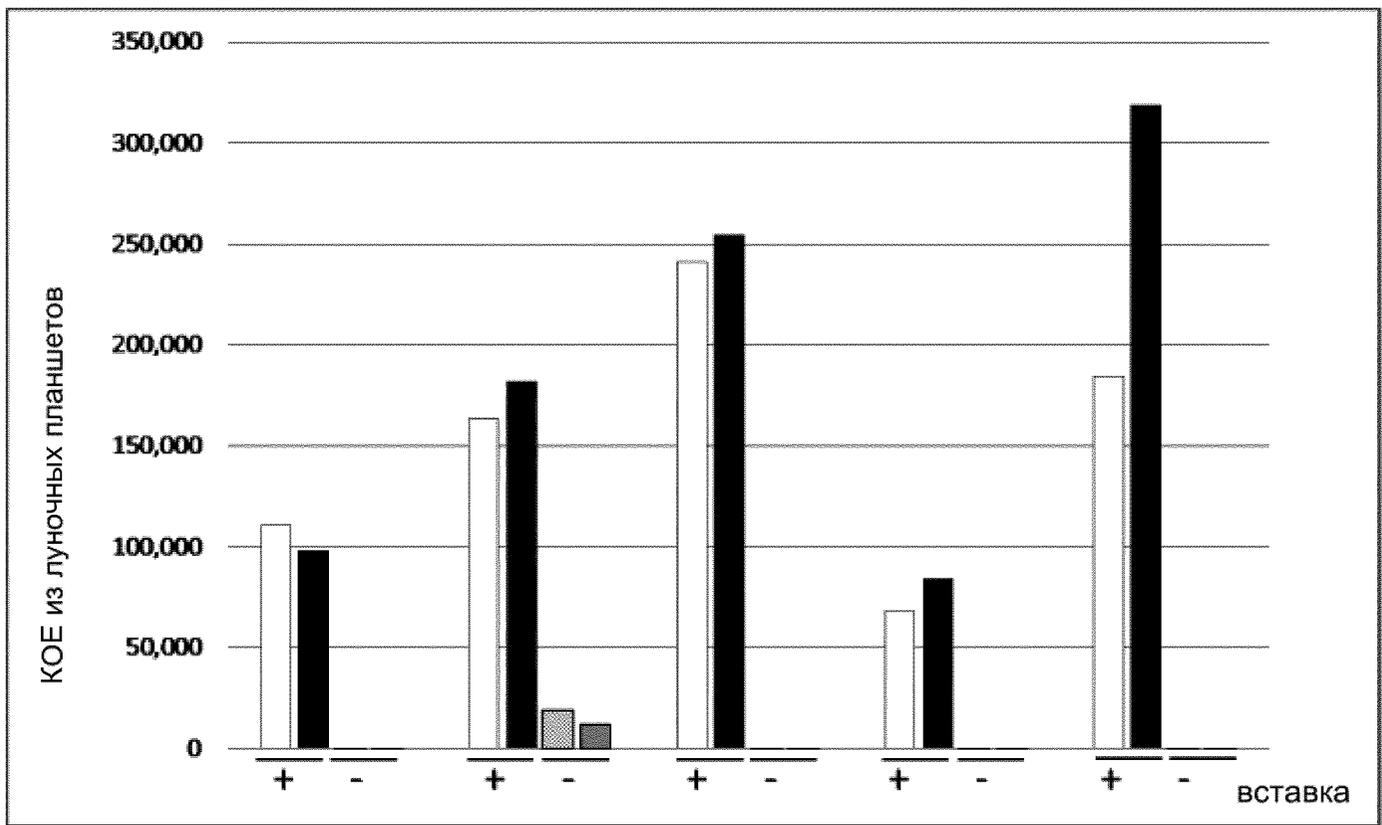


10 / 37

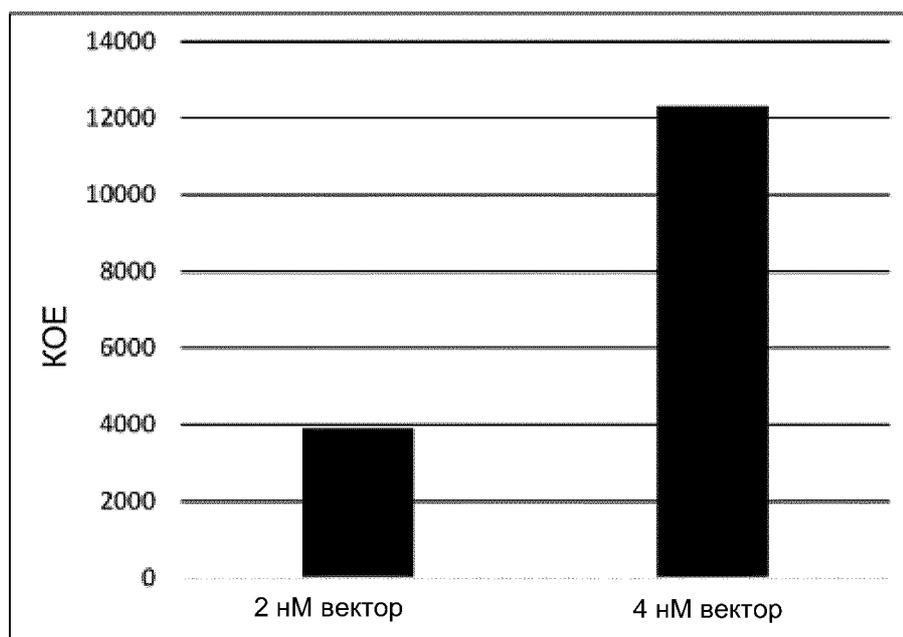
ФИГ. 9



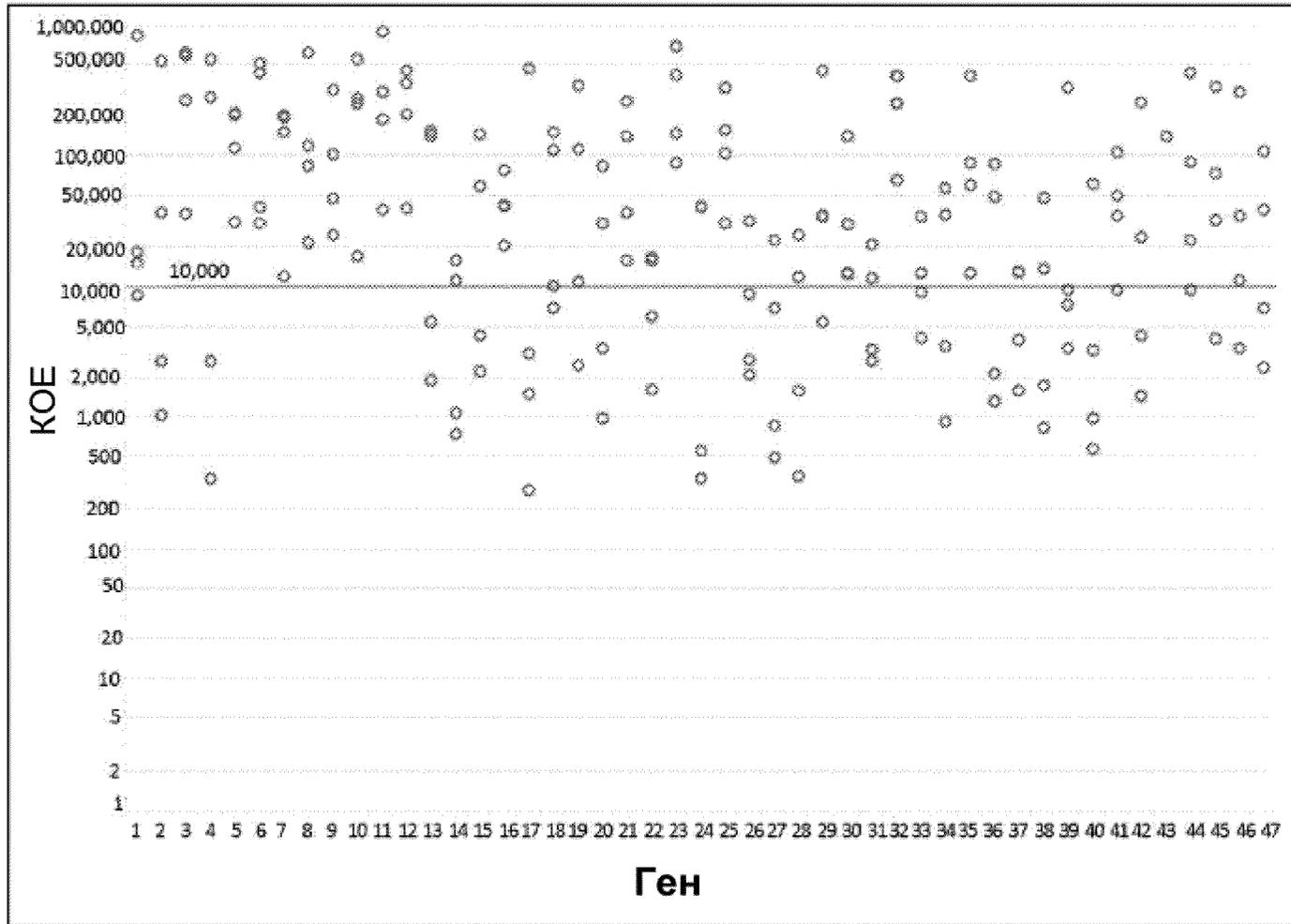
ФИГ. 10



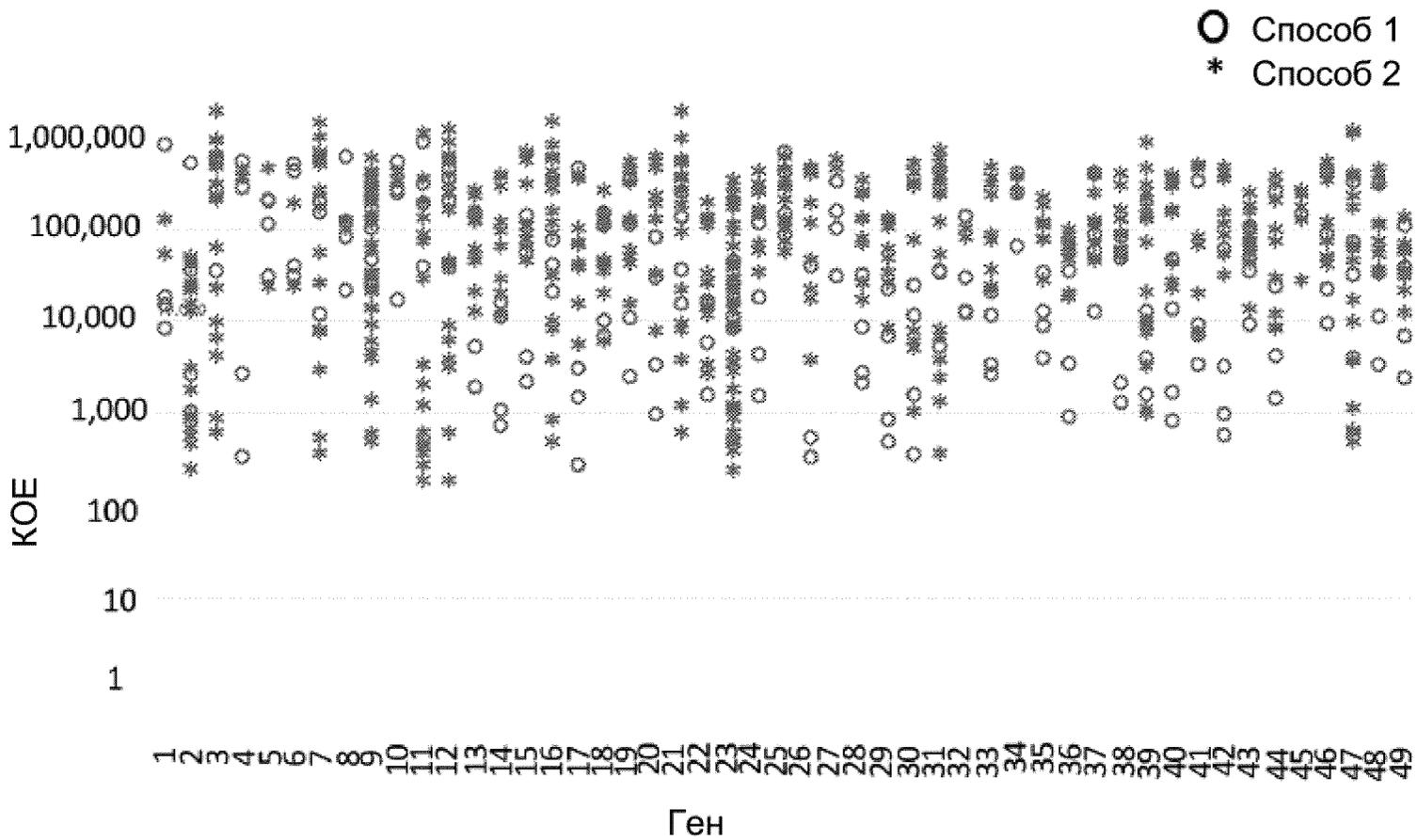
ФИГ. 11



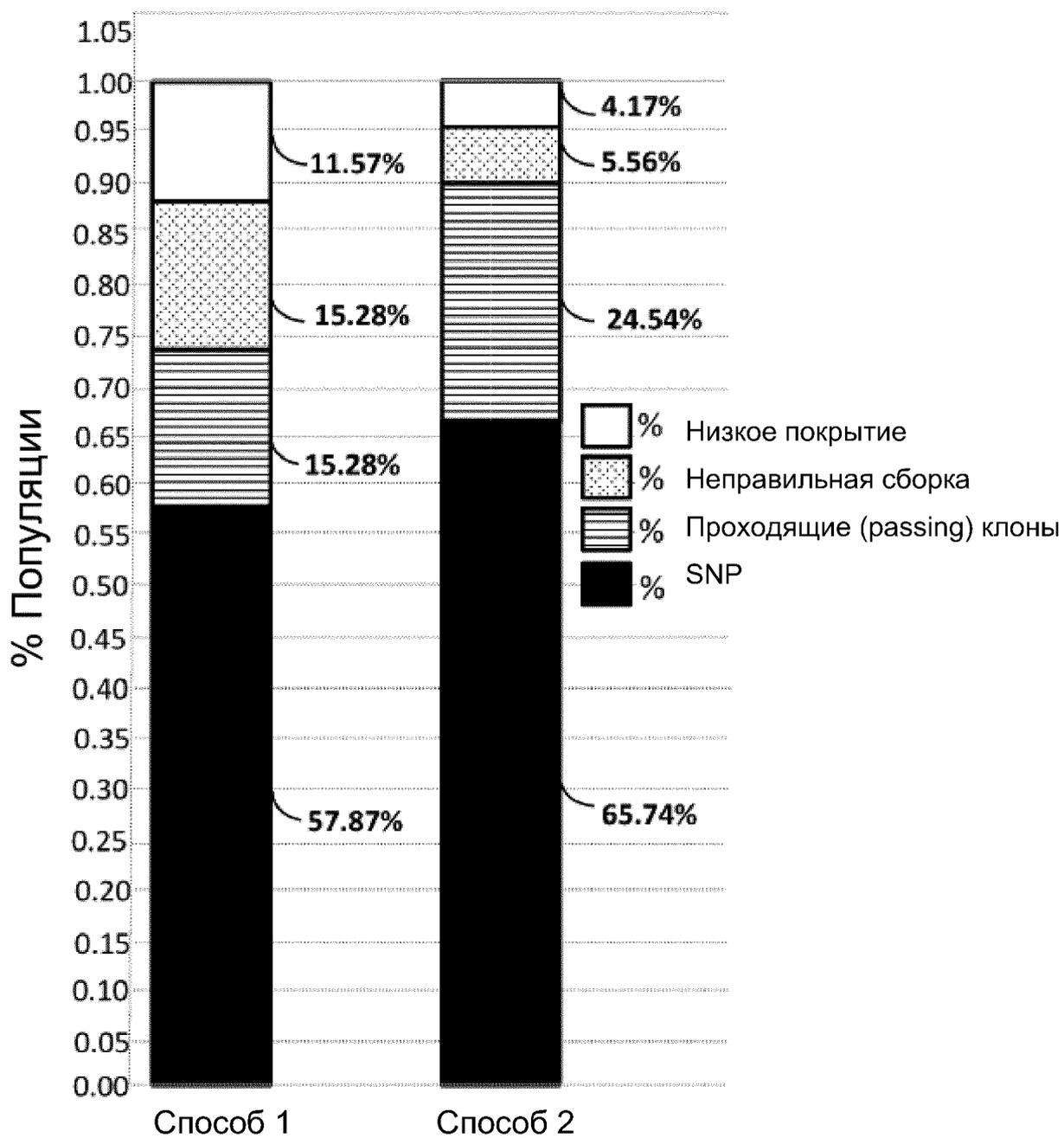
ФИГ. 12



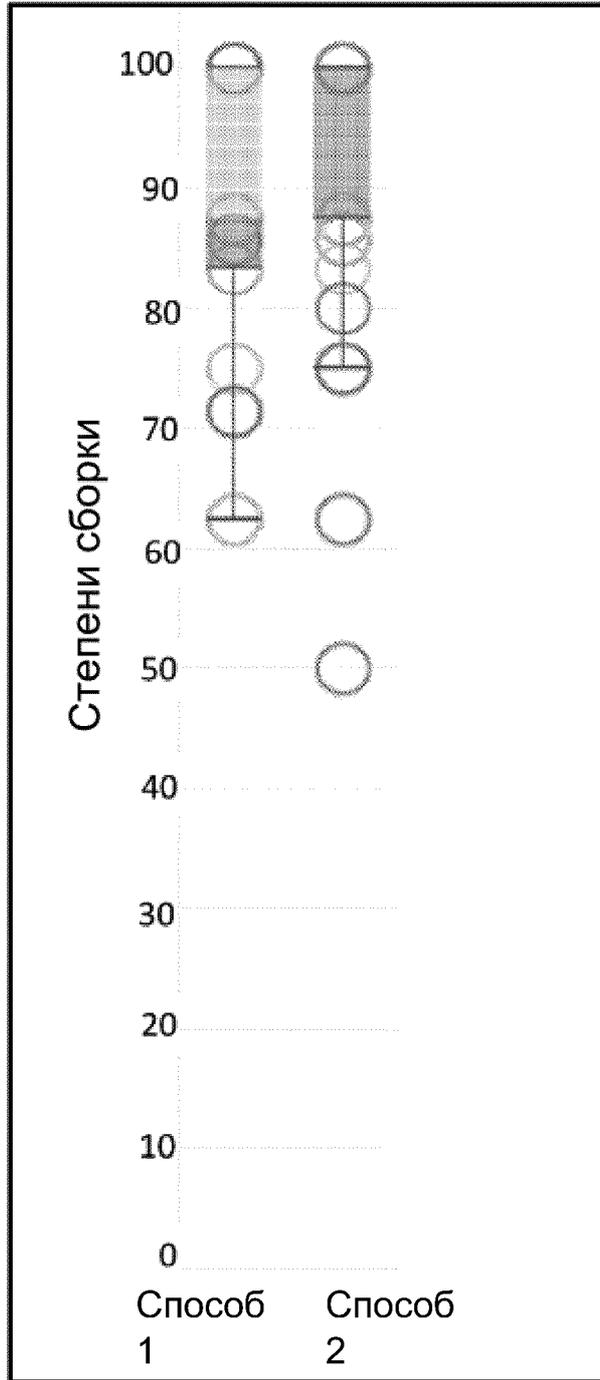
ФИГ. 13



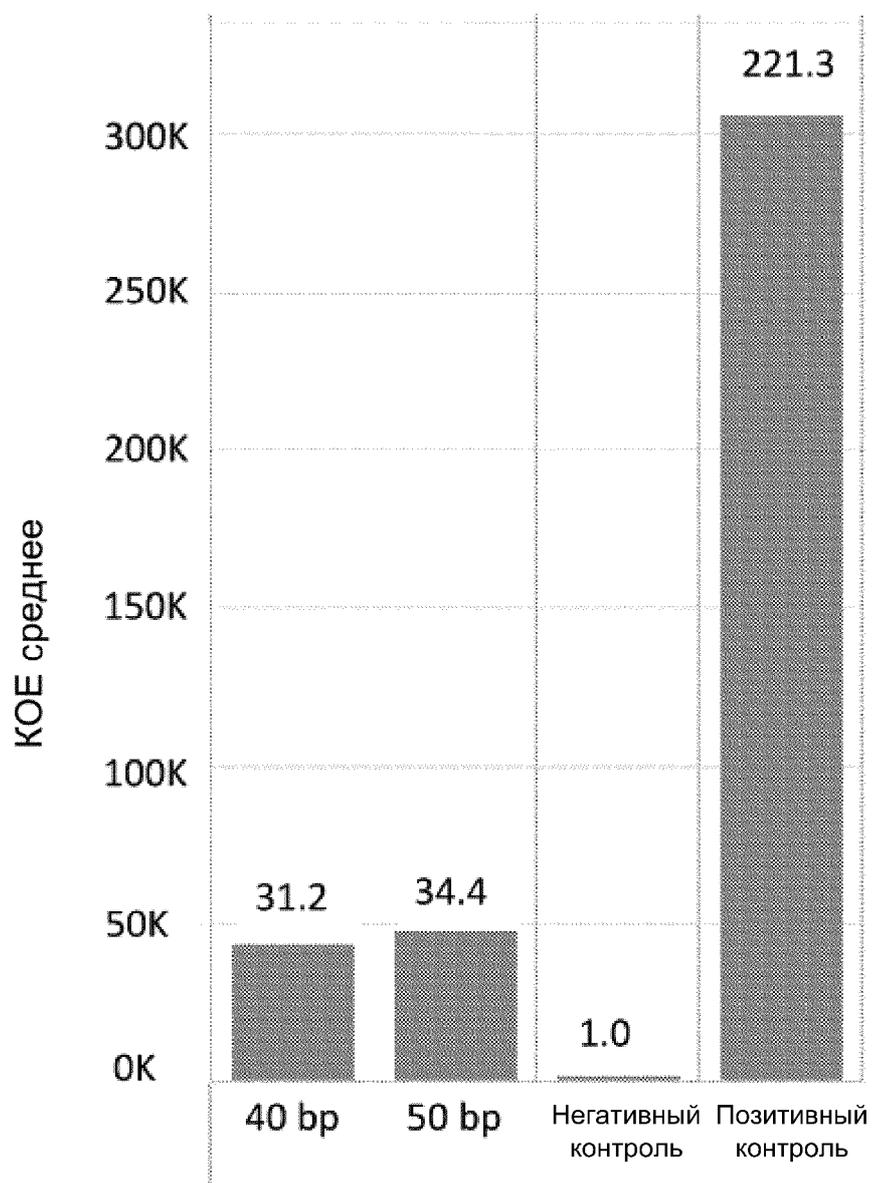
ФИГ. 14А



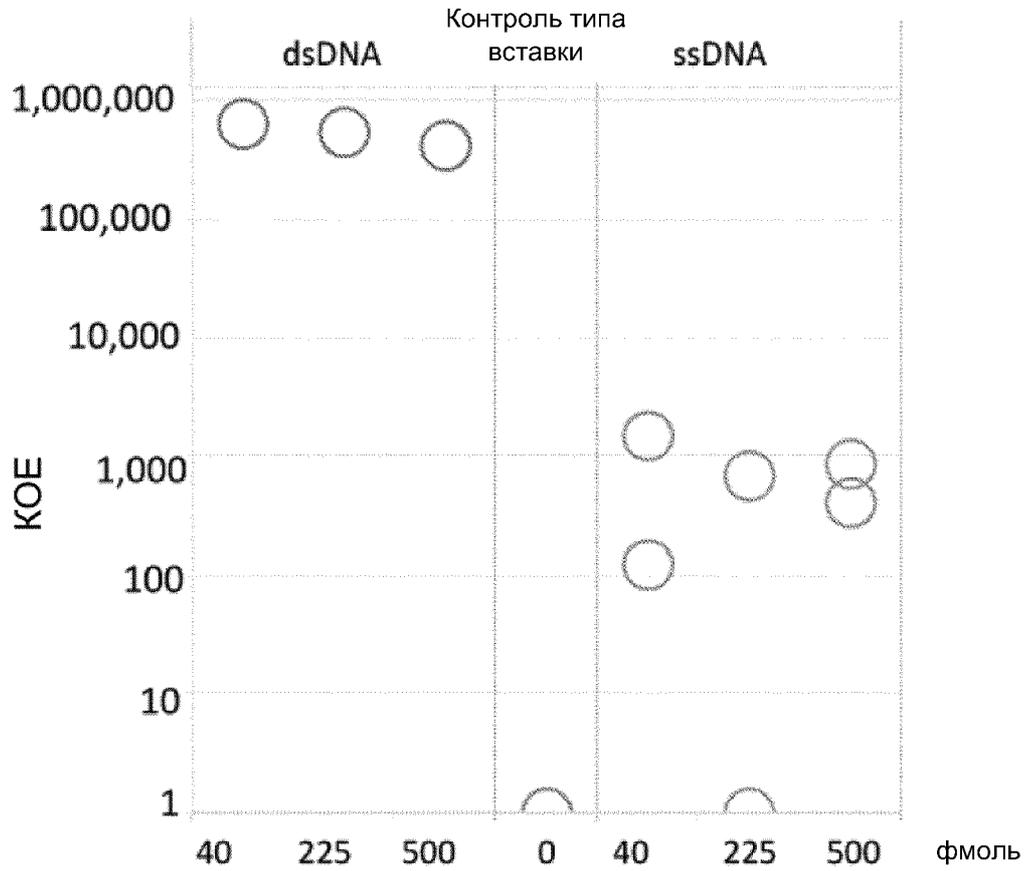
ФИГ. 14В



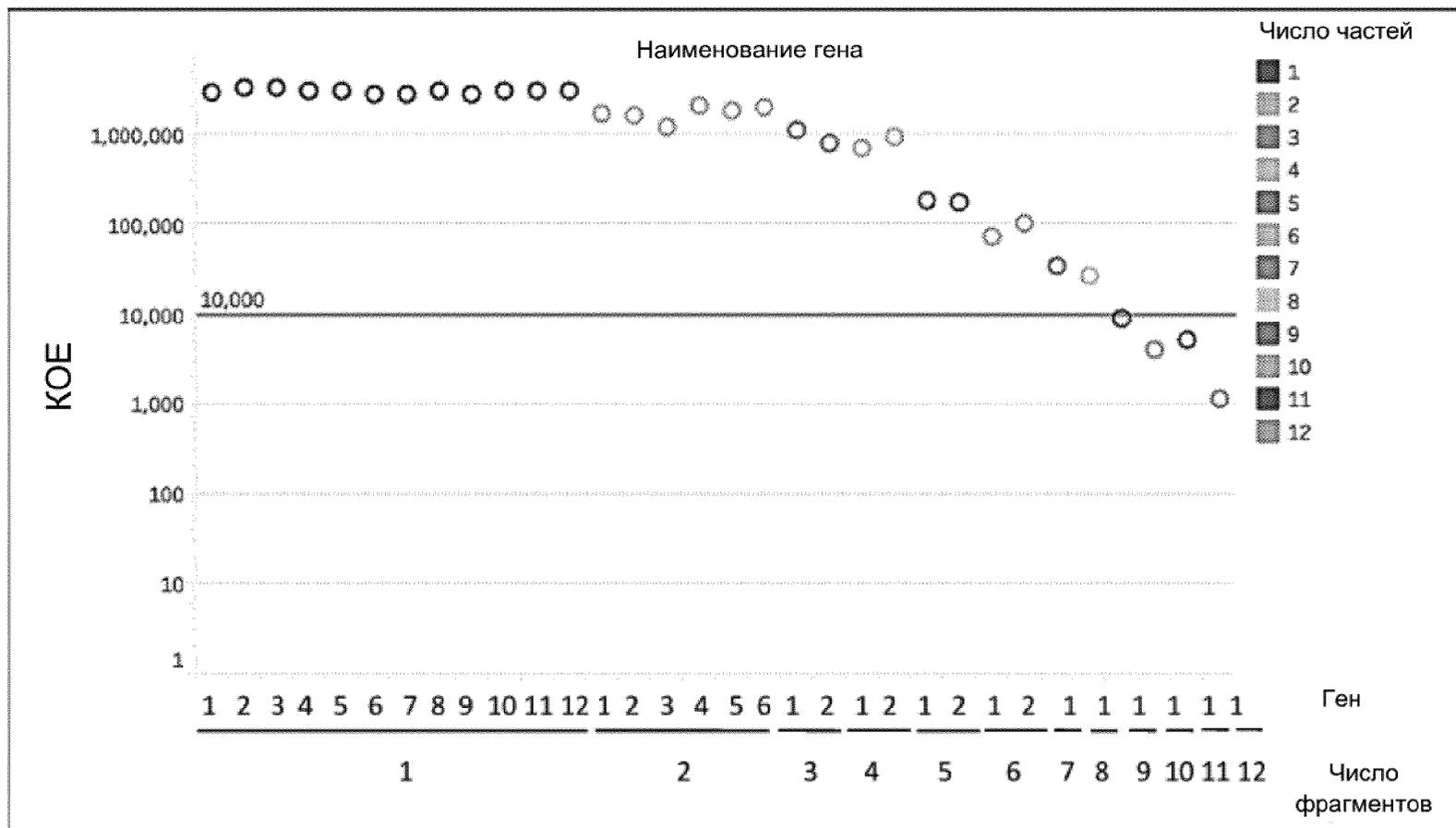
ФИГ. 14С



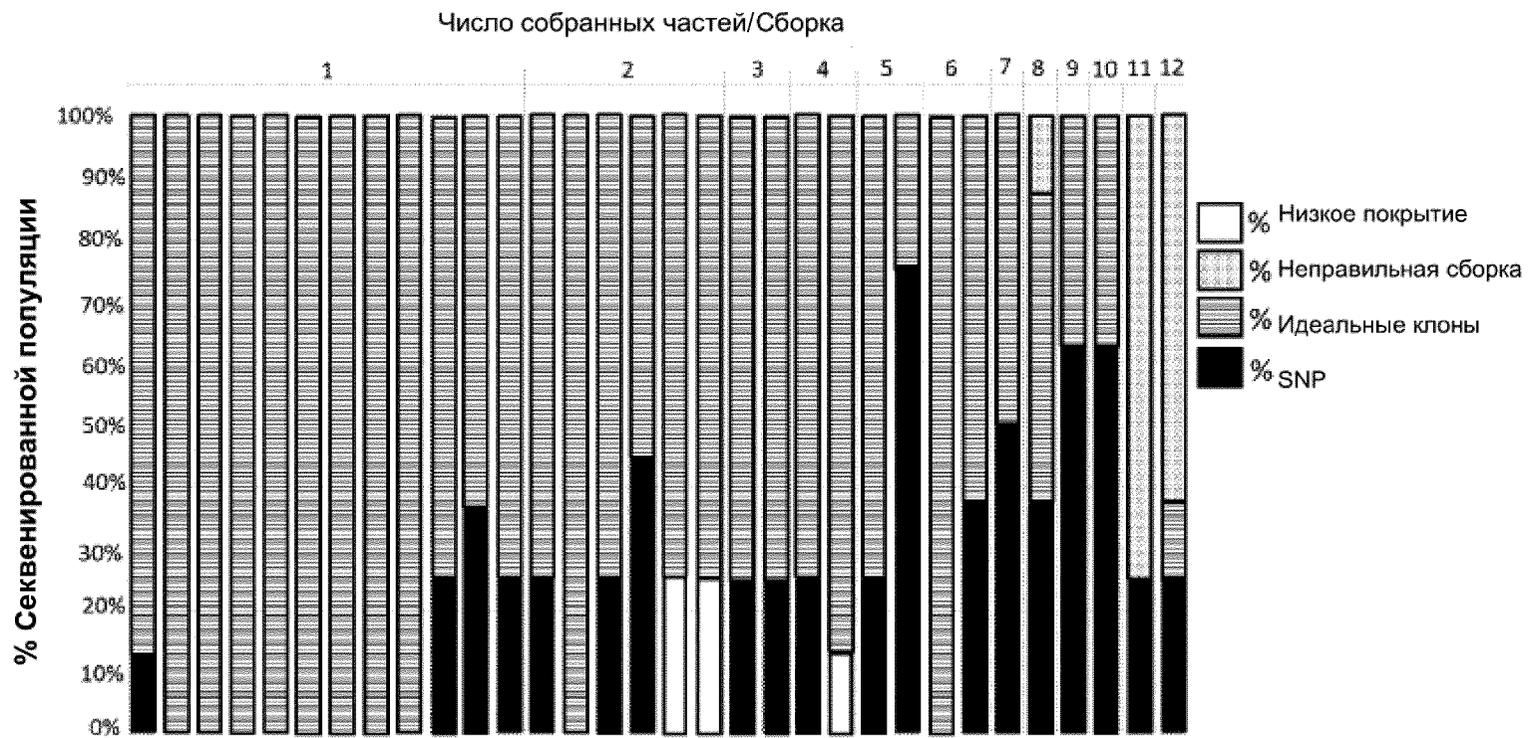
ФИГ. 15А



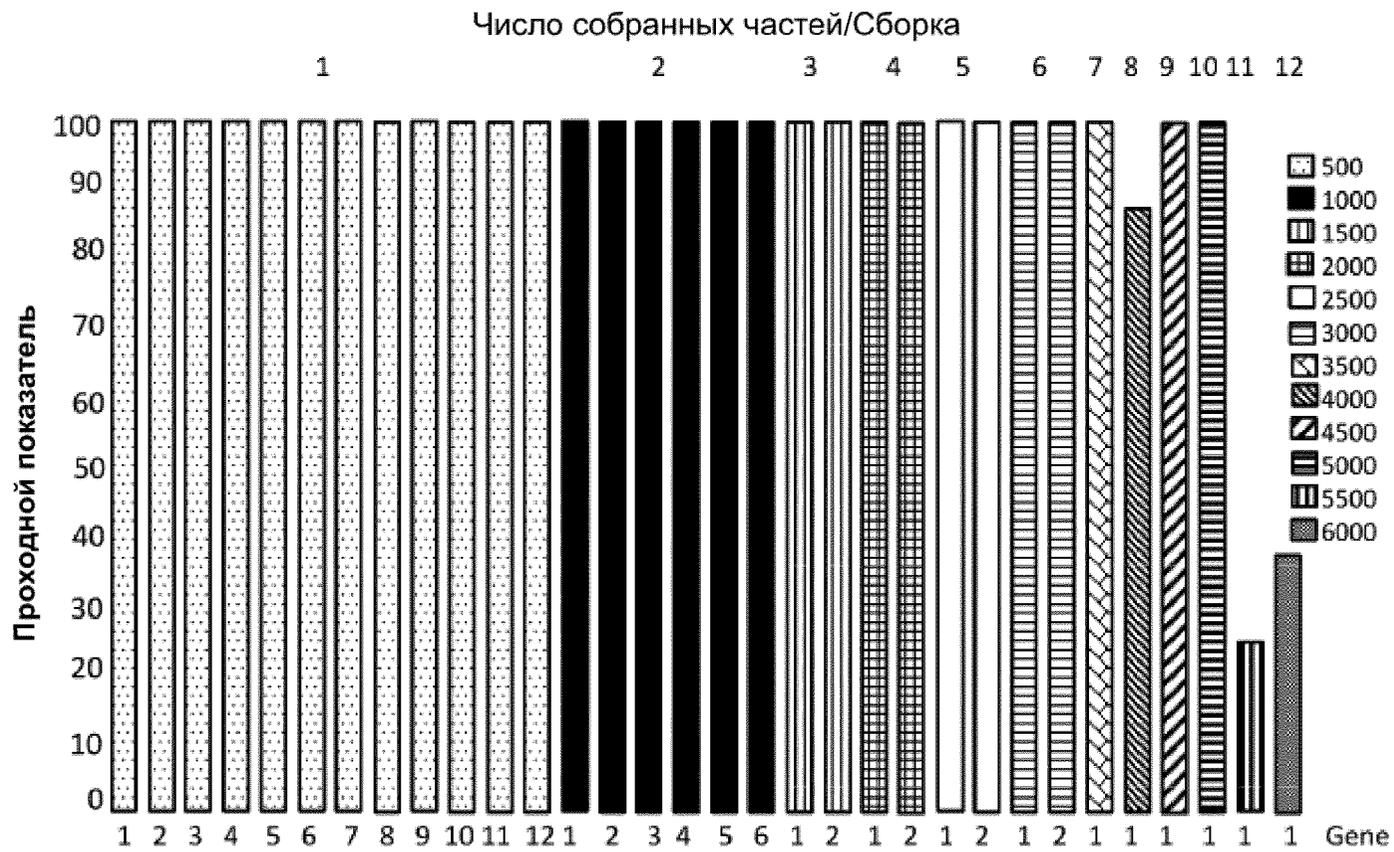
ФИГ. 15В



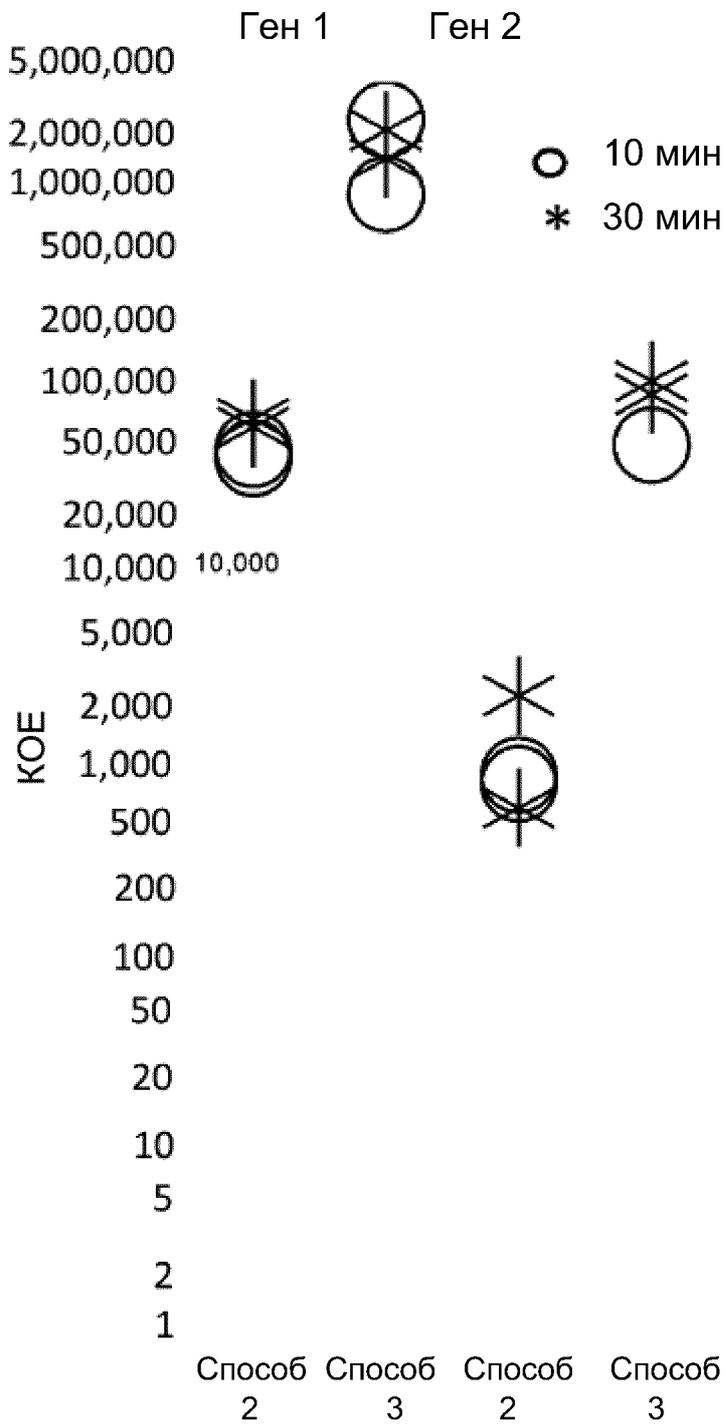
ФИГ. 16А



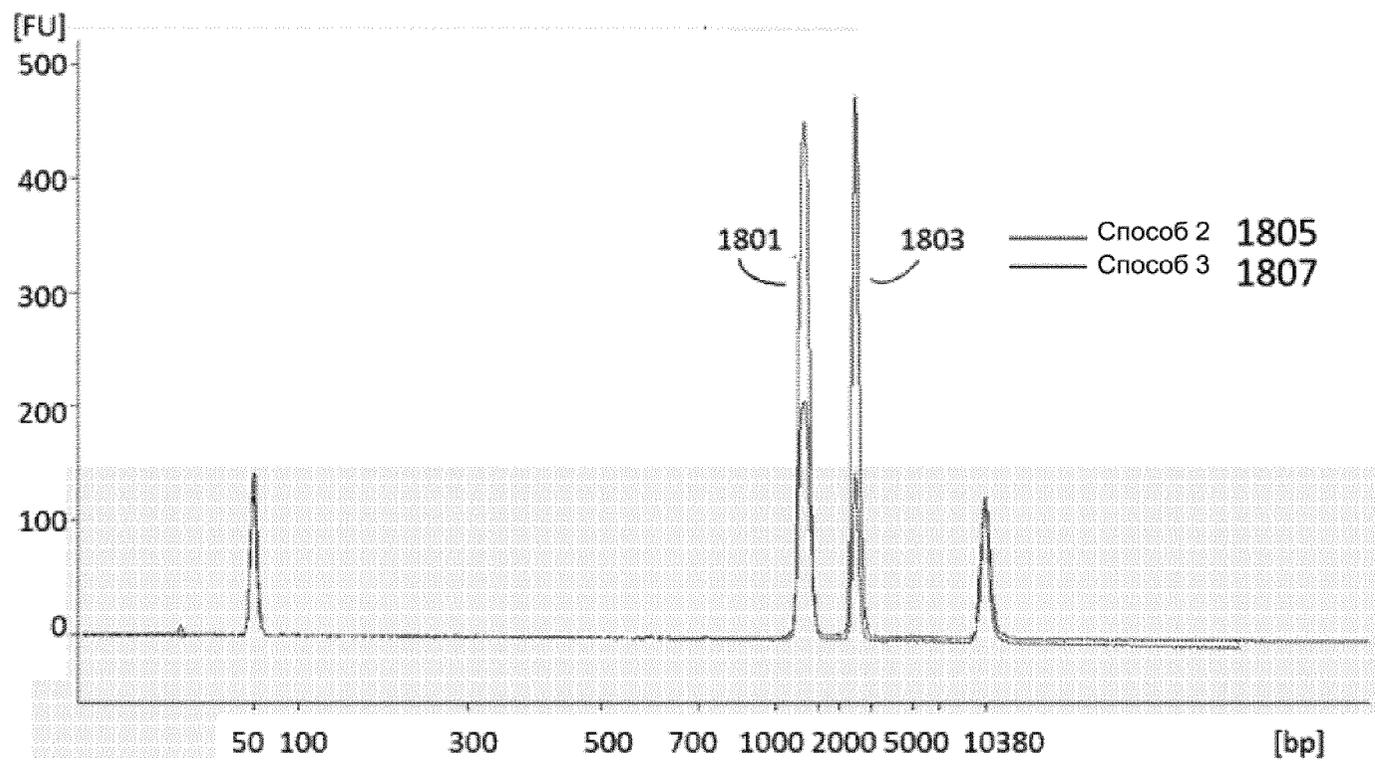
ФИГ. 16В



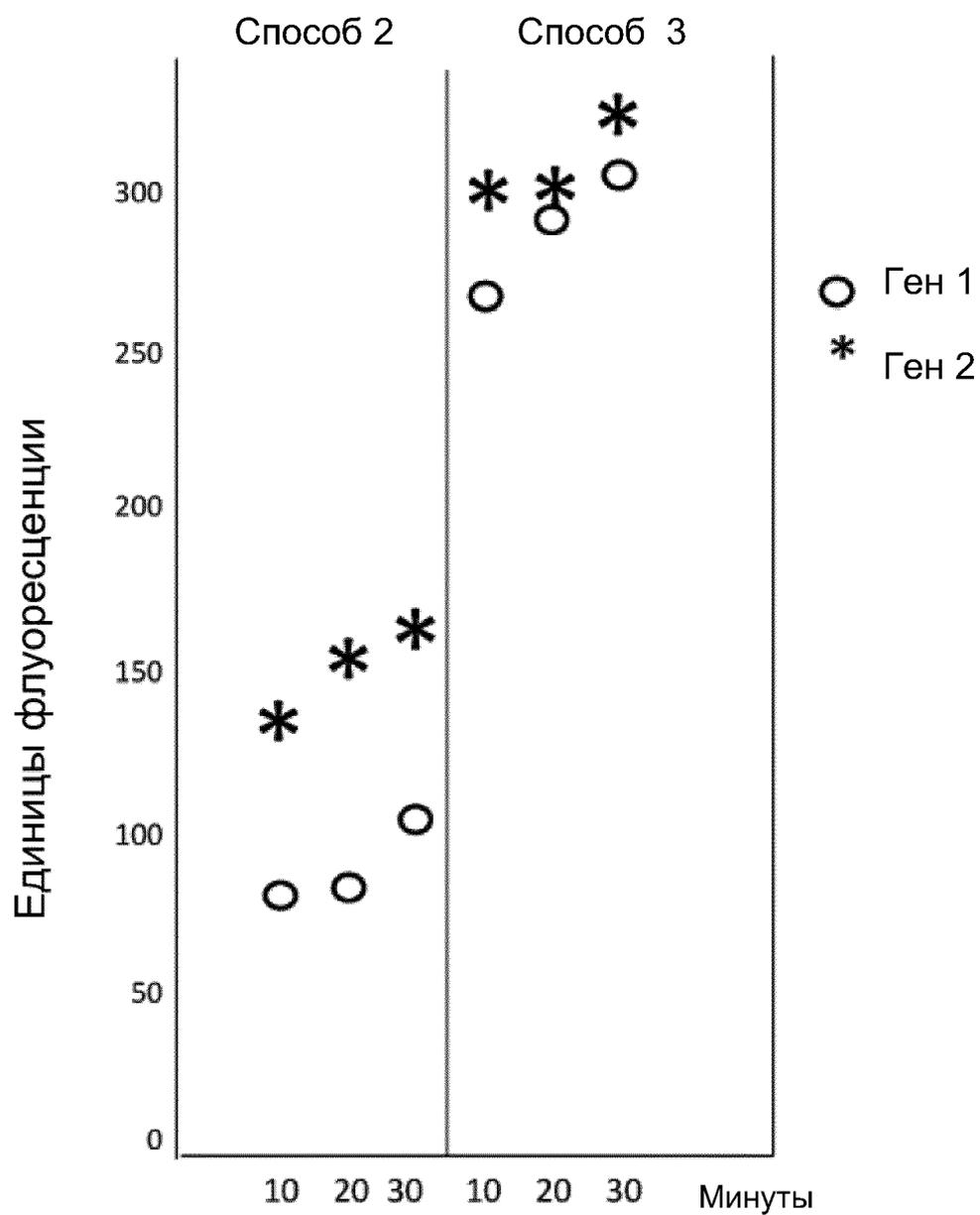
ФИГ. 16С



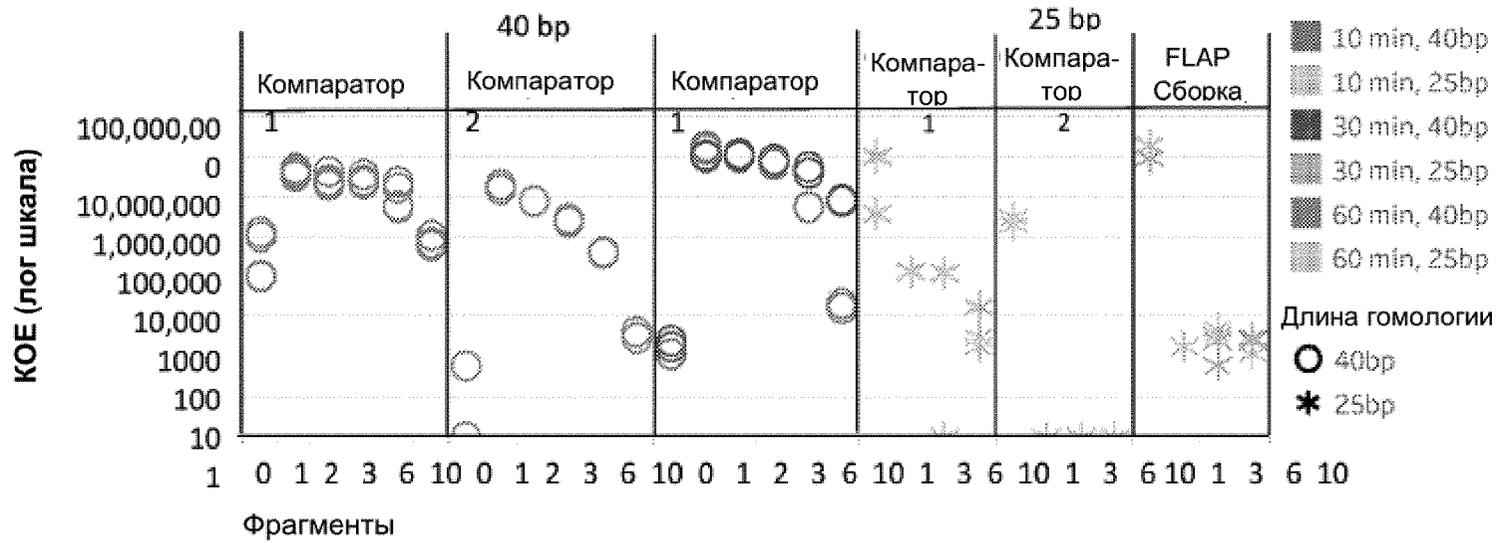
ФИГ. 17



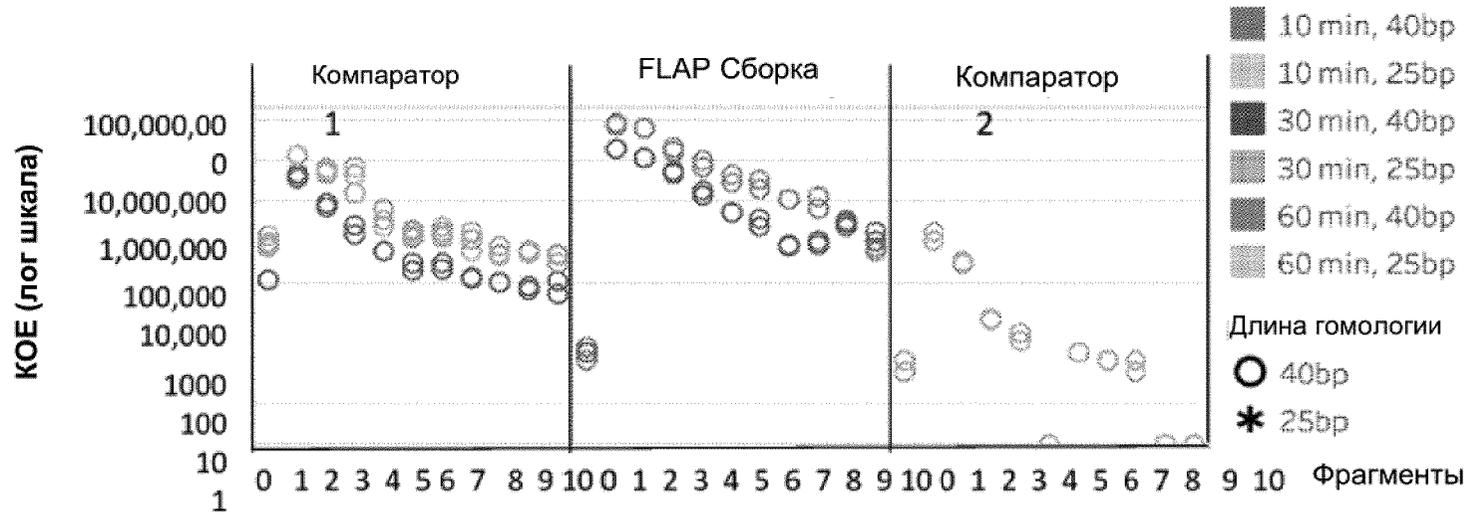
ФИГ. 18А



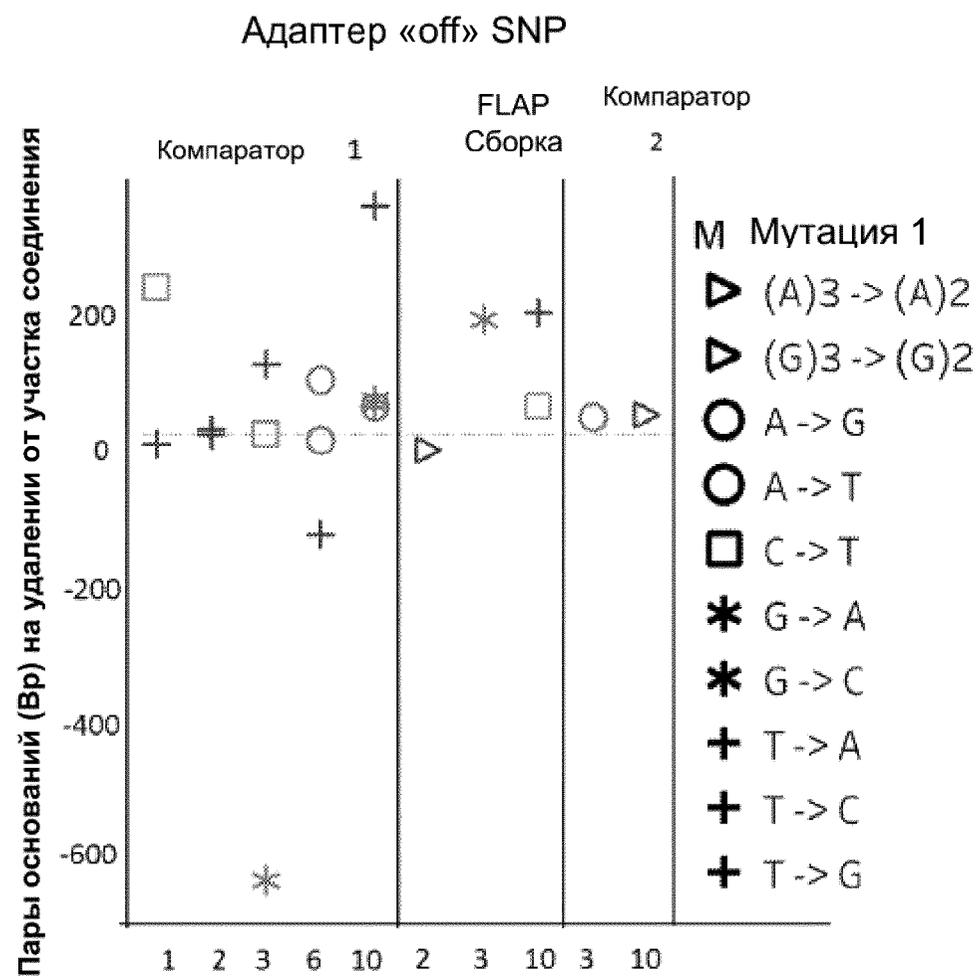
ФИГ. 18В



ФИГ. 19А

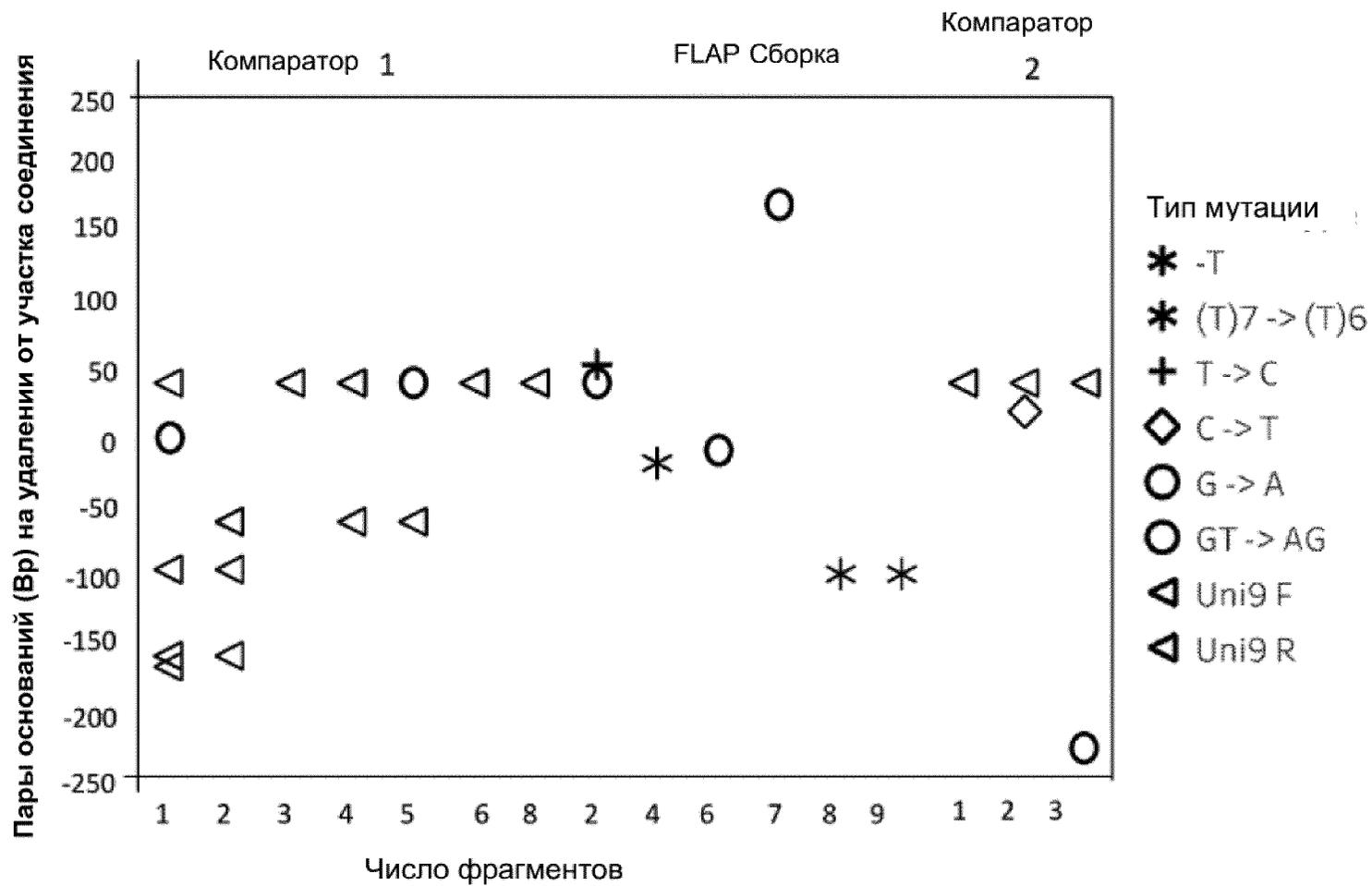


ФИГ. 19В

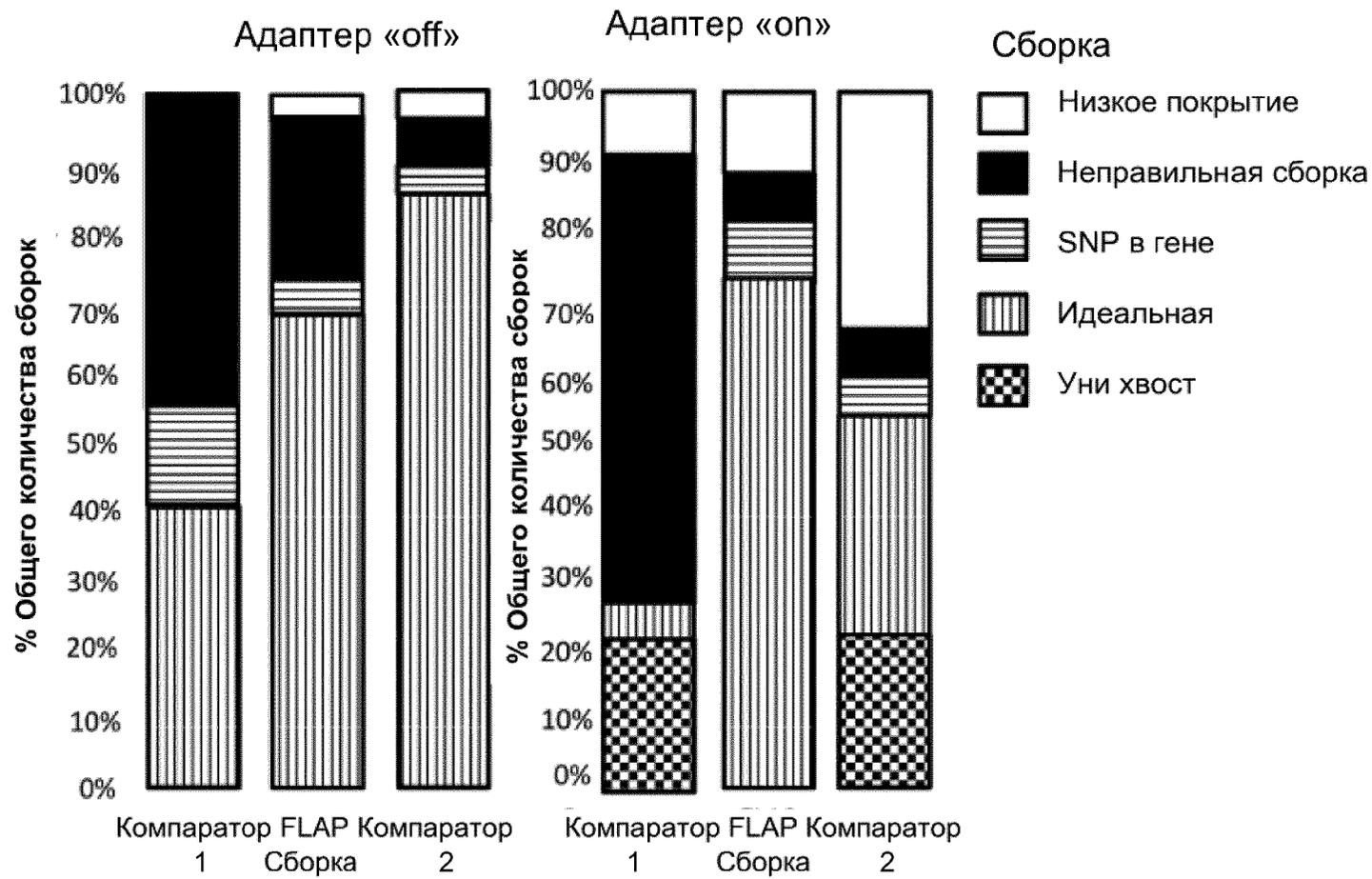


ФИГ. 20А

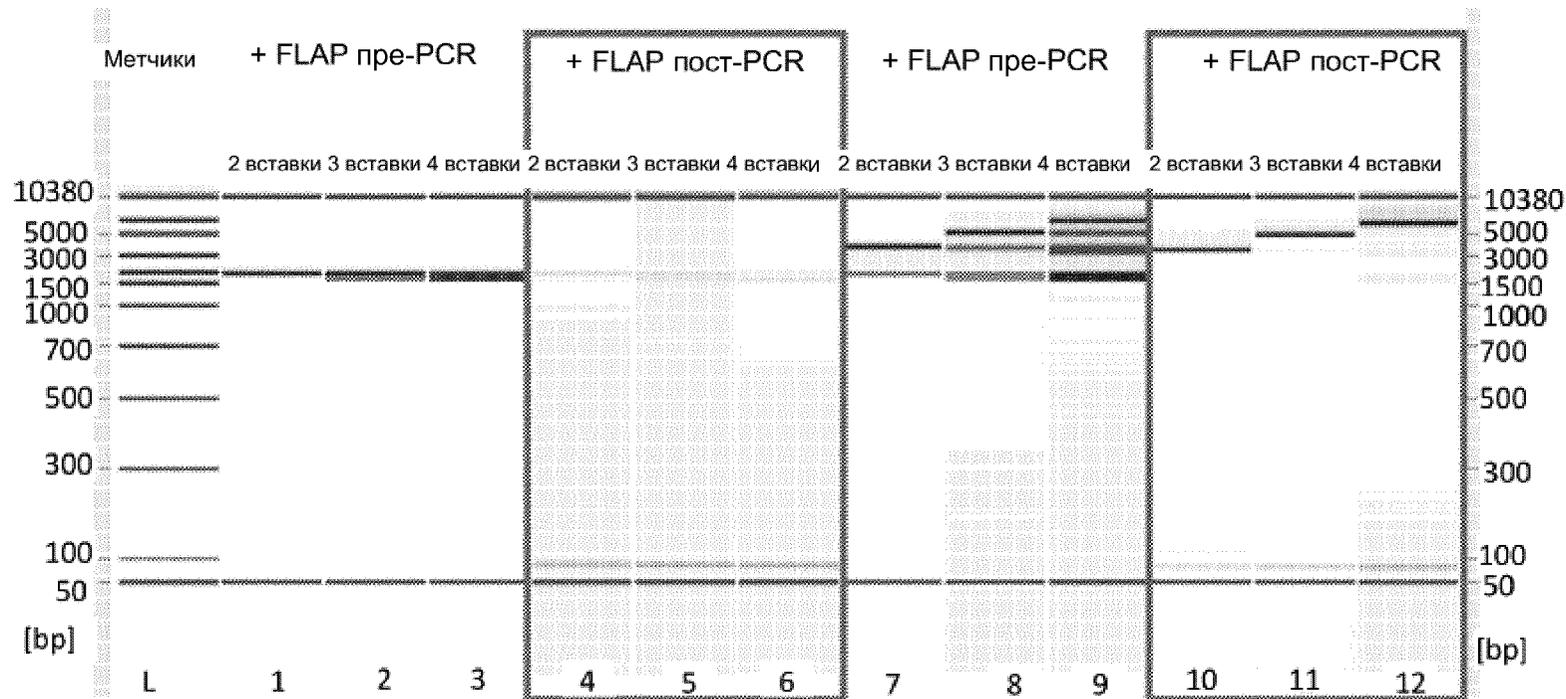
Адаптер «оп» мутации и местоположения



ФИГ. 20В

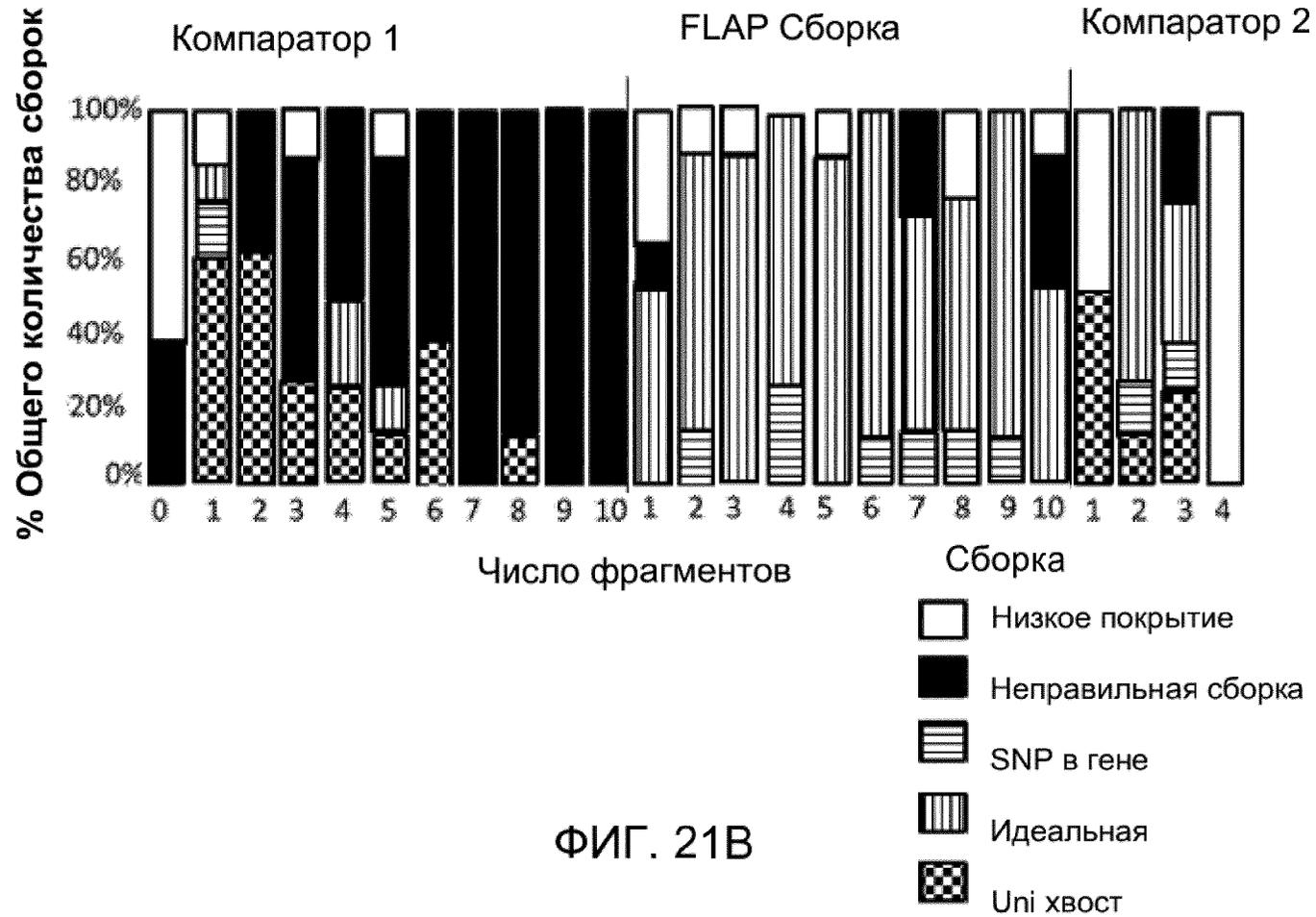


ФИГ. 20С

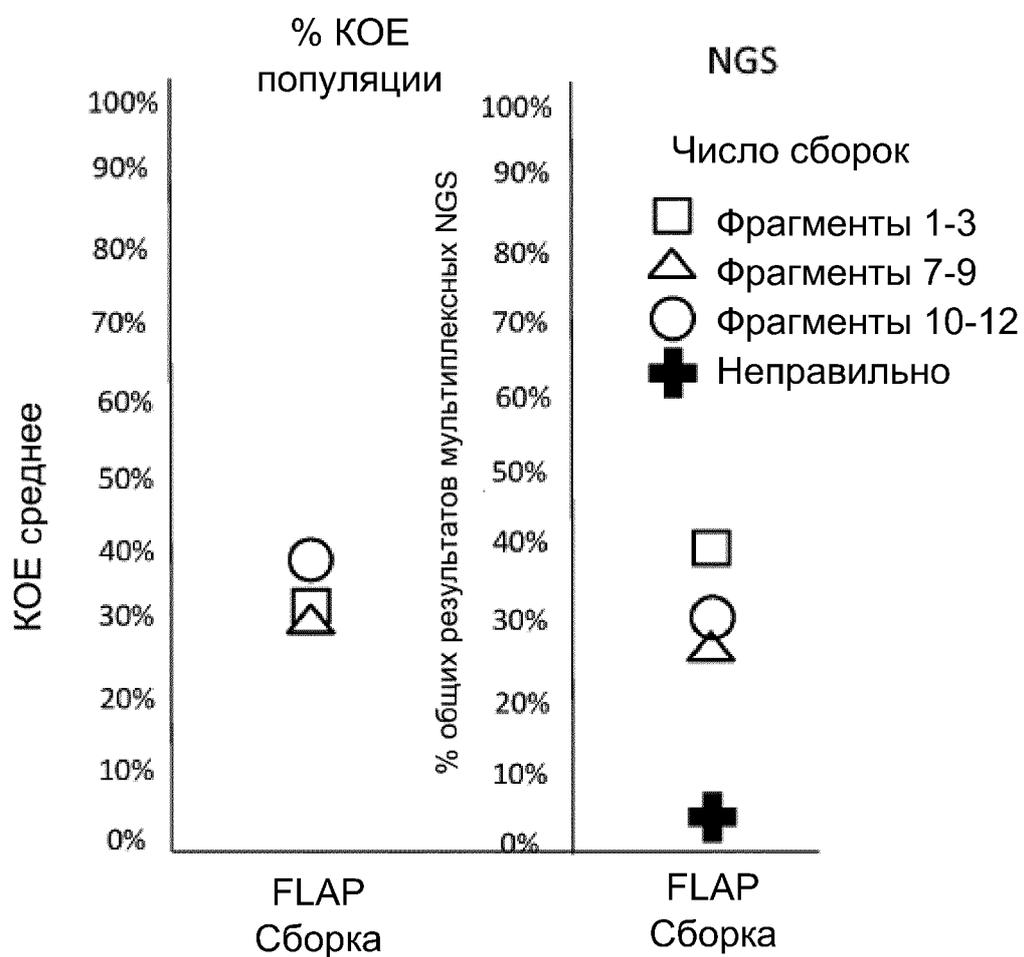


ФИГ. 21А

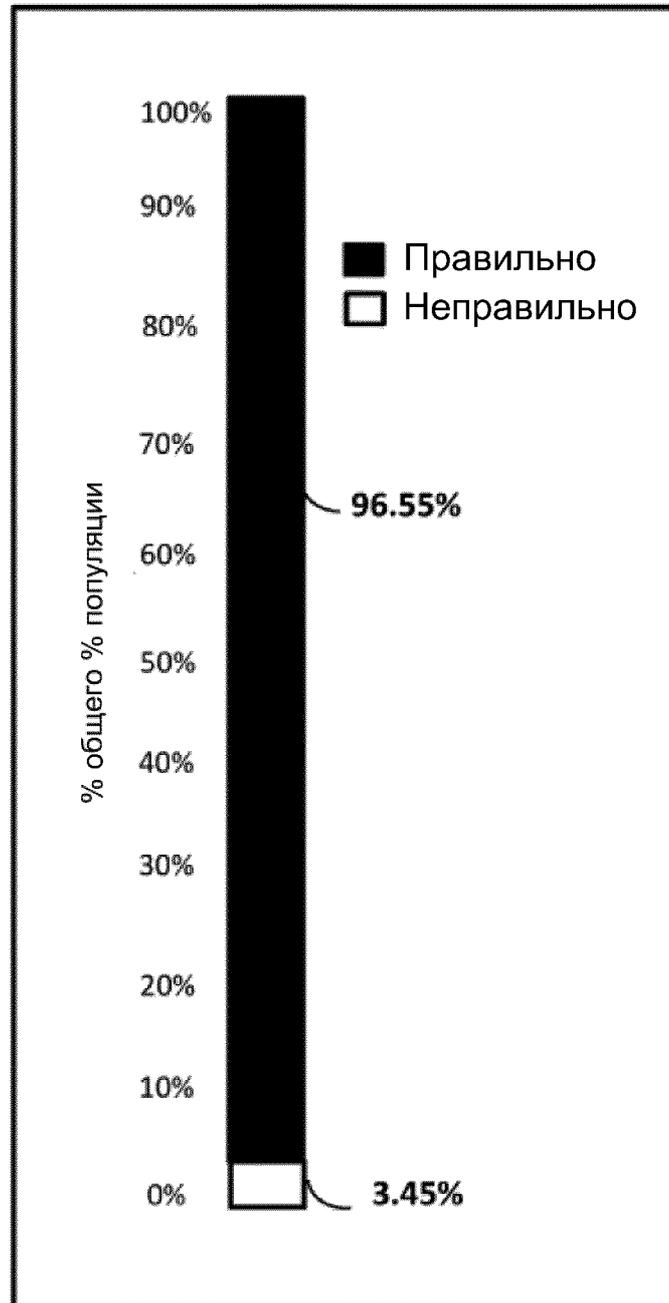
### Адаптер «on» процент



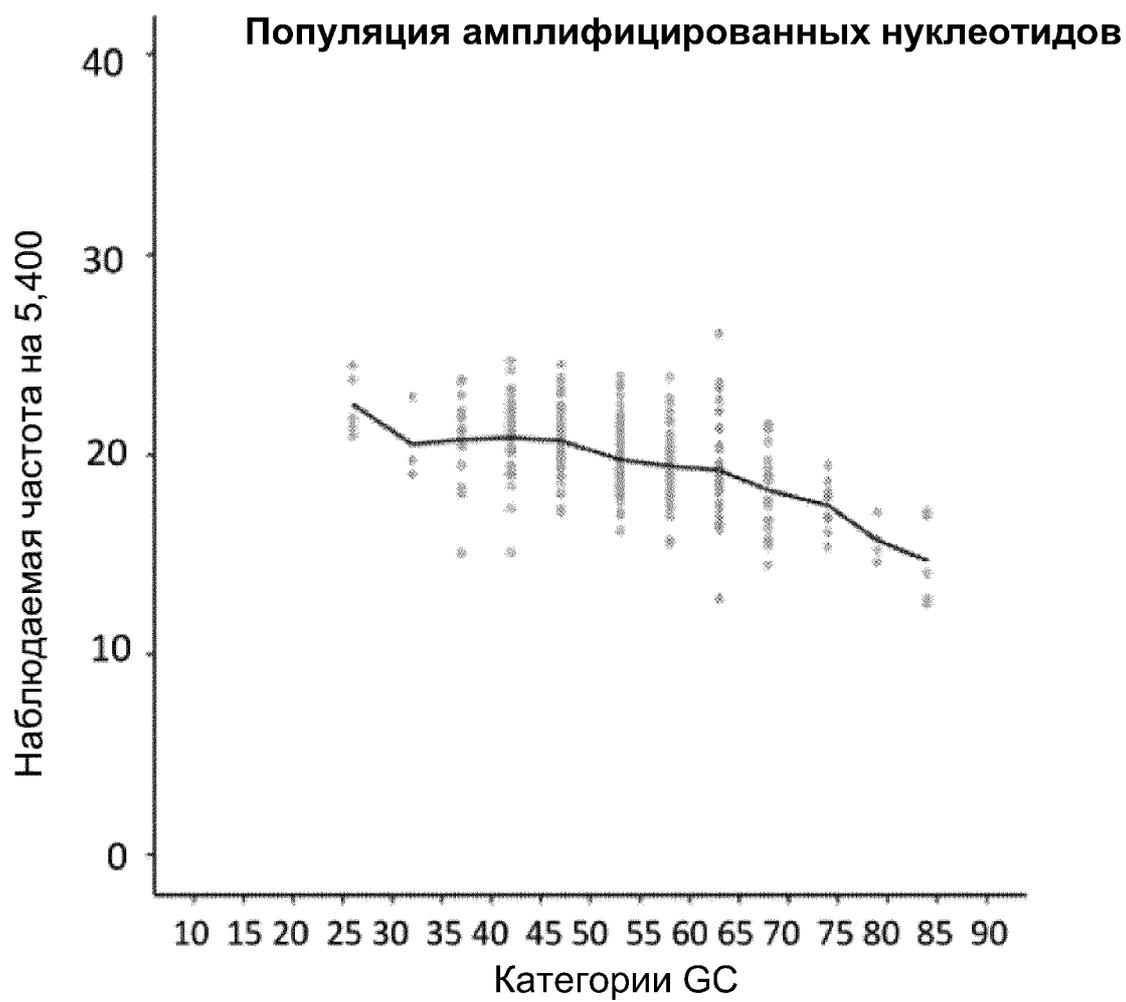
ФИГ. 21В



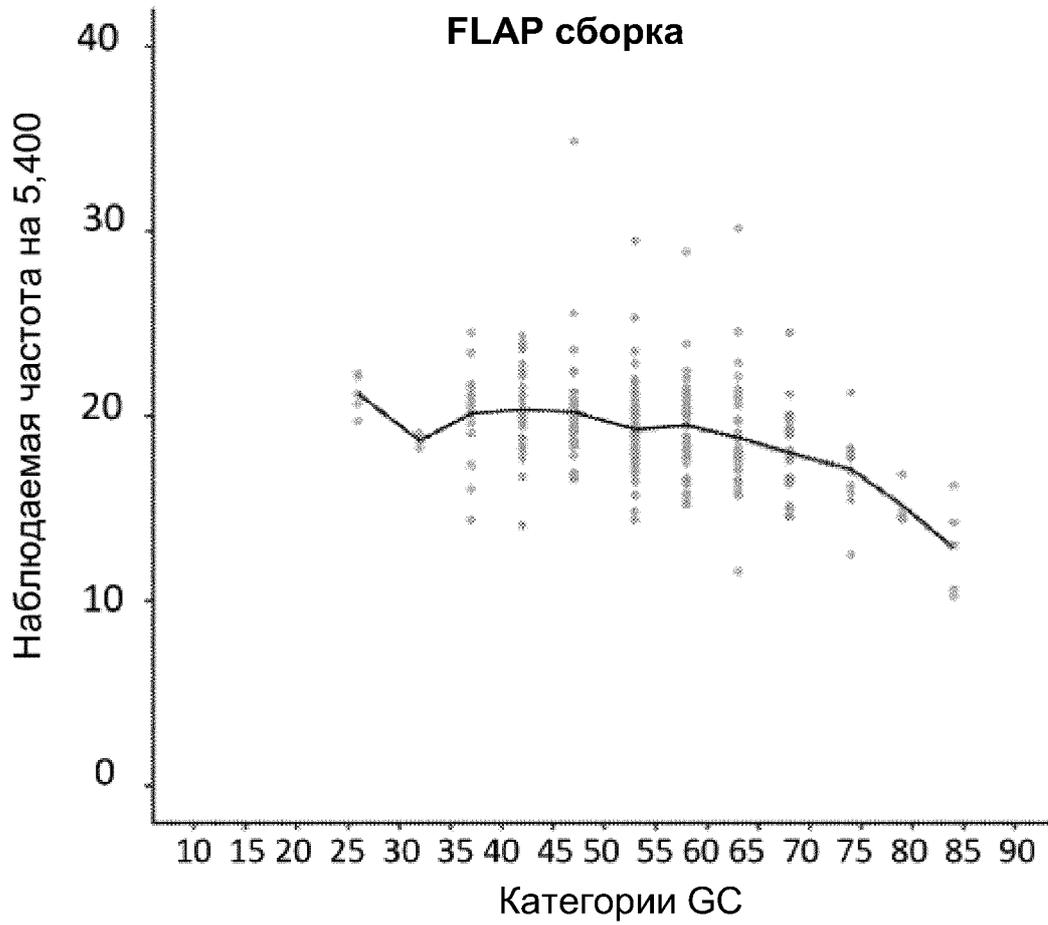
ФИГ. 21С



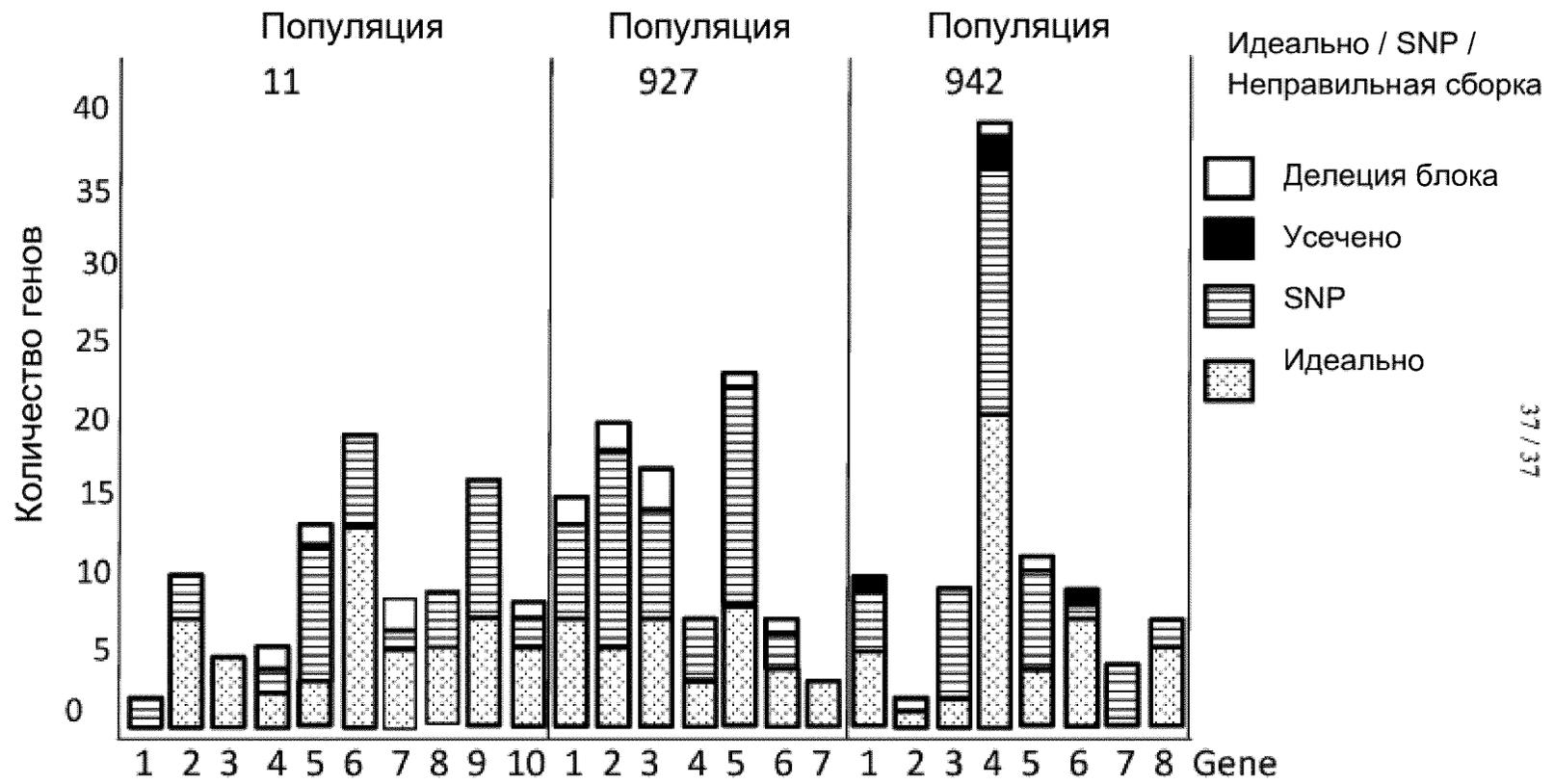
ФИГ. 21D



ФИГ. 22А



ФИГ. 22В



ФИГ. 23