

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091489** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.01.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/09* (2006.01)
G11C 11/00 (2006.01)
G11C 11/56 (2006.01)
G01N 27/403 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.03

(54) **ХРАНЕНИЕ ЦИФРОВОЙ ИНФОРМАЦИИ НА ОСНОВЕ ДНК**

(31) 62/613,728; 62/617,067; 62/650,231

(72) Изобретатель:

(32) 2018.01.04; 2018.01.12; 2018.03.29

**Брамлетт Брайан Уэйн, Пек Билл
Джэймс (US)**

(33) US

(86) PCT/US2019/012218

(74) Представитель:

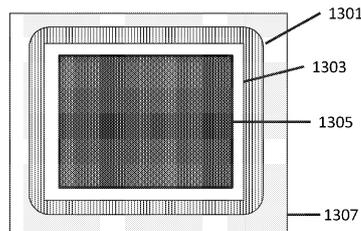
(87) WO 2019/136175 2019.07.11

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

(71) Заявитель:

**ТВИСТ БАЙОСАЙЕНС
КОРПОРЕЙШН (US)**

(57) В настоящем документе представлены композиции, устройства, системы и способы получения и применения информации на основе биомолекул для хранения. Кроме того, представлены устройства, содержащие адресуемые электроды, обеспечивающие контроль синтеза полинуклеотидов (снятие защитных групп, удлинение или отщепление и т.д.). Описанные в настоящем документе композиции, устройства, системы и способы обеспечивают улучшенные хранение, плотность и извлечение информации на основе биомолекул.



A1

202091489

202091489

A1

ХРАНЕНИЕ ЦИФРОВОЙ ИНФОРМАЦИИ НА ОСНОВЕ ДНК

ОПИСАНИЕ

Перекрестные ссылки на родственные заявки

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 62/613728, поданной 4 января 2018 года; предварительной заявке на выдачу патента США № 62/617067, поданной 12 января 2018 года; и предварительной заявке на выдачу патента США № 62/650231, поданной 29 марта 2018 года, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте.

Уровень техники

[0002] Системы хранения информации на основе биомолекул, например, на основе ДНК, характеризуются большой емкостью хранения и стабильностью во времени. Однако существует потребность в масштабируемых, автоматизированных, высокоточных и высокоэффективных системах для получения биомолекул с целью хранения информации.

Сущность изобретения

[0003] В настоящем документе представлены устройства для хранения информации, предусматривающие: твердую подложку, причем твердая подложка содержит множество лунок, причем каждая из лунок содержит адресуемый локус, содержащий: поверхность для синтеза, расположенную в нижней области каждой из лунок; нижний электрод, находящийся в адресуемом сообщении с поверхностью для синтеза; и по меньшей мере один боковой электрод, расположенный на боковой стенке каждой из лунок, причем по меньшей мере один боковой электрод находится на расстоянии от 50 нм до 200 нм от нижней области. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где твердая подложка содержит адресуемые локусы с плотностью по меньшей мере 100×10^6 адресуемых локусов на см^2 . Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где твердая подложка содержит адресуемые локусы с плотностью от 100×10^6 до 100×10^7 адресуемых локусов на см^2 . Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где адресуемый локус содержит диаметр до около 750 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок содержит глубину до около 1000 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок содержит глубину от

100 нм до 1000 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок содержит наибольший диаметр поперечного сечения от 100 нм до 800 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок является цилиндрической. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где нижний электрод содержит наибольшую площадь поперечного сечения от 10^4 нм² до 10^5 нм². Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где по меньшей мере один боковой электрод находится на расстоянии от 50 нм до 200 нм от нижней области. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где по меньшей мере один боковой электрод содержит высоту от 5 нм до 25 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, содержащие по меньшей мере два боковых электрода. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где по меньшей мере один боковой электрод и нижний электрод являются независимо адресуемыми.

[0004] В настоящем документе представлены устройства для хранения информации, предусматривающие: твердую подложку, причем твердая подложка содержит множество лунок, причем каждая из лунок содержит адресуемый локус, содержащий: поверхность для синтеза, расположенную в нижней области каждой из лунок; нижний электрод, находящийся в адресуемом сообщении с поверхностью для синтеза; по меньшей мере один боковой электрод, расположенный на боковой стенке каждой из лунок, причем поверхность для синтеза в каждом адресуемом локусе содержит по меньшей мере один полинуклеотид, удлиняющийся от поверхности для синтеза, и причем содержащие разные последовательности полинуклеотиды на твердой подложке присутствуют с плотностью по меньшей мере 100×10^6 полинуклеотидов на см². Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где твердая подложка содержит полинуклеотиды с разными последовательностями с плотностью по меньшей мере 100×10^7 полинуклеотидов на см². Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где твердая подложка содержит адресуемые локусы с плотностью от 100×10^6 до 100×10^7 полинуклеотидов на см². Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок содержит глубину до около 1000 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок содержит глубину от 100 нм до 1000 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где адресуемый локус содержит диаметр до около 750 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок содержит наибольший диаметр поперечного сечения от 100 нм до 800 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где каждая из лунок является цилиндрической. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где нижний электрод содержит

наибольшую площадь поперечного сечения от 10^4 нм² до 10^5 нм². Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где по меньшей мере один боковой электрод находится на расстоянии от 50 нм до 200 нм от нижней области. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где по меньшей мере один боковой электрод содержит высоту от 5 нм до 25 нм. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, содержащие по меньшей мере два боковых электрода. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где по меньшей мере один боковой электрод и основной электрод являются независимо адресуемыми.

[0005] В настоящем документе представлены способы хранения информации, предусматривающие: (a) обеспечение описанного в настоящем документе устройства; (b) обеспечение инструкций для синтеза полинуклеотидов; (c) внесение по меньшей мере одного нуклеотида на поверхность для синтеза, причем по меньшей мере один нуклеотид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности для синтеза; и (d) повторение стадии c) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности для синтеза, причем инструкции предусматривают по меньшей мере одну последовательность, кодирующую множество полинуклеотидов. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, дополнительно предусматривающие отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, дополнительно предусматривающие секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых нуклеотид предусматривает амидофосфит нуклеотида. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, дополнительно включающие стадию отщепления, причем стадия отщепления включает приложение электрического потенциала к нижнему электроду с целью генерации реагента для отщепления. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает высушивание поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, дополнительно предусматривающие смывание нуклеотидов с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию кэпирования. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию окисления. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию деблокирования, причем стадия деблокирования включает приложение электрического потенциала по меньшей

мере к одному боковому электроду с целью генерации реагента для снятия защитных групп.

[0006] В настоящем документе представлены способы хранения информации, предусматривающие: (а) обеспечение твердой подложки, содержащей поверхность; (b) внесение по меньшей мере одного нуклеозида на поверхность, причем по меньшей мере один нуклеозид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и (с) повторение стадии b) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем полинуклеотиды, имеющие разные последовательности, присутствуют на поверхности с плотностью по меньшей мере 100×10^6 полинуклеотидов на см^2 . Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых плотность адресуемых локусов на твердой подложке составляет по меньшей мере 100×10^7 полинуклеотидов на см^2 . Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых плотность адресуемых локусов на твердой подложке составляет от 100×10^6 до 100×10^7 полинуклеотидов на см^2 . Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых нуклеозид предусматривает амидофосфит нуклеозида. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает высушивание поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает смывание нуклеозидов с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию кэпирования. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию окисления. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию деблокирования.

[0007] В настоящем документе представлены способы хранения информации, предусматривающие: (а) обеспечение твердой подложки, содержащей поверхность; (b) внесение на поверхность капли, содержащей по меньшей мере один нуклеозид, причем по меньшей мере один нуклеозид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и (с) повторение стадии b) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем объем капли составляет менее чем около 100 фемтолитров. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в

которых объем капли составляет менее чем около 50 фемтолитров. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых объем капли составляет от менее чем около 25 фемтолитров до 100 фемтолитров. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых нуклеозид предусматривает амидофосфит нуклеозида. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает высушивание поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию кэпирования. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию окисления. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию деблокирования.

[0008] В настоящем документе представлены способы хранения информации, предусматривающие: (a) обеспечение твердой подложки, содержащей поверхность; (b) внесение по меньшей мере одного нуклеозида на поверхность, причем по меньшей мере один нуклеозид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и (c) повторение стадии b) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем время для повтора стадии b) с применением четырех разных нуклеотидов составляет менее чем около 100 миллисекунд. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых время для повтора стадии b) с применением четырех разных нуклеотидов составляет менее чем около 50 миллисекунд. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых время для повтора стадии b) с применением четырех разных нуклеотидов составляет от 25 миллисекунд до 100 миллисекунд. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, дополнительно предусматривающие секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых нуклеозид предусматривает амидофосфит нуклеозида. Кроме того, в настоящем документе представлены способы,

причем указанный способ дополнительно включает высушивание поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает смывание нуклеозидов с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию кэпирования. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию окисления. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает стадию деблокирования.

Включение посредством ссылки

[0009] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

[0010] Новые признаки настоящего изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет обеспечено со ссылкой на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы настоящего изобретения, и прилагаемые чертежи, в числе которых:

[0011] На **фиг. 1** показана иллюстративная последовательность выполняемых действий для хранения данных на основе нуклеиновых кислот.

[0012] На **фиг. 2** показан планшет, выполненный с возможностью синтеза полинуклеотидов, содержащий 24 области, или субполя, каждая из которых содержит массив из 256 кластеров.

[0013] На **фиг. 3** показано увеличенное изображение субполя из **фиг. 2** с кластерами 16×16 , причем каждый кластер содержит 121 отдельный локус.

[0014] На **фиг. 4** показано детализированное изображение кластера из **фиг. 2**, где кластер содержит 121 локус.

[0015] На **фиг. 5A** показан вид спереди планшета с множеством каналов.

[0016] На **фиг. 5B** показан вид в разрезе планшета с множеством каналов.

[0017] На **фигурах 6A-6B** представлена непрерывная петля и катушечные форматы для гибких структур.

[0018] На **фигурах 6С-6D** представлены схемы высвобождения и экстракции синтезированных полинуклеотидов.

[0019] На **фигурах 7А-7С** представлено увеличенное изображение гибкой структуры, содержащей пятна, каналы или лунки соответственно.

[0020] На **фиг. 8** показан пример компьютерной системы.

[0021] **Фиг. 9** представляет собой блок-схему, на которой показана архитектура компьютерной системы.

[0022] **Фиг. 10** представляет собой схему, на которой показана сеть, предназначенная для объединения множества компьютерных систем, множества мобильных телефонов и карманных персональных компьютеров, и сетевое устройство хранения данных (NAS).

[0023] **Фиг. 11** представляет собой блок-схему многопроцессорной компьютерной системы, в которой применяется общее пространство памяти виртуальной адресации.

[0024] **Фиг. 12А** представляет собой переднюю сторону иллюстративного массива на твердой подложке.

[0025] **Фиг. 12В** представляет собой заднюю сторону иллюстративного массива на твердой подложке.

[0026] **Фиг. 13** представляет собой схему твердой подложки, содержащей активную область и микрожидкостную поверхность контакта.

[0027] На **фиг. 14** представлен пример прибора в формате стойки.

[0028] На **фиг. 15** представлена твердая подложка, содержащая адресуемые области для синтеза или хранения нуклеиновых кислот.

[0029] На **фиг. 16А** представлен массив для синтеза с применением электрохимических процессов.

[0030] На **фиг. 16В** представлен массив для синтеза с применением электрохимических процессов.

[0031] На **фиг. 17** представлены лунки для синтеза или хранения нуклеиновых кислот и величина шага между лунками.

[0032] На **фиг. 18** показан пример твердой подложки, содержащей адресуемый массив.

[0033] На **фиг. 19** показан пример массива на твердой подложке, где шаг приблизительно равен длине 240-мерного полинуклеотида.

Подробное описание изобретения

[0034] Существует потребность в системах памяти большей емкости, поскольку количество генерируемой и хранимой информации увеличивается экспоненциально. Традиционные носители данных имеют ограниченную емкость, и для их производства требуются специализированные технологии, которые со временем меняются, что требует постоянного переноса данных на новые носители, зачастую с большими затратами. Биомолекула, такая как молекула ДНК, обеспечивает подходящий хост для хранения информации частично благодаря своей стабильности во времени и способности к четырехбитному кодированию информации, в отличие от традиционного бинарного кодирования информации. Таким образом, большие объемы данных кодируются в ДНК в относительно меньшем объеме физического пространства в сравнении с таковым, применяемым коммерчески доступными устройствами хранения информации. В настоящем документе представлены способы повышения производительности синтеза ДНК за счет увеличения плотности последовательностей и уменьшения обратного времени.

[0035] Определения

[0036] Если не указано иное, все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в данной области, к которой относятся настоящие изобретения.

[0037] Во всем настоящем раскрытии количественные признаки представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона предназначено лишь для удобства и краткости и не должно истолковываться как негибкое ограничение объема каких-либо вариантов осуществления. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно раскрывающее все возможные поддиапазоны, а также отдельные числовые значения в пределах диапазона до десятой доли единицы нижнего предела, если контекстом явно не указано иное. Например, описание диапазона, такого как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно раскрывающее поддиапазоны, такие 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. п., а также отдельные значения в пределах такого диапазона, например, 1,1, 2, 2,3, 5 и 5,9. Этот принцип применим независимо от ширины диапазона. Верхние и нижние пределы таких промежуточных диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны, и также охватываются настоящим изобретением, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. В случаях, когда указанный диапазон включает один или оба из пределов, диапазоны, исключаящие один из или оба из таких

включенных пределов, также включены в настоящее изобретение, если контекстом явно не указано иное.

[0038] Применяемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения какого-либо варианта осуществления. Подразумевается, что в контексте настоящего документа формы единственного числа включают также формы множественного числа, если контекстом явно не указано иное. Кроме того, следует понимать, что термины «включает» («включает», «предусматривает») и/или «включающий» («содержащий», «предусматривающий») при применении в настоящем описании определяют наличие указанных признаков, целых чисел, стадий, действий, элементов и/или компонентов, но не исключают наличие или добавление одного или более других признаков, целых чисел, стадий, действий, элементов, компонентов и/или их групп. В контексте настоящего документа термин «и/или» включает любые комбинации одного или более из связанных с ним перечисленных позиций.

[0039] Если специально не указано, или не очевидно из контекста, в контексте настоящего документа термин «приблизительно» по отношению к числу или диапазону чисел следует понимать как означающий указанные число и числа +/- 10% от них, или на 10% меньше нижнего указанного предела и на 10% больше верхнего указанного предела для значений, перечисленных в диапазоне.

[0040] В контексте настоящего документа термины «предварительно выбранная последовательность», «предопределенная последовательность» или «заданная последовательность» применяют взаимозаменяемо. Указанные термины означают, что последовательность полимера является известной и выбранной перед синтезом или сборкой полимера. В частности, различные аспекты настоящего изобретения описаны в настоящем документе, главным образом, по отношению к получению молекул нуклеиновых кислот, причем последовательность полинуклеотида известна и выбрана до синтеза или сборки молекул нуклеиновых кислот.

[0041] В настоящем документе представлены способы и композиции для получения синтетических (т. е. синтезированных *de novo* или химически синтезированных) полинуклеотидов. Полинуклеотиды также могут называться олигонуклеотидами или олиго. Полинуклеотидные последовательности, описанные в настоящем документе, если не указано иное, могут предусматривать ДНК или РНК.

[0042] Синтез и хранение нуклеиновых кислот на твердой подложке

[0043] В настоящем документе описаны устройства, композиции, системы и способы для синтеза и хранения нуклеиновых кислот на чипе. В некоторых случаях

полинуклеотиды синтезируют *de novo* с применением способов с использованием твердой подложки, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях полинуклеотиды после синтеза хранят на твердой подложке. В некоторых случаях описанные в настоящем документе способы с использованием твердой подложки применяют исключительно для хранения.

[0044] В настоящем документе описаны устройства, композиции, системы и способы для синтеза и хранения нуклеиновых кислот на твердой подложке, причем один или более компонентов синтезатора нуклеиновых кислот интегрированы в твердую подложку. Компоненты или функциональные эквиваленты компонентов могут предусматривать контроллеры температуры, адресуемые электроды, полупроводящие поверхности, резервуары для текучих сред, струйные элементы, поверхности для синтеза, источники питания или другой компонент, применяемый для синтеза полинуклеотидов. Любая комбинация интегрированных компонентов подходит для применения с описанными в настоящем документе устройствами, композициями, системами и способами. В некоторых случаях один или более компонентов находятся за пределами (не являются интегрированными) твердой подложки.

[0045] Плотность уникальных локусов для синтеза полинуклеотидов на поверхности зачастую контролируется за счет пространственного разрешения, обеспечиваемого внесением реагентов. Кроме того, для внесения реагентов в уникальные сайты требуется перемещение либо устройства для внесения реагентов, либо принимающей поверхности для перемещения сайта внесения реагентов от одного участка к другому. В качестве альтернативы, сочетание оснований локально контролируется в определенных сайтах на поверхности для синтеза без перемещения поверхности или устройства для внесения реагентов. Локальный контроль достигается благодаря массиву адресуемых электродов **1503**, причем каждый электрод контролирует сочетание нуклеозидов (амидофосфитов нуклеозидов) посредством электрохимических процессов в определенных локусах на поверхности **1505**. В некоторых случаях электрод представляет собой расположенный в нижней области основной электрод (или нижний электрод), находящийся в адресуемом сообщении с поверхностью для синтеза. В некоторых случаях электроды представляют собой боковые электроды, расположенные на боковой стенке лунки. Однако традиционный электрохимический метод на двумерной матрице в некоторых случаях ограничен величиной шага (см. **фиг. 19**). При высоких показателях плотности (например, в случае малого шага **1507**), длина растущих ДНК-олигонуклеотидов **1601** может достигать расстояния от одного сайта синтеза до смежных сайтов синтеза, что приводит к смешиванию дискретных продуктов реакции. Во

избежание смешивания смежных продуктов реакции, величину шага **1507**, согласно некоторым вариантам осуществления, увеличивают. Диффузия через реакционную среду **1901** является дополнительным фактором, который влияет на пространственный контроль синтеза полинуклеотидов. Таким образом, целесообразно изолировать активные сайты с целью достижения более высоких показателей плотности массива. Контроль сочетания нуклеозидов осуществляется с помощью локальных электродов посредством любого числа манипуляций, таких как генерация локальных реагентов, локальное удаление реагентов, отталкивание реагентов, ограничение объема растворителя, притяжение растворителя, или другой электрохимической или физической манипуляции, которая влияет на одну или более стадий в процессе сочетания оснований. В некоторых случаях для синтеза полинуклеотидов применяют устройство **1500**, предусматривающее планшет **1501** с лунками **1502** (см. **фиг. 15**). Дно **1505** каждой лунки содержит электрод **1503**, с которого синтезируются полинуклеотиды. Каждая лунка характеризуется диаметром поперечного сечения **1506** и величиной шага **1507** между любыми двумя лунками. Боковые стенки **1504** лунки в некоторых случаях содержат один или более боковых электродов (не показано).

[0046] Контроль сочетания в некоторых случаях осуществляется напрямую посредством контроля стадии добавления нуклеозида, стадии снятия защитных групп или другой стадии, которая влияет на эффективность реакции сочетания нуклеозидов. В некоторых случаях паттерн электродов заряжают с целью создания градиента концентрации ионов H^+ **1602** на определенных сайтах вблизи поверхности для синтеза (см. **фиг. 16A**); полинуклеотиды **1601** в таких сайтах являются незаблокированными (где полинуклеотид блокируют с помощью отщепляемой под действием кислоты блокирующей группы) и будут доступны для сочетания с нуклеозидами.

[0047] В настоящем документе описаны устройства, предусматривающие твердую подложку, причем твердая подложка содержит множество лунок, причем каждая из лунок содержит адресуемый локус, содержащий: поверхность для синтеза, расположенную в нижней области каждой из лунок; и по меньшей мере один боковой электрод, расположенный на боковой стенке каждой из лунок, причем электрохимическая генерация реагентов отделена в пространстве от точки присоединения полинуклеотида к поверхности для синтеза. В некоторых случаях описанные в настоящем документе устройства также содержат нижний электрод, находящийся в адресуемом сообщении с поверхностью для синтеза. Например, боковые электроды **1603** можно применять для контроля адгезии субстратов или реагентов (см. **фиг. 16B**). В некоторых случаях реагенты предусматривают протоны или другую кислую молекулу. В некоторых случаях боковые

электроды **1603** расположены в определенных местах по краям поверхности лунки (см. **фиг. 16В**) в случае лунки, характеризующейся глубиной **1604**. В некоторых случаях боковые электроды обеспечивают контроль химических реакций, протекающих вблизи поверхности для синтеза. Например, если кислота или другой реагент генерируются вблизи поверхности для синтеза, часть полинуклеотида **1601**, связанного с такой поверхностью, будет контактировать с более высокой концентрацией кислоты, чем часть полинуклеотида, который является дистальным по отношению к сайту генерации кислоты. Это может приводить к разрушению части полинуклеотида, который подвергнут воздействию более высоких концентраций кислоты. Боковые электроды **1603** в некоторых случаях создают градиент концентрации протонов **1602** или осуществляют его контроль, что обеспечивает в результате равномерное или направленное воздействие кислоты на часть полинуклеотида **1601**. Сайты вблизи незаряженных электродов не сочетаются с нуклеозидами, внесенными на поверхность для синтеза, и паттерн заряженных электродов изменяется до добавления следующего нуклеозида. Благодаря нанесению на поверхность серий контролируемых с помощью электродов масок, требуемые полинуклеотиды синтезируются в точных местоположениях на поверхности. Кроме того, локальный контроль сочетания в некоторых случаях обеспечивает сокращение стадий синтеза, уменьшение количества реагентов/материалов (благодаря более высокой плотности полинуклеотидов и уменьшенному масштабу) и сокращение времени синтеза (отсутствие перемещения поверхности для синтеза). Лунки в некоторых случаях содержат один, два, три, четыре или более четырех боковых электродов. В некоторых случаях лунки содержат два боковых электрода. В некоторых случаях каждый боковой электрод является независимо адресуемым. Например, к двум или более разным боковым электродам прикладывают разное напряжение. Такие схемы в некоторых случаях обеспечивают содействие диффузии реагентов или полинуклеотидов в определенной плоскости между двумя боковыми электродами. Такие боковые электроды в некоторых случаях являются кольцеобразными или расположены непрерывно по окружности поперечного сечения лунки. В некоторых случаях боковые электроды являются прерывистыми или только частично покрывают часть поверхности боковой стенки. Например, боковой электрод расположен непрерывно по около 5%, 10%, 15%, 30%, 50%, 75% или около 90% окружности поперечного сечения лунки. Такие боковые электроды в некоторых случаях характеризуются высотой, около равной высоте лунки, или составляющей около 5%, 10%, 15%, 30%, 50%, 75% или около 90% от высоты лунки. В некоторых случаях приложение разного напряжения независимо к двум или более прерывистым боковым электродам обуславливает диффузию реагентов или полинуклеотидов в горизонтальной плоскости. В

некоторых случаях приложение разного напряжения независимо к двум или более прерывистым боковым электродам обуславливает диффузию реагентов или полинуклеотидов в вертикальной плоскости.

[0048] Для синтеза полинуклеотидов в целом требуется повторяющееся внесение жидкостей (струйные элементы) на поверхность для синтеза и удаление указанного с нее. В некоторых случаях массовое перемещение текучей среды приводит к потере текучей среды (потери на смачивание, объема, расходуемого на пути перемещения или реакционные лунки), что приводит к низкой эффективности использования реагентов и увеличению продолжительности цикла за счет перемещения текучих сред. Альтернативой струйным элементам, обеспечивающим массовое перемещение текучих сред, в процессе синтеза является применение струйных элементов с цифровым управлением, причем реагенты или реакционные резервуары представлены в виде дискретных капель. Капли в некоторых случаях смешивают, перемещают (погружают, осуществляют реакцию), разделяют, хранят, добавляют, удаляют или анализируют в дискретных объемах путем манипуляции через поверхность, содержащую изолированные (или покрытые полупроводником) электроды, или посредством электрохимического смачивания. Электрохимическое смачивание обеспечивает локальный контроль взаимодействия текучая среда-поверхность; например, активация электрода вблизи капли приводит к разделению капли. В некоторых случаях описанные в настоящем документе капли имеют небольшой объем. Например, объем капли составляет до 10, 20, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 300, 500, 800 или более 1000 фемтолитров. В некоторых случаях объем капли составляет от около 50 до около 200 фемтолитров. В некоторых случаях струйные элементы с цифровым управлением обеспечивают в результате сокращение длительности цикла по меньшей мере в 2, 3, 4, 7, 10 или более 10 раз по сравнению со струйными элементами, обеспечивающими массовое перемещение текучих сред. В некоторых случаях струйные элементы с цифровым управлением обеспечивают в результате сокращение длительности цикла по меньшей мере в 2-10 раз по сравнению со струйными элементами, обеспечивающими массовое перемещение текучих сред. В некоторых случаях время выполнения одного цикла (последовательное сочетание 4 оснований, включая промывки) составляет около 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 30, 50, 100 или около 200 миллисекунд (мс). В некоторых случаях время выполнения одного цикла составляет до 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 30, 50, 100 или до 200 мс. В некоторых случаях время выполнения одного цикла составляет от около 10 до около 50 мс.

[0049] Перемещение жидкостей на описанных в настоящем документе поверхностях или за их пределами может предусматривать модификации или условия,

которые предотвращают нежелательное перемещение текучей среды или другое явление. Например, перемещение текучей среды в некоторых случаях приводит в результате к образованию пузырьков или скоплений газа, что ограничивает контакт текучих сред с компонентами, такими как поверхности или полинуклеотиды. Описанные в настоящем документе способы, системы и композиции предусматривают различные способы контроля или сведения к минимуму образования пузырьков. Такие способы включают контроль давления текучей среды, геометрию лунок или материалы/покрытия поверхностей. Определенная геометрия лунок может обеспечивать сведение к минимуму образование пузырьков. Например, сужение лунок, каналов или другой поверхности может обеспечивать снижение степени или предотвращение образования пузырьков в ходе движения текучей среды. Материалы поверхности, обладающие специфическими свойствами в отношении смачиваемости, могут обеспечивать снижение степени или предотвращение образования пузырьков. Например, описанные в настоящем документе поверхности содержат гидрофобные материалы. В некоторых случаях описанные в настоящем документе поверхности содержат гидрофильные материалы. Для контроля образования пузырьков в ходе перемещения текучей среды можно применять давление. Давление в некоторых случаях локально прикладывают к компоненту, площади поверхности, капилляру/каналу, или его прикладывают ко всей системе. В некоторых случаях давление прикладывают либо позади области перемещения текучей среды, либо перед ней. В некоторых случаях для предотвращения образования пузырьков прикладывают обратное давление. Подходящие показатели давления, применяемые для предотвращения образования пузырьков, могут варьироваться в зависимости от текучей среды, масштаба, геометрии потока и применяемых материалов. Например, в системе поддерживают давление от 5 до 10 атмосфер. В некоторых случаях прикладывают давление по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20 или более 50 атмосфер. В некоторых случаях прикладывают давление до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20 или до 50 атмосфер. В некоторых случаях прикладывают давление от около 2 до около 10, от около 2 до около 8, от около 2 до около 5, от около 4 до около 10, от около 4 до около 12, от около 5 до около 15, от около 5 до около 7, от около 7 до около 20, от около 8 до около 15 или от около 10 до около 20 атмосфер.

[0050] В описанных в настоящем документе устройствах могут использоваться контроллеры для регуляции окружающих условий, таких как температура. Контроллеры температуры зачастую применяют для создания или поддержания условий для хранения твердых подложек, содержащих полинуклеотиды. Условия хранения нуклеиновых кислот могут влиять на их долгосрочную стабильность, которая напрямую влияет на качество

извлекаемой информации, хранимой в цифровой форме. Полинуклеотиды необязательно хранят при низкой температуре (например, 10 градусов С, 4 градуса С, 0 градусов С или ниже) на твердой подложке, при этом такую температуру твердой подложки поддерживает контроллер температуры. Среда для хранения полинуклеотидов на твердой подложке, как, например, в сольватированной или сухой форме, также влияет на стабильность при хранении. В некоторых случаях полинуклеотиды хранят в растворе, таком как водный раствор или буфер, в виде капель. В некоторых случаях полинуклеотиды хранят в лиофилизированной форме (сухой). Контроллеры температуры в некоторых случаях повышают температуру чипа для содействия высушиванию присоединенных на нем полинуклеотидов. В некоторых случаях контроллеры температуры также обеспечивают локальный контроль нагревания в адресуемых местоположениях на твердой подложке. В некоторых случаях после добавления на твердую подложку содержащих полинуклеотиды капель твердую подложку сушат. В некоторых случаях содержимое высушенной твердой подложки впоследствии подвергают повторной сольватации. В некоторых случаях твердую подложку хранят для последующего применения. В некоторых случаях твердая подложка дополнительно содержит карту-схему полинуклеотидов. В некоторых случаях твердая подложка дополнительно предусматривает метаданные.

[0051] Описанные в настоящем документе устройства могут содержать источники питания, применяемые для подачи питания на различные компоненты устройства. Компоненты для синтеза на твердой подложке необязательно запитаны от внешнего источника питания, или источник питания интегрирован в твердую подложку. Источники питания могут включать батареи, солнечные батареи, термоэлектрогенераторы, индукционные (беспроводные) блоки питания, кинетическое зарядное устройство, сотовые телефоны, планшеты или другой источник питания, подходящий для применения с описанными в настоящем документе компонентами для синтеза или устройствами. В некоторых случаях описанные в настоящем документе компоненты для синтеза, поверхности или устройства являются портативными.

[0052] Текущие среды, содержащие реагенты, растворители для промывки или другие компоненты для синтеза, вносят на поверхность для синтеза. Неиспользованная текущая среда (до контакта с поверхностью для синтеза) или отработанная текущая среда (после контакта с поверхностью для синтеза) в некоторых случаях хранится в одном или более ячейках, интегрированных в твердую подложку. В качестве альтернативы, или в комбинации, полинуклеотиды помещают на твердую подложку или извлекают из нее для внешнего анализа или хранения. Например, синтезированные полинуклеотиды отщепляют

от локусов на твердой подложке в виде капли, причем полученную каплю перемещают за пределами участка синтеза на твердой подложке. В случае хранения каплю необязательно высушивают. В некоторых случаях текучие среды хранят за пределами твердой подложки. В некоторых случаях описанное в настоящем документе устройство содержит твердую подложку с множеством отверстий для текучей среды, которые обеспечивают перемещение текучих сред на твердую подложку или за ее пределы. В некоторых случаях отверстия упорядочены на боковых стенках твердой подложки, однако другие конфигурации также подходят для доставки текучих сред к поверхности для синтеза. Такое устройство зачастую содержит, например, по меньшей мере 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 или по меньшей мере 10000 отверстий на мм длины твердой подложки. В некоторых случаях описанное в настоящем документе устройство содержит от около 100 до около 5000 отверстий на мм длины твердой подложки.

[0053] В настоящем документе описаны адресуемые электроды, интегрированные в твердую подложку. Электроды без ограничения предусматривают проводники, изоляторы или полупроводники, и они выполнены из хорошо известных в данной области материалов. Материалы могут предусматривать металлы, неметаллы, смешанные оксиды металлов, нитриды, карбиды, материалы на кремниевой основе или другой материал. В некоторых случаях оксиды металлов включают TiO_2 , Ta_2O_5 , Nb_2O_5 , Al_2O_3 , BaO , Y_2O_3 , HfO_2 , SrO или другой известный в данной области оксид металла. В некоторых случаях карбиды металлов включают TiC , WC , ThC_2 , ThC , VC , W_2C , ZrC , HfC , NbC , TaC , Ta_2C или другой известный в данной области карбид металла. В некоторых случаях нитриды металлов включают GaN , InN , BN , Be_3N_2 , Cr_2N , MoN , Si_3N_4 , TaN , Th_2N_2 , VN , ZrN , TiN , HfN , NbC , WN , TaN или другой известный в данной области нитрид металла. В некоторых случаях раскрытое в настоящем документе устройство изготовлено с использованием комбинации материалов, перечисленных в настоящем документе, или любого другого известного в данной области подходящего материала.

Электроды могут быть любой формы, включая форму дисков, стержней, лунок, столбиков, практически плоскую форму или любую другую форму, подходящую для синтеза нуклеиновых кислот. Площадь поперечного сечения каждого электрода варьируется в зависимости от размера локусов для синтеза полинуклеотидов, при этом в некоторых случаях она составляет до 500 мкм^2 , 200 мкм^2 , 100 мкм^2 , 75 мкм^2 , 50 мкм^2 , 25 мкм^2 , 10 мкм^2 , менее 5 мкм^2 . В некоторых случаях площадь поперечного сечения каждого электрода составляет от около 500 мкм^2 до 10 мкм^2 , от около 100 мкм^2 до 25 мкм^2 или от около 150 мкм^2 до 50 мкм^2 . В некоторых случаях площадь поперечного сечения каждого электрода составляет от около 150 мкм^2 до 50 мкм^2 . Представленные в настоящем

документе устройства включают электроды с диаметром, который варьируется в зависимости от размера локусов для синтеза полинуклеотидов. Иллюстративные диаметры электрода включают без ограничения значения до 500 мкм, 200 мкм, 100 мкм, 75 мкм, 50 мкм, 25 мкм, 10 мкм, менее 5 мкм. В некоторых случаях диаметр каждого электрода составляет от около 500 мкм до 10 мкм, от около 100 мкм до 25 мкм, от около 100 мкм до около 200 мкм, от около 50 мкм до около 200 мкм или от около 150 мкм до 50 мкм. В некоторых случаях диаметр каждого электрода составляет от около 200 мкм до 50 мкм. В некоторых случаях диаметр каждого электрода составляет от около 200 мкм до 100 мкм. В некоторых случаях диаметр каждого электрода составляет до 500 нм, 200 нм, 100 нм, 75 нм, 50 нм, 25 нм, 10 нм, менее 5 нм. В некоторых случаях диаметр каждого электрода составляет от около 500 нм до 10 нм, от около 100 нм до 25 нм, от около 100 нм до около 200 нм, от около 50 нм до около 200 нм или от около 150 нм до 50 нм. В некоторых случаях диаметр каждого электрода составляет от около 200 нм до 50 нм. В некоторых случаях диаметр каждого электрода составляет от около 200 нм до 100 нм. Толщина каждого электрода варьируется в зависимости от размера локусов для синтеза полинуклеотидов, при этом в некоторых случаях она составляет около 50 нм, 100 нм, 200 нм, 500 нм, 750 нм, 1000 нм, 1200 нм, 1500 нм, 2000 нм, 2500 нм, 3000 нм или около 3500 нм. В некоторых случаях толщина электрода составляет по меньшей мере 50 нм, 100 нм, 200 нм, 500 нм, 750 нм, 1000 нм, 1200 нм, 1500 нм, 2000 нм, 2500 нм, 3000 нм или по меньшей мере 3500 нм. В некоторых случаях толщина электрода составляет по меньшей мере 1 мкм, 2 мкм, 3 мкм, 5 мкм, 10 мкм, 15 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 50 мкм или по меньшей мере 75 мкм. В некоторых случаях толщина электрода составляет около 1 мкм, 2 мкм, 3 мкм, 5 мкм, 10 мкм, 15 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 50 мкм или около 75 мкм. В некоторых случаях толщина электрода составляет до 1 мкм, 2 мкм, 3 мкм, 5 мкм, 10 мкм, 15 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 50 мкм или до 75 мкм. В некоторых случаях толщина электрода составляет до 50 нм, 100 нм, 200 нм, 500 нм, 750 нм, 1000 нм, 1200 нм, 1500 нм, 2000 нм, 2500 нм, 3000 нм или до 3500 нм. В некоторых случаях толщина электрода составляет от около 20 нм до 3000 нм, от около 50 нм до 2500, от около 100 нм до 750 нм, от около 400 нм до 750 нм, от около 500 нм до 3000 нм или от около 1000 нм до 3000 нм. В некоторых случаях толщина электрода составляет от около 10 мкм до около 20 мкм. В некоторых случаях толщина электрода составляет от около 5 мкм до около 50 мкм, от около 10 мкм до около 30 мкм, от около 15 мкм до около 25 мкм или от около 30 мкм до около 50 мкм. В некоторых случаях электроды покрыты дополнительными материалами, такими как полупроводники или изоляторы. В некоторых случаях электроды покрыты материалами для присоединения и синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях

размер, форма, паттерн или ориентация электродов подбираются с целью сведения к минимуму вредных побочных реакций, обусловленных электрохимически генерируемыми реагентами. В некоторых случаях применяют комбинации электродов, как, например, сетку адресуемых электродов и обычный электрод. В некоторых случаях электроды представляют собой катоды или аноды. Электроды или массивы электродов могут быть расположены в любом месте на поверхности с полинуклеотидами или вблизи нее. В некоторых случаях электроды размещены на дне локусов для синтеза, как, например, на дне лунки или канала. В некоторых случаях электроды размещены на боковых стенках лунки или канала («боковые электроды»). В некоторых случаях множество боковых электродов находятся на стенках лунки. Находящиеся в разных местоположениях электроды в устройстве могут выполнять разные функции и могут быть независимо или одновременно адресуемыми. В некоторых случаях электрод на дне лунки применяют для отщепления полинуклеотидов от поверхности в одном или более локусах, а боковой электрод применяют с целью генерации кислоты для снятия защитных групп с полинуклеотидов. В некоторых случаях электрод на дне лунки применяют для отщепления полинуклеотидов от поверхности в одном или более локусах, и первый боковой электрод применяют с целью генерации кислоты для снятия защитных групп с полинуклеотидов, и второй боковой электрод применяют для перемещения полинуклеотидов из лунки после отщепления. В иллюстративных конфигурациях боковые электроды расположены на расстоянии около 10 нм, около 25 нм, около 50 нм, около 75 нм, около 100 нм, около 125 нм или около 200 нм над поверхностью для синтеза. В некоторых случаях боковые электроды расположены на расстоянии от около 10 нм до около 100 нм, от около 50 нм до около 150 нм, от около 40 нм до 100 нм, от около 75 нм до около 125 нм, от около 100 до 300 нм над поверхностью для синтеза. В некоторых случаях несколько боковых электродов расположены на разной высоте над поверхностью для синтеза. Например, локус содержит по меньшей мере один боковой электрод, по меньшей мере 2 боковых электрода, по меньшей мере 3 боковых электрода или более 3 боковых электродов. В иллюстративных конфигурациях боковые электроды имеют высоту около 1 нм, около 5 нм, около 10 нм, около 20 нм, около 25 нм, около 30 нм, около 40 нм или около 50 нм. В некоторых случаях боковые электроды имеют высоту от 1 нм до 20 нм, от 2 нм до 30 нм, от 5 нм до 20 нм, от 10 нм до 40 нм или от 5 нм до 25 нм.

[0054] Поверхности электрода могут содействовать перемещению, поддержанию конформации, синтезу, росту и высвобождению полинуклеотидов. В некоторых случаях электроды покрыты одним или более слоями. В некоторых случаях слой представляет собой монослой, который облегчает присоединение линкера. В некоторых случаях

электрод заряжают с целью оказания воздействия на участок монослоя, подлежащего функционализации линкером. Это позволяет маскировать определенные участки для химической функционализации, такой как модификация поверхности гидрофобными или гидрофильными химическими группами. В некоторых случаях электрод заряжают с целью оказания воздействия на участок монослоя, где будет осуществляться удлинение с использованием нуклеозида в качестве мономера. В некоторых случаях такое воздействие включает обеспечение генерации реагентов для содействия или препятствия сочетанию мономеров с поверхностями для синтеза вблизи электрода. В некоторых случаях электрод заряжают с целью оказания воздействия на участок монослоя, из которого высвобождаются полинуклеотиды. В некоторых случаях такое контролируемое высвобождение определенных полинуклеотидов в определенном порядке применяют для контроля сборки синтезированных мономеров в более крупные полинуклеотиды. Например, процесс итеративной сборки полинуклеотидов оптимизируют путем изучения различных комбинаций полинуклеотидов, которые высвобождаются и могут гибридизоваться для сборки с использованием ПЦР с перекрыванием.

[0055] Каждый электрод может осуществлять контроль в отношении одного или множества разных локусов для синтеза, причем каждый локус для синтеза характеризуется определенной плотностью полинуклеотидов. В некоторых случаях плотность составляет по меньшей мере 1 олигонуклеотид на 10 нм^2 , 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 или по меньшей мере 1 олигонуклеотид на 10000 нм^2 . В некоторых случаях плотность составляет от около 1 олигонуклеотида на 10 нм^2 до около 1 олигонуклеотида на 5000 нм^2 , от около 1 олигонуклеотида на 50 нм^2 до около 1 олигонуклеотида на 500 нм^2 или от около 1 олигонуклеотида на 25 нм^2 до около 1 олигонуклеотида на 75 нм^2 . В некоторых случаях плотность полинуклеотидов составляет от около 1 олигонуклеотида на 25 нм^2 до около 1 олигонуклеотида на 75 нм^2 .

[0056] В настоящем документе представлены устройства для синтеза полинуклеотидов с различными типами электродов. В некоторых случаях устройство содержит эталонный электрод. Эталонные электроды размещают вблизи поверхности для синтеза или, в случае лунки или канала, например, над лункой или каналом. В некоторых случаях эталонный электрод находится на расстоянии от около 1 до около 50 мкм, от около 2 мкм до около 40 мкм, от около 3 мкм до около 30 мкм, от около 5 мкм до около 20 мкм, от около 10 до около 20 мкм, от около 15 до около 50 мкм, от около 30 до около 50 мкм, от около 5 мкм до около 30 мкм или от около 7 мкм до около 25 мкм над поверхностью для синтеза. В некоторых случаях эталонный электрод находится на расстоянии около 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 мкм или более 26 мкм над

поверхностью для синтеза. В некоторых случаях эталонный электрод находится на расстоянии до 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 мкм или до 26 мкм над поверхностью для синтеза. В некоторых случаях эталонный электрод находится на расстоянии по меньшей мере 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 мкм или по меньшей мере 26 мкм над поверхностью для синтеза. Эталонные электроды в некоторых случаях примыкают к поверхностям для синтеза, как, например, примыкают к лунке или каналу. В некоторых случаях каждый локус имеет один соответствующий эталонный электрод. В некоторых случаях каждый локус имеет общий эталонный электрод с одним или более смежными локусами. Описанные в настоящем документе устройства могут содержать любое число эталонных электродов. В некоторых случаях эталонный электрод представляет собой одиночную однородную пластинку. В некоторых случаях устройства содержат множество эталонных электродов. Эталонный электрод может быть связан с множеством локусов, например, 2, 3, 4, 5, 10 или более локусами.

[0057] В настоящем документе описаны устройства, композиции, системы и способы синтеза и хранения нуклеиновых кислот на твердой подложке, при этом твердая подложка характеризуется различными размерами. В некоторых случаях размер твердой подложки составляет от около 40 до 120 мм на от около 25 до 100 мм. В некоторых случаях размер твердой подложки составляет около 80 мм на около 50 мм. В некоторых случаях ширина твердой подложки составляет по меньшей мере или около 10 мм, 20 мм, 40 мм, 60 мм, 80 мм, 100 мм, 150 мм, 200 мм, 300 мм, 400 мм, 500 мм или более 500 мм. В некоторых случаях высота твердой подложки составляет по меньшей мере или около 10 мм, 20 мм, 40 мм, 60 мм, 80 мм, 100 мм, 150 мм, 200 мм, 300 мм, 400 мм, 500 мм или более 500 мм. В некоторых случаях твердая подложка характеризуется площадью плоской поверхности по меньшей мере или около 100 мм²; 200 мм²; 500 мм²; 1000 мм²; 2000 мм²; 4500 мм²; 5000 мм²; 10000 мм²; 12000 мм²; 15000 мм²; 20000 мм²; 30000 мм²; 40000 мм²; 50000 мм² или больше. В некоторых случаях толщина твердой подложки составляет от около 50 мм до около 2000 мм, от около 50 мм до около 1000 мм, от около 100 мм до около 1000 мм, от около 200 мм до около 1000 мм или от около 250 мм до около 1000 мм. Неограничивающие примеры значений толщины твердой подложки включают 275 мм, 375 мм, 525 мм, 625 мм, 675 мм, 725 мм, 775 мм и 925 мм. В некоторых случаях толщина твердой подложки составляет по меньшей мере или около 0,5 мм, 1,0 мм, 1,5 мм, 2,0 мм, 2,5 мм, 3,0 мм, 3,5 мм, 4,0 мм или более 4,0 мм.

[0058] В настоящем документе описаны устройства, где две или более твердых подложек являются сборными. В некоторых случаях твердые подложки соединены вместе на более крупном элементе. Соединение может предусматривать обмен текучими

средами, электрическими сигналами или обмен другими средами между твердыми подложками. Этот элемент может взаимодействовать с любым числом серверов, компьютеров или сетевых устройств. Например, множество твердых подложек интегрированы в стойко-место, которое удобно вставляется в серверную стойку или убирается из нее. Стойко-место может содержать любое число твердых подложек. В некоторых случаях стойко-место содержит по меньшей мере 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000 или более 100000 твердых подложек. В некоторых случаях две или более твердых подложек не соединены друг с другом. Стойко-место может обеспечивать доступ к нуклеиновым кислотам (и хранимой в них информации), находящимся на твердых подложках. См., например, **фиг. 14**. Доступ включает извлечение полинуклеотидов из твердых подложек, прямой анализ полинуклеотидов на твердой подложке или любой другой способ, который позволяет осуществлять манипуляции или идентификацию в отношении информации, хранимой в нуклеиновых кислотах. В некоторых случаях информация является доступной из множества стоек, одной стойки, одной твердой подложки из стойки, части твердой подложки или одного локуса на твердой подложке. В различных случаях доступ предусматривает обеспечение взаимодействия нуклеиновых кислот с дополнительными устройствами, такими как масс-спектрометры, приборы для HPLC, приборы для секвенирования, ПЦР-амплификаторы или другое устройство для манипуляций с нуклеиновыми кислотами. В некоторых случаях доступ к хранимой в нуклеиновых кислотах информации обеспечивается за счет отщепления полинуклеотидов от всей или части твердой подложки. В некоторых случаях отщепление предусматривает воздействие реагентов (аммиака или другого реагента), электрического потенциала, излучения, тепла, света, звука или другой формы энергии, способной воздействовать на химические связи. В некоторых случаях отщепление происходит в результате зарядки одного или более электродов вблизи полинуклеотидов. В некоторых случаях для отщепления полинуклеотидов применяют электромагнитное излучение в форме УФ-света. В некоторых случаях для отщепления полинуклеотидов применяют лампу, а маска обеспечивает места воздействия УФ-света на поверхность. В некоторых случаях для отщепления полинуклеотидов применяют лазер, а открытый/закрытый режим затвора обеспечивает контроль воздействия УФ-света на поверхность. В некоторых случаях доступ к хранимой в нуклеиновых кислотах информации (включая удаление/добавление стоек, твердых подложек, реагентов, нуклеиновых кислот или другого компонента) является полностью автоматизированным.

[0059] Описанные в настоящем документе твердые подложки содержат активный участок. В некоторых случаях активный участок содержит адресуемые области или локусы для синтеза нуклеиновых кислот. В некоторых случаях активный участок содержит адресуемые области или локусы для хранения нуклеиновых кислот.

Активный участок предусматривает различные размеры. Например, размер активного участка составляет от около 1 мм до около 50 мм на от около 1 мм до около 50 мм. В некоторых случаях активный участок предусматривает ширину по меньшей мере или около 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 или более 80 мм. В некоторых случаях активный участок предусматривает высоту по меньшей мере или около 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 или более 80 мм. Иллюстративный активный участок в пределах твердой подложки показан на **фиг. 13**. Блок **1307** содержит активный участок **1305** в пределах твердой подложки **1303**. Блок **1307** также содержит микрожидкостную поверхность контакта **1301**.

[0060] В настоящем документе описаны устройства, композиции, системы и способы синтеза и хранения нуклеиновых кислот на твердой подложке, при этом твердая подложка характеризуется определенным числом сайтов (например, пятен) или положений для синтеза или хранения. В некоторых случаях твердая подложка предусматривает до или около 10000 на 10000 положений в данном участке. В некоторых случаях твердая подложка предусматривает от около 1000 до 20000 на от около 1000 до 20000 положений в данном участке. В некоторых случаях твердая подложка предусматривает по меньшей мере или около 10, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 12000, 14000, 16000, 18000, 20000 положений на по меньшей мере или около 10, 30, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 12000, 14000, 16000, 18000, 20000 положений в данном участке. В некоторых случаях площадь участка составляет до 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 или 2,0 квадратных дюйма. В некоторых случаях твердая подложка содержит адресуемые локусы с величиной шага по меньшей мере или около 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 мкм. В некоторых случаях твердая подложка содержит адресуемые локусы с величиной шага около 5 мкм. В некоторых случаях твердая подложка содержит адресуемые локусы с величиной шага около 2 мкм. В некоторых случаях твердая подложка содержит адресуемые локусы с величиной шага около 1 мкм. В некоторых случаях твердая подложка содержит адресуемые локусы с величиной шага около 0,2 мкм. В некоторых случаях твердая подложка содержит адресуемые локусы с величиной шага от около 0,2 мкм до около 10 мкм, от около 0,2 до около 8 мкм, от около 0,5 до около 10 мкм, от

около 1 мкм до около 10 мкм, от около 2 мкм до около 8 мкм, от около 3 мкм до около 5 мкм, от около 1 мкм до около 3 мкм или от около 0,5 мкм до около 3 мкм. В некоторых случаях твердая подложка содержит адресуемые локусы с величиной шага от около 0,1 мкм до около 3 мкм. См, например, **фиг. 15**, **фиг. 16А** и **фиг. 16В**.

[0061] Описанная в настоящем документе твердая подложка для синтеза или хранения нуклеиновых кислот обладает высокой емкостью для хранения данных. Например, емкость твердой подложки составляет по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более 1000 петабайт. В некоторых случаях емкость твердой подложки составляет от около 1 до около 10 петабайт или от около 1 до около 100 петабайт. В некоторых случаях емкость твердой подложки составляет около 100 петабайт. В некоторых случаях данные хранят в виде адресуемых массивов блоков данных в виде капель. В некоторых случаях данные хранят в виде адресуемых массивов блоков данных в виде капель на пятне. В некоторых случаях данные хранят в виде адресуемых массивов блоков данных в высушенных лунках. В некоторых случаях данные хранят в виде адресуемых массивов блоков данных в высушенных лунках. В некоторых случаях адресуемые массивы содержат по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200 или более 200 гигабайт данных. В некоторых случаях адресуемые массивы содержат по меньшей мере или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200 или более 200 терабайт данных. В некоторых случаях элемент информации хранится в составе исходных данных. Например, в элементе информации закодировано от около 10 до около 100 мегабайт данных, и он хранится в 1 петабайте исходных данных. В некоторых случаях в элементе информации закодировано по меньшей мере или около 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500 или более 500 мегабайт данных, и он хранится в 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500 или более 500 петабайтах исходных данных.

[0062] В настоящем документе представлены устройства, композиции, системы и способы для синтеза и хранения нуклеиновых кислот на твердой подложке, причем после синтеза полинуклеотиды собраны в блоки данных в виде одной или более капель. В некоторых случаях полинуклеотиды собраны в блоки данных в виде одной или более капель и хранят. В некоторых случаях число капель составляет по меньшей мере или около 1, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 500, 1000, 2500, 5000, 75000, 10000, 25000, 50000, 75000, 100000, 1 миллион, 5 миллионов, 10 миллионов, 25 миллионов, 50 миллионов, 75 миллионов, 100 миллионов, 250 миллионов, 500 миллионов, 750 миллионов или более 750 миллионов капель. В некоторых случаях размер капли составляет 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или более 100 мкм (микрометр) в

диаметре. В некоторых случаях размер капли составляет 1-100 мкм, 10-90 мкм, 20-80 мкм, 30-70 мкм или 40-50 мкм в диаметре.

[0063] В некоторых случаях полинуклеотиды, собранные в блоки данных, содержат одинаковую последовательность. В некоторых случаях полинуклеотиды также содержат неидентичную последовательность, применяемую в качестве метки или штрихкода. Например, неидентичную последовательность применяют для обозначения полинуклеотидов, хранимых на твердой подложке, и для последующего поиска конкретных полинуклеотидов по отличающейся последовательности. Иллюстративная длина метки или штрихкода включает последовательности штрихкода, длина которых составляет без ограничения около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 или более оснований. В некоторых случаях длина метки или штрихкода составляет по меньшей мере или около 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400 или более 400 пар оснований.

[0064] В настоящем документе представлены устройства, композиции, системы и способы для синтеза и хранения нуклеиновых кислот на твердой подложке, причем полинуклеотиды собраны в блоки данных, характеризующиеся избыточностью. Например, блоки данных содержат от около 100 до около 1000 копий каждого полинуклеотида. В некоторых случаях блоки данных содержат по меньшей мере или около 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000 или более 2000 копий каждого полинуклеотида. В некоторых случаях блоки данных характеризуются от около 1000X до около 5000X избыточностью синтеза. В некоторых случаях избыточность синтеза составляет по меньшей мере или около 500X, 1000X, 1500X, 2000X, 2500X, 3000X, 3500X, 4000X, 5000X, 6000X, 7000X, 8000X или более 8000X. Полинуклеотиды, синтезированные с применением способов с использованием твердой подложки, как описано в настоящем документе, предусматривают различную длину. В некоторых случаях полинуклеотиды синтезируют и дополнительно хранят на твердой подложке. В некоторых случаях длина полинуклеотида находится в диапазоне от около 100 до около 1000 оснований. В некоторых случаях длина полинуклеотидов составляет по меньшей мере или около 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 2000 оснований.

[0065] Хранение информации на основе нуклеиновых кислот

[0066] В настоящем документе представлены устройства, композиции, системы и способы для хранения информации (данных) на основе нуклеиновых кислот. Иллюстративная последовательность выполняемых действий представлена на **фиг. 1**. На первой стадии получают **101** последовательность в цифровом виде, в которой закодирован

элемент информации (т. е. цифровая информация в форме бинарного кода для обработки компьютером). Схему шифрования **103** применяют для преобразования последовательности в цифровом виде из бинарного кода в последовательность нуклеиновой кислоты **105**. Подбирают **107** материал поверхности для удлинения нуклеиновой кислоты, конструкцию локусов для удлинения нуклеиновой кислоты (иначе, расположенные в определенном порядке пятна) и реагенты для синтеза нуклеиновых кислот. Готовят **108** поверхность структуры для синтеза нуклеиновых кислот. Осуществляют синтез **109** полинуклеотидов de novo. Синтезированные полинуклеотиды хранятся **111** и являются доступными для последующего высвобождения **113**, целиком или частично. После высвобождения полинуклеотиды, целиком или частично, поддаются секвенированию **115**, подвергают дешифрованию **117** с целью обратного преобразования последовательности нуклеиновой кислоты в последовательность в цифровом виде. Последовательность в цифровом виде затем собирают **119** с получением продукта выравнивания, в котором закодирован исходный элемент информации.

[0067] Элементы информации

[0068] Необязательно, начальная стадия процесса сохранения данных, раскрытого в настоящем документе, включает получение или прием одного или более элементов информации в форме исходного кода. Элементы информации включают без ограничения текстовую, аудио- и визуальную информацию. Иллюстративные источники элементов информации включают без ограничения книги, периодические издания, электронные базы данных, медицинскую документацию, письма, формы, записи речи, записи, связанные с животными, биологические профили, записи телерадиовещания, фильмы, короткие видео, электронные письма, бухгалтерию, журналы звонков, журналы данных, полученных в ходе пользования информационными ресурсами интернета, рисунки, картины, печати, фотографии, пиксельную графику и программный код. Иллюстративные источники элементов информации в случае биологического профиля включают без ограничения библиотеки генов, геномы, данные по экспрессии генов и данные по активности белков. Иллюстративные форматы элементов информации включают без ограничения .txt, .PDF, .doc, .docx, .ppt, .pptx, .xls, .xlsx, .rtf, .jpg, .gif, .psd, .bmp, .tiff, .png и .mpeg. Размеры отдельных файлов, в которых закодирован элемент информации, или множества файлов, в которых закодированы элементы информации, в цифровом формате, включают без ограничения размеры до 1024 байт (что равняется 1 КБ), 1024 КБ (что равняется 1 МБ), 1024 МБ (что равняется 1 ГБ), 1024 ГБ (что равняется 1 ТБ), 1024 ТБ (что равняется 1 ПБ), 1 эксабайта, 1 зеттабайта, 1 йоттабайта, 1 ксеноттабайта или больше. В некоторых случаях количество цифровой информации составляет по меньшей мере 1 гигабайт (ГБ). В

некоторых случаях количество цифровой информации составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более 1000 гигабайт. В некоторых случаях количество цифровой информации составляет по меньшей мере 1 терабайт (ТБ). В некоторых случаях количество цифровой информации составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более 1000 терабайт. В некоторых случаях количество цифровой информации составляет по меньшей мере 1 петабайт (ПБ). В некоторых случаях количество цифровой информации составляет по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более 1000 петабайт.

[0069] Структуры для синтеза полинуклеотидов

[0070] В настоящем документе представлены жесткие или гибкие структуры для синтеза полинуклеотидов. В случае жестких структур, в настоящем документе представлены устройства, имеющее структуру для создания библиотеки полинуклеотидов. В некоторых случаях структура представляет собой планшет. Иллюстративная структура **200** показана на **фиг. 2**, причем структура **200** характеризуется около такими же размерами, что и стандартный 96-луночный планшет: 140 мм на 90 мм. Структура **200** содержит кластеры, сгруппированные по 24 области или субполя **205**, причем каждое субполе **205** содержит массив из 256 кластеров **210**. Развернутый вид иллюстративного субполя **205** представлен на **фиг. 3**. В развернутом виде четырех кластеров (**фиг. 3**), единичный кластер **210** характеризуется шагом кластера по оси Y (расстояние от центра до центра смежных кластеров) 1079,210 мкм или 1142,694 мкм и шагом кластера по оси X 1125 мкм. Иллюстративный кластер **210** показан на **фиг. 4**, где шаг локусов по оси Y (расстояние от центра до центра смежных локусов) составляет 63,483 мкм, а шаг локусов по оси X составляет 75 мкм. Ширина локуса в самой длинной части, например, диаметр круглого локуса, составляет 50 мкм, а расстояние между локусами составляет 24 мкм. Число локусов **405** в иллюстративном кластере на **фиг. 4** составляет 121. Локусы могут представлять собой плоскую поверхность, лунки или каналы. Иллюстративное расположение каналов показано на **фигурах 5A-5B**, на которых показано, что планшет **505** содержит основной канал **510** и множество каналов **515**, соединенных с основным каналом **510**. Соединение между основным каналом **510** и множеством каналов **515** обеспечивает сообщение по текучей среде для путей потока от основного канала **510** к каждому из множества каналов **515**. Описанный в настоящем документе планшет **505** может содержать множество основных каналов **510**. Множество каналов **515** совместно образуют кластер в пределах основного канала **510**.

[0071] В случае гибких структур, в настоящем документе представлены устройства, где гибкая структура представляет собой непрерывную петлю **601**, намотанный вокруг одной или более зафиксированных структур, например, пары роликов **603**, или прерывающуюся гибкую структуру **607**, намотанную вокруг отдельных зафиксированных структур, например, пары катушек **605**. См. **фигуры 6А-6В**. В некоторых случаях структуры содержат множество областей для синтеза полинуклеотидов. Иллюстративная структура показана на **фиг. 6С**, где планшет содержит отдельные области **609** для синтеза полинуклеотидов. Отдельные области **609** могут быть разделены **611** путем отламывания или разрезания. Каждую из отдельных областей можно также высвободить, подвергнуть секвенированию, дешифрованию и считывать **613** или хранить **615**. Альтернативная структура показана на **фиг. 6D**, на которой лента содержит отдельные области **617** для синтеза полинуклеотидов. Отдельные области **617** могут быть разделены **619** путем отламывания или разрезания. Каждую из отдельных областей можно также высвободить, подвергнуть секвенированию, дешифрованию и считывать **621** или хранить **623**. В настоящем документе представлены гибкие структуры, содержащие поверхность с множеством локусов для удлинения полинуклеотидов. На **фигурах 7А-7С** показано увеличенное изображение локуса в составе гибкой структуры. Каждый локус на участке гибкой структуры **701** может представлять собой практически плоское пятно **703** (например, плоскую поверхность), канал **705** или лунку **707**. В некоторых случаях ширина каждого локуса структуры составляет около 10 мкм, а расстояние между центрами каждой структуры составляет около 21 мкм. Локусы могут иметь без ограничения круглую, прямоугольную, коническую или закругленную формы. В качестве альтернативы, или в комбинации, структуры являются жесткими. В некоторых случаях жесткие структуры содержат локусы для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях жесткие структуры содержат практически плоские области, каналы или лунки для синтеза полинуклеотидов.

[0072] В некоторых случаях описанная в настоящем документе лунка характеризуется соотношением ширины и глубины (или высоты) от 1 до 0,01, причем ширина является показателем ширины в самом узком сегменте лунки. В некоторых случаях описанная в настоящем документе лунка характеризуется соотношением ширины и глубины (или высоты) от 0,5 до 0,01, причем ширина является показателем ширины в самом узком сегменте лунки. В некоторых случаях описанная в настоящем документе лунка характеризуется соотношением ширины и глубины (или высоты) около 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,16, 0,2, 0,5 или 1. В настоящем документе представлены структуры для синтеза полинуклеотидов, содержащие множество дискретных локусов для синтеза полинуклеотидов. Иллюстративные структуры для локусов включают без ограничения

практически плоские области, каналы, лунки или выступы. Описанные в настоящем документе структуры могут содержать множество кластеров, причем каждый кластер содержит множество лунок, локусов или каналов. В качестве альтернативы, описанные в настоящем документе структуры могут предусматривать равномерное расположение лунок, локусов или каналов. Представленные в настоящем документе структуры могут содержать лунки с высотой или глубиной от около 5 мкм до около 500 мкм, от около 5 мкм до около 400 мкм, от около 5 мкм до около 300 мкм, от около 5 мкм до около 200 мкм, от около 5 мкм до около 100 мкм, от около 5 мкм до около 50 мкм или от около 10 мкм до около 50 мкм. В некоторых случаях высота лунки составляет менее 100 мкм, менее 80 мкм, менее 60 мкм, менее 40 мкм или менее 20 мкм. В некоторых случаях высота лунки составляет около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 мкм или больше. В некоторых случаях высота или глубина лунки составляет по меньшей мере 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более 1000 нм. В некоторых случаях высота или глубина лунки находится в диапазоне от около 10 нм до около 1000 нм, от около 25 нм до около 900 нм, от около 50 нм до около 800 нм, от около 75 нм до около 700 нм, от около 100 нм до около 600 нм или от около 200 нм до около 500. В некоторых случаях высота или глубина лунки находится в диапазоне от около 50 нм до около 1 мкм. В некоторых случаях высота лунки составляет около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 700, 800, 900 или около 1000 нм.

[0073] Представленные в настоящем документе структуры для синтеза полинуклеотидов могут содержать каналы. Каналы могут характеризоваться соотношением ширины и глубины (или высоты) от 1 до 0,01, причем ширина является показателем ширины в самом узком сегменте микроканала. В некоторых случаях описанный в настоящем документе канал характеризуется соотношением ширины и глубины (или высоты) от 0,5 до 0,01, причем ширина является показателем ширины в самом узком сегменте микроканала. В некоторых случаях описанный в настоящем документе канал характеризуется соотношением ширины и глубины (или высоты) около 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,16, 0,2, 0,5 или 1.

[0074] В настоящем документе описаны структуры для синтеза полинуклеотидов, содержащие множество дискретных локусов. Структуры без ограничения содержат практически плоские области, каналы, выступы или лунки для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях предусматривается, что описанные в настоящем документе структуры содержат множество каналов, причем высота или глубина канала составляет от около 5 мкм до около 500 мкм, от около 5 мкм до около 400 мкм, от около 5 мкм до около 300 мкм, от около 5 мкм до около 200 мкм, от около 5 мкм до около 100 мкм, от около

5 мкм до около 50 мкм или от около 10 мкм до около 50 мкм. В некоторых случаях высота канала составляет менее 100 мкм, менее 80 мкм, менее 60 мкм, менее 40 мкм или менее 20 мкм. В некоторых случаях высота канала составляет около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 мкм или больше. В некоторых случаях высота или глубина канала составляет по меньшей мере 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более 1000 нм. В некоторых случаях высота или глубина канала находится в диапазоне от около 10 нм до около 1000 нм, от около 25 нм до около 900 нм, от около 50 нм до около 800 нм, от около 75 нм до около 700 нм, от около 100 нм до около 600 нм или от около 200 нм до около 500. Описанные в настоящем документе каналы могут быть расположены на поверхности в пределах кластеров или в виде однородного поля.

[0075] Ширина локуса на поверхности описанной в настоящем документе структуры для синтеза полинуклеотидов может составлять от около 0,1 мкм до около 500 мкм, от около 0,5 мкм до около 500 мкм, от около 1 мкм до около 200 мкм, от около 1 мкм до около 100 мкм, от около 5 мкм до около 100 мкм или от около 0,1 мкм до около 100 мкм, например, около 90 мкм, 80 мкм, 70 мкм, 60 мкм, 50 мкм, 40 мкм, 30 мкм, 20 мкм, 10 мкм, 5 мкм, 1 мкм или 0,5 мкм. В некоторых случаях ширина локуса составляет менее чем около 100 мкм, 90 мкм, 80 мкм, 70 мкм, 60 мкм, 50 мкм, 40 мкм, 30 мкм, 20 мкм или 10 мкм. В некоторых случаях ширина локуса составляет по меньшей мере 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более 1000 нм. В некоторых случаях ширина локуса находится в диапазоне от около 10 нм до около 1000 нм, от около 25 нм до около 900 нм, от около 50 нм до около 800 нм, от около 75 нм до около 700 нм, от около 100 нм до около 600 нм или от около 200 нм до около 500. В некоторых случаях ширина локуса находится в диапазоне от около 50 нм до около 1000 нм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух смежных локусов составляет от около 0,1 мкм до около 500 мкм, от 0,5 мкм до около 500 мкм, от около 1 мкм до около 200 мкм, от около 1 мкм до около 100 мкм, от около 5 мкм до около 200 мкм, от около 5 мкм до около 100 мкм, от около 5 мкм до около 50 мкм или от около 5 мкм до около 30 мкм, например, около 20 мкм. В некоторых случаях общая ширина локуса составляет около 5 мкм, 10 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм или 100 мкм. В некоторых случаях общая ширина локуса составляет от около 1 мкм до 100 мкм, от 30 мкм до 100 мкм или от 50 мкм до 70 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами двух смежных локусов составляет от около 0,5 мкм до около 2 мкм, от 0,5 мкм до около 2 мкм, от около 0,75 мкм до около 2 мкм, от около 1 мкм до около 2 мкм, от около 0,2 мкм до около 1 мкм, от около 0,5 мкм до около 1,5 мкм, от около 0,5 мкм до около 0,8 мкм или от около 0,5 мкм до около 1 мкм, например, около 1 мкм. В некоторых

случаях общая ширина локуса составляет около 50 нм, 0,1 мкм, 0,2 мкм, 0,3 мкм, 0,4 мкм, 0,5 мкм, 0,6 мкм, 0,7 мкм, 0,8 мкм, 0,9 мкм, 1 мкм, 1,1 мкм, 1,2 мкм, 1,3 мкм, 1,4 мкм или 1,5 мкм. В некоторых случаях общая ширина локуса составляет от около 0,5 мкм до 2 мкм, от 0,75 мкм до 1 мкм или от 0,9 мкм до 2 мкм.

[0076] В некоторых случаях каждый локус является основой для синтеза популяции полинуклеотидов, имеющих последовательность, отличную от таковой у популяции полинуклеотидов, наращенных на другом локусе. В настоящем документе представлены поверхности, которые содержат по меньшей мере 10, 100, 256, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000 или более кластеров. В настоящем документе представлены поверхности, которые содержат более 2000; 5000; 10000; 20000; 30000; 50000; 100000; 200000; 300000; 400000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; 1000000; 5000000 или 10000000 или более отдельных локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 150, 200, 500 или более локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает от 50 до 500, от 50 до 200, от 50 до 150 или от 100 до 150 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает от 100 до 150 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает 109, 121, 130 или 137 локусов.

[0077] В настоящем документе представлены локусы с шириной в самом длинном сегменте от 5 до 100 мкм. В некоторых случаях локусы имеют ширину в самом длинном сегменте около 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 мкм. В некоторых случаях локусы представляют собой каналы с несколькими сегментами, причем расстояние между центрами каждого сегмента составляет от 5 до 50 мкм. В некоторых случаях расстояние между центрами каждого сегмента составляет около 5, 10, 15, 20 или 25 мкм.

В некоторых случаях число отдельных полинуклеотидов, синтезированных на поверхности описанной в настоящем документе структуры, зависит от числа отдельных локусов, доступных на подложке. В некоторых случаях плотность локусов в пределах кластера подложки составляет по меньшей мере или около 1 локус на мм^2 , 10 локусов на мм^2 , 25 локусов на мм^2 , 50 локусов на мм^2 , 65 локусов на мм^2 , 75 локусов на мм^2 , 100 локусов на мм^2 , 130 локусов на мм^2 , 150 локусов на мм^2 , 175 локусов на мм^2 , 200 локусов на мм^2 , 300 локусов на мм^2 , 400 локусов на мм^2 , 500 локусов на мм^2 , 1000 локусов на мм^2 , 10^4 локусов на мм^2 , 10^5 локусов на мм^2 , 10^6 локусов на мм^2 или больше. В некоторых случаях подложка содержит от около 10 локусов на мм^2 до около 500 локусов на мм^2 , от около 25 локусов на мм^2 до около 400 локусов на мм^2 , от около 50 локусов на мм^2 до около 500 локусов на мм^2 , от около 100 локусов на мм^2 до около

500 локусов на мм^2 , от около 150 локусов на мм^2 до около 500 локусов на мм^2 , от около 10 локусов на мм^2 до около 250 локусов на мм^2 , от около 50 локусов на мм^2 до около 250 локусов на мм^2 , от около 10 локусов на мм^2 до около 200 локусов на мм^2 или от около 50 локусов на мм^2 до около 200 локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит от около 10^4 локусов на мм^2 до около 10^5 локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит от около 10^5 локусов на мм^2 до около 10^7 локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит по меньшей мере 10^5 локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит по меньшей мере 10^6 локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит по меньшей мере 10^7 локусов на мм^2 . В некоторых случаях подложка содержит от около 10^4 локусов на мм^2 до около 10^5 локусов на мм^2 . В некоторых случаях плотность локусов в пределах кластера подложки составляет по меньшей мере или около 1 локус на мкм^2 , 10 локусов на мкм^2 , 25 локусов на мкм^2 , 50 локусов на мкм^2 , 65 локусов на мкм^2 , 75 локусов на мкм^2 , 100 локусов на мкм^2 , 130 локусов на мкм^2 , 150 локусов на мкм^2 , 175 локусов на мкм^2 , 200 локусов на мкм^2 , 300 локусов на мкм^2 , 400 локусов на мкм^2 , 500 локусов на мкм^2 , 1000 локусов на мкм^2 или больше. В некоторых случаях подложка содержит от около 10 локусов на мкм^2 до около 500 локусов на мкм^2 , от около 25 локусов на мкм^2 до около 400 локусов на мкм^2 , от около 50 локусов на мкм^2 до около 500 локусов на мкм^2 , от около 100 локусов на мкм^2 до около 500 локусов на мкм^2 , от около 150 локусов на мкм^2 до около 500 локусов на мкм^2 , от около 10 локусов на мкм^2 до около 250 локусов на мкм^2 , от около 50 локусов на мкм^2 до около 250 локусов на мкм^2 , от около 10 локусов на мкм^2 до около 200 локусов на мкм^2 или от около 50 локусов на мкм^2 до около 200 локусов на мкм^2 .

[0078] В некоторых случаях расстояние между центрами двух смежных локусов в пределах кластера составляет от около 10 мкм до около 500 мкм , от около 10 мкм до около 200 мкм или от около 10 мкм до около 100 мкм . В некоторых случаях расстояние между центрами двух смежных локусов превышает около 10 мкм , 20 мкм , 30 мкм , 40 мкм , 50 мкм , 60 мкм , 70 мкм , 80 мкм , 90 мкм или 100 мкм . В некоторых случаях расстояние между центрами двух смежных локусов составляет менее чем около 200 мкм , 150 мкм , 100 мкм , 80 мкм , 70 мкм , 60 мкм , 50 мкм , 40 мкм , 30 мкм , 20 мкм или 10 мкм . В некоторых случаях расстояние между центрами двух смежных локусов составляет менее чем около 10000 нм , 8000 нм , 6000 нм , 4000 нм , 2000 нм , 1000 нм , 800 нм , 600 нм , 400 нм , 200 нм , 150 нм , 100 нм , 80 нм , 70 нм , 60 нм , 50 нм , 40 нм , 30 нм , 20 нм или 10 нм . В некоторых случаях каждый квадратный метр описанной в настоящем документе структуры обеспечивает по меньшей мере 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} локусов, где каждый

локус несет один полинуклеотид. В некоторых случаях 10^9 полинуклеотидов содержатся на менее чем около 6, 5, 4, 3, 2 или 1 м² описанной в настоящем документе структуре.

[0079] В некоторых случаях описанная в настоящем документе структура обеспечивает основу для синтеза более 2000; 5000; 10000; 20000; 30000; 50000; 100000; 200000; 300000; 400000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; 1000000; 1200000; 1400000; 1600000; 1800000; 2000000; 2500000; 3000000; 3500000; 4000000; 4500000; 5000000; 10000000 или более неидентичных полинуклеотидов. В некоторых случаях структура обеспечивает основу для синтеза более 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; 10000000 или более полинуклеотидов, кодирующих отдельные последовательности. В некоторых случаях по меньшей мере часть полинуклеотидов имеет идентичную последовательность или сконструирована с возможностью синтеза с идентичной последовательностью. В некоторых случаях структура обеспечивает поверхностные условия для роста полинуклеотидов, имеющих по меньшей мере 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 или более оснований. В некоторых форматах описанные в настоящем документе структуры для синтеза полинуклеотидов содержат сайты для синтеза полинуклеотидов, расположенные равномерно.

[0080] В некоторых случаях полинуклеотиды синтезируют на отдельных локусах структуры, причем на каждом локусе синтезируется популяция полинуклеотидов. В некоторых случаях на каждом локусе синтезируется популяция полинуклеотидов с последовательностью, отличной от таковой в случае популяции полинуклеотидов, выращенных на другом локусе. В некоторых случаях локусы структуры расположены в пределах множество кластеров. В некоторых случаях структура 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 структура 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 каждый кластер включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 150 или более локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает от 50 до 500, от 100 до 150 или от 100 до 200 локусов. В некоторых случаях

каждый кластер включает 109, 121, 130 или 137 локусов. В некоторых случаях каждый кластер включает 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 локусов. В некоторых случаях полинуклеотиды из отдельных локусов в пределах одного кластера имеют последовательности, которые, после сборки, кодируют непрерывный более длинный полинуклеотид с заданной последовательностью.

[0081] Размер структуры

[0082] В некоторых случаях размер описанной в настоящем документе структуры около соответствует размеру пластинки (например, чипа), например, от около 40 до 120 мм на около 25-100 мм. В некоторых случаях описанная в настоящем документе структура имеет диаметр менее чем или равный около 1000 мм, 500 мм, 450 мм, 400 мм, 300 мм, 250 мм, 200 мм, 150 мм, 100 мм или 50 мм. В некоторых случаях диаметр подложки составляет от около 25 мм до 1000 мм, от около 25 мм до около 800 мм, от около 25 мм до около 600 мм, от около 25 мм до около 500 мм, от около 25 мм до около 400 мм, от около 25 мм до около 300 мм или от около 25 мм до около 200. Неограничивающие примеры размеров подложки включают около 300 мм, 200 мм, 150 мм, 130 мм, 100 мм, 84 мм, 76 мм, 54 мм, 51 мм и 25 мм. В некоторых случаях подложка характеризуется площадью плоской поверхности по меньшей мере 100 мм²; 200 мм²; 500 мм²; 1000 мм²; 2000 мм²; 4500 мм²; 5000 мм²; 10000 мм²; 12000 мм²; 15000 мм²; 20000 мм²; 30000 мм²; 40000 мм²; 50000 мм² или больше. В некоторых случаях толщина составляет от около 50 мм до около 2000 мм, от около 50 мм до около 1000 мм, от около 100 мм до около 1000 мм, от около 200 мм до около 1000 мм или от около 250 мм до около 1000 мм. Неограничивающие примеры толщины включают 275 мм, 375 мм, 525 мм, 625 мм, 675 мм, 725 мм, 775 мм и 925 мм. В некоторых случаях толщина составляет по меньшей мере или около 0,5 мм, 1,0 мм, 1,5 мм, 2,0 мм, 2,5 мм, 3,0 мм, 3,5 мм, 4,0 мм или более 4,0 мм. В некоторых случаях толщина варьируется в зависимости от диаметра и зависит от состава подложки. Например, толщина структуры, содержащей материалы, отличные от кремния, может отличаться от толщины структуры из кремния того же диаметра. Толщина структуры может определяться механической прочностью применяемого материала, и структура должна быть достаточно толстой, чтобы выдерживать собственный вес без растрескивания в ходе осуществления манипуляций. В некоторых случаях размер структуры составляет более чем около 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 30, 40, 50 футов в любом направлении.

[0083] Материалы

[0084] В настоящем документе представлены устройства, содержащие поверхность, причем поверхность модифицирована для обеспечения синтеза

полинуклеотидов в заданных местоположениях и с итоговой низкой частотой ошибок, низким коэффициентом отсева, высоким выходом и высокой представленностью олигонуклеотидов. В некоторых случаях поверхности устройств для представленного в настоящем документе синтеза полинуклеотидов выполнены из различных материалов, которые можно модифицировать для обеспечения реакции синтеза полинуклеотидов *de novo*. В некоторых случаях устройства являются достаточно проводящими, например, способны образовывать однородные электрические поля по всему устройству или его части. Описанные в настоящем документе устройства могут содержать гибкий материал. Иллюстративные гибкие материалы включают без ограничения модифицированный нейлон, немодифицированный нейлон, нитроцеллюлозу и полипропилен. Описанные в настоящем документе устройства могут содержать жесткий материал. Иллюстративные жесткие материалы включают без ограничения стекло, кварцевое стекло, кремний, диоксид кремния, нитрид кремния, пластмассы (например, политетрафторэтилен, полипропилен, полистирол, поликарбонат и их смеси, а также металлы (например, золото, платина). Раскрытые в настоящем документе устройства могут быть выполнены из материала, включающего кремний, полистирол, агарозу, декстран, полимеры на основе целлюлозы, полиакриламиды, полидиметилсилоксан (PDMS), стекло или любую их комбинацию. В некоторых случаях раскрытые в настоящем документе устройства изготовлены с использованием комбинации материалов, перечисленных в настоящем документе, или любого другого подходящего материала, известного в данной области.

[0085] Описанные в настоящем документе устройства могут содержать материал, характеризующийся диапазоном значений прочности на разрыв. Иллюстративные материалы, характеризующиеся диапазоном значений прочности на разрыв, включают без ограничения нейлон (70 МПа), нитроцеллюлозу (1,5 МПа), полипропилен (40 МПа), кремний (268 МПа), полистирол (40 МПа), агарозу (1-10 МПа), полиакриламид (1-10 МПа), полидиметилсилоксан (PDMS) (3,9-10,8 МПа). Описанные в настоящем документе твердые подложки могут характеризоваться прочностью на разрыв 1-300, 1-40, 1-10, 1-5 или 3-11 МПа. Описанные в настоящем документе твердые подложки могут характеризоваться прочностью на разрыв около 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 20, 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 270 или более МПа. В некоторых случаях описанное в настоящем документе устройство содержит твердую подложку для синтеза полинуклеотидов, выполненную из гибкого материала, который можно хранить в виде непрерывной петли или рулона, например, ленты или гибкого листового материала.

[0086] Модуль Юнга определяет способность материала к сопротивлению упругой (обратимой) деформации под нагрузкой. Иллюстративные материалы, характеризующиеся

диапазоном значений модуля Юнга для жесткости, включают без ограничения нейлон (3 ГПа), нитроцеллюлозу (1,5 ГПа), полипропилен (2 ГПа), кремний (150 ГПа), полистирол (3 ГПа), агарозу (1-10 ГПа), полиакриламид (1-10 ГПа), полидиметилсилоксан (PDMS) (1-10 ГПа). Описанные в настоящем документе твердые подложки могут характеризоваться значениями модуля Юнга 1-500, 1-40, 1-10, 1-5 или 3-11 ГПа. Описанные в настоящем документе твердые подложки могут характеризоваться значениями модуля Юнга около 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 20, 25, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 400, 500 ГПа или больше. Поскольку соотношение между гибкостью и жесткостью обратно пропорционально друг другу, гибкий материал характеризуется низким значением модуля Юнга и значительно меняет свою форму под нагрузкой. В некоторых случаях описанная в настоящем документе твердая подложка имеет поверхность с гибкостью, обеспечиваемой по меньшей мере нейлоном.

[0087] В некоторых случаях раскрытые в настоящем документе устройства содержат основу из диоксида кремния и поверхностный слой из оксида кремния. В качестве альтернативы, устройства могут иметь основу из оксида кремния. Поверхность представленного в настоящем документе устройства может быть текстурированной, что приводит к увеличению общей площади поверхности для синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях раскрытые в настоящем документе устройства могут содержать по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 80%, 90%, 95% или 99% кремния. В некоторых случаях раскрытые в настоящем документе устройства выполнены из пластины, изготовленной по технологии «кремний на изоляторе» (SOI).

[0088] Структура может быть выполнена из ряда материалов, подходящих для описанных в настоящем документе способов и композиций по настоящему изобретению. В определенных случаях материалы, из которых выполнены подложки/твердые подложки по настоящему изобретению, характеризуются низким уровнем связывания полинуклеотидов. В некоторых ситуациях можно использовать материал, который является проницаемым для видимого и/или УФ-света. Можно использовать материалы, которые являются достаточно проводящими, например таковые, способные образовывать однородные электрические поля по всей площади описанных в настоящем документе подложек/твердых подложек или ее части. В некоторых случаях такие материалы могут быть соединены с заземляющим устройством. В некоторых случаях подложка или твердая подложка могут быть теплопроводящими или изолированными. Материалы могут быть химически инертными и термоустойчивыми для обеспечения протекания химических или биохимических реакций, таких как серия реакций синтеза полинуклеотидов. В случае

гибких материалов, представляющие интерес материалы могут включать: нейлон, как модифицированный, так и немодифицированный, нитроцеллюлозу, полипропилен и т. д.

[0089] В случае жестких материалов, конкретные представляющие интерес материалы включают: стекло; кварцевое стекло; кремний, пластмассы (например, политетрафторэтилен, полипропилен, полистирол, поликарбонат и их смеси, и т. д.); металлы (например, золото, платина и т. д.). Структура может быть выполнена из материала, выбранного из группы, состоящей из кремния, полистирола, агарозы, декстрана, полимеров на основе целлюлозы, полиакриламидов, полидиметилсилоксана (PDMS) и стекла. Подложки/твердые подложки или микроструктуры, реакторы в них могут быть изготовлены из комбинации материалов, перечисленных в настоящем документе, или любого другого известного в данной области подходящего материала.

[0090] В некоторых случаях раскрытая в настоящем документе подложка содержит машиночитаемый объект. Машиночитаемые объекты включают без ограничения магнитный носитель, катушечную ленту, кассетную ленту, магнитную ленту, дискету, бумажный носитель, пленку, микрофишу, бесконечную ленту (например, конвейерную ленту) и любой носитель, подходящий для хранения электронных инструкций. В некоторых случаях подложка содержит магнитную катушечную ленту или магнитную полосу. В некоторых случаях подложка содержит гибкую печатную плату.

[0091] Описанные в настоящем документе структуры могут быть проницаемыми для видимого и/или УФ-света. В некоторых случаях описанные в настоящем документе структуры являются достаточно проводящими, чтобы образовывать однородные электрические поля по всей структуре или ее части. В некоторых случаях описанные в настоящем документе структуры являются теплопроводящими или изолированными. В некоторых случаях структуры являются химически инертными и термоустойчивыми для обеспечения протекания химической реакции, такой как синтез полинуклеотидов. В некоторых случаях подложка является магнитной. В некоторых случаях структуры содержат металл или металлический сплав.

[0092] Длина структур для синтеза полинуклеотидов может составлять более 1, 2, 5, 10, 30, 50 или более футов в любом направлении. В случае гибкой структуры, гибкую структуру необязательно хранят в намотанном состоянии, например, в виде рулона. В случае крупной жесткой структуры, длиной, например, более 1 фута, жесткую структуру можно хранить вертикально или горизонтально.

[0093] Подготовка поверхности

[0094] В настоящем документе представлены способы содействия иммобилизации биомолекулы на подложке, где поверхность описанной в настоящем документе структуры

содержит материал и/или покрыта материалом, который способствует реакции сочетания с биомолекулой с целью присоединения. Для подготовки структуры с целью иммобилизации биомолекулы можно использовать модификации поверхности, которые химически и/или физически изменяют поверхность подложки с помощью аддитивного или субтрактивного процесса с целью изменения одного или более химических и/или физических свойств поверхности подложки или выбранного сайта или области поверхности. Например, модификация поверхности включает (1) изменение смачиваемости поверхности, (2) функционализирование поверхности, т. е. внесение, модификацию или замену поверхностных функциональных групп, (3) дефункционализирование поверхности, т. е. удаление поверхностных функциональных групп, (4) другое изменение химического состава поверхности, например, посредством травления, (5) увеличение или уменьшение шероховатости поверхности, (6) нанесение покрытия на поверхность, например, покрытия, которое характеризуется смачиваемостью, отличной от смачиваемости поверхности, и/или (7) осаждение частиц на поверхности. В некоторых случаях поверхность структуры подвергают избирательной функционализации с целью получения двух или более отдельных участков на структуре, причем по меньшей мере один участок характеризуется поверхностью или химическим свойством, которые отличаются от таковых другого участка в пределах той же структуры. Такие свойства включают без ограничения поверхностную энергию, концевые группы химических веществ, концентрацию определенного химического вещества и т. д.

[0095] В некоторых случаях поверхность раскрытой в настоящем документе структуры модифицируют так, чтобы она содержала одну или более функционализированных активными средствами поверхностей, сконфигурированных с возможностью связывания как с поверхностью подложки, так и с биомолекулой, что обеспечивает возможность реакции сочетания с поверхностью. В некоторых случаях поверхность также подвергают функционализации с использованием пассивного материала, который не связывает эффективно биомолекулу, за счет чего предотвращается присоединение биомолекулы в сайтах, где связано пассивное средство для функционализации. В некоторых случаях поверхность содержит активный слой, определяющий границы только отдельных локусов, на которых будут содержаться биомолекулы.

[0096] В некоторых случаях поверхность приводят в контакт со смесью групп для функционализации, которые находятся в разном соотношении. В некоторых случаях смесь содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более разных типов средств для функционализации. В некоторых случаях соотношение в смеси по меньшей мере двух

типов средств для функционализации поверхности составляет около 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 2:10, 3:10, 4:10, 5:10, 6:10, 7:10, 8:10, 9:10 или представляет собой любое другое соотношение для достижения требуемого представления поверхностей двух групп. В некоторых случаях требуемые показатели поверхностного натяжения, смачиваемости, угла смачивания водой и/или угла смачивания для других подходящих растворителей достигаются путем обеспечения поверхности подложки средствами для функционализации в подходящем соотношении. В некоторых случаях средства в смеси выбирают из подходящих реакционноспособных и инертных веществ, разбавляя тем самым плотность реакционноспособных групп на поверхности до требуемого уровня для осуществления последующих реакций. В некоторых случаях смесь реагентов для функционализации содержит один или более реагентов, которые связываются с биомолекулой и одним или более реагентами, которые не связываются с биомолекулой. Следовательно, модуляция в отношении реагентов позволяет контролировать степень связывания биомолекулы, которое происходит в отдельном участке функционализации.

[0097] В некоторых случаях способ функционализации подложки предусматривает нанесение на поверхность подложки молекул силана. Молекулы силана могут быть нанесены на области подложки с высокой поверхностной энергией. В некоторых случаях область с высокой поверхностной энергией включает пассивный реагент для функционализации. В описанных в настоящем документе способах предусматривается, что силановая группа связывается с поверхностью, тогда как остальная часть молекулы обеспечивает некоторое расстояние от поверхности и наличие свободной гидроксильной группы на конце, к которой присоединяется биомолекула. В некоторых случаях силан представляет собой молекулу оргофункционального алкоксисилана. Неограничивающие примеры молекул оргофункциональных алкоксисиланов включают хлордиметилдоктадецилсилан, дихлорметилдоктадецилсилан, трихлордоктадецилсилан и триметилдоктадецилсилан, триэтилдоктадецилсилан. В некоторых случаях силан представляет собой аминосилан. Примеры аминосиланов включают без ограничения 11-ацетоксиундецилтриэтоксисилан, н-децилтриэтоксисилан, (3-аминопропил)триметоксисилан, (3-аминопропил)триэтоксисилан, глицидилоксипропил/триметоксисилан и N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксипиридин. В некоторых случаях силан предусматривает 11-ацетоксиундецилтриэтоксисилан, н-децилтриэтоксисилан, (3-аминопропил)триметоксисилан, (3-аминопропил)триэтоксисилан, глицидилоксипропил/триметоксисилан, N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксипиридин или любую их комбинацию. В некоторых случаях активное средство

для функционализации предусматривает 11-ацетоксиундецилтриэтоксисилан. В некоторых случаях активное средство для функционализации предусматривает н-децилтриэтоксисилан. В некоторых случаях активное средство для функционализации предусматривает глицидилоксипропилтриэтоксисилан (GOPS). В некоторых случаях силан представляет собой фторсилан. В некоторых случаях силан представляет собой углеводород-содержащий силан. В некоторых случаях силан представляет собой 3-йод-пропилтриметоксисилан. В некоторых случаях силан представляет собой октилхлорсилан.

[0098] В некоторых случаях силанизация осуществляется на поверхности посредством самосборки молекул оргонофункционального алкоксисилана. Оргонофункциональные алкоксисиланы классифицируются в соответствии с их функциями, свойственными органическим соединениям. Неограничивающие примеры реагентов для функционализации на основе силоксана включают гидроксиалкилсилоксаны (силилирование поверхности, функционализирование с использованием диборана и окисление спирта с помощью пероксида водорода), (дигидроксиалкил)-силоксандиолы (силилирование поверхности и гидролиз с образованием диола), аминоалкилсилоксаны (в случае аминов не требуется промежуточная стадия функционализирования), глицидоксисиланы (3-глицидоксипропил-диметил-этоксисилан, глицидокси-триметоксисилан), меркаптосиланы (3-меркаптопропил-триметоксисилан, 3-4-эпоксициклогексил-этилтриметоксисилан или 3-меркаптопропил-метил-диметоксисилан), бициклопентенил-трихлорсилан, бутил-альдегид-триметоксисилан или димерные вторичные аминоалкилсилоксаны. Иллюстративные гидроксиалкилсилоксаны включают аллилтрихлорсилан, превращающийся в 3-гидроксипропил, или 7-окт-1-енилтрихлорсилан, превращающийся в 8-гидроксиоктил. (Дигидроксиалкил)-силоксандиолы включают глицидилтриметоксисилан-производный (2,3-дигидроксипропилокси)пропил (GOPS). Аминоалкилсилоксаны включают 3-аминопропилтриметоксисилан, превращающийся в 3-аминопропил (3-аминопропил-триэтоксисилан, 3-аминопропил-диэтокси-метилсилан, 3-аминопропил-диметил-этоксисилан или 3-аминопропил-триметоксисилан). В некоторых случаях димерный вторичный аминоалкилсилоксан представляет собой бис-(3-триметоксисилилпропил)амин, превращающийся в бис-(силилоксипропил)амин.

[0099] Участки функционализации активными средствами могут содержать один или более разных видов силанов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более видов силана. В некоторых случаях один из одного или более видов силанов присутствует в составе композиции для функционализации в количестве, превышающем таковое другого вида силана. Например, смешанный раствор силанов, содержащий два вида силанов,

предусматривает соотношение одного вида силана и другого вида силана 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, 92:8, 91:9, 90:10, 89:11, 88:12, 87:13, 86:14, 85:15, 84:16, 83:17, 82:18, 81:19, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45. В некоторых случаях активное средство для функционализации предусматривает 11-ацетоксиундецилтриэтоксисилан и н-децилтриэтоксисилан. В некоторых случаях активное средство для функционализации предусматривает 11-ацетоксиундецилтриэтоксисилан и н-децилтриэтоксисилан в соотношении от около 20:80 до около 1:99, или от около 10:90 до около 2:98, или около 5:95.

[00100] В некоторых случаях функционализация предусматривает нанесение средства для функционализации на структуру с помощью любой методики нанесения, включая без ограничения химическое осаждение из газовой фазы (CVD), осаждение атомных слоев (ALD), плазменное CVD (PECVD), плазменное ALD (PEALD), CVD для осаждения металлоорганических соединений (MOCVD), каталитическое CVD (HWCVD), инициированное CVD (iCVD), модифицированное CVD (MCVD), осевое осаждение из газовой фазы (VAD), внешнее осаждение из газовой фазы (OVD), физическое осаждение из газовой фазы (например, осаждение методом распыления, осаждение из паровой фазы) и молекулярно-слоевое осаждение (MLD).

[00101] Любая стадия или компонент в нижеследующем способе функционализации могут быть пропущены или изменены в соответствии со свойствами, требуемыми для конечной функционализированной подложки. В некоторых случаях к изложенным в настоящем документе последовательностям действий в рамках способа добавляют дополнительные компоненты и/или стадии способа. В некоторых случаях подложку сперва очищают, например, с применением раствора «пиранья». Пример процесса очистки включает замачивание подложки в растворе «пиранья» (например, 90% H₂SO₄, 10% H₂O₂) при повышенной температуре (например, 120°C) и промывку (например, водой) и высушивание подложки (например, с использованием газообразного азота). Процесс необязательно включает обработку после очистки раствором «пиранья», предусматривающую замачивание обработанной раствором «пиранья» подложки в основном растворе (например, NH₄OH) с последующей промывкой водной средой (например, водой). В некоторых случаях поверхность структуры подвергают плазмохимической очистке, необязательно с последующим замачиванием в растворе «пиранья» и необязательной обработкой после очистки раствором «пиранья». Пример процесса плазмохимической очистки предусматривает травление в кислородной плазме. В некоторых случаях на поверхность наносят активное средство для функционализации с последующим выпариванием. В некоторых случаях подложку подвергают

функционализации активными средствами до очистки, например, путем обработки раствором «пиранья» и/или плазмохимической очистки.

[00102] Способ функционализации поверхности необязательно предусматривает покрытие резистом и снятие резиста. В некоторых случаях после функционализации поверхности активными средствами подложку путем центрифугирования покрывают резистом, например, позитивным фоторезистом SPR™ 3612. В различных случаях способ функционализации поверхности предусматривает литографию с функционализацией поверхности в виде паттерна. В некоторых случаях фотолитографию осуществляют после покрытия резистом. В некоторых случаях после литографии поверхность визуально проверяют на наличие дефектов литографии. В некоторых случаях способ функционализации поверхности предусматривает стадию очистки, посредством которой удаляются остатки из подложки, например, путем плазмохимической очистки или травления. В некоторых случаях стадию плазмохимической очистки осуществляют в ходе одной из стадий после осуществления стадии литографии.

[00103] В некоторых случаях поверхность, покрытую резистом, обрабатывают с целью удаления резиста, например, после функционализации и/или после литографии. В некоторых случаях резист удаляют с помощью растворителя, например, с помощью раствора для снятия резиста, содержащего N-метил-2-пирролидон. В некоторых случаях снятие резиста предусматривает обработку соникацией или ультразвуком. В некоторых случаях резист наносят и снимают, после чего проводят функционализацию активными средствами экспонированных участков для создания требуемого дифференциального паттерна функционализации.

[00104] В некоторых случаях описанные в настоящем документе способы и композиции предусматривают нанесение фоторезиста для получения модифицированных свойств поверхности в выбранных участках, причем нанесение фоторезиста основывается на свойствах поверхности в отношении взаимодействия с текучей средой, определяющих пространственное распределение фоторезиста. Не вдаваясь в теорию, эффекты поверхностного натяжения, связанные с наносимой текучей средой, могут определять характеристики потока фоторезиста. Например, поверхностное натяжение и/или капиллярные эффекты могут содействовать проникновению фоторезиста в маленькие структуры контролируемым образом до испарения растворителей резиста. В некоторых случаях точки контакта резиста фиксируются при взаимодействии с острыми краями, за счет чего обеспечивается контроль продвижения текучей среды. Базовые структуры могут быть сконструированы исходя из требуемых паттернов потока, которые применяются для нанесения фоторезиста в ходе процессов изготовления и функционализации. Твердый

органический слой, остающийся после испарения растворителей, можно применять для проведения последующих стадий процесса изготовления. Структуры могут быть сконструированы так, чтобы обеспечивался контроль потока текучих сред за счет содействия или ингибирования эффектов капиллярного затекания в соседние пути потока текучих сред. Например, структура сконструирована так, чтобы избегалось перекрытие между верхним и нижним краями, что содействует удержанию текучей среды в верхних структурах, что обеспечивает возможность определенного расположения резиста. Согласно альтернативному примеру верхний и нижний края перекрываются, что приводит к капиллярному затеканию нанесенной текучей среды в нижние структуры. Соответствующие конструкции могут быть соответственно выбраны в зависимости от требуемого применения резиста.

[00105] В некоторых случаях описанная в настоящем документе структура имеет поверхность, которая содержит материал толщиной по меньшей мере или около 0,1 нм, 0,5 нм, 1 нм, 2 нм, 5 нм, 10 нм или 25 нм, который предусматривает реакционноспособную группу, способную к связыванию нуклеозидов. Примеры включают без ограничения стекло и кремний, как, например, диоксид кремния и нитрид кремния. В некоторых случаях иллюстративные поверхности включают нейлон и PMMA.

[00106] В некоторых случаях для нанесения на поверхность паттерна применяют электромагнитное излучение в форме УФ-света. В некоторых случаях для нанесения на поверхность паттерна применяют лампу, а маска обеспечивает места воздействия УФ-света на поверхность. В некоторых случаях для нанесения на поверхность паттерна применяют лазер, а открытый/закрытый режим затвора обеспечивает контроль воздействия УФ-света на поверхность. Расположение лазера можно применять в сочетании с гибкой структурой, которая способна перемещаться. В таком формате, координату воздействия лазера и перемещения гибкой структуры применяют для создания паттернов из одного или более средств с отличающимися способностями в отношении сочетания нуклеозидов.

[00107] В настоящем документе описаны поверхности для синтеза полинуклеотидов, которые можно использовать повторно. После синтеза и/или отщепления полинуклеотидов поверхность можно обмывать, промывать, чистить, обжигать, подвергать травлению или иному способу функционального восстановления до состояния, подходящего для последующего синтеза полинуклеотидов. Количество раз повторного использования поверхности и способов возвращения в повторный цикл/подготовки поверхности для повторного использования варьируется в зависимости от последующих применений. Подготовленные к повторному использованию поверхности

в некоторых случаях используют повторно по меньшей мере 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100, 1000 или более раз. В некоторых случаях определяют или прогнозируют оставшийся «срок службы» поверхности или количество раз, подходящее для повторного использования поверхности.

[00108] Системы для внесения материалов

[00109] В некоторых случаях синтезированные полинуклеотиды хранят на подложке, например, твердой подложке. Реагенты-нуклеиновые кислоты можно вносить на поверхность подложки методом прерывающейся подачи или методом подачи по требованию. Примеры таких методов включают электромеханический метод переноса, электротермический метод переноса и метод на основе электростатического притяжения. В случае электромеханического метода переноса, пьезоэлектрические элементы, деформируемые электрическими импульсами, обуславливают выталкивание капель. В случае электротермического метода переноса, в камере устройства образуются пузырьки, и силы расширения пузырьков обуславливают выталкивание капель. В случае метода на основе электростатического притяжения, для выталкивания капель на подложку используется электростатическая сила притяжения. В некоторых случаях частота каплеобразования составляет от около 5 кГц до около 500 кГц; от около 5 кГц до около 100 кГц; от около 10 кГц до около 500 кГц; от около 10 кГц до около 100 кГц или от около 50 кГц до около 500 кГц. В некоторых случаях частота составляет менее чем около 500 кГц, 200 кГц, 100 кГц или 50 кГц.

[00110] Размер вносимых капель зависит от разрешения устройства. В некоторых случаях устройства обеспечивают внесение капель реагентов размером от около 0,01 пл до около 20 пл, от около 0,01 пл до около 10 пл, от около 0,01 пл до около 1 пл, от около 0,01 пл до около 0,5 пл, от около 0,01 пл до около 0,01 пл или от около 0,05 пл до около 1 пл. В некоторых случаях размер капли составляет менее чем около 1 пл, 0,5 пл, 0,2 пл, 0,1 пл или 0,05 пл.

[00111] В некоторых форматах конфигурация системы синтеза полинуклеотидов обеспечивает непрерывный процесс синтеза полинуклеотидов, в котором используется гибкость подложки для перемещения в процессе типа «с катушки на катушку». Такой процесс синтеза происходит в режиме непрерывной поточной линии, при этом подложка перемещается в ходе различных стадий синтеза полинуклеотидов с помощью одной или более катушек с изменением положения подложки. В иллюстративном случае реакция синтеза полинуклеотидов предусматривает прокручивание подложки: через ванну с растворителем, под устройством для внесения реагентов с целью внесения амидофосфитов, через ванну с окислительным средством, через ванну для промывки

ацетонитрилом и через ванну для деблокирования. Необязательно лента также проходит через ванну с реагентами для кэпирования. Процесс типа «с катушки на катушку» позволяет без труда собирать конечный продукт с подложки, содержащей синтезированные полинуклеотиды, на приемную катушку, откуда он может быть транспортирован для дальнейшей обработки или хранения.

[00112] В некоторых форматах синтез полинуклеотидов протекает в рамках непрерывного процесса, в ходе которого непрерывная гибкая лента перемещается по конвейерной системе. Подобно процессу типа «с катушки на катушку», синтез полинуклеотидов на непрерывной ленте происходит в режиме непрерывной поточной линии, при этом подложка перемещается в ходе различных стадий синтеза полинуклеотидов в процессе конвейерного передвижения. Однако в процессе с конвейерной системой непрерывная лента снова включается в стадию синтеза полинуклеотидов без накручивания и раскручивания ленты, как в процессе типа «с катушки на катушку». В некоторых форматах стадии синтеза полинуклеотидов разделены на зоны и непрерывная лента в конвейерном режиме проходит через каждую зону один или более раз за цикл. Например, реакция синтеза полинуклеотидов может предусматривать (1) прохождение подложки в конвейерном режиме через ванну с растворителем, под устройством для внесения реагентов с целью внесения амидофосфитов, через ванну с окислительным средством, через ванну для промывки ацетонитрилом и через ванну для снятия блокирующих групп за цикл; а затем (2) повторение циклов с получением синтезированных полинуклеотидов заданной длины. После синтеза полинуклеотидов гибкую подложку убирают с конвейерной системы и необязательно наматывают для хранения. Для хранения наматывание может осуществляться на катушку. В некоторых случаях гибкую подложку, содержащую термопластический материал, покрывают реагентом для сочетания нуклеозидов. Покрытие наносят в виде паттерна на локусы так, что каждый локус имеет диаметр около 10 мкм, при этом расстояние между центрами двух смежных локусов составляет около 21 мкм. В этом случае размер локуса достаточен для размещения неподвижной капли объемом 0,2 пл в ходе стадии синтеза полинуклеотидов с внесением реагентов. В некоторых случаях плотность локусов составляет около 2,2 миллиарда локусов на м² (1 локус/441 × 10⁻¹² м²). В некоторых случаях подложка площадью 4,5 м² содержат около 10 миллиардов локусов, каждый диаметром 10 мкм.

[00113] В некоторых форматах устройство для нанесения на подложку в ходе реакции синтеза одного или более реагентов выполнено с возможностью внесения реагентов и/или нуклеозидов в качестве мономеров для синтеза на основе использования

амидофосфитов нуклеозидов. Реагенты для синтеза полинуклеотидов включают реагенты для удлинения полинуклеотидов и промывочные буферы. В качестве неограничивающих примеров, устройство обеспечивает внесение реагентов для чистки, реагентов для реакций сочетания, реагентов для кэпирования, окислителей, средств для снятия блокирующих групп, ацетонитрила, газов, таких как газообразный азот, и любой их комбинации. Кроме того, устройство необязательно обеспечивает внесение реагентов для подготовки и/или поддержания целостности подложки. В некоторых случаях синтезатор полинуклеотидов обеспечивает внесение капли с диаметром менее чем около 200 мкм, 100 мкм или 50 мкм в объеме менее чем около 1000, 500, 100, 50 или 20 пл. В некоторых случаях синтезатор полинуклеотидов обеспечивает внесение от около 1 до 10000, от 1 до 5000, от 100 до 5000 или от 1000 до 5000 капель в секунду.

[00114] В настоящем документе описаны устройства, способы, системы и композиции, где реагенты для синтеза полинуклеотидов возвращаются в повторный цикл или применяются повторно. Возвращение реагентов в повторный цикл может предусматривать сбор, хранение и применением неиспользованных реагентов или очистку/преобразование применяемых реагентов. Например, ванну с реагентами возвращают в повторный цикл и применяют для осуществления стадии синтеза полинуклеотидов на той же или на другой поверхности. Описанные в настоящем документе реагенты можно возвращать в повторный цикл 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более раз. В качестве альтернативы, или в комбинации, раствор реагента, содержащий побочный продукт реакции, фильтруют с целью удаления побочного продукта, и раствор реагента применяют для дополнительных реакций синтеза полинуклеотидов.

[00115] В системах синтеза полинуклеотидов зачастую применяется множество интегрированных или неинтегрированных элементов. В некоторых случаях система синтеза полинуклеотидов содержит один или более элементов, пригодных для последующей обработки синтезированных полинуклеотидов. В качестве примера, система содержит элемент с контролем температуры, такой как термоциклер. В некоторых случаях элемент с контролем температуры применяют в отношении множества отдельных реакторов для осуществления сборки нуклеиновых кислот, например, с помощью РСА, и/или амплификации нуклеиновых кислот, например, с помощью ПЦР.

[00116] Синтез полинуклеотидов de novo

[00117] В настоящем документе представлены системы и способы для синтеза полинуклеотидов на подложке с высокой плотностью за короткие промежутки времени. В некоторых случаях подложка представляет собой гибкую подложку. В некоторых случаях за один день синтезируется по меньшей мере 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} оснований.

В некоторых случаях за один день синтезируется по меньшей мере 10×10^8 , 10×10^9 , 10×10^{10} , 10×10^{11} или 10×10^{12} полинуклеотидов. В некоторых случаях каждый синтезированный полинуклеотид содержит по меньшей мере 20, 50, 100, 200, 300, 400 или 500 азотистых оснований. В некоторых случаях эти основания синтезируются с общей средней частотой ошибок менее чем около 1 на 100; 200; 300; 400; 500; 1000; 2000; 5000; 10000; 15000; 20000 оснований. В некоторых случаях такие значения частоты ошибок наблюдаются по меньшей мере для 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% или более синтезированных полинуклеотидов. В некоторых случаях такие по меньшей мере 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% или более синтезированных полинуклеотидов не отличаются от заданной последовательности, которую они кодируют. В некоторых случаях частота ошибок для полинуклеотидов, синтезированных на подложке с применением описанных в настоящем документе способов и систем, составляет менее чем около 1 на 200. В некоторых случаях частота ошибок для полинуклеотидов, синтезированных на подложке с применением описанных в настоящем документе способов и систем, составляет менее чем около 1 на 1000. В некоторых случаях частота ошибок для полинуклеотидов, синтезированных на подложке с применением описанных в настоящем документе способов и систем, составляет менее чем около 1 на 2000. В некоторых случаях частота ошибок для полинуклеотидов, синтезированных на подложке с применением описанных в настоящем документе способов и систем, составляет менее чем около 1 на 3000. В некоторых случаях частота ошибок для полинуклеотидов, синтезированных на подложке с применением описанных в настоящем документе способов и систем, составляет менее чем около 1 на 5000. Отдельные типы ошибок включают ошибочные спаривания, делеции, вставки и/или замены в полинуклеотидах, синтезированных на подложке. Термин «частота ошибок» относится к сравнению общего количества синтезированных полинуклеотидов с совокупностью заданных полинуклеотидных последовательностей. В некоторых случаях раскрытые в настоящем документе синтезированные полинуклеотиды содержат привязку длиной от 12 до 25 оснований. В некоторых случаях привязка содержит 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более оснований.

[00118] В настоящем документе описаны способы, системы, устройства и композиции, где контроль химических реакций, применяемых в синтезе полинуклеотидов, осуществляется с применением электрохимических процессов. В некоторых случаях контроль электрохимических реакций осуществляется с использованием любого источника энергии, такого как свет, тепло, излучение или электричество. Например, электроды применяют для контроля химических реакций во всех или части дискретных

локусов на поверхности. В некоторых случаях электроды заряжают путем приложения электрического потенциала к электроду с целью контроля одной или более стадий химических реакций в процессе синтеза полинуклеотидов. В некоторых случаях такие электроды являются адресуемыми. В некоторых случаях с помощью одного или более электродов осуществляется контроль любого числа стадий химических реакций, описанных в настоящем документе. Электрохимические реакции могут предусматривать реакции окисления, восстановления, кислотно-основные реакции или другие реакции, контроль которых осуществляется с помощью электрода. В некоторых случаях электроды генерируют электроны или протоны, которые используются в качестве реагентов для химических превращений. В некоторых случаях электроды напрямую генерируют реагент, такой как кислота. В некоторых случаях кислота представляет собой протон. В некоторых случаях электроды напрямую генерируют реагент, такой как основание. Кислоты или основания зачастую применяют для отщепления защитных групп или оказания воздействия на кинетику различных реакций синтеза полинуклеотидов, например, путем корректировки pH раствора для реакций. В некоторых случаях электрохимически контролируемые реакции синтеза полинуклеотидов предусматривают редокс-активные металлы или другие редокс-активные органические вещества. В некоторых случаях для таких электрохимических реакций используют металлические или органические катализаторы. В некоторых случаях кислоты генерируются в результате окисления хинонов.

[00119] Контроль химических реакций не ограничивается электрохимической генерацией реагентов; на реакционную способность можно повлиять косвенно путем биофизических изменений субстратов или реагентов посредством электрических полей (или градиентов), генерируемых электродами. В некоторых случаях субстраты включают без ограничения нуклеиновые кислоты. В некоторых случаях генерируются электрические поля, которые отталкивают определенные реагенты или субстраты от электрода или поверхности или притягивают определенные реагенты или субстраты к электроду или поверхности. В некоторых случаях такие поля генерируются за счет приложения электрического потенциала к одному или более электродам. Например, отрицательно заряженные нуклеиновые кислоты отталкиваются от отрицательно заряженной поверхности электрода. В некоторых случаях такие отталкивания или притяжения полинуклеотидов или других реагентов, обусловленные действием локальных электрических полей, обеспечивают перемещение полинуклеотидов или других реагентов в область устройства или структуры для синтеза, или из нее. В некоторых случаях электроды генерируют электрические поля, которые отталкивают полинуклеотиды от

поверхности для синтеза, структуры, или устройства. В некоторых случаях электроды генерируют электрические поля, которые притягивают полинуклеотиды к поверхности для синтеза, структуре, или устройству. В некоторых случаях протоны отталкиваются от положительно заряженной поверхности с ограничением контакта протонов с подложками или их частями. В некоторых случаях силы отталкивания или притяжения используются для обеспечения или блокировки поступления реагентов или субстратов в определенные участки поверхности для синтеза. В некоторых случаях обеспечивают предотвращение контакта нуклеозидов в качестве мономеров с полинуклеотидной цепью путем приложения электрического поля вблизи одного или обоих компонентов. Такие схемы обеспечивают введение определенных реагентов, что может устранять необходимость в защитных группах, поскольку осуществляется контроль концентрации или степени контакта между реагентами и/или субстратами. В некоторых случаях для синтеза полинуклеотидов применяют нуклеозиды в качестве мономеров без защитных групп. В качестве альтернативы, приложение электрического поля вблизи одного или обоих компонентов стимулирует контакт нуклеозидов в качестве мономеров с полинуклеотидной цепью. Кроме того, приложение электрических полей к подложке может обеспечивать изменение реакционной способности или конформации субстратов. Согласно иллюстративному варианту применения электрические поля, генерируемые электродами, используются для предотвращения взаимодействия полинуклеотидов из смежных локусов. В некоторых случаях субстратом является полинуклеотид, необязательно присоединенный к поверхности. В некоторых случаях приложение электрического поля обеспечивает изменение трехмерной структуры полинуклеотида. Такие изменения предусматривают сворачивание или разворачивание различных структур, таких как спирали, шпильки, петли или другие 3-мерные структуры нуклеиновой кислоты. Такие изменения являются пригодными для проведения манипуляций с нуклеиновыми кислотами внутри лунок, каналов или других структур. В некоторых случаях электрические поля прикладывают к нуклеиновым кислотам в качестве субстрата для предотвращения образования вторичных структур. В некоторых случаях электрические поля устраняют необходимость в линкерах или присоединении к твердой подложке в ходе синтеза полинуклеотидов.

[00120] Подходящий способ синтеза полинуклеотидов на подложке по настоящему раскрытию представляет собой амидофосфитный способ, включающий контролируемое добавление амидофосфита в качестве структурного звена, т. е. амидофосфита нуклеозида, для наращивания полинуклеотидной цепи в ходе стадии сочетания, в результате которой образуется фосфитная триэфирная связь между амидофосфитом в качестве структурного

звена и нуклеозидом, связанным с подложкой. В некоторых случаях амидофосфит нуклеозида вносится на активированную подложку. В некоторых случаях амидофосфит нуклеозида вносится на подложку с активатором. В некоторых случаях амидофосфиты нуклеозидов вносятся 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 избытке или более по сравнению с количеством связанных с подложкой нуклеозидов. В некоторых случаях добавление амидофосфита нуклеозида осуществляют в безводной среде, например, в безводном ацетонитриле. После добавления и присоединения амидофосфита нуклеозида на стадии сочетания подложку необязательно промывают. В некоторых случаях стадию сочетания повторяют один или более дополнительных раз, необязательно со стадией промывки в промежутке между добавлениями на подложку амидофосфита нуклеозида. В некоторых случаях способ синтеза полинуклеотидов, применяемый в настоящем документе, предусматривает 1, 2, 3 или более последовательных стадий сочетания. Во многих случаях перед сочетанием нуклеозид, связанный с подложкой, подвергают снятию защитных групп путем удаления защитной группы, причем функция защитной группы состоит в предотвращении полимеризации. Защитные группы могут представлять собой любую химическую группу, которая препятствует удлинению полинуклеотидной цепи. В некоторых случаях защитную группу отщепляют (или удаляют) в присутствии кислоты. В некоторых случаях защитную группу отщепляют в присутствии основания. В некоторых случаях защитную группу удаляют под действием электромагнитного излучения, как, например, под действием света, тепла или другого источника энергии. В некоторых случаях защитную группу удаляют посредством реакции окисления или восстановления. В некоторых случаях защитная группа представляет собой триарилметильную группу. В некоторых случаях защитная группа представляет собой арильный эфир. В некоторых случаях защитная группа представляет собой дисульфид. В некоторых случаях защитная группа представляет собой неустойчивый к действию кислот силан. В некоторых случаях защитная группа представляет собой ацеталь. В некоторых случаях защитная группа представляет собой кеталь. В некоторых случаях защитная группа представляет собой енольный эфир. В некоторых случаях защитная группа представляет собой метоксибензильную группу. В некоторых случаях защитная группа представляет собой азид. В некоторых случаях защитная группа представляет собой 4,4'-диметокситритил (DMT). В некоторых случаях защитная группа представляет собой трет-бутилкарбонат. В некоторых случаях защитная группа представляет собой трет-бутиловый сложный эфир. В некоторых случаях защитная группа представляет собой неустойчивую к действию оснований группу.

[00121] После сочетания, амидофосфитные способы синтеза полинуклеотидов необязательно включают стадию кэпирования. На стадии кэпирования растущий полинуклеотид обрабатывают кэпирующим средством. Стадия кэпирования обычно предназначена для блокировки непрореагировавших связывающихся с подложкой 5'-ОН-групп после сочетания от дальнейшего удлинения цепи, что обеспечивает предотвращение образования полинуклеотидов с внутренними делециями оснований. Кроме того, амидофосфиты, активированные 1Н-тетразолом, зачастую в небольшой степени вступают в реакцию по Об-положению гуанозина. Не вдаваясь в теорию, при окислении I₂/водой, этот побочный продукт, вероятно, посредством Об-N7-миграции, подвергается депуринизации. Апуриновые сайты могут в конечном итоге подвергаться расщеплению в ходе окончательного снятия защитных групп с полинуклеотида, тем самым обуславливая снижение выхода полноразмерного продукта. Об-модификации могут быть устранены путем обработки реагентом для кэпирования перед окислением I₂/водой. В некоторых случаях включение стадии кэпирования в ходе синтеза полинуклеотидов обеспечивает уменьшение частоты ошибок в сравнении с синтезом без кэпирования. В качестве примера, стадия кэпирования включает обработку связанного с подложкой полинуклеотида смесью ангидрида уксусной кислоты и 1-метилимидазола. После стадии кэпирования подложку необязательно промывают.

[00122] После добавления амидофосфита нуклеозида и необязательно после осуществления кэпирования и одной или более стадий промывки, описанная в настоящем документе подложка содержит связанную растущую нуклеиновую кислоту, которую можно подвергать окислению. Стадия окисления включает окисление триэфира фосфитной кислоты до четырехкоординированного триэфира фосфатной кислоты, защищенного предшественника для образования встречающейся в природе фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. В некоторых случаях триэфиры фосфитной кислоты окисляют электрохимически. В некоторых случаях окисление растущего полинуклеотида достигается путем обработки йодом и водой, необязательно в присутствии слабого основания, такого как пиридин, лутидин или коллидин. Иногда окисление осуществляют в безводных условиях с применением трет-бутилгидропероксида или (1S)-(+)-(10-камфорсульфонил)-оксазиридина (CSO). В некоторых способах стадию кэпирования осуществляют после окисления. Вторая стадия кэпирования позволяет высушивать подложку, поскольку остаточная вода после окисления, которая может сохраняться, может препятствовать последующему сочетанию. После окисления подложку и растущий полинуклеотид необязательно промывают. В некоторых случаях стадию окисления заменяют стадией сульфуризации с целью получения тиофосфатов

полинуклеотидов, причем любые стадии кэпирования можно осуществлять после сульфуризации. К эффективному переносу серы способны многие реагенты, включая без ограничения 3-(диметиламинометилен)амино)-3Н-1,2,4-дитиазоле-3-тион, DDTT, 1,1-диоксид 3Н-1,2-бензодитиол-3-она, также известный как реагент Бокажа, и дисульфид N,N,N'N'-тетраэтилтиурама (TETD).

[00123] Чтобы последующий цикл включения нуклеозидов происходил посредством сочетания, защищенный 5'-конец (или 3'-конец, если синтез проводят в направлении от 5' к 3') связанного с подложкой растущего полинуклеотида удаляют, так что первичная гидроксильная группа может вступать в реакцию со следующим амидофосфитом нуклеозида. В некоторых случаях защитная группа представляет собой DMT, а деблокирование происходит с использованием трихлоруксусной кислоты в дихлорметане. В некоторых случаях защитная группа представляет собой DMT, а деблокирование происходит под действием электрохимически генерируемых протонов. Проведение детритилирования в течение более длительного промежутка времени или с использованием более сильных, чем рекомендуемые, растворов кислот, может приводить к повышенной степени депуринизации связанного с твердой подложкой полинуклеотида, и, таким образом, приводит к снижению выхода требуемого полноразмерного продукта. Способы и композиции, описанные в настоящем документе, обеспечивают контролируемые условия деблокирования, ограничивающие нежелательные реакции депуринизации. В некоторых случаях связанный на подложке полинуклеотид после деблокирования промывают. В некоторых случаях эффективная промывка после деблокирования способствует тому, что синтезированные полинуклеотиды характеризуются низкой частотой ошибок.

[00124] Описанные в настоящем документе способы синтеза полинуклеотидов на подложке могут включать повторяющуюся последовательность следующих стадий: внесение защищенного мономера на поверхность элемента подложки для связывания либо с поверхностью, либо с линкером, либо с мономером, с которого предварительно были сняты защитные группы; снятие защитных групп с внесенного мономера так, чтобы он мог вступать в реакцию с последующим внесенным защищенным мономером; и внесение другого защищенного мономера для связывания. Одна или более промежуточных стадий включают окисление и/или сульфуризацию. В некоторых случаях одну или более стадий промывки осуществляют до или после проведения одной или всех стадий.

[00125] Описанные в настоящем документе способы синтеза полинуклеотидов на подложке могут включать стадию окисления. Например, способы включают повторяющуюся последовательность следующих стадий: внесение защищенного

мономера на поверхность элемента подложки для связывания либо с поверхностью, либо с линкером, либо с мономером, с которого предварительно были сняты защитные группы; снятие защитных групп с внесенного мономера так, чтобы он мог вступать в реакцию с последующим внесенным защищенным мономером; внесение другого защищенного мономера для связывания и окисление и/или сульфуризация. В некоторых случаях одну или более стадий промывки осуществляют до или после проведения одной или всех стадий.

[00126] Описанные в настоящем документе способы синтеза полинуклеотидов на подложке могут дополнительно включать повторяющуюся последовательность следующих стадий: внесение защищенного мономера на поверхность элемента подложки для связывания либо с поверхностью, либо с линкером, либо с мономером, с которого предварительно были сняты защитные группы; снятие защитных групп с внесенного мономера так, чтобы он мог вступать в реакцию с последующим внесенным защищенным мономером; и окисление и/или сульфуризация. В некоторых случаях одну или более стадий промывки осуществляют до или после проведения одной или всех стадий.

[00127] Описанные в настоящем документе способы синтеза полинуклеотидов на подложке могут дополнительно включать повторяющуюся последовательность следующих стадий: внесение защищенного мономера на поверхность элемента подложки для связывания либо с поверхностью, либо с линкером, либо с мономером, с которого предварительно были сняты защитные группы; и окисление и/или сульфуризация. В некоторых случаях одну или более стадий промывки осуществляют до или после проведения одной или всех стадий.

[00128] Описанные в настоящем документе способы синтеза полинуклеотидов на подложке могут дополнительно включать повторяющуюся последовательность следующих стадий: внесение защищенного мономера на поверхность элемента подложки для связывания либо с поверхностью, либо с линкером, либо с мономером, с которого предварительно были сняты защитные группы; снятие защитных групп с внесенного мономера так, чтобы он мог вступать в реакцию с последующим внесенным защищенным мономером; и окисление и/или сульфуризация. В некоторых случаях одну или более стадий промывки осуществляют до или после проведения одной или всех стадий.

[00129] В некоторых случаях полинуклеотиды синтезируют с использованием фотолabileльных защитных групп, при этом гидроксильные группы, образующиеся на поверхности, блокируют с помощью фотолabileльных защитных групп. При воздействии на поверхность УФ-света, например, через фотолитографическую маску, можно получить паттерн свободных гидроксильных групп на поверхности. Такие гидроксильные группы

могут вступать в реакцию с фотозащищенными амидофосфитами нуклеозидов, в соответствии с амидофосфитной химией. Можно наносить вторую фотолитографическую маску, и поверхность можно подвергать воздействию УФ-света с получением второго паттерна гидроксильных групп, с последующим сочетанием с 5'-фотозащищенным амидофосфитом нуклеозида. Аналогичным образом, можно получать паттерны и удлинять олигомерные цепи. Не вдаваясь в теорию, лабильность фоторасщепляемой группы зависит от длины волны и полярности используемого растворителя, а скорость фоторасщепления может зависеть от продолжительности воздействия и интенсивности света. В этом способе может учитываться ряд факторов, таких как точность выравнивания масок, эффективность удаления фотозащитных групп и выход на стадии сочетания амидофосфитов. Кроме того, можно свести к минимуму непредвиденное проникновение света на соседние сайты. Плотность синтезированных олигомеров на пятне можно контролировать, регулируя загрузку лидерного нуклеозида на поверхность для синтеза.

[00130] Поверхность описанной в настоящем документе подложки, которая обеспечивает основу для синтеза полинуклеотидов, может быть химически модифицирована для обеспечения возможности отщепления синтезированной полинуклеотидной цепи от поверхности. В некоторых случаях полинуклеотидная цепь отщепляется одновременно со снятием с полинуклеотида защитных групп. В некоторых случаях полинуклеотидная цепь отщепляется после снятия с полинуклеотида защитных групп. Согласно иллюстративной схеме, триалкоксисилиламин, такой как $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{Si}(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$, вступает в реакцию с поверхностными SiOH-группами подложки, после чего осуществляется реакция янтарного ангидрида с амином с образованием амидной связи и свободной -ОН, на которой происходит рост цепи нуклеиновой кислоты. Отщепление включает отщепление с применением газа с использованием аммиака или метиламина. В некоторых случаях отщепление включает отщепление линкера с помощью генерируемых под действием электрического поля реагентов, таких как кислоты или основания. В некоторых случаях после высвобождения с поверхности полинуклеотиды подвергают сборке в более крупные нуклеиновые кислоты, которые подвергают секвенированию и дешифрованию для извлечения хранимой информации.

[00131] Описанные в настоящем документе поверхности после отщепления полинуклеотидов можно использовать повторно для проведения дополнительных циклов синтеза полинуклеотидов. Например, линкер можно использовать повторно без дополнительной обработки/химических модификаций. В некоторых случаях линкер связан с поверхностью подложки или полинуклеотидом нековалентно. Согласно некоторым вариантам осуществления линкер остается присоединенным к полинуклеотиду

после его отщепления от поверхности. Согласно некоторым вариантам осуществления линкеры содержат обратимые ковалентные связи, например, предусматривают сложные эфиры, амиды, кетали, бета-замещенные кетоны, гетероциклы или другие группы, которые можно обратимо отщеплять. В некоторых случаях контроль протекания таких обратимых реакций отщепления обеспечивается посредством добавления или удаления реагентов или за счет электрохимических процессов, контролируемых с помощью электродов. Необязательно химические линкеры или связанные с поверхностью химические группы регенерируют после проведения определенного числа циклов с целью восстановления реакционной способности и устранения образования нежелательных побочных продуктов на таких линкерах или связанных с поверхностью химических группах.

[00132] Сборка

[00133] Полинуклеотиды могут быть сконструированы так, чтобы совместно они охватывали большую область заданной последовательности, в которой закодирована информация. В некоторых случаях более крупные полинуклеотиды получают посредством реакций лигирования с соединением синтезированных полинуклеотидов. Одним из примеров реакции лигирования является полимеразная циклическая сборка (РСА). В некоторых случаях по меньшей мере часть полинуклеотидов сконструированы так, что они включают дополнительную область, которая является субстратом для связывания универсальных праймеров. В случае РСА-реакций, предварительно синтезированные полинуклеотиды включают области перекрытия друг с другом (например, перекрывающаяся последовательность составляет 4, 20, 40 или более оснований). В ходе циклов полимеразной реакции полинуклеотиды подвергаются отжигу с комплементарными фрагментами, а гэпы затем заполняются с помощью полимеразы. Таким образом, каждый цикл обеспечивает увеличение длины различных фрагментов случайным образом в зависимости от того, какие полинуклеотиды «находят» друг друга. Комплементарность между фрагментами обеспечивает образование полноразмерной двунитевой ДНК. В некоторых случаях после завершения РСА-реакции проводят стадию исправления ошибок с применением ферментов, вовлеченных в обнаружение и репарацию ошибочно спаренных нуклеотидов, с целью удаления ошибочно спаренных нуклеотидов из последовательности. После получения более крупных фрагментов целевой последовательности, они могут быть амплифицированы. В некоторых случаях, например, целевую последовательность, содержащую 5'- и 3'-концевые адаптерные последовательности, амплифицируют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), которая включает модифицированные праймеры, которые гибридизируются с

адаптерными последовательностями. В некоторых случаях модифицированные праймеры содержат одно или более урациловых оснований. Применение модифицированных праймеров позволяет удалять праймеры посредством ферментативных реакций, основывающихся на нацеливании на модифицированное основание и/или гэпы, оставляемые ферментами, которые отщепляют пару модифицированных оснований от фрагмента. В результате остается двунитевой продукт амплификации, в котором отсутствуют остатки адаптерной последовательности. Таким образом, множество продуктов амплификации можно получать параллельно с использованием одного и того же набора праймеров для получения разных фрагментов двунитевой ДНК.

[00134] Исправление ошибок можно осуществлять в отношении синтезированных полинуклеотидов и/или продуктов после сборки. Иллюстративная стратегия исправления ошибок включает сайт-направленный мутагенез с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами для исправления ошибок, которая необязательно сочетается с двумя или более раундами клонирования и секвенирования. В определенных случаях двунитевые нуклеиновые кислоты с ошибочно спаренными нуклеотидами, выпетливаниями и небольшими петлями, химически измененными основаниями и/или другими гетеродуплексами избирательно удаляют из популяций правильно синтезированных нуклеиновых кислот. В некоторых случаях исправление ошибок осуществляют с применением белков/ферментов, которые распознают и связываются с ошибочно спаренными или неспаренными основаниями или вблизи них в пределах двунитевых нуклеиновых кислот для создания одно- или двунитевого разрыва или для инициации события переноса цепи. Неограничивающие примеры белков/ферментов для исправления ошибок включают эндонуклеазы (эндонуклеаза I T7, эндонуклеаза V *E. coli*, эндонуклеаза VII T4, нуклеаза золотистой фасоли, *Celi*, эндонуклеаза IV *E. coli*, UVDE), ферменты рестрикции, гликозилазы, рибонуклеазы, ферменты, вовлеченные в репарацию ошибочно спаренных нуклеотидов, резольвазы, хеликазы, лигазы, антитела, специфические в отношении ошибочно спаренных нуклеотидов, и их варианты. Примеры конкретных ферментов для исправления ошибок включают эндонуклеазу 7 T4, эндонуклеазу 1 T7, S1, нуклеазу золотистой фасоли, MutY, MutS, MutH, MutL, Cleavase, CELI и HINF1. В некоторых случаях с целью удаления из популяции синтезированных продуктов неудачных продуктов применяют связывающий ошибочно спаренные нуклеотиды белок MutS (*Thermus aquaticus*). В некоторых случаях исправление ошибок осуществляют с применением фермента Correctase. В некоторых случаях исправление ошибок осуществляют с применением эндонуклеазы SURVEYOR (Transgenomic), специфичной в

отношении ошибочно спаренных нуклеотидов эндонуклеазы ДНК, которая «сканирует» гетеродуплекс ДНК на наличие известных и неизвестных мутаций и полиморфизмов.

[00135] Секвенирование

[00136] После экстракции и/или амплификации полинуклеотидов с поверхности структуры, можно использовать подходящую технологию секвенирования для секвенирования полинуклеотидов. В некоторых случаях ДНК-последовательность прочитывают на подложке или в пределах элемента структуры. В некоторых случаях полинуклеотиды, хранящиеся на подложке, экстрагируют, необязательно подвергают сборке в более крупные нуклеиновые кислоты, а затем секвенируют.

[00137] В полинуклеотидах, синтезированных и хранящихся на описанных в настоящем документе структурах, закодированы данные, которые могут быть расшифрованы с помощью прочтения последовательности синтезированных полинуклеотидов и преобразования последовательности в машиночитаемый бинарный код. В некоторых случаях для последовательностей требуется сборка, и может быть необходимо, чтобы стадия сборки осуществлялась на уровне последовательности нуклеиновой кислоты или на уровне последовательности в цифровом виде.

[00138] В настоящем документе представлены системы обнаружения, содержащие устройство, способное секвенировать хранящиеся полинуклеотиды или прямо на структуре, и/или после удаления из основной структуры. В тех случаях, когда структура представляет собой катушечную ленту из гибкого материала, система обнаружения содержит устройство для удержания и продвижения структуры через область обнаружения и детектор, расположенный рядом с областью обнаружения, для обнаружения сигнала, исходящего от отрезка ленты, когда указанный отрезок ленты находится в области обнаружения. В некоторых случаях сигнал указывает на наличие полинуклеотида. В некоторых случаях сигнал указывает на наличие последовательности полинуклеотида (например, флуоресцентный сигнал). В некоторых случаях информация, закодированная в полинуклеотидах на непрерывной ленте, считывается компьютером по мере того, как лента в конвейерном режиме проходит через детектор, функционально соединенный с компьютером. В некоторых случаях система обнаружения содержит компьютерную систему, содержащую устройство для секвенирования полинуклеотидов, базу данных для хранения и поиска данных, относящихся к полинуклеотидной последовательности, программное обеспечение для преобразования ДНК-кода полинуклеотидной последовательности в бинарный код, компьютер для чтения бинарного кода или любую комбинацию перечисленного.

[00139] В настоящем документе представлены системы секвенирования, которые могут быть интегрированы в описанные в настоящем документе устройства. Различные способы секвенирования хорошо известны в данной области и включают «распознавание азотистых оснований», при котором определяется идентичность основания в целевом полинуклеотиде. В некоторых случаях полинуклеотиды, синтезированные с применением описанных в настоящем документе способов, устройств, композиций и систем, секвенируют после отщепления от поверхности для синтеза. В некоторых случаях секвенирование происходит в ходе или одновременно с синтезом полинуклеотидов, причем распознавание азотистых оснований происходит сразу же после или непосредственно перед добавлением нуклеозида в качестве мономера в растущую полинуклеотидную цепь. Способы распознавания азотистых оснований включают измерение электрического тока, генерируемого в результате катализируемого полимеразой добавления оснований к нити матрицы. В некоторых случаях поверхности для синтеза содержат ферменты, такие как полимеразы. В некоторых случаях такие ферменты связаны с электродами или с поверхностью для синтеза.

[00140] Компьютерные системы

[00141] Согласно различным аспектам любые из описанных в настоящем документе систем функционально связаны с компьютером и необязательно автоматизированы за счет компьютера либо локально, либо удаленно. В различных случаях способы и системы по настоящему изобретению могут дополнительно предусматривать программы системы программного обеспечения для компьютерных систем и их применение. Соответственно, компьютеризированное управление для синхронизации функций дозирования/вакуума/пополнения, таких как управление и синхронизация движений устройства для внесения материала, осуществление дозирования и включения вакуума, находятся в пределах объема настоящего изобретения. В некоторых случаях компьютерные системы запрограммированы на соответствие между указанной пользователем нуклеотидной последовательностью и положением устройства для внесения материала для доставки надлежащих реагентов в указанные области подложки.

[00142] Компьютерная система **800**, проиллюстрированная на **фиг. 8**, может пониматься как логическое устройство, которое может считывать команды с носителя информации **811** и/или сетевого порта **805**, который необязательно может быть соединен с сервером **809**, содержащий несъемный носитель **812**. Система может включать ЦПУ **801**, дисковод **803**, необязательное устройство ввода, такое как клавиатура **815** и/или компьютерная мышь **816**, и необязательный монитор **807**. Передача данных может

обеспечиваться через указанный канал связи на сервер в локальном или удаленном местоположении. Канал связи может включать любые средства передачи и/или приема данных. Например, канал связи может представлять собой сетевое подключение, беспроводное подключение или подключение к сети Интернет. Такое подключение может обеспечить связь через всемирную паутину. Предполагается, что данные, относящиеся к настоящему раскрытию, могут передаваться через такие сети или соединения для приема и/или просмотра пользователем **822**.

[00143] **Фиг. 9** представляет собой блок-схему, на которой проиллюстрирован первый пример архитектуры компьютерной системы, которую можно использовать применительно к примерам настоящего изобретения. Как показано на **фиг. 5**, иллюстративная компьютерная система может включать процессор **902** для обработки команд. Неограничивающие примеры процессоров включают: Процессор Intel Xeon™, процессор AMD Opteron™, процессор 32-битной RISC-архитектуры ARM 1176JZ(F)-S v1.0™ от Samsung, процессор ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100™, процессор ARM Cortex-A8 Apple A4™, процессор Marvell PXA 930™ или функционально эквивалентный процессор. Для параллельной обработки можно применять множество потоков выполнения. В некоторых случаях можно также применять несколько процессоров или процессоры с несколькими ядрами, будь то в одной компьютерной системе, в кластере или распределенные по системам в пределах сети, состоящей из множества компьютеров, мобильных телефонов и/или карманных персональных компьютеров.

[00144] Как проиллюстрировано на **фиг. 9**, кэш **904** может быть соединен с процессором **902**, или может входить в его состав, для обеспечения быстродействующей памяти для команд или данных, которые применялись недавно, или которые часто применяются процессором **902**. Процессор **902** соединен с северным мостом **906** посредством шины процессора **908**. Северный мост **906** соединен с запоминающим устройством с произвольным доступом (RAM) **910** посредством шины памяти **912**, и управляет доступом к RAM **910** процессора **902**. Северный мост **906** также соединен с южным мостом **914** посредством внутренней шины **916**. Южный мост **914**, в свою очередь, соединен с периферийной шиной **918**. Периферийная шина может представлять собой, например, PCI, PCI-X, PCI Express или другую периферийную шину. Северный мост и южный мост часто называют чипсетом для процессора, и они управляют передачей данных между процессором, RAM и периферийными компонентами на периферийной шине **918**. В некоторых альтернативных архитектурах функционал северного моста может быть включен в процессор, вместо применения отдельного северного моста.

[00145] В некоторых случаях система **900** может включать акселератор **922**, присоединенный к периферийной шине **918**. Акселератор может включать программируемые пользователем вентиляемые матрицы (FPGA) или другие аппаратные средства для ускорения определенной обработки. Например, акселератор можно применять для адаптивной реструктуризации данных или для вычисления алгебраических выражений, применяемых при обработке расширенных множеств.

[00146] Программное обеспечение и данные хранятся на внешнем запоминающем устройстве **924**, и могут быть загружены в RAM **910** и/или кэш **904** для применения процессором. Система **900** включает операционную систему для управления системными ресурсами; неограничивающие примеры операционных систем включают: Linux, Windows™, MACOSTM, BlackBerry OSTM, iOSTM и другие функционально эквивалентны операционные системы, а также прикладное программное обеспечение, запускаемое на базе операционной системы, для управления хранением и оптимизацией данных в соответствии с иллюстративными вариантами осуществления настоящего изобретения.

[00147] Согласно этому примеру, система **900** также включает сетевые платы (NIC) **920** и **921**, соединенные с периферийной шиной, для обеспечения сетевых интерфейсов для внешнего запоминающего устройства, такого как сетевое устройство хранения данных (NAS), и других компьютерных систем, которые можно применять для распределенной параллельной обработки.

[00148] На фиг. **10** представляет собой схему, на которой показана сеть **1000** со множеством компьютерных систем **1002a** и **1002b**, множеством мобильных телефонов и карманных персональных компьютеров **1002c**, и сетевым устройством хранения данных (NAS) **1004a** и **1004b**. Согласно иллюстративным вариантам осуществления системы **1002a**, **1002b** и **1002c** могут обеспечивать управление хранением данных и оптимизацию доступа к данным в случае данных, хранящихся на сетевом устройстве хранения данных (NAS) **1004a** и **1004b**. Для данных можно применять математическую модель, и вычислять с применением распределенной параллельной обработки в пределах компьютерных систем **1002a** и **1002b**, и систем с использованием мобильных телефонов и карманных персональных компьютеров **1002c**. Компьютерные системы **1002a** и **1002b**, и системы с использованием мобильных телефонов и карманных персональных компьютеров **1002c**, также могут обеспечивать параллельную обработку для адаптивной реструктуризации данных для данных, хранящихся на сетевом устройстве хранения данных (NAS) **1004a** и **1004b**. На фиг. **10** представлен лишь пример, и по отношению к различным вариантам осуществления настоящего изобретения можно применять большое разнообразие других

компьютерных архитектур и систем. Например, для обеспечения параллельной обработки можно применять блейд-сервер. Блейд-серверы с процессорами могут быть соединены посредством объединительной платы для обеспечения параллельной обработки. Запоминающее устройство также может быть соединено с объединительной платой или, в виде сетевого устройства хранения данных (NAS), через отдельный сетевой интерфейс.

[00149] Согласно некоторым иллюстративным вариантам осуществления процессоры могут содержать отдельные пространства памяти и передавать данные через сетевые интерфейсы, объединительную плату или другие соединители для параллельной обработки другими процессорами. Согласно другим вариантам осуществления некоторые или все из процессоров могут применять общее пространство памяти виртуальной адресации.

[00150] Фиг. 11 представляет собой блок-схему многопроцессорной компьютерной системы **1100**, в которой применяется общее пространство памяти виртуальной адресации в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. Система включает множество процессоров **1102a-f**, которые могут иметь доступ к общей подсистеме памяти **1104**. Система включает в себя множество программируемых процессоров для алгоритмического управления аппаратной памятью (MAP) **1106a-f** в подсистеме памяти **1104**. Каждый MAP **1106a-f** может содержать память **1108a-f** и одну или более программируемых пользователем вентильных матриц (FPGA) **1110a-f**. MAP обеспечивает настраиваемый функциональный узел и конкретные алгоритмы, или части алгоритмов могут быть предоставлены FPGA **1110a-f** для обработки в тесной координации с соответствующим процессором. Например, MAP можно применять для вычисления алгебраических выражений в отношении модели данных и для осуществления адаптивной реструктуризации данных в иллюстративных вариантах осуществления. Согласно этому примеру, каждый MAP доступен всем процессорам для этих целей. В одной конфигурации, каждый MAP может применять прямой доступ к памяти (DMA) для доступа к ассоциативной памяти **1108a-f**, что позволяет ему выполнять задачи независимо и асинхронно от соответствующего микропроцессора **1102a-f**. В этой конфигурации MAP может передавать результаты напрямую к другому MAP для конвейеризации и параллельного выполнения алгоритмов.

[00151] Вышеприведенные компьютерные архитектуры и системы являются только примерами, и по отношению к иллюстративным вариантам осуществления можно применять большое разнообразие других архитектур и систем с использованием компьютеров, мобильных телефонов и карманных персональных компьютеров, включая системы с применением любой комбинации универсальных процессоров, сопроцессоров,

FPGA и других программируемых логических устройств, систем на кристалле (SOC), интегральных схем специального назначения (ASIC) и других обрабатывающих и логических элементов. Согласно некоторым вариантам осуществления вся или часть компьютерной системы может быть реализована программно или аппаратно. По отношению к иллюстративным вариантам осуществления можно применять любые различные носители данных, включая запоминающее устройство с произвольным доступом, жесткие диски, флэш-память, ленточные накопители, массив дисков, сетевое устройство хранения данных (NAS) и другие локальные или распределенные устройства и системы хранения данных.

[00152] Согласно иллюстративным вариантам осуществления компьютерная система может быть реализована с применением модулей программного обеспечения, работающих в рамках любой из вышеприведенных или других компьютерных архитектур и систем. Согласно другим вариантам осуществления функции системы могут быть реализованы частично или полностью во встроенном программном обеспечении, программируемых логических устройствах, таких как программируемые пользователем вентильные матрицы (FPGA), системы на кристалле (SOC), интегральные схемы специального назначения (ASIC) и другие обрабатывающие и логические элементы. Например, группа процессоров и оптимизатор могут быть реализованы с аппаратным ускорением посредством применения аппаратного акселератора.

[00153] Варианты осуществления

[00154] В настоящем документе представлены способы хранения информации, включающие: а) обеспечение структуры, содержащей поверхность; б) внесение по меньшей мере одного нуклеотида на поверхность, причем по меньшей мере один нуклеотид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и с) повторение стадии б) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем плотность размещения уникальных полинуклеотидов на поверхности составляет по меньшей мере 100×10^6 полинуклеотидов на см^2 . Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает высушивание поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает смывание нуклеотидов с

поверхности. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых поверхность представляет собой твердую подложку. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, в которых поверхность содержит стекло, кварцевое стекло, кремний, диоксид кремния, нитрид кремния, пластмассы, металлы или комбинации перечисленного.

[00155] В настоящем документе представлены способы хранения информации, включающие: а) обеспечение структуры, содержащей поверхность; б) внесение на поверхность капли, содержащей по меньшей мере один нуклеотид, причем по меньшей мере один нуклеотид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и с) повторение стадии б) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем объем капли составляет менее чем около 100 фемтолитров.

[00156] В настоящем документе представлены способы хранения информации, включающие: а) обеспечение структуры, содержащей поверхность; б) внесение по меньшей мере одного нуклеотида на поверхность, причем по меньшей мере один нуклеотид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и с) повторение стадии б) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем время для повтора стадии б) с применением четырех разных нуклеотидов составляет менее чем около 100 миллисекунд. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает одну или более стадий промывки. Кроме того, в настоящем документе представлены способы, причем указанный способ дополнительно включает деблокирование, окисление, промывку, кэпирование или любую их комбинацию.

[00157] В настоящем документе представлены устройства для хранения информации, содержащие: чип, содержащий массив адресуемых локусов, причем один или более адресуемых локусов содержат по меньшей мере один электрод, поверхность для синтеза и по меньшей мере одно отверстие для текучей среды, причем поверхность для синтеза в каждом из адресуемых локусов содержит по меньшей мере один полинуклеотид, удлиняющийся от поверхности, причем плотность адресуемых локусов на чипе составляет по меньшей мере 100×10^6 полинуклеотидов на см^2 . Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где длина по меньшей мере одного полинуклеотида составляет от около 150 до около 500 оснований. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где длина по меньшей мере одного полинуклеотида составляет около 200 оснований. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, причем указанное устройство дополнительно содержит резервуар для реагентов. Кроме того, в

настоящем документе представлены устройства, причем указанное устройство дополнительно содержит нагревательный или охлаждающий элемент. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где по меньшей мере один адресуемый локус содержит каплю. Кроме того, в настоящем документе представлены устройства, где диаметр капли составляет менее 50 микрон.

[00158] В настоящем документе представлены способы хранения информации, причем способ включает: а) преобразование по меньшей мере одного элемента информации в форме по меньшей мере одной последовательности в цифровом виде по меньшей мере в одну последовательность нуклеиновой кислоты; б) синтезирование множества полинуклеотидов с заданными последовательностями, совместно кодирующими по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты; в) внесение на поверхность капли, содержащей по меньшей мере один нуклеотид, причем по меньшей мере один нуклеотид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; д) повторение стадии в) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности; и е) хранение множества полинуклеотидов, причем объем капли составляет менее чем около 100 фемтолитров.

[00159] В настоящем документе представлены способы хранения информации, причем способ включает: а) преобразование по меньшей мере одного элемента информации в форме по меньшей мере одной последовательности в цифровом виде по меньшей мере в одну последовательность нуклеиновой кислоты; б) синтезирование множества полинуклеотидов с заданными последовательностями, совместно кодирующими по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты; в) внесение на поверхность капли, содержащей по меньшей мере один нуклеотид, причем по меньшей мере один нуклеотид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; д) повторение стадии в) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности; и е) хранение множества полинуклеотидов, причем время для повтора стадии в) с применением четырех разных нуклеотидов составляет менее чем около 100 миллисекунд.

[00160] В настоящем документе представлены способы синтеза полинуклеотидов, включающие: а) обеспечение структуры, содержащей поверхность, причем поверхность содержит множество локусов для удлинения полинуклеотидов; и б) синтезирование множества полинуклеотидов, удлиняющихся от поверхности, причем синтезирование включает внесение одного или более реагентов за счет приложения к поверхности потенциала. Также представлены способы, в которых потенциал

представляет собой электрический потенциал. Кроме того, документе представлены способы, в которых поверхность представляет собой твердую подложку.

[00161] В настоящем документе представлены устройства для хранения информации с применением любого из описанных в настоящем документе способов. В настоящем документе представлены системы для хранения информации с применением любого из описанных в настоящем документе способов.

[00162] Нижеследующие примеры изложены для более ясной иллюстрации принципа и осуществления на практике раскрытых в настоящем документе вариантов осуществления для специалистов в данной области, и не должны истолковываться как ограничивающие объем какого-либо из заявленных вариантов осуществления. Если не указано иное, все части и процентные доли представлены по весу.

Примеры

[00163] Пример 1. Функционализация поверхности устройства.

[00164] Устройство функционализировали для обеспечения присоединения и синтеза библиотеки полинуклеотидов. Поверхность устройства сперва подвергали влажной очистке с применением раствора «пиранья», содержащего 90% H_2SO_4 и 10% H_2O_2 в течение 20 минут. Устройство промывали в нескольких лабораторных стаканах с DI-водой, выдерживали под водопроводным краном со струей DI-воды в течение 5 мин и сушили N_2 . Устройство затем замачивали в NH_4OH (1:100; 3 мл:300 мл) в течение 5 мин, промывали DI-водой с применением ручного дозатора-пистолета, последовательно замачивали в трех лабораторных стаканах с DI-водой в течение 1 мин каждый раз, а затем снова промывали DI-водой с применением ручного дозатора-пистолета. Затем устройство подвергали плазмохимической очистке путем воздействия на поверхность устройства O_2 . Прибор SAMCO PC-300 применяли для травления O_2 -плазмой при 250 Вт в течение 1 мин в нисходящем режиме.

[00165] Очищенную поверхность устройства подвергали функционализации активными средствами с использованием раствора, содержащего N-(3-триэтоксисилилпропил)-4-гидроксипиридин, с применением системы YES-1224P для осаждения из газовой фазы с использованием следующих параметров: 0,5-1 торр, 60 мин, 70°C, температура испарителя 135°C. Поверхность устройства покрывали резистом с применением прибора для нанесения растворов центрифугированием Brewer Science 200X. Устройство путем центрифугирования покрывали фоторезистом SPR™ 3612 при 2500 об/мин в течение 40 сек. Устройство предварительно обжигали в течение 30 мин при 90°C на нагревательной пластине прибора Brewer. Устройство подвергали

фотолитографии с применением масочного фотолитографа Karl Suss MA6. Устройство экспонировали в течение 2,2 сек и проявляли в течение 1 мин в MSF 26A. Оставшийся проявитель вымывали с помощью ручного дозатора-пистолета, и устройство замачивали в воде в течение 5 мин. Устройство обжигали в течение 30 мин при 100°C в сушильном шкафу с последующей визуальной проверкой на наличие дефектов литографии с применением Nikon L200. Процесс очистки применяли для удаления остаточного резиста с применением прибора SAMCO PC-300 для травления O₂-плазмой при 250 Вт в течение 1 мин.

[00166] Поверхность устройства подвергали функционализации пассивными средствами с использованием 100 мкл раствора перфтороктилтрихлорсилана, смешанного с 10 мкл легкого минерального масла. Устройство помещали в камеру, прокачивали в течение 10 мин, а затем клапан, ведущий к насосу, перекрывали, и оставляли устройство на 10 мин. Камера вентилировалась воздухом. Устройство подвергали процедуре снятия резиста путем осуществления двух замачиваний в течение 5 мин в 500 мл NMP при 70°C с ультразвуковой обработкой при максимальной мощности (9 в системе Crest). Затем устройство замачивали в течение 5 мин в 500 мл изопропанола при комнатной температуре с ультразвуковой обработкой при максимальной мощности. Устройство погружали в 300 мл этанола крепостью 200 пруф и продували N₂. Функционализированная поверхность была активирована для функционирования в качестве подложки для синтеза полинуклеотидов.

[00167] Пример 2. Высокоточное хранение и сборка информации на основе ДНК.

[00168] Цифровая информация, выбранная в форме бинарных данных общим объемом около 0,2 Гб, включала содержание Всеобщей декларации прав человека более чем на 100 языках, топ-100 книг из проекта «Гутенберг» и базу данных семян. Цифровая информация была зашифрована в последовательность нуклеиновой кислоты и разделена на строки. На жесткой кремниевой поверхности было синтезировано более 10 миллионов неидентичных полинуклеотидов, каждый из которых соответствует определенной строке. Длина каждого неидентичного полинуклеотида равнялась 200 или менее основаниям. Синтезированные полинуклеотиды собирали и секвенировали и дешифровали обратно в цифровой код, при этом при сравнении с исходной по меньшей мере одной последовательностью в цифровом виде, точность исходной цифровой информации составляла 100%.

[00169] Пример 3. Система хранения информации высокой плотности.

[00170] Полинуклеотиды синтезируют *de novo* с помощью описанных в настоящем документе способов. После синтеза полинуклеотиды собирают в виде одной капли и переносят для хранения на твердую подложку из кремния. Твердая подложка имеет размеры 86 мм × 54 мм, а ее толщина составляет 1–2 мм. Емкость твердой подложки составляет 1-10 петабайт (ПБ), представленных в виде адресуемого массива блоков данных по 10 гигабайт. Физическое разделение на блоки данных избыточно кодируется в виде ведущей последовательности, причем каждый полинуклеотид в блоке данных имеет общую начальную последовательность и любую другую информацию о последовательности для обозначения или поиска. Блоки данных представлены в виде капель воды с растворенными полинуклеотидами, с физической избыточностью 100-1000 копий каждого полинуклеотида. Длина полинуклеотидов находится в диапазоне 100-1000 оснований. Объем капли эквивалентен сферам диаметром 40-50 мкм. Твердая подложка также предусматривает до 10000 × 10000 положений на участке площадью менее квадратного дюйма.

[00171] Иллюстративная твердая подложка показана на **фигурах 12А-12В**. На **фиг. 12А** показана передняя сторона твердой подложки, выполненная из стекла и содержащая прозрачное окно для массива и отверстий для текучей среды. На **фиг. 12В** показана задняя сторона твердой подложки, которая представляет собой электронную схему, содержащую электрические контакты (LGA с шагом между контактами 1 мм) и поверхность теплового контакта под участком, соответствующим твердой подложке.

[00172] После добавления на твердую подложку каплю, твердую подложку можно подвергать сушке, а позже повторной сольватации для последующих применений. В качестве альтернативы, твердую подложку сушат и хранят. Поскольку капли в пределах каждого блока данных содержат информацию о последовательности для обозначения или поиска, определенные блоки данных извлекают из множества блоков данных на основе информации о последовательности.

[00173] **Пример 4. Система хранения информации высокой плотности с доступом.**

[00174] Полинуклеотиды синтезировали *de novo* с помощью описанных в настоящем документе способов. После синтеза полинуклеотиды собирали в виде одной капли и переносили для хранения на твердую подложку из бумаги. Твердая подложка имеет размеры 3,5 дюйма на 2,5 дюйма. Емкость твердой подложки составляет 1 петабайт, представленных в виде адресуемого массива 32 × 32, содержащего 1024 пятен. Каждое пятно содержит пул объемом 1 терабайт. См, например, **фиг. 17** и **фиг. 18**.

[00175] По меньшей мере один элемент информации объемом 10-100 мегабайт закодирован в ДНК и хранится в 1 петабайте данных. Далее 10-100 мегабайт

закодированной ДНК извлекают посредством произвольного доступа к закодированной ДНК и извлечения закодированной ДНК из пула объемом 1 терабайт.

[00176] Пример 5. Локальный контроль синтеза полинуклеотидов на твердой подложке.

[00177] Полинуклеотиды длиной 240 оснований синтезируют на твердой подложке с применением описанных в настоящем документе способов. Длина полинуклеотидов, представляющих собой днДНК, составляет приблизительно 80 нм, а длина полинуклеотидов, представляющих собой онДНК, составляет приблизительно 160 нм. Твердая подложка содержит массив лунок с параметрами 500 нм (глубина) × 400 нм (диаметр) (объем составляет приблизительно 0,628 фемтолитра). Каждая из лунок содержит адресуемый локус, адресуемые электроды внутри боковых стенок каждой лунки (площадь составляет 50000 нм²/электрод) и 250 нм (диаметр) поверхность для синтеза/присоединения полинуклеотидов в адресуемом сообщении с 250 нм (диаметр) адресуемым нижним электродом. Электроды являются независимо адресуемыми.

Полинуклеотиды присутствуют на поверхности для синтеза с плотностью 1 полинуклеотид на 50 нм². Лунки разделены с шагом в 1,0 мкм. Боковые электроды толщиной 10 нм (расположенные на расстоянии около 100 нм над поверхностью с полинуклеотидами) заряжают с целью создания градиента концентрации ионов Н⁺, которые обеспечивают удаление защитных групп (где полинуклеотид блокируют с помощью отщепляемой под действием кислоты блокирующей группы) с 5'-ОН-групп на определенных полинуклеотидах в локусах на поверхности для синтеза. Ионы Н⁺ затем удаляют. (См. **фиг. 16В**). Добавляют амидофосфит нуклеозида в качестве мономера, и полинуклеотиды будут доступны для сочетания с нуклеозидами по незаблокированным сайтам. Для синтеза полинуклеотидов осуществляют повтор циклов снятия защитных групп и сочетания. Благодаря нанесению перед добавлением на поверхность каждого типа мономера серий контролируемых с помощью электродов масок, требуемые полинуклеотиды синтезируются в точных местоположениях на поверхности в контролируемой последовательности.

[00178] Пример 6. Локальный контроль синтеза полинуклеотидов на твердой подложке с помощью электрических полей.

[00179] Полинуклеотиды длиной 240 оснований синтезируют на твердой подложке с применением описанных в настоящем документе способов. Твердая подложка содержит массив лунок с параметрами 500 нм (глубина) × 500 нм (диаметр). Каждая из лунок содержит адресуемый локус, адресуемые электроды внутри боковых стенок каждой лунки (площадь составляет 50000 нм²/электрод) и 250 нм (диаметр) поверхность для

синтеза/присоединения полинуклеотидов в адресуемом сообщении с 250 нм (диаметр) адресуемым нижним электродом. Электроды являются независимо адресуемыми.

Полинуклеотиды присутствуют на поверхности для синтеза с плотностью 1 полинуклеотид на 50 нм^2 . Лунки разделены с шагом в 1,0 мкм. Добавляют амидофосфит нуклеозида в качестве мономера, и полинуклеотиды будут доступны для сочетания с нуклеозидами по незаблокированным сайтам. Для синтеза полинуклеотидов осуществляют повтор циклов снятия защитных групп и сочетания. Благодаря нанесению перед добавлением на поверхность каждого типа мономера серий контролируемых с помощью электродов масок, требуемые полинуклеотиды синтезируются в точных местоположениях на поверхности в контролируемой последовательности. Нижние электроды на дне лунки активируются, в результате чего индуцируется высвобождение присоединенных к ней полинуклеотидов. Боковые электроды заряжают с целью генерации электрического поля, которое обеспечивает перемещение полинуклеотидов за пределы лунки. Затем добавляют амидофосфиты нуклеозидов в качестве мономеров, которые наращиваются на линкеры с возможностью повторного использования, присоединенные к поверхности, и синтез повторяется.

[00180] Пример 7. Локальный контроль синтеза полинуклеотидов на твердой подложке.

[00181] Полинуклеотиды длиной 240 оснований синтезируют на твердой подложке с применением описанных в настоящем документе способов. Длина полинуклеотидов, представляющих собой днДНК, составляет приблизительно 80 нм, а длина полинуклеотидов, представляющих собой онДНК, составляет приблизительно 160 нм. Твердая подложка содержит массив адресуемых электродов диаметром 100 нм на поверхности для синтеза/присоединения полинуклеотидов (см. **фиг. 19**).

Полинуклеотиды присутствуют на поверхности для синтеза с плотностью 1 полинуклеотид на $39,27 \text{ нм}^2$. Лунки разделены с шагом в 0,25 мкм. Электроды заряжают с целью создания градиента концентрации ионов H^+ , которые обеспечивают удаление защитных групп (где полинуклеотид блокируют с помощью отщепляемой под действием кислоты блокирующей группы) с 5'-ОН-групп на определенных полинуклеотидах в локусах на поверхности для синтеза. Ионы H^+ затем удаляют. Добавляют амидофосфит нуклеозида в качестве мономера, и полинуклеотиды будут доступны для сочетания с нуклеозидами по незаблокированным сайтам. Для синтеза полинуклеотидов осуществляют повтор циклов снятия защитных групп и сочетания. Благодаря нанесению перед добавлением на поверхность каждого типа мономера серий контролируемых с

помощью электродов масок, требуемые полинуклеотиды синтезируются в точных местоположениях на поверхности в контролируемой последовательности.

[00182] Хотя в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены исключительно в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены будут приходиться на ум специалистам в данной области без отступления от настоящего изобретения. Следует понимать, что при применении настоящего изобретения на практике можно использовать различные альтернативы описанным в настоящем документе вариантам осуществления настоящего изобретения. Подразумевается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что способы и структуры в пределах объема этой формулы изобретения и их эквиваленты также охватываются ею.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство для хранения информации, содержащее:
твердую подложку, причем твердая подложка содержит множество лунок, причем каждая из лунок содержит адресуемый локус, содержащий:
поверхность для синтеза, расположенную в нижней области каждой из лунок;
нижний электрод, находящийся в адресуемом сообщении с поверхностью для синтеза; и
по меньшей мере один боковой электрод, расположенный на боковой стенке каждой из лунок, причем по меньшей мере один боковой электрод находится на расстоянии от 50 нм до 200 нм от нижней области.
2. Устройство по п. 1, где твердая подложка содержит адресуемые локусы с плотностью по меньшей мере 100×10^6 адресуемых локусов на см^2 .
3. Устройство по п. 1, где твердая подложка содержит адресуемые локусы с плотностью от 100×10^6 до 100×10^7 адресуемых локусов на см^2 .
4. Устройство по любому из пп. 1-3, где адресуемый локус содержит диаметр до около 750 нм.
5. Устройство по любому из пп. 1-4, где каждая из лунок содержит глубину до около 1000 нм.
6. Устройство по любому из пп. 1-4, где каждая из лунок содержит глубину от 100 нм до 1000 нм.
7. Устройство по любому из пп. 1-6, где каждая из лунок содержит наибольший диаметр поперечного сечения от 100 нм до 800 нм.
8. Устройство по любому из пп. 1-7, где каждая из лунок является цилиндрической.
9. Устройство по любому из пп. 1-8, где нижний электрод предусматривает наибольшую площадь поперечного сечения от 10^4 нм^2 до 10^5 нм^2 .

10. Устройство по любому из пп. 1-9, где по меньшей мере один боковой электрод находится на расстоянии от 75 нм до 125 нм от нижней области.

11. Устройство по любому из пп. 1-10, где по меньшей мере один боковой электрод предусматривает высоту от 5 нм до 25 нм.

12. Устройство по любому из пп. 1-11, содержащее по меньшей мере два боковых электрода.

13. Устройство по любому из пп. 1-12, где по меньшей мере один боковой электрод и нижний электрод являются независимо адресуемыми.

14. Устройство для хранения информации, предусматривающее:

твердую подложку, причем твердая подложка содержит множество лунок, причем каждая из лунок содержит адресуемый локус, содержащий:

поверхность для синтеза, расположенную в нижней области каждой из лунок;

нижний электрод, находящийся в адресуемом сообщении с поверхностью для синтеза;

по меньшей мере один боковой электрод, расположенный на боковой стенке каждой из лунок,

причем поверхность для синтеза в каждом адресуемом локусе содержит по меньшей мере один полинуклеотид, удлиняющийся от поверхности для синтеза, и причем содержащие разные последовательности полинуклеотиды на твердой подложке присутствуют с плотностью по меньшей мере 100×10^6 полинуклеотидов на см^2 .

15. Устройство по п. 14, где твердая подложка содержит полинуклеотиды с разными последовательностями с плотностью по меньшей мере 100×10^7 полинуклеотидов на см^2 .

16. Устройство по п. 14, где твердая подложка содержит адресуемые локусы с плотностью от 100×10^6 до 100×10^7 полинуклеотидов на см^2 .

17. Устройство по любому из пп. 14-16, где каждая из лунок содержит глубину до около 1000 нм.

18. Устройство по любому из пп. 14-16, где каждая из лунок содержит глубину от 100 нм до 1000 нм.

19. Устройство по любому из пп. 14-18, где адресуемый локус содержит диаметр до около 750 нм.

20. Устройство по любому из пп. 14-18, где каждая из лунок содержит наибольший диаметр поперечного сечения от 100 нм до 800 нм.

21. Устройство по любому из пп. 14-20, где каждая из лунок является цилиндрической.

22. Устройство по любому из пп. 14-21, где нижний электрод содержит наибольшую площадь поперечного сечения от 10^4 нм² до 10^5 нм².

23. Устройство по любому из пп. 14-22, где по меньшей мере один боковой электрод находится на расстоянии от 50 нм до 200 нм от нижней области.

24. Устройство по любому из пп. 14-23, где по меньшей мере один боковой электрод содержит высоту от 5 нм до 25 нм.

25. Устройство по любому из пп. 14-24, содержащее по меньшей мере два боковых электрода.

26. Устройство по любому из пп. 14-25, где по меньшей мере один боковой электрод и основной электрод являются независимо адресуемыми.

27. Способ хранения информации, включающий:

- а) обеспечение устройства по любому из пп. 1-26;
- б) обеспечение инструкций для синтеза полинуклеотидов;
- в) внесение по меньшей мере одного нуклеозида на поверхность для синтеза, причем по меньшей мере один нуклеозид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности для синтеза; и

d) повторение стадии с) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности для синтеза, причем инструкции предусматривают по меньшей мере одну последовательность, кодирующую множество полинуклеотидов.

28. Способ по п. 27, где способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле.

29. Способ по п. 27 или п. 28, где способ дополнительно включает секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности.

30. Способ по любому из пп. 27-29, в котором нуклеозид предусматривает амидофосфит нуклеозида.

31. Способ по любому из пп. 27-30, где способ дополнительно включает высушивание поверхности.

32. Способ по любому из пп. 27-31, где способ дополнительно включает стадию отщепления, причем стадия отщепления включает приложение электрического потенциала к нижнему электроду с целью генерации реагента для отщепления.

33. Способ по любому из пп. 27-32, где способ дополнительно включает стадию кэпирования.

34. Способ по любому из пп. 27-33, где способ дополнительно включает стадию окисления.

35. Способ по любому из пп. 27-34, где способ дополнительно включает стадию деблокирования, причем стадия деблокирования включает приложение электрического потенциала по меньшей мере к одному боковому электроду с целью генерации реагента для снятия защитных групп.

36. Способ хранения информации, предусматривающий:

а) обеспечение твердой подложки, содержащей поверхность;

b) внесение по меньшей мере одного нуклеозида на поверхность, причем по меньшей мере один нуклеозид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и

c) повторение стадии b) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем полинуклеотиды, имеющие разные последовательности, присутствуют на поверхности с плотностью по меньшей мере 100×10^6 полинуклеотидов на см^2 .

37. Способ по п. 36, в котором плотность адресуемых локусов на твердой подложке составляет по меньшей мере 100×10^7 полинуклеотидов на см^2 .

38. Способ по п. 36, в котором плотность адресуемых локусов на твердой подложке составляет от 100×10^6 до 100×10^7 полинуклеотидов на см^2 .

39. Способ по любому из пп. 36-38, где способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле.

40. Способ по любому из п. 36 или п. 39, где способ дополнительно включает секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности.

41. Способ по любому из пп. 36-40, в котором нуклеозид предусматривает амидофосфит нуклеозида.

42. Способ по любому из пп. 36-41, где способ дополнительно включает высушивание поверхности.

43. Способ по любому из пп. 36-42, где способ дополнительно включает смывание нуклеозидов с поверхности.

44. Способ по любому из пп. 36-43, где способ дополнительно включает стадию кэпирования.

45. Способ по любому из пп. 36-44, где способ дополнительно включает стадию окисления.

46. Способ по любому из пп. 36-45, где способ дополнительно включает стадию деблокирования.

47. Способ хранения информации, предусматривающий:

- а) обеспечение твердой подложки, содержащей поверхность;
- б) внесение на поверхность капли, содержащей по меньшей мере один нуклеозид, причем по меньшей мере один нуклеозид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и
- с) повторение стадии б) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем объем капли составляет менее чем около 100 фемтолитров.

48. Способ по п. 47, в котором объем капли составляет менее чем около 50 фемтолитров.

49. Способ по п. 47, в котором объем капли составляет от менее чем около 25 фемтолитров до 100 фемтолитров.

50. Способ по любому из пп. 47-49, где способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле.

51. Способ по любому из п. 47 или п. 50, где способ дополнительно включает секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности.

52. Способ по любому из пп. 47-51, в котором нуклеозид предусматривает амидофосфит нуклеозида.

53. Способ по любому из пп. 47-52, где способ дополнительно включает высушивание поверхности.

54. Способ по любому из пп. 47-53, где способ дополнительно включает смывание нуклеозидов с поверхности.

55. Способ по любому из пп. 47-54, где способ дополнительно включает стадию кэпирования.

56. Способ по любому из пп. 47-55, где способ дополнительно включает стадию окисления.

57. Способ по любому из пп. 47-56, где способ дополнительно включает стадию деблокирования.

58. Способ хранения информации, предусматривающий:

а) обеспечение твердой подложки, содержащей поверхность;

б) внесение по меньшей мере одного нуклеозида на поверхность, причем по меньшей мере один нуклеозид вступает в реакцию сочетания с полинуклеотидом, присоединенным к поверхности; и

с) повторение стадии б) для осуществления синтеза множества полинуклеотидов на поверхности, причем время для повтора стадии б) с применением четырех разных нуклеотидов составляет менее чем около 100 миллисекунд.

59. Способ по п. 58, в котором время для повтора стадии б) с применением четырех разных нуклеотидов составляет менее чем около 50 миллисекунд.

60. Способ по п. 58, в котором время для повтора стадии б) с применением четырех разных нуклеотидов составляет от 25 миллисекунд до 100 миллисекунд.

61. Способ по любому из пп. 58-60, где способ дополнительно включает отщепление по меньшей мере одного полинуклеотида от поверхности, причем полинуклеотид растворен в капле.

62. Способ по любому из п. 58-61, где способ дополнительно включает секвенирование по меньшей мере одного полинуклеотида с поверхности.

63. Способ по любому из пп. 58-62, в котором нуклеозид предусматривает амидофосфит нуклеозида.

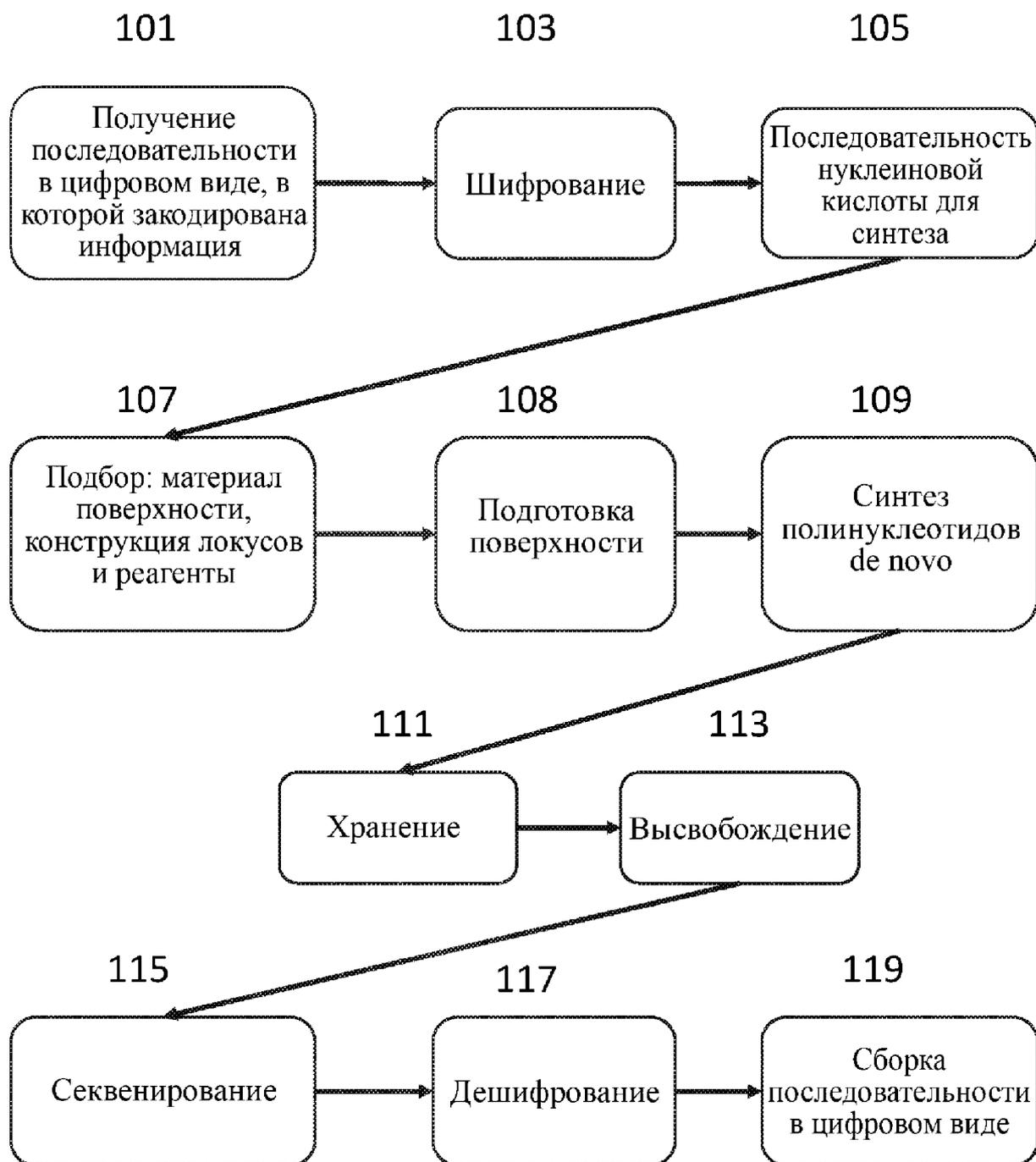
64. Способ по любому из пп. 58-63, где способ дополнительно включает высушивание поверхности.

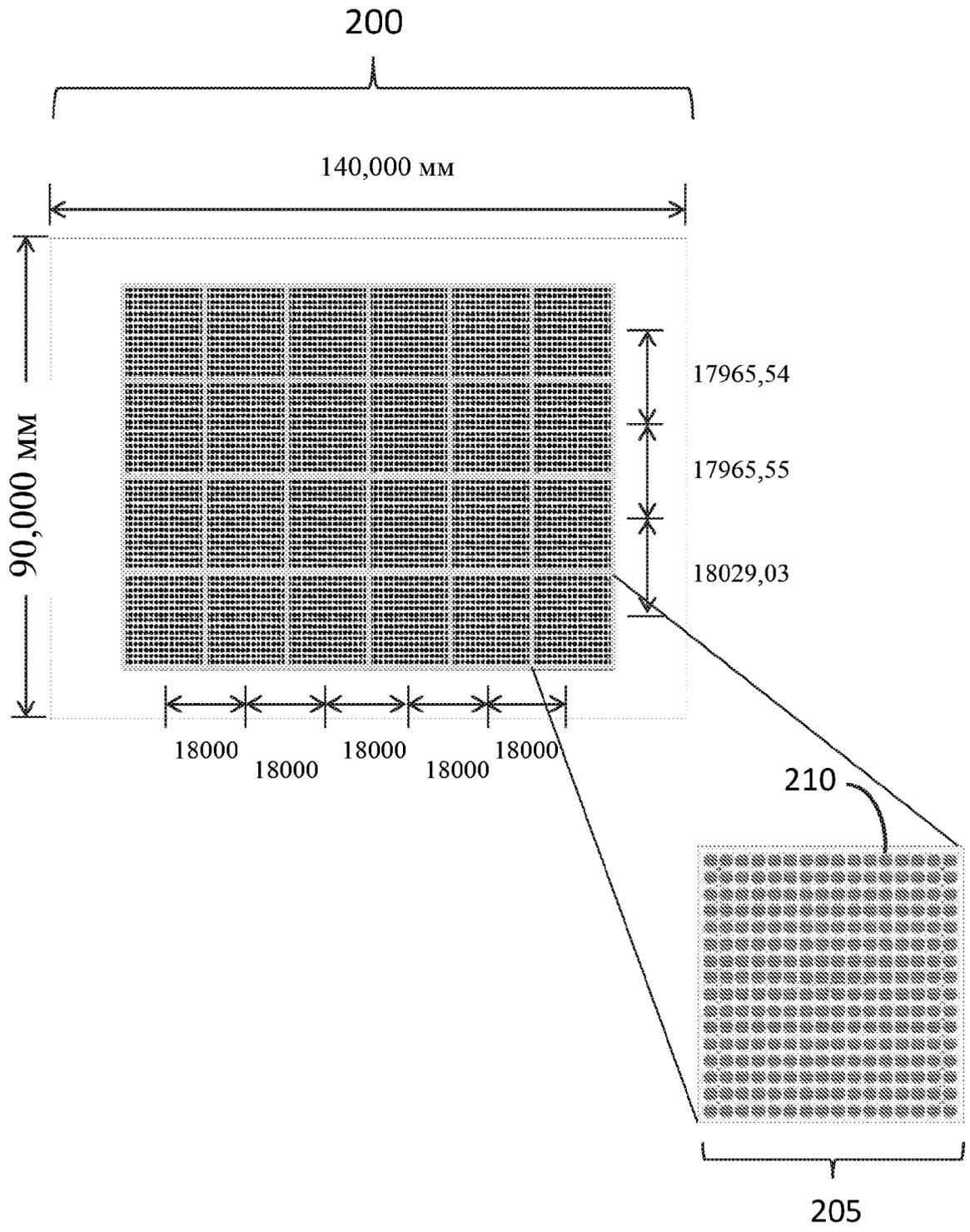
65. Способ по любому из пп. 58-64, где способ дополнительно включает смывание нуклеозидов с поверхности.

66. Способ по любому из пп. 58-65, где способ дополнительно включает стадию кэпирования.

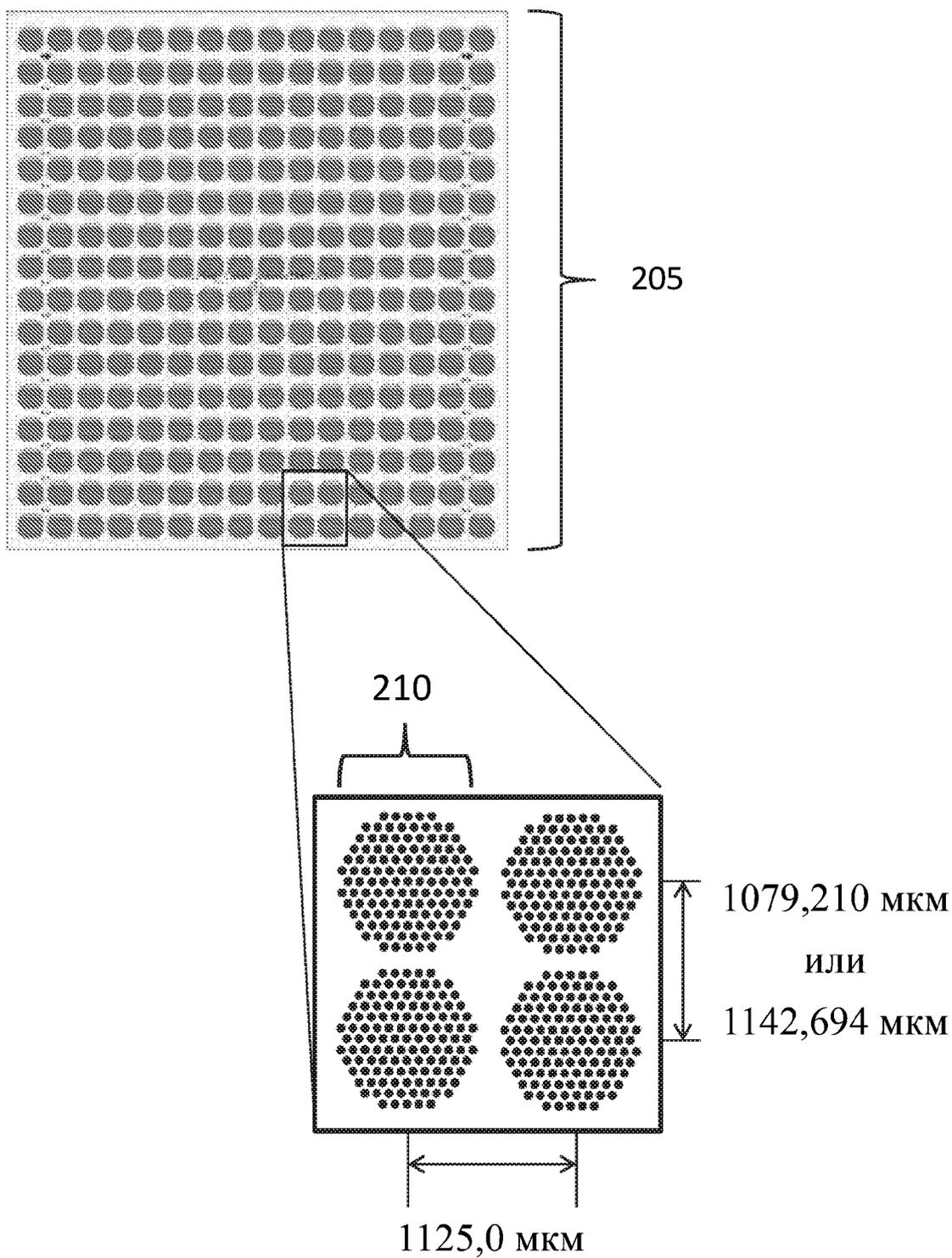
67. Способ по любому из пп. 58-66, где способ дополнительно включает стадию окисления.

68. Способ по любому из пп. 58-67, где способ дополнительно включает стадию деблокирования.

**Фиг. 1**



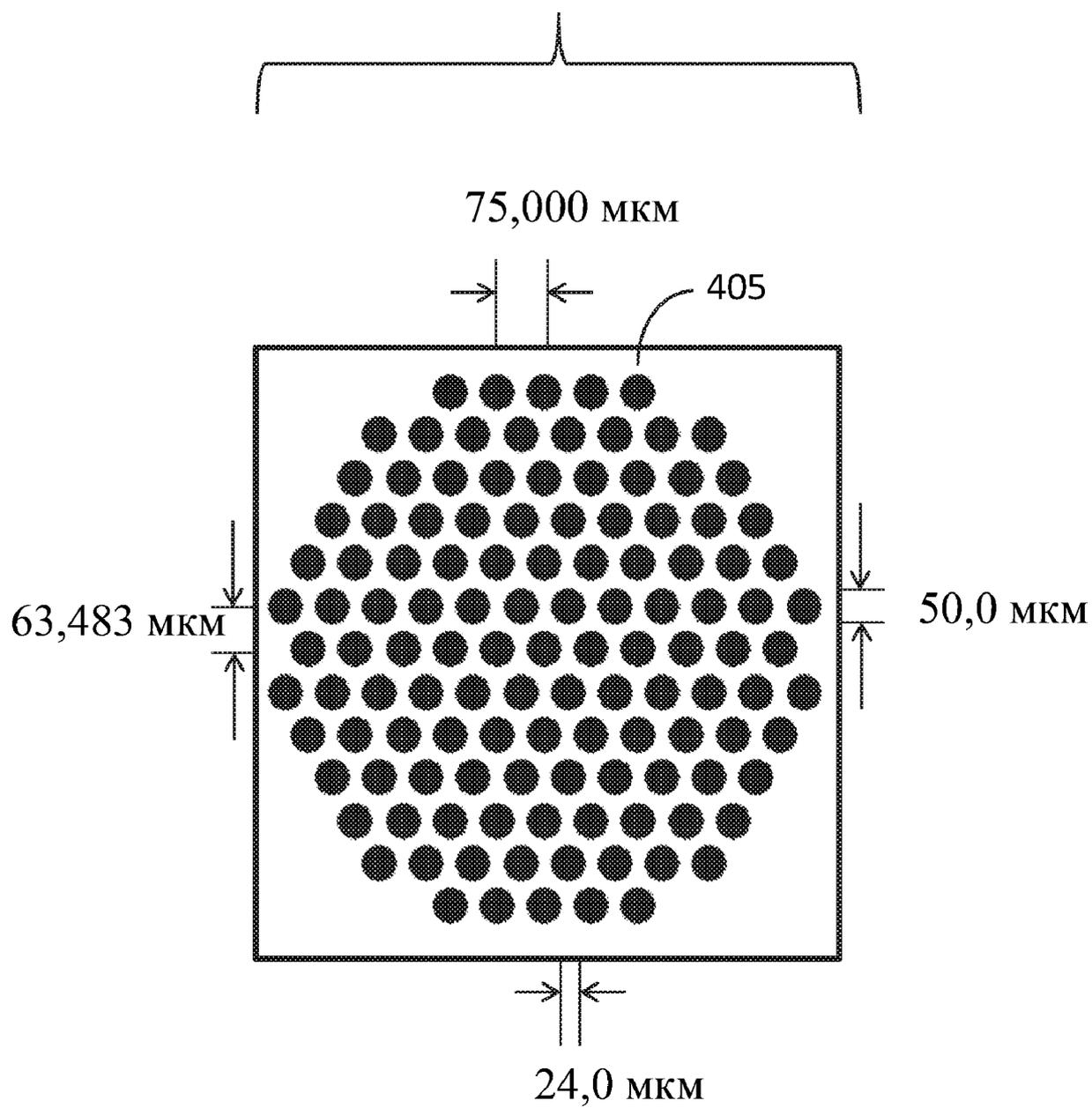
Фиг. 2



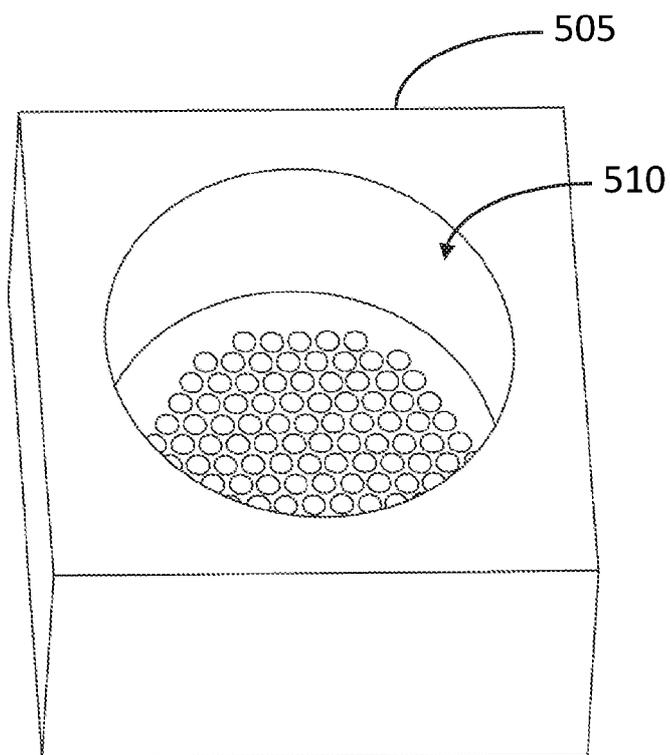
Фиг. 3

4/19

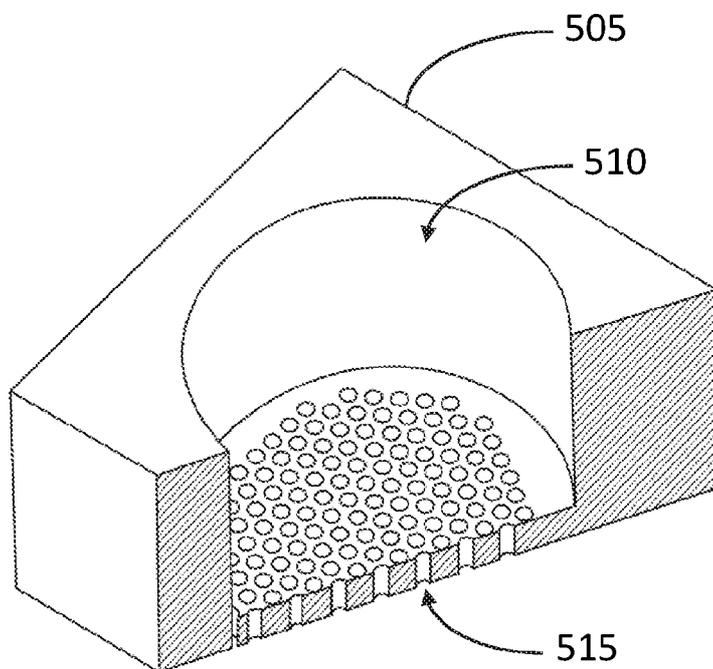
210



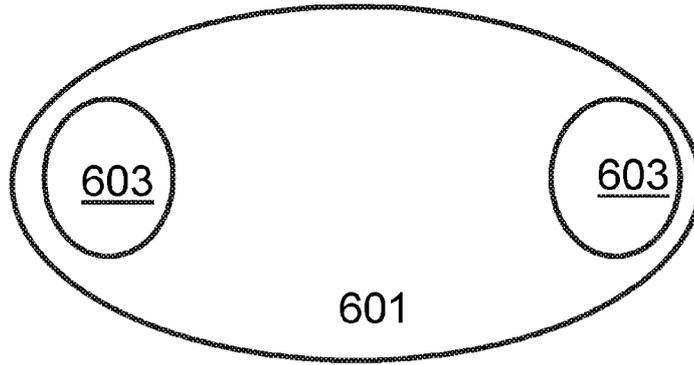
Фиг. 4



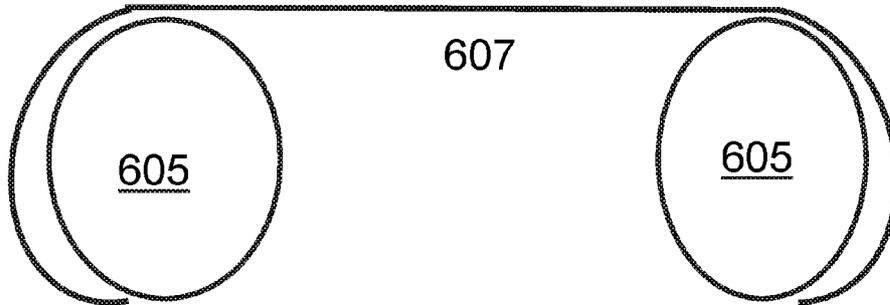
Фиг. 5А



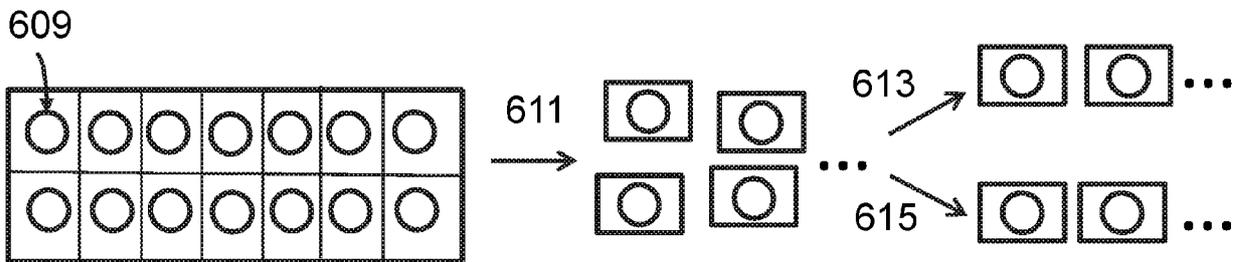
Фиг. 5В



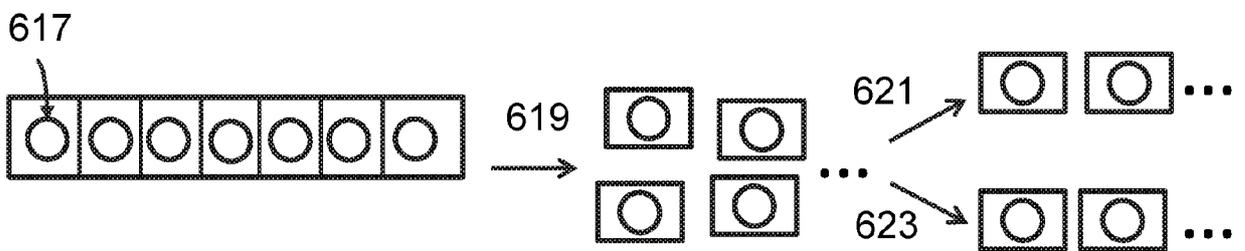
Фиг. 6А



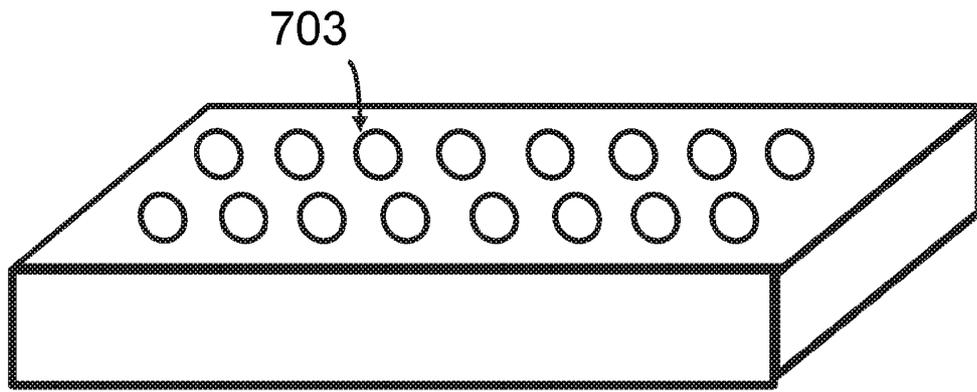
Фиг. 6В



Фиг. 6С

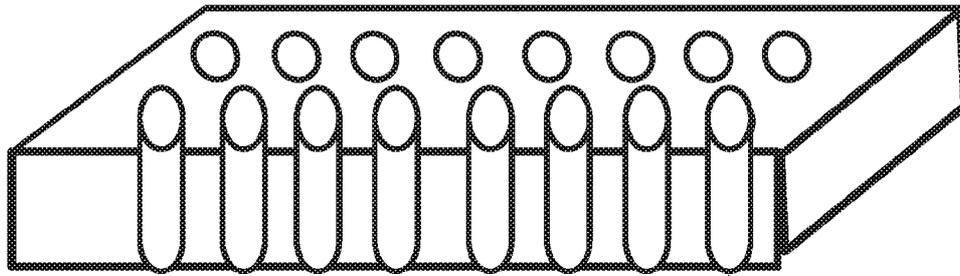


Фиг. 6D



701

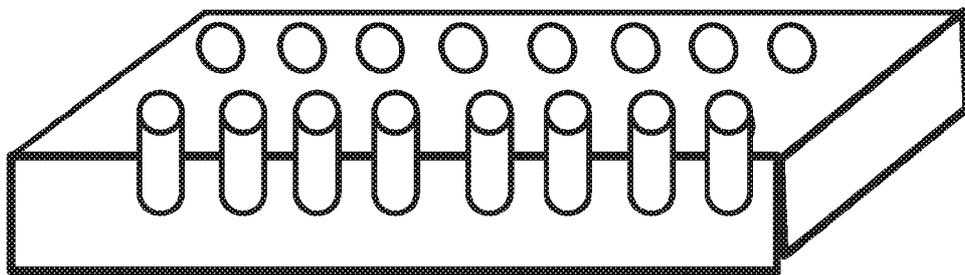
Фиг. 7А



701

705

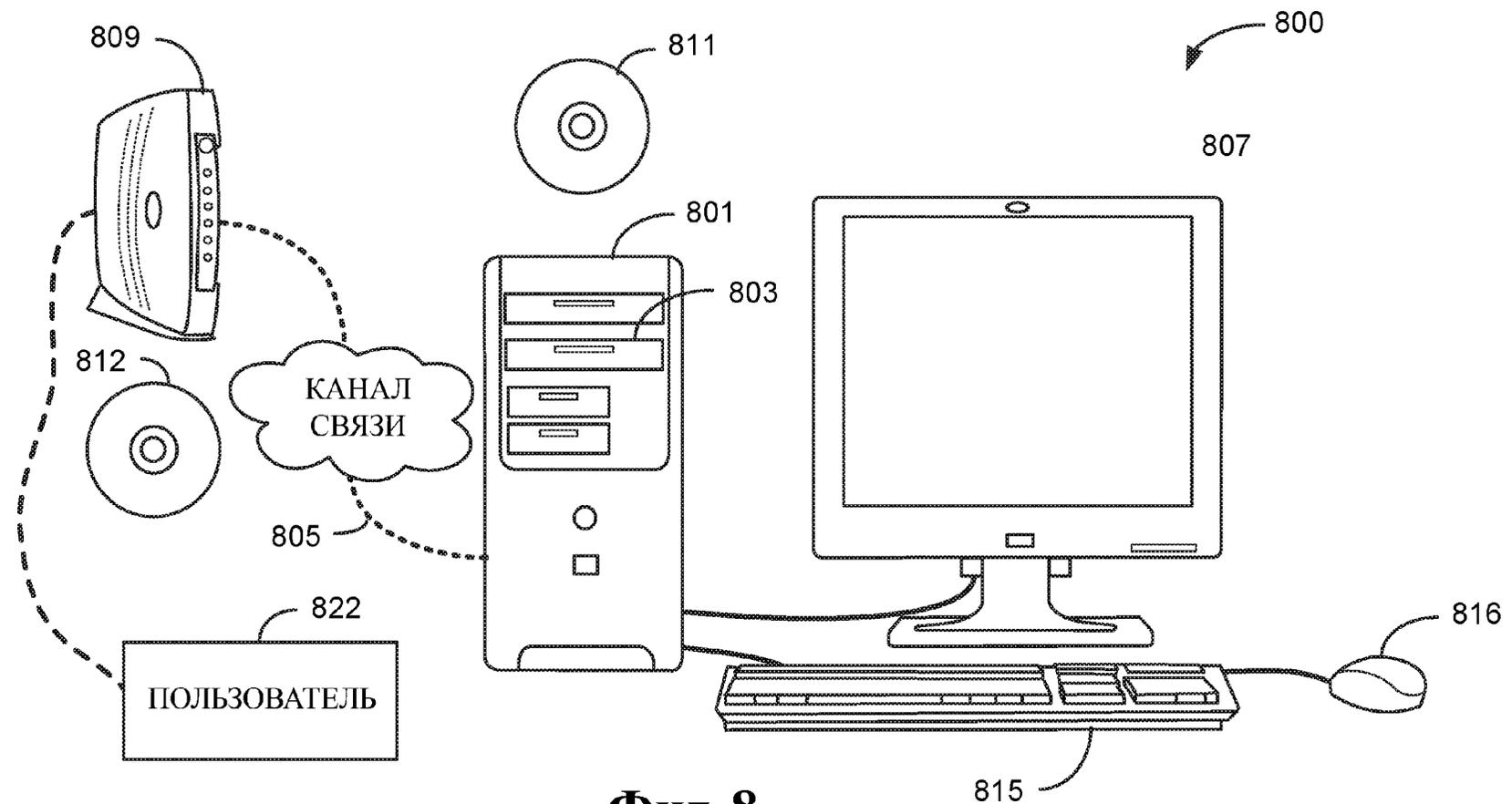
Фиг. 7В



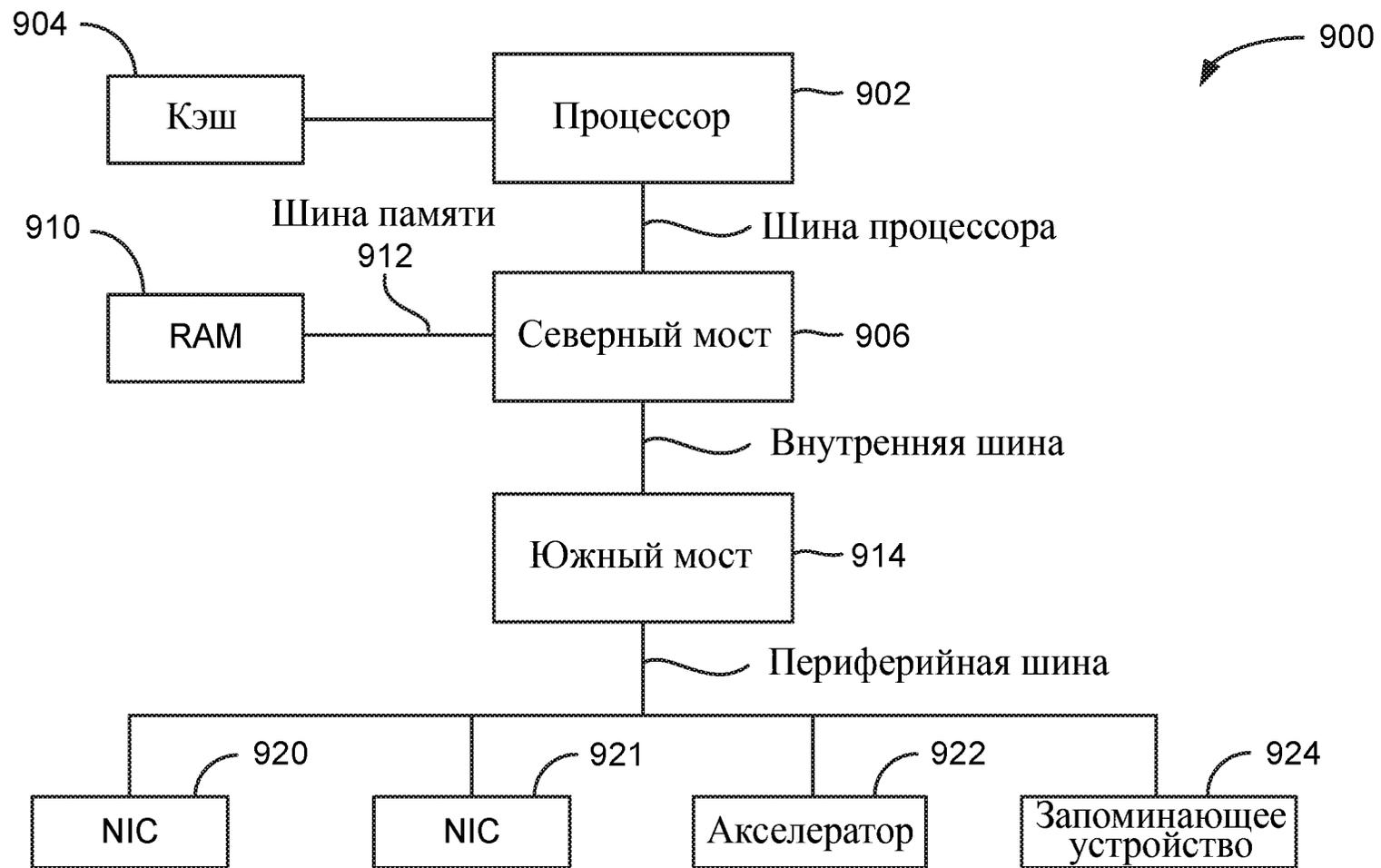
701

707

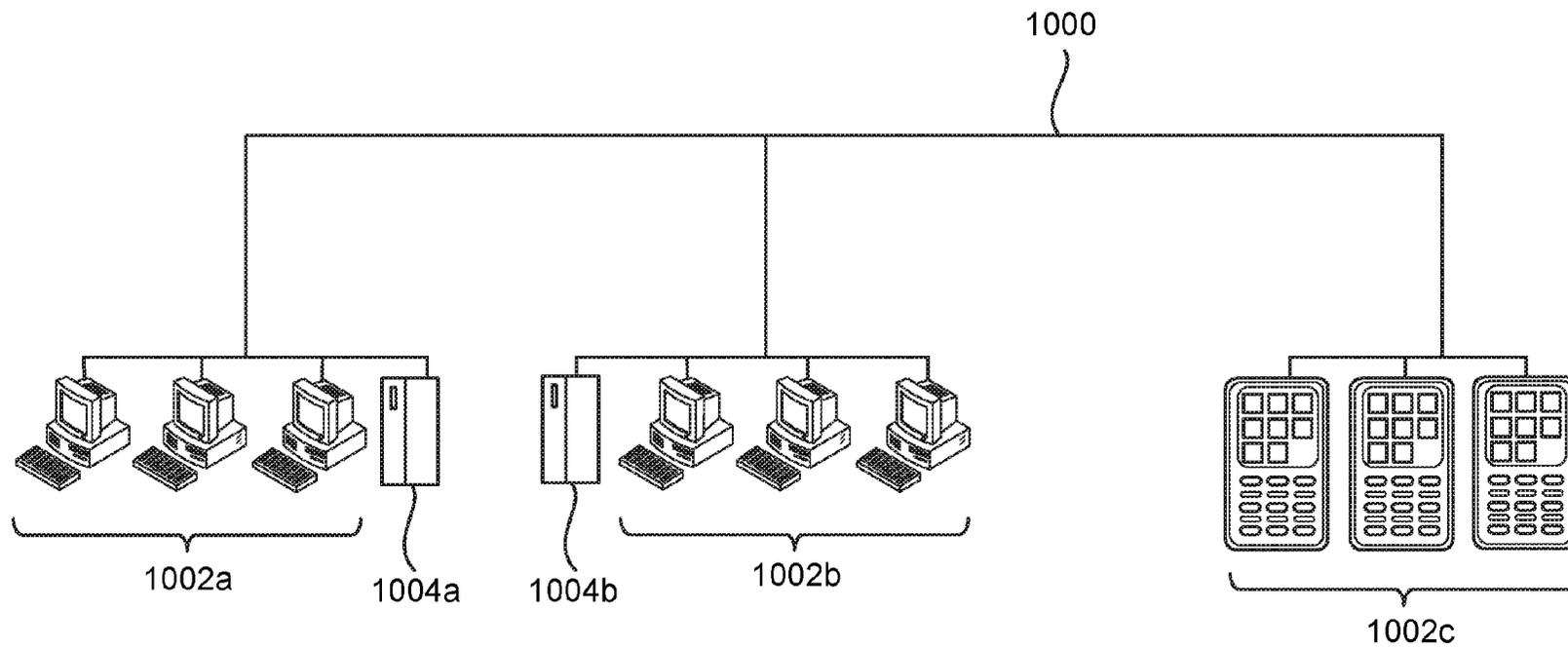
Фиг. 7С



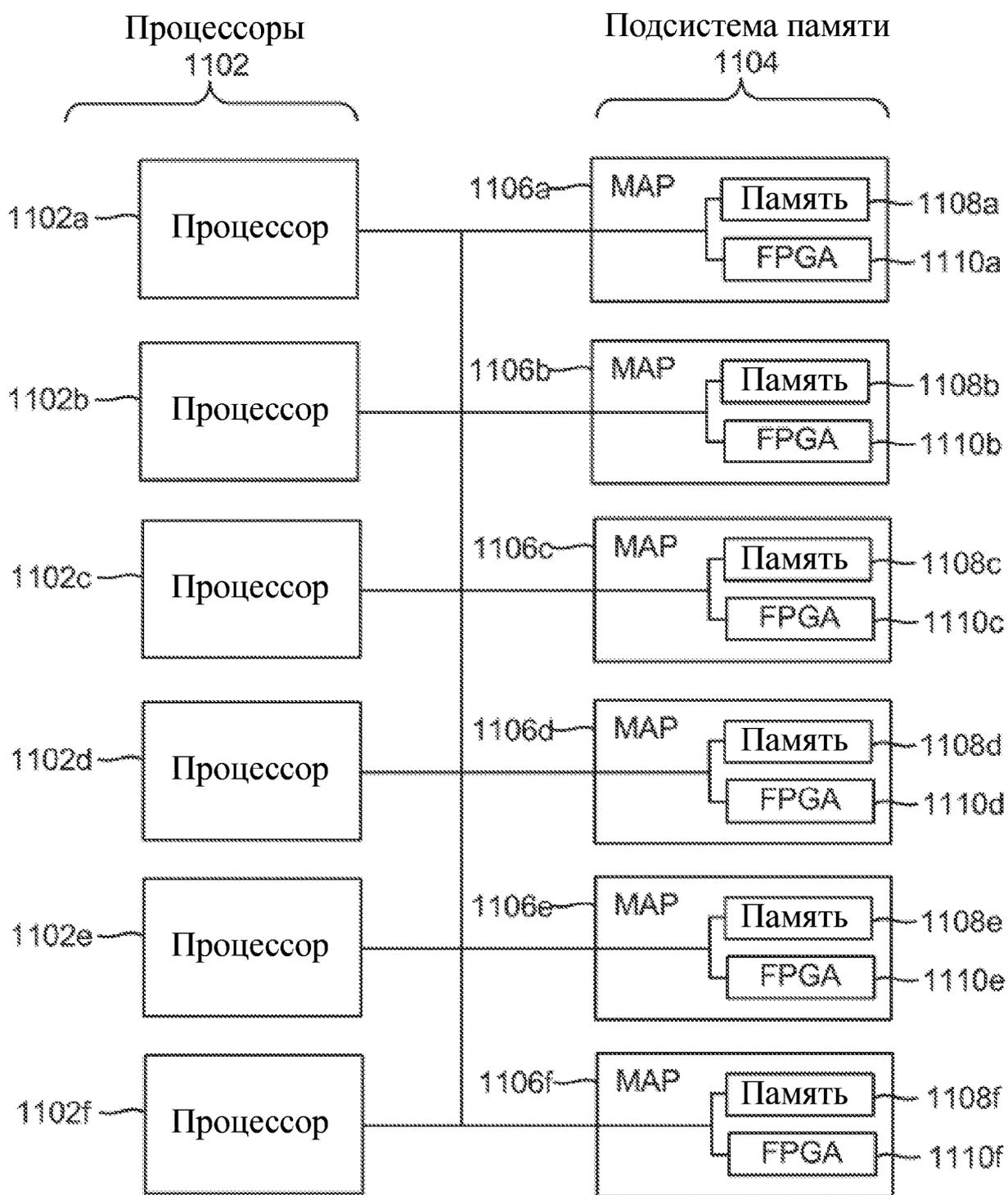
Фиг. 8

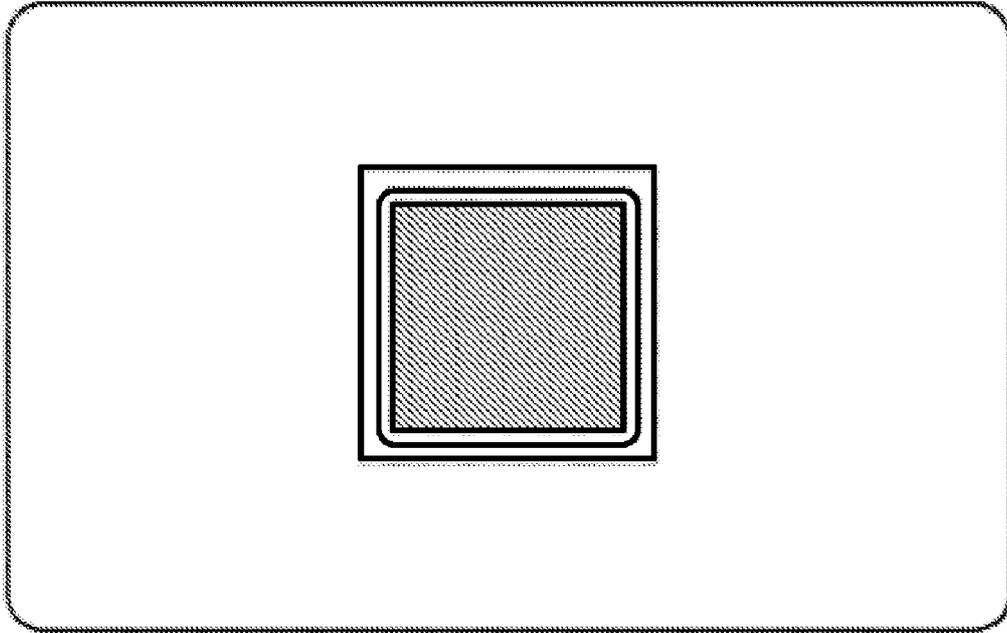


Фиг. 9

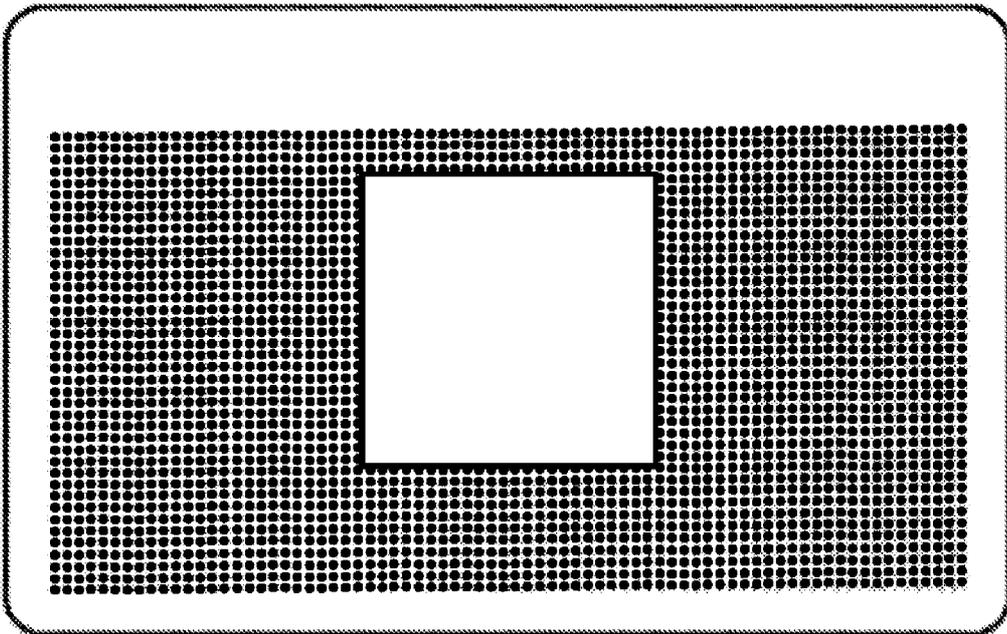


Фиг. 10

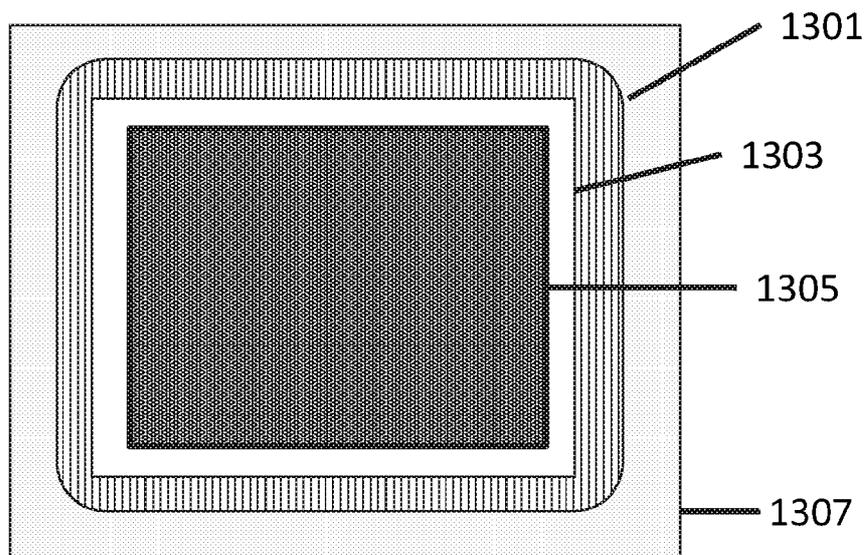
**Фиг. 11**



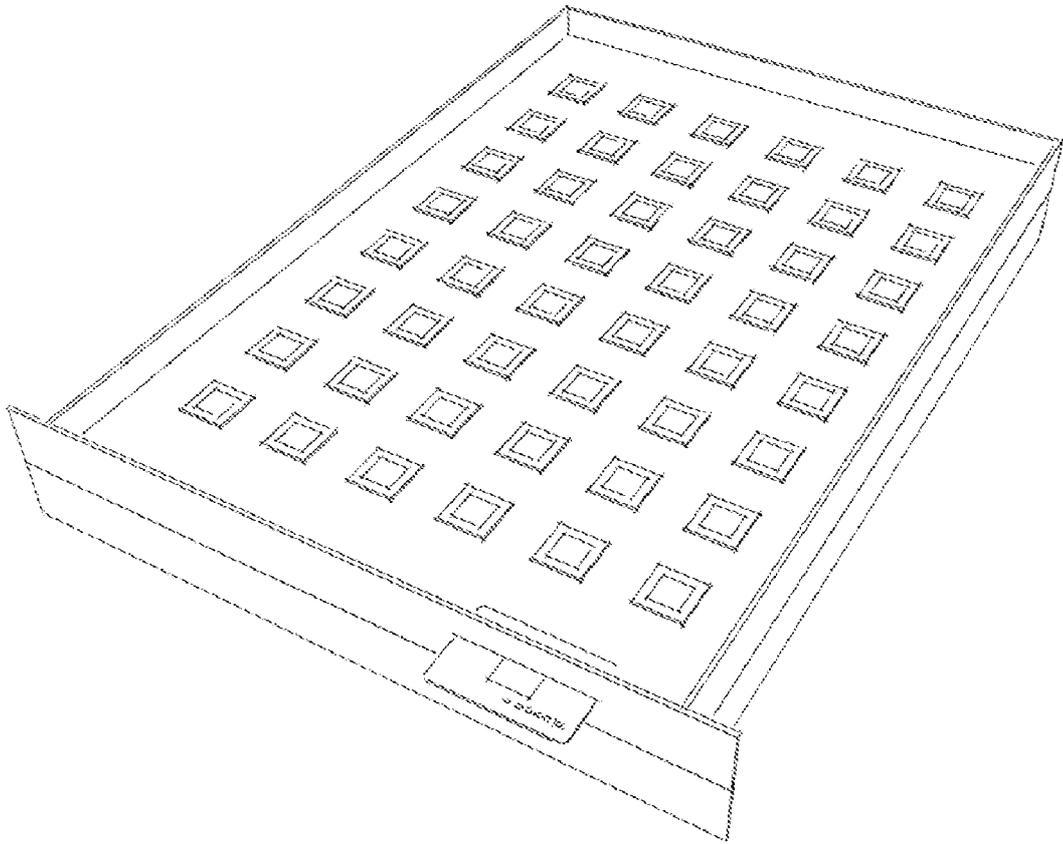
Фиг. 12А



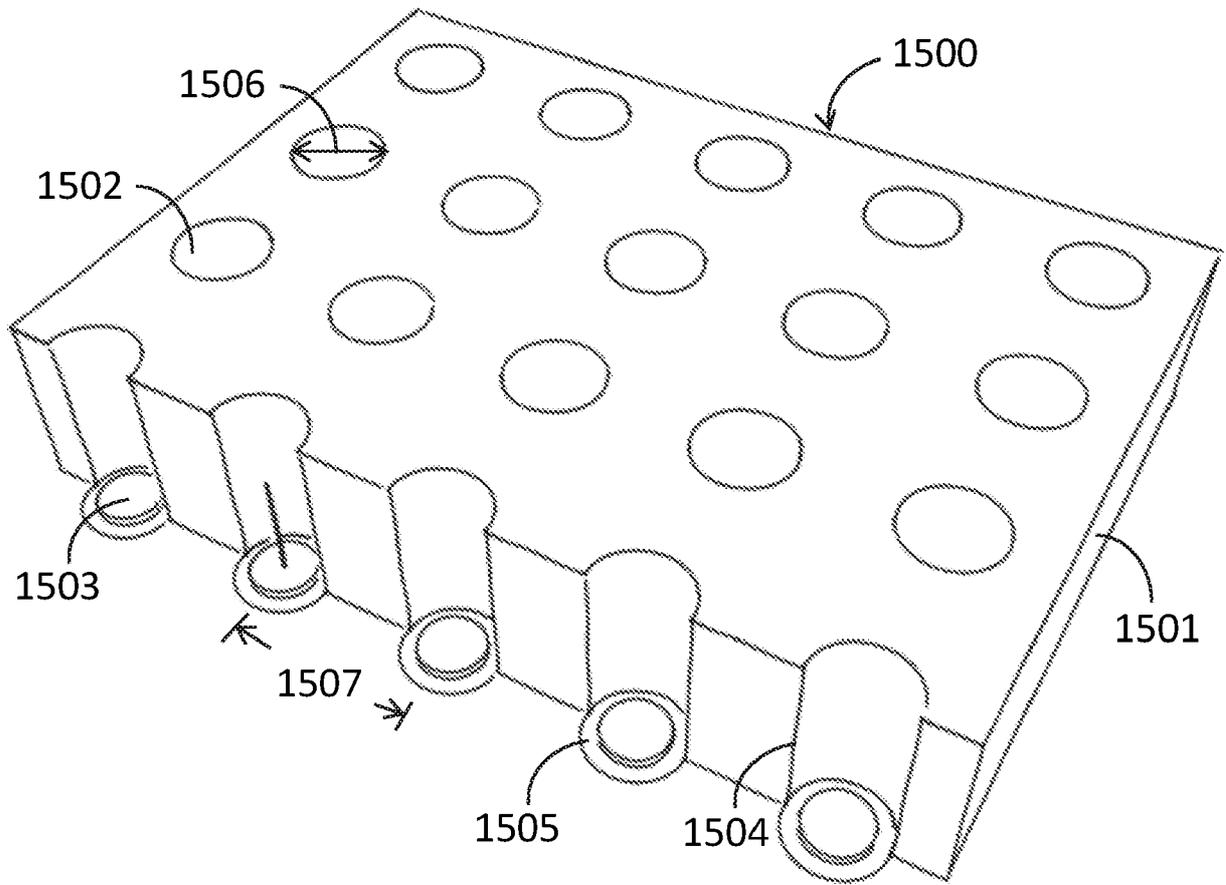
Фиг. 12В



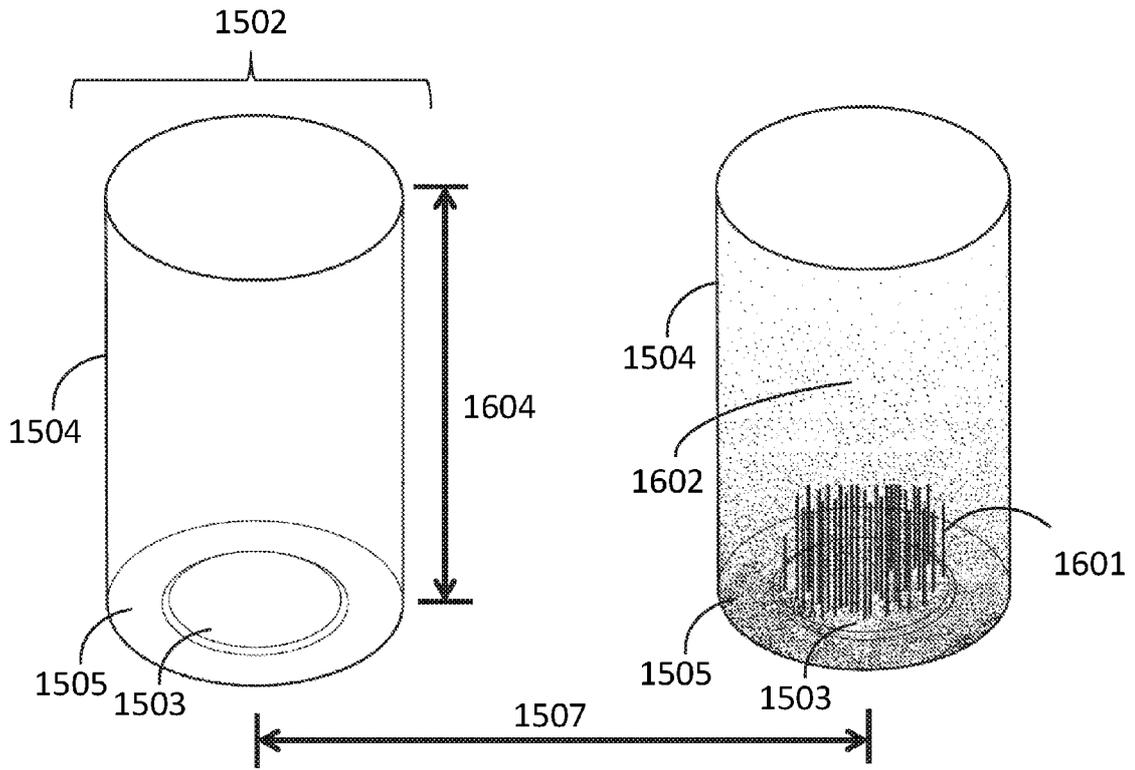
Фиг. 13



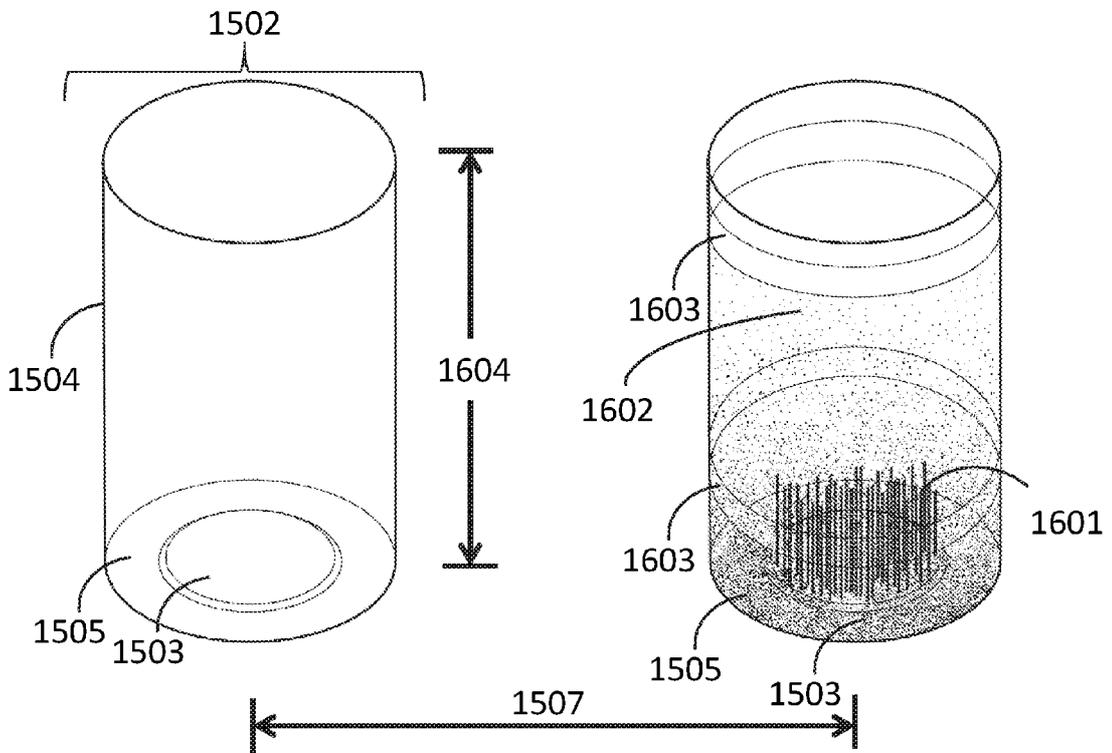
Фиг. 14



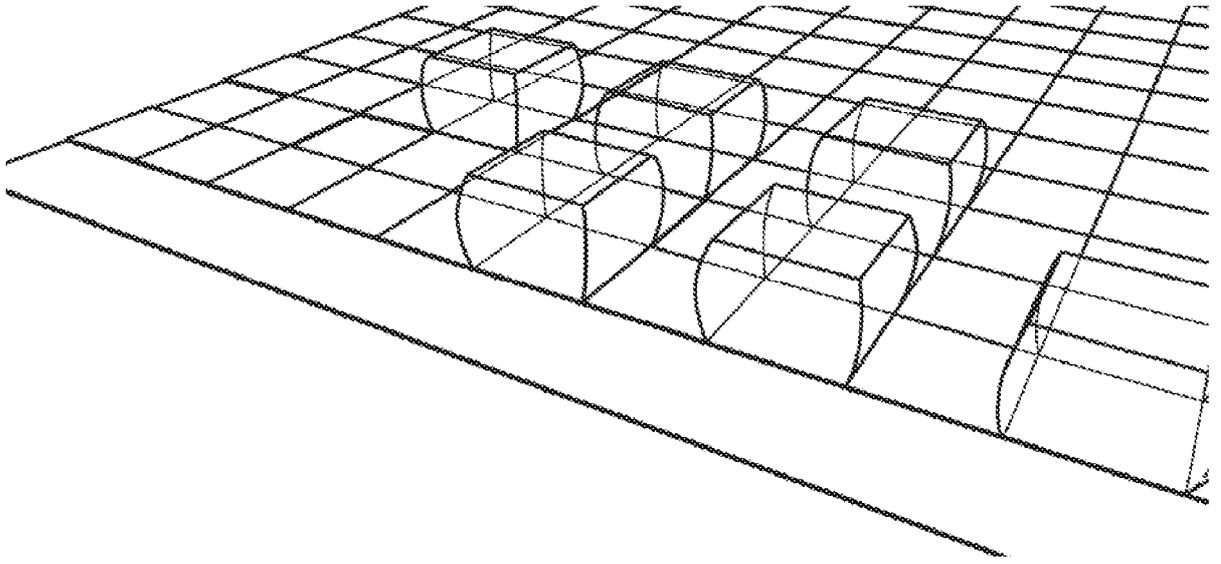
Фиг. 15



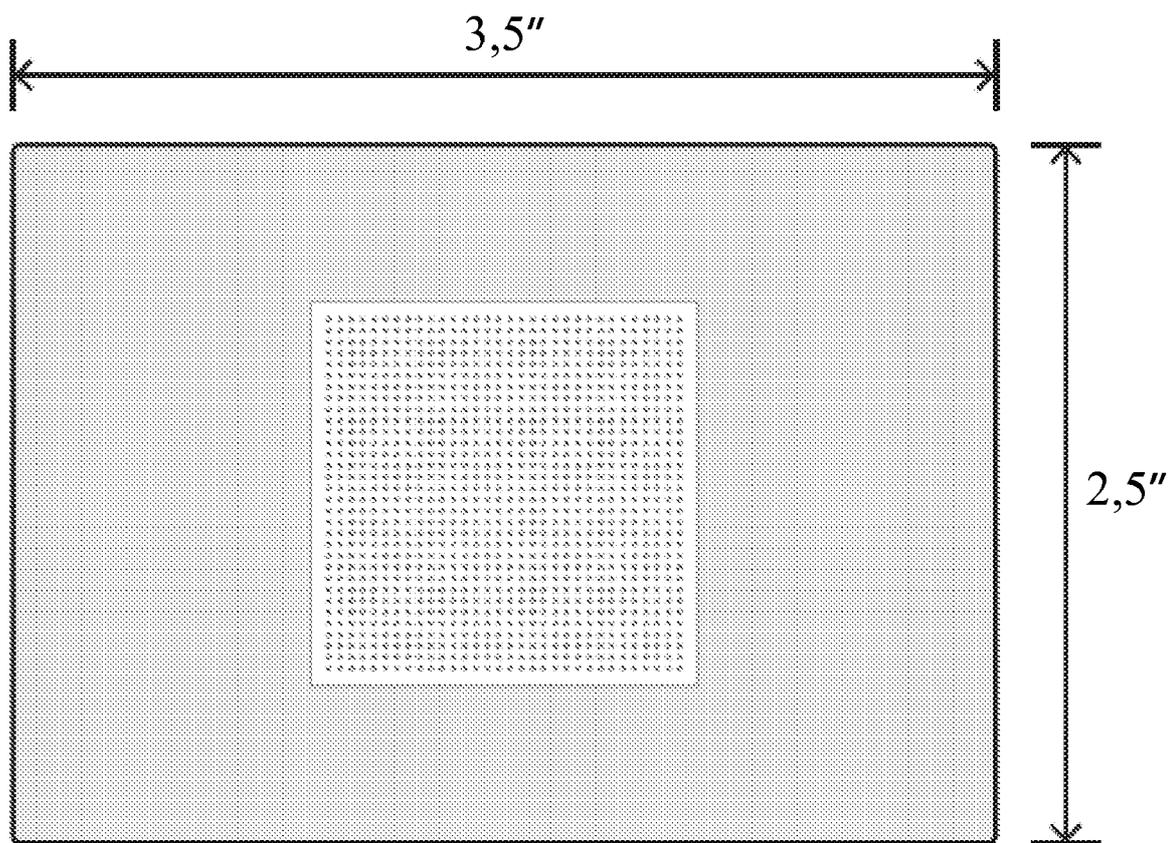
Фиг. 16А



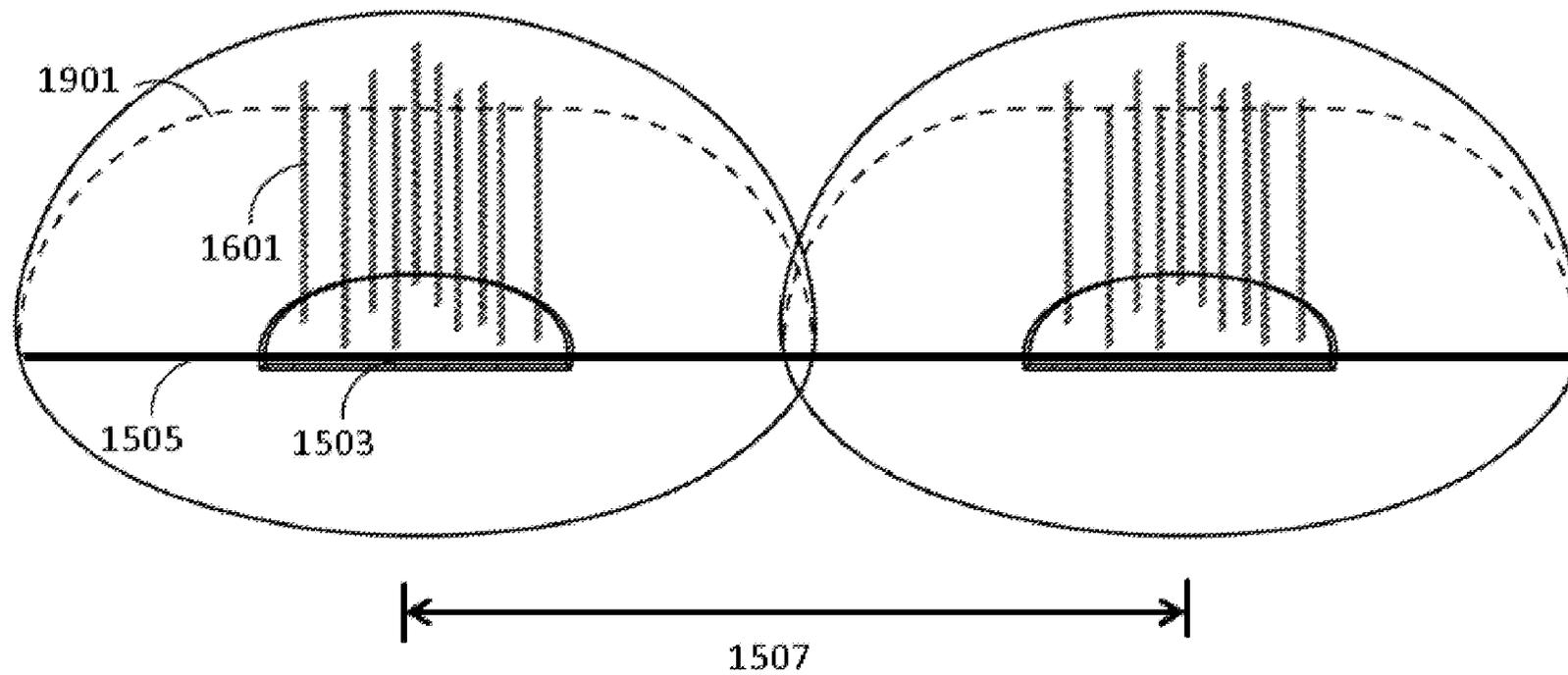
Фиг. 16В



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19