

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6656733号
(P6656733)

(45) 発行日 令和2年3月4日 (2020. 3. 4)

(24) 登録日 令和2年2月7日 (2020. 2. 7)

(51) Int. Cl.	F I
C 4 O B 10/00 (2006. 01)	C 4 O B 10/00 Z N A
C 1 2 N 15/11 (2006. 01)	C 1 2 N 15/11 Z
C 1 2 P 19/34 (2006. 01)	C 1 2 P 19/34
G O 1 N 37/00 (2006. 01)	G O 1 N 37/00 1 O 1
C 1 2 N 9/16 (2006. 01)	C 1 2 N 9/16 A
請求項の数 11 (全 234 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2016-533384 (P2016-533384)	(73) 特許権者	516040017
(86) (22) 出願日	平成26年8月5日 (2014. 8. 5)		ツイスト バイオサイエンス コーポレー ション
(65) 公表番号	特表2016-527313 (P2016-527313A)		アメリカ合衆国 9 4 1 5 8 カリフォル ニア州 サンフランシスコ ミッション・ ベイ・ブールバード サウス 4 5 5 ス イート 5 4 5
(43) 公表日	平成28年9月8日 (2016. 9. 8)	(74) 代理人	100082072
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/049834		弁理士 清原 義博
(87) 国際公開番号	W02015/021080	(72) 発明者	パニヤイ, ウィリアム
(87) 国際公開日	平成27年2月12日 (2015. 2. 12)		アメリカ合衆国 9 4 1 3 4 カリフォル ニア州 サンフランシスコ ウェイランド ・ストリート 7 3 8
審査請求日	平成29年8月1日 (2017. 8. 1)		
(31) 優先権主張番号	61/862, 445		
(32) 優先日	平成25年8月5日 (2013. 8. 5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/862, 457		
(32) 優先日	平成25年8月5日 (2013. 8. 5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規合成した遺伝子ライブラリ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリヌクレオチド合成のための方法であって、該方法は、

a) 少なくとも 30, 000 の異なるポリヌクレオチドのライブラリに対する予め決められた配列を提供する工程であって、前記ポリヌクレオチドが、少なくとも 750 の遺伝子に対する cDNA 配列をコード化する、工程；

b) 表面を含む構造を提供する工程；

c) 前記ポリヌクレオチドを合成する工程を含み、

ここで、前記ポリヌクレオチドの各々は、長さが少なくとも 30 の塩基を含み、表面から伸長し、前記ポリヌクレオチドの各々は、ポリヌクレオチドの複数のサブセットを含み、ポリヌクレオチドのサブセットの各々は、cDNA 配列の 1 つをまとめてコード化し、長さの範囲が様々なポリヌクレオチドを含み、および、前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドに対する予め決められた配列と比較して、1, 000 塩基中に 1 つ未満のエラー率で配列をコード化し、

表面から前記ポリヌクレオチドを放出する工程を含み、表面から前記ポリヌクレオチドを放出する前に増幅工程を含まず、

前記ポリヌクレオチドの各々が、表面上の異なる場所から伸長し、各場所が、第 1 の複数の分子を含み、第 1 の複数の分子の各分子が、表面に結合し、ヌクレオシドに結合することができる反応性基を含み、前記場所が表面上に 1 つのパターンで官能化されている、方法。

【請求項 2】

表面から伸長する少なくとも 30, 000 の異なるポリヌクレオチドが、クラスター化され、各クラスターが、cDNA 配列の 1 つをコード化する、少なくとも 30, 000 の異なるポリヌクレオチドのサブセットを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

各クラスターが、50 乃至 500 の場所を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1 の複数の分子が、シランまたはシロキサンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

第 1 の複数の分子が、11-アセトキシウンデシルトリエトキシシラン、n-デシルトリエトキシシラン、(3-アミノプロピル)トリメトキシシラン、またはN-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミドを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 6】

各場所が、第 2 の複数の分子を含む領域に隣接しており、第 2 の複数の分子の各分子が、表面に結合し、ヌクレオチドに結合することができる利用可能な反応性基を欠いている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

第 2 の複数の分子が、フルオロシランを含み、随意に、フルオロシランが、(トリデカフルオロテトラヒドロオクチル)トリエトキシシランである、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

少なくとも 30, 000 の異なるポリヌクレオチドの各々が、少なくとも 30, 000 の異なるポリヌクレオチドの別の第 2 の重複領域と相補的である、第 1 の重複領域を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

重複領域が、長さが 10 乃至 100 の塩基を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 5, 000 の遺伝子をコード化する少なくとも 200, 000 の異なるポリヌクレオチドを合成する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

エラー率が合計エラー率である、請求項 1 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2013 年 8 月 5 日出願の米国仮特許出願第 61/862, 445 号、および 2013 年 8 月 5 日出願の米国仮特許出願第 61/862, 457 号の利益を主張するものであり、該出願は引用によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

40

高忠実度および低コストでの非常に効率的な化学的遺伝子合成は、バイオテクノロジーおよび医療において、および基礎的な生物学的研究において中心的な役割を有している。

新規遺伝子合成は、基礎的な生物学的研究およびバイオテクノロジーでの適用のための強力なツールである。小規模での比較的短いフラグメントの合成のための様々な方法が知られているが、これらの技術には、スケーラビリティ、自動化、速度、精度、およびコストの点で問題がある。所望の遺伝子の合成の成功を保証する且つ自動化に適用可能である、簡潔な、再生可能な、スケーラブルな、誤差がより少ない傾向の、およびコスト効率に優れた方法のためのデバイスが必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【0003】

上に言及されるように、より少ない誤差で効率的に、大きな遺伝子ライブラリまたは比較的より長いオリゴヌクレオチドフラグメントを迅速に合成することができる、方法、デバイスおよびシステムが急速に必要とされている。同様に、平行して多くの個々に対処可能な反応のためにマイクロ流体の規模で液体試薬を分割および混合することができる方法も必要とされている。本発明は、これらの必要性に対処し、関連する利点も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

一態様では、本明細書は、本発明に記載される遺伝子ライブラリを提供する。遺伝子ライブラリは、遺伝子の集合体を含む。幾つかの実施形態では、集合体は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満のエラー率を有する少なくとも0.5kbの長さであり得る、少なくとも100の異なる予め選択された合成遺伝子を含む。別の態様では、本発明はまた、遺伝子の集合体を含む遺伝子ライブラリを提供する。集合体は、各々が少なくとも0.5kbの長さであり得る、少なくとも100の異なる予め選択された合成遺伝子を含み得る。予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満のエラー率を含み得る。所望の予め決められた配列は、典型的にユーザー、例えばコンピューター化されたシステムを使用してデータを入力するユーザーによって、任意の方法によって供給され得る。様々な実施形態では、合成された核酸は、幾つかの場合において、例えば、次世代配列決定方法を使用して、合成された核酸の少なくとも一部分を配列決定することによって、これらの予め決められた配列と比較される。本明細書に記載される遺伝子ライブラリのいずれかに関連する幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、5000bpに1未満のエラー率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも0.05%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも0.5%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満のエラー率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、エラーがないか又はエラーが略ない。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満の欠失率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満の挿入率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満の置換率を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、各合成遺伝子の少なくとも10のコピーをさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、各合成遺伝子の少なくとも100のコピーをさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、各合成遺伝子の少なくとも1000のコピーをさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子の集合体は、少なくとも500の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、集合体は、少なくとも5000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、集合体は、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、少なくとも1kbである。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、少なくとも2kbである。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、少なくとも3kbである。幾つかの実施形態では、予め決められた配列は、予め選択された合成遺伝子と比較して、追加で20bp未満を含む。幾つかの実施形態では、予め決められた配列は、予め選択された合成遺伝子と比較して、追加で15bp未満を含む。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の少なくとも1つは、少なくとも0.1%、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の各々は、少なくとも0.1%、

10

20

30

40

50

他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の少なくとも1つは、少なくとも10%、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の各々は、少なくとも10%、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の少なくとも1つは、少なくとも2つの塩基対分、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の各々は、少なくとも2つの塩基対分、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、遺伝子の予め選択された配列と比較して、20000bpに1未満のエラー率を有する2kb未満である合成遺伝子をさらに含む。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセットは、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子の集合体の第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって遺伝子の集合体を構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の集合体の第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリは、100m³未満である空間内にある。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリは、1m³未満である空間内にある。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリは、1m³未満である空間内にある。

10

【0005】

別の態様では、本発明はまた、遺伝子ライブラリを構築する方法を提供する。該方法は、第1時点前にコンピューター可読非一時的媒体に、少なくとも遺伝子の第1リストおよび遺伝子の第2リストを入力する工程であって、遺伝子が、少なくとも500bpであり、結合リストへとコンパイルされたときに、結合リストが少なくとも100の遺伝子を含む、工程、および第2時点前に結合リスト中の遺伝子の90%以上を合成し、それによって、送達可能な遺伝子で遺伝子ライブラリを構築する工程を含む。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは1か月未満離れている。

20

【0006】

本明細書で提供されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、本明細書に記載されるような方法は、第2時点で少なくとも1つの遺伝子を送達する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子は、1/3000未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子の結合リスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、3000bpに1未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子の結合リスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセット中の遺伝子は、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストの第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかは、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって、遺伝子の第1リスト、第2リストまたは結合リストを構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストの第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストは、少なくとも500の遺伝子を含む。幾

30

40

50

つかの実施形態では、遺伝子の結合リストは、少なくとも5000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストは、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも1 kbであり得る。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも2 kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも3 kbである。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは25日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは5日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは2日未満離れている。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0007】

10

別の態様では、遺伝子ライブラリを構築する方法は、本明細書で提供される。該方法は、第1時点で、コンピューター可読非一時的媒体に、遺伝子のリストを入力する工程、遺伝子のリストの90%以上を合成し、それによって、送達可能な遺伝子で遺伝子ライブラリを構築する工程、および第2時点で送達可能な遺伝子を送達する工程を含む。幾つかの実施形態では、リストは少なくとも100の遺伝子を含み、遺伝子は少なくとも500 bpであり得る。さらにまた幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは1か月未満離れている。

【0008】

本明細書で提供されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような方法は、第2時点で少なくとも1つの遺伝子を送達する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子は、1/3000未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、3000 bpに1未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセット中の遺伝子は、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリを構築する方法は、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって、遺伝子のリストを構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0009】

本明細書で提供されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、遺伝子のリストは、少なくとも500の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも5000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも1 kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも2 kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも3 kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリを構築する方法に記載されるような第2時点は、第1時点とは25日未

50

満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは5日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは2日未満離れている。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0010】

別の態様では、本発明はまた、基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、a)ヌクレオチド結合に適した化学部分で官能化される分解された場所 (loci) を基板に提供する工程、およびb) 場所に特異的な予め決められた配列に従って、毎時少なくとも12のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロック (building blocks) を結合し、それによって、nの塩基対長である複数のオリゴヌクレオチドを合成する工程を含む。

基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法に関連した様々な実施形態が、本明細書に記載される。

【0011】

本明細書で提供されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法のいずれかにおいて、幾つかの実施形態では、該方法は、毎時少なくとも15のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、該方法は、毎時少なくとも20のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、該方法は、毎時少なくとも25のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/500bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/1000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/2000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、基板上の複数のオリゴヌクレオチドは、1/500bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上の複数のオリゴヌクレオチドは、1/1000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上の複数のオリゴヌクレオチドは、1/2000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。

【0012】

本明細書で提供されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、構築ブロックは、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、またはウリジン基、あるいは修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ホスホラミダイトを含む。幾つかの実施形態では、n量体オリゴヌクレオチドのnは、少なくとも100である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも200である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも300である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも400である。幾つかの実施形態では、表面は、少なくとも100, 000の分解された場所を含み、複数の成長しているオリゴヌクレオチドの少なくとも2つは、互いに異なり得る。

【0013】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチ

ドを合成する方法は、結合前に基板を真空乾燥する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ブロッキング基を含む。幾つかの実施形態では、ブロッキング基は、酸不安定性DMTを含む。幾つかの実施形態では、酸不安定性DMTは、4, 4'-ジメトキシトリチルを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法は、酸化または硫化をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法は、分離されたオリゴヌクレオチド鎖を化学的にキャップする(capping)工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法は、ブロッキング基を除去し、それによって、成長しているオリゴヌクレオチド鎖を非ブロック化する(deblocking)工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、真空乾燥工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、酸化工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、キャップ工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、非ブロック化工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも10,000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも100,000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも1,000,000のビアを含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

10

20

【0014】

本発明の別の態様では、一連の併発反応を行うためのシステムが、本明細書で提供される。該システムは、複数の分解された場所を有する第1表面、および複数の分解されたリアクターキャップを有するキャップ要素を含む。幾つかの実施形態では、該システムは、複数の分解されたリアクターキャップを、第1表面とキャップ要素との間に仮シール(seal)を形成する第1表面上の複数の分解された場所と並べ、それによって、第1表面上の場所を各リアクターキャップに関係するリアクターへと少なくとも2つの場所の群に物理的に分割する。幾つかの実施形態では、各リアクターは、第1セットの試薬を保持する。

30

【0015】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行うためのシステムのいずれかに関連する幾つかの実施形態では、第1表面からの放出後に、リアクターキャップは、第1セットの試薬の少なくとも一部分を保持する。幾つかの実施形態では、一部分は、約30%である。幾つかの実施形態では、一部分は、約90%である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、支持体表面に作られたマイクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、 mm^2 当たり少なくとも1の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、 mm^2 当たり少なくとも10の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、 mm^2 当たり少なくとも100の密度である。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャネルは、異なる幅を有する2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャネルは、異なる長さを有する2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、100 μm より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、1000 μm より短い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が50 μm より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が100 μm より短い。幾つかの実施形態では、該システムは、 mm^2 当たり少なくとも0.1の密度で複数の分解された場所を有する第2表面をさらに含む。幾つかの実施形態では、該システムは、 mm^2 当たり少なくとも1の密度で複数の分解された場所を有する第2表面をさらに含む。

40

50

幾つかの実施形態では、該システムは、 mm^2 当たり少なくとも 10 の密度で複数の分解された場所を有する第 2 表面をさらに含む。

【0016】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行うためのシステムのいずれに関連する幾つかの実施形態では、第 1 表面の分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、第 2 表面の分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第 1 または第 2 の表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所における分解された場所は、少なくとも $0.001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の密度で外周の名目の (nominal) アーク長さを含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所における分解された場所は、少なくとも $0.01 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の密度で外周の名目のアーク長さを含む。幾つかの実施形態では、第 1 表面の複数の分解された場所における分解された場所は、高エネルギー表面を含む。幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 の表面は、与えられた液体とは異なる表面張力を含む。幾つかの実施形態では、高い表面エネルギーは、20 度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体基板上に位置付けられる。幾つかの実施形態では、キャップ要素は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0017】

また別の態様では、本発明はまた、一連の (an array of) 筐体を提供する。一連の筐体は、リアクターキャップを含む第 1 基板および第 2 基板を含む、複数の分解されたリアクター、および各リアクター中の少なくとも 2 つの分解された場所を含む。幾つかの場合では、分解されたリアクターは、可剥性シールで分離される。幾つかの場合では、リアクターキャップは、第 1 基板からの第 2 基板の放出後にリアクターの中身の少なくとも一部分を保持する。幾つかの実施形態では、第 2 基板上のリアクターキャップは、 mm^2 当たり少なくとも 0.1 の密度を有している。幾つかの実施形態では、第 2 基板上のリアクターキャップは、 mm^2 当たり少なくとも 1 の密度を有している。幾つかの実施形態では、第 2 基板上のリアクターキャップは、 mm^2 当たり少なくとも 10 の密度を有している。

【0018】

本明細書で提供されるような一連の筐体に関連する幾つかの実施形態では、リアクターキャップは、リアクターの中身の少なくとも 30% を保持する。幾つかの実施形態では、リアクターキャップは、リアクターの中身の少なくとも 90% を保持する。幾つかの実施形態では、分解された場所は、少なくとも $2/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、分解された場所は、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも 5 つの分解された場所をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも 20 の分解された場所をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも 50 の分解された場所をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも 100 の分解された場所をさらに含む。

【0019】

本明細書に記載されるような一連の筐体に関連する幾つかの実施形態では、分解された場所は、支持体表面に作られたマイクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる幅を有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる長さ有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $0.01\text{ }\mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の密度を有している少なくとも2つのチャンネルの外周の名目のアーク長さを含む。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $0.001\text{ }\mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の密度を有している少なくとも2つのチャンネルの外周の名目のアーク長さを含む。幾つかの実施形態では、分解されたリアクターは、可剥性シールで分離される。幾つかの実施形態では、可剥性シールは、キャピラリーバーストバルブ (capillary burst valve) を含む。

【0020】

本明細書に記載されるような一連の筐体に関連する幾つかの実施形態では、第1基板の複数の分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、第2基板の複数の分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第1または第2の表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\text{ }\mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\text{ }\mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\text{ }\mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、第1基板の複数の分解された場所は、高エネルギー表面を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2の基板は、与えられた液体とは異なる表面張力を含む。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、 20 度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所またはリアクターキャップは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体基板上に位置付けられる。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0021】

さらにまた別の態様では、本発明はまた、一連の併発反応を行う方法を提供する。該方法は、(a) 第1表面に複数の分解された場所を提供する工程、(b) キャップ要素に複数の分解されたリアクターキャップを提供する工程、(c) 複数の分解されたリアクターキャップを、第1表面とキャップ要素との間に仮シールを形成する第1表面上の複数の分解された場所と並べ、それによって、第1表面上の場所を少なくとも2つの場所の群に物理的に分割する工程、(d) 第1反応を行い、それによって、第1セットの試薬を形成する工程、および(e) 第1表面からキャップ要素を放出する工程を含み、ここで、各リアクターキャップは、第1反応容積中に第1セットの試薬の少なくとも一部分を保持する。幾つかの実施形態では、一部分は、約 30% である。幾つかの実施形態では、一部分は、約 90% である。

【0022】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法はさらに、(f) 第2表面に複数の分解された場所を提供する工程、(g) 複数の分解されたリアクターキャップを、第2表面とキャップ要素との間に仮シールを形成する第2表面上の複数の分解された場所と並べ、それによって、第2表面上の場所を物理的に分割する工程、(h) 第1セットの試薬の一部分を使用して第2反応を行い、それによって、第2セッ

トの試薬を形成する工程、および (i) 第2表面からキャップ要素を放出する工程を含み、ここで、各リアクターキャップは、第2反応容積中に第2セットの試薬の少なくとも一部分を保持することができる。幾つかの実施形態では、一部分は、約30%である。幾つかの実施形態では、一部分は、約90%である。

【0023】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法のいずれかの実施において、複数の分解された場所は、第1表面上に mm^2 当たり少なくとも1の密度を有することができる。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第1表面上に mm^2 当たり少なくとも10の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第1表面上に mm^2 当たり少なくとも100の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、キャップ要素上に mm^2 当たり少なくとも0.1の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、キャップ要素上に mm^2 当たり少なくとも1の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、キャップ要素上に mm^2 当たり少なくとも10の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第2表面上に mm^2 当たり0.1を超える密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第2表面上に mm^2 当たり1を超える密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第2表面上に mm^2 当たり10を超える密度を有している。

【0024】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法のいずれかの実施において、本明細書に記載されるような (e) および (i) における放出工程などの表面工程からのキャップ要素の放出は、異なる速度で行うことができる。幾つかの実施形態では、第1表面の分解された場所は、第1反応に対する試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、第2表面の分解された場所は、第2反応に対する試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第1または第2の表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも25bpである。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも200bpである。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも300bpである。幾つかの実施形態では、第1表面の分解された場所は、高エネルギー表面を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2の表面は、与えられた液体とは異なる表面張力を含む。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、20度未満の水接触角に対応する。

【0025】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法に関連する幾つかの実施形態では、複数の分解された場所または分解されたリアクターキャップは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体基板上に位置付けられる。幾つかの実施形態では、第1および第2の反応容積は、異なる。幾つかの実施形態では、第1または第2の反応は、ポリメラーゼサイクリングアセンブリを含む。幾つかの実施形態では、第1または第2の反応は、酵素的遺伝子合成、アニーリングおよびライゲーション反応、ハイブリッド遺伝子を介する2つの遺伝子の同時合成、ショットガンライゲーションおよび共ライゲーション、挿入遺伝子合成、DNAの一本鎖を介する遺伝子合成、テンプレート向けのライゲーション、リガーゼ連鎖反応、マイクロアレイ媒介性の遺伝子合成、固相アセンブリ、Sloning構築ブロック技術、またはRNAライゲーション媒介性遺伝子合成を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応

を行う方法はさらに、キャップ要素を冷却する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法はさらに、第1表面を冷却する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法はさらに、第2表面を冷却する工程を含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0026】

別の態様では、本発明は、官能化された表面を有する基板を提供する。官能化された表面を有する基板は、複数の分解された場所を有する固体担体を含むことができる。幾つかの実施形態では、分解された場所は、固体担体の表面エネルギーを増大させる部分で官能化される。幾つかの実施形態では、分解された場所は、マイクロチャネル上で局所化される。

10

【0027】

本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板に関連する幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、 1 nl 未満の容積を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、 $0.036\text{ }\mu\text{m}/\text{平方}\text{ }\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所における分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、基板に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、 20 度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、固体担体は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロース酸ポリマー、ポリアクリルアミド、PDMSおよび、ガラスから成る群から選択される物質を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度である。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

20

30

【0028】

別の態様では、本発明はまた、官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、(a)少なくとも1つのインクジェットポンプによって第1試薬の少なくとも1滴を複数の場所の第1場所に適用する工程、(b)基板に負圧を加える工程、および(c)少なくとも1つのインクジェットポンプによって第2試薬の少なくとも1滴を第1場所に適用する工程を含む。

40

【0029】

本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成するための方法のいずれかの実施において、第1および第2の試薬は、異なり得る。幾つかの実施形態では、第1場所は、その表面エネルギーを増大させる部分で官能化される。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、複数の場所は、基板表面に作られたミクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、ミクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャネルは、異なる幅を有する2つのチャネルを含む。幾

50

つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる長さを有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、基板表面は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。

【0030】

本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成するための方法に関連する幾つかの実施形態では、第1試薬及び／又は第2試薬の滴下の容積は、少なくとも 2 p l である。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、約 40 p l である。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、多くて 100 p l である。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも $0.01\text{ }\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも $0.001\text{ }\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、基板の周囲の圧力は、 1 mTorr 未満に低下される。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0031】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、第1滴下から生じる少なくとも第1構築ブロックを第1場所上の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ブロッキング基を含む。幾つかの実施形態では、ブロッキング基は、酸不安定性DMTを含む。幾つかの実施形態では、酸不安定性DMTは、4,4'-ジメトキシトリチルを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、酸化または硫化を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、分離されたオリゴヌクレオチド鎖を化学的にキャップする工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、ブロッキング基を除去し、それによって、成長しているオリゴヌクレオチド鎖を非ブロック化する工程を含む。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、結合工程の間に基板の位置から 10 cm 以内にある。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、酸化工程の間に基板の位置から 10 cm 以内にある。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、キャップ工程の間に基板の位置から 10 cm 以内にある。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、非ブロック化工程の間に基板の位置から 10 cm 以内にある。幾つかの実施形態では、第1場所は、基板表面に作られたマイクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、酸化工程のための少なくとも1つの試薬は、少なくとも1つの試薬を含む溶液でマイクロ構造を満たすことによって提供される。幾つかの実施形態では、キャップ工程のための少なくとも1つの試薬は、少なくとも1つの試薬を含む溶液でマイクロ構造を満たすことによって提供される。幾つかの実施形態では、第1場所は、基板表面に作られたマイクロ構造上に存在し、非ブロック化工程のための少なくとも1つの試薬は、少なくとも1つの試薬を含む溶液でマイクロ構造を満たすことによって提供され得る。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面

を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、密閉チャンバー内の基板を封入する工程を含む。幾つかの実施形態では、密閉チャンバーは、第1場所からの液体のパーズを可能にする。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、液体を第1場所に動作可能に連結されるドレインに通して排水する工程を含む。幾つかの実施形態では、基板に負圧を加えた後に、基板上の含水量は、1 p p m未満である。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、20度未満の水接触角に対応して増大される。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0032】

また別の態様では、本発明は、複数の分解された場所に試薬を付着させる方法を提供する。該方法は、インクジェットポンプを介して第1試薬の少なくとも1滴を複数の場所の第1場所に適用する工程、およびインクジェットポンプを介して第2試薬の少なくとも1滴を複数の分解された場所の第2場所に適用する工程を含む。幾つかの実施形態では、第2場所は、第1場所に隣接している。さらに幾つかの実施形態では、第1および第2の試薬は、異なる。さらにまた幾つかの実施形態では、第1および第2の場所は、支持体表面に作られたマイクロ構造上に存在する。また幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、100 μm の深さを超える少なくとも1つのチャンネルを含む。

【0033】

本明細書に記載されるような複数の分解された場所に試薬を付着させる方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる幅を有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる長さを有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、第1場所は、第2試薬の0.1%未満を受け、第2場所は、第1試薬の0.1%未満を受ける。幾つかの実施形態では、場所は、少なくとも0.01 μm /平方 μm の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、場所は、少なくとも0.001 μm /平方 μm の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2の場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態において、試薬のコーティンは、基板に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、100 μm より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、1000 μm より短い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が50 μm より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が100 μm より短い。幾つかの実施形態では、支持体表面は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも1/mm²の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも100/mm²の密度である。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、少なくとも2 p lである。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、約40 p lである。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、多くて100 p lである。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0034】

さらにまた別の態様では、本発明は、マイクロ流体システムを提供する。マイクロ流体システムは、mm²当たり少なくとも10の密度で複数のマイクロウェルを有する第1表面、および複数のマイクロウェルの1つの内部の液滴を含む。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルの1つの内部の液滴は、約1-1000の範囲でレイノルズ数を有している。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、mm²当たり少なくとも1の密度である。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、mm²当たり少なくとも

10

20

30

40

50

10の密度である。

【0035】

本明細書で提供されるようなマイクロ流体システムに関連する幾つかの実施形態では、マイクロ流体システムはさらに、インクジェットポンプを含む。幾つかの実施形態では、液滴は、インクジェットポンプによって付着される。幾つかの実施形態では、液滴は、第1マイクロウェルの寸法の下半分において移動する。幾つかの実施形態では、液滴は、第1マイクロウェルの寸法の中部3分の1において移動する。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、 mm^2 当たり少なくとも100の密度である。幾つかの実施形態では、第1マイクロウェルの寸法は、液滴より大きい。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、少なくとも2 p lである。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、約40 p lである。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、多くて100 p lである。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルの各々は、少なくとも1つのマイクロチャンネルに流体接続される。幾つかの実施形態では、少なくとも1つのマイクロチャンネルは、表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、20度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体担体上で形成される。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも $0.01\text{ }\mu\text{m}/\text{平方}\text{ }\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、 $0.001\text{ }\mu\text{m}/\text{ }\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。幾つかの実施形態では、液滴は、オリゴヌクレオチド合成を可能にする試薬を含む。幾つかの実施形態では、試薬は、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログである。

【0036】

別の態様では、本発明は、複数のマイクロウェルに液滴を付着させる方法を提供する。該方法は、インクジェットポンプを介して少なくとも1滴を複数のマイクロウェルの第1マイクロウェルに適用する工程を含む。幾つかの場合では、複数のマイクロウェルの1つの内部の液滴は、約1-1000の範囲でレイノルズ数を有している。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、少なくとも 1 mm^2 の密度を有する。また幾つかの場合では、複数のマイクロウェルは、少なくとも $10/\text{mm}^2$ の密度を有する。

【0037】

本明細書で提供されるような複数のマイクロウェルに液滴を付着させる方法のいずれかの実施において、複数のマイクロウェルは、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度を有することができる。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、液滴は、少なくとも $2\text{ m}/\text{秒}$ の速度で適用される。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、少なくとも2 p lである。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、約40 p lである。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、多くて100 p lである。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルの各々は、少

なくとも1つのマイクロチャネルに流体接続される。幾つかの実施形態では、少なくとも1つのマイクロウェルは、表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、20度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体担体上で形成される。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、少なくとも $0.01\mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、少なくとも $0.001\mu\text{m}^2\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、マイクロウェルの内部の液滴は、マイクロウェルの中部3分の1において移動する。幾つかの実施形態では、マイクロウェルの内部の液滴は、マイクロウェルの下半分において移動する。幾つかの実施形態では、液滴は、オリゴヌクレオチド合成を可能にする試薬を含む。幾つかの実施形態では、試薬は、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログである。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わされ得ることが留意される。

【0038】

別の態様では、本発明はまた、分割の方法を提供する。分割の方法は、第1の複数の分解された場所で液体を含む第1表面を第2の複数の分解された場所を含む第2表面と接触させる工程、液体の所望の画分を第1の複数の分解された場所から第2の複数の分解された場所まで移すことができるように放出の速度を決定する工程、および前記速度で第1表面から第2表面を引き離す工程を含む。幾つかの実施形態では、第1表面は、液体との第1表面張力を含み、第2表面は、液体との第2表面張力を含むことができる。

【0039】

本明細書で提供されるような分割の方法のいずれかの実施において、第1表面の一部は、表面張力を増大させる部分でコーティングされ得る。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、第1表面の表面張力は、20度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、第2表面の表面張力は、90度を超える水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、第1表面は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $0.01\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $0.001\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、第1の複数の分解された場所は、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、第1の複数の分解された場所は、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、第1または第2の表面は、液体の少なくとも一部分を保持するマイクロチャネルを含む。幾つかの実施形態では、第1または第2の表面は、液体の少なくとも一部分を保持するナノリアクターを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような分割の方法は、第3表面を第3の複数の分解された場所と接触させる工程をさらに含む

。幾つかの実施形態では、液体は、核酸を含む。幾つかの実施形態では、所望の画分は、30%を超える。幾つかの実施形態では、所望の画分は、90%を超える。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0040】

また別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載されるような混合の方法を提供する。該方法は、(a)作られた複数のマイクロ構造を含む第1基板を提供する工程、(b)複数の分解されたリアクターキャップを含む第2基板を提供する工程、(c)複数の第1リアクターキャップを第1基板中のnのマイクロ構造から液体を受けるように構成することができるように第1基板と第2基板を並べる工程、および(d)液体をnのマイクロ構造から第1リアクターキャップへと送達し、それによって、混合物を形成するnのマイクロ構造から液体を混合する工程を含む。

【0041】

本明細書に記載されるような混合の方法のいずれかの実施において、複数の分解されたリアクターキャップは、少なくとも $0.1/\text{mm}^2$ の密度であり得る。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、少なくとも $10/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、複数のマイクロ構造の各々は、異なる幅の少なくとも2つのチャンネルを含むことができる。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体担体上で形成される。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも $0.01\text{ }\mu\text{m}/\text{平方}\text{ }\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも $0.001\text{ }\mu\text{m}/\text{ }\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\text{ }\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、複数のマイクロ構造は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第1表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $10/\text{mm}^2$ の密度である。

【0042】

本明細書に記載されるような混合の方法に関連する幾つかの実施形態では、複数の第1リアクターキャップを第1基板中のnのマイクロ構造から液体を受けるように構成することができるように第1基板と第2基板を並べる、工程(c)の後に、第1基板と第2基板との間に $100\text{ }\mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、工程(c)の後、第1基板と第2基板との間に $50\text{ }\mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、工程(c)の後、第1基板と第2基板との間に $20\text{ }\mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、工程(c)の後、第1基板と第2基板との間に $10\text{ }\mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、混合物は、部分的に間隙へと広がる。幾つかの実施形態では、混合の方法はさらに、第1および第2の基板をともにより近づけることによって、間隙を密閉する工程を含む

。幾つかの実施形態では、2つのチャネルの1つは、20度未満の水接触角に対応する表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、送達は、圧力によって実行される。幾つかの実施形態では、混合物の容積は、リアクターキャップの容積より大きい。幾つかの実施形態では、液体は、核酸を含む。幾つかの実施形態において、nは、少なくとも10である。幾つかの実施形態において、nは、少なくとも25である。幾つかの実施形態では、混合物を形成する、液体が混合されるマイクロ構造の数である、nは、少なくとも50であり得る。幾つかの実施形態において、nは、少なくとも75である。幾つかの実施形態において、nは、少なくとも100である。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わされ得ることが留意される。

10

【0043】

また別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、ヌクレオチド結合に適した化学部分で官能化される分解された場所を基板に提供する工程、および場所に特異的な予め決められた配列に従って、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合し、それによって、nの塩基対長である複数のオリゴヌクレオチドを合成する工程を含む。

【0044】

本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法のいずれかの実施において、該方法はさらに、毎時少なくとも12のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、毎時少なくとも15のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、毎時少なくとも20のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、毎時少なくとも25のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/500bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/1000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/2000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/500bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/1000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/2000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。

20

30

40

【0045】

本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法に関連する幾つかの実施形態では、構築ブロックは、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、またはウリジン基、あるいは修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ジヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ホスホラミダイトを含む。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも100である。幾つかの実施形態では、nは、少なく

50

とも200である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも300である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも400である。幾つかの実施形態では、基板は、少なくとも100,000の分解された場所を含み、複数の成長しているオリゴヌクレオチドの少なくとも2つは、互いに異なる。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、結合前に基板を真空乾燥する工程を含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ブロック基を含む。幾つかの実施形態では、ブロック基は、酸不安定性DMTを含む。幾つかの実施形態では、酸不安定性DMTは、4,4'-ジメトキシトリチルを含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、酸化または硫化を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、分離されたオリゴヌクレオチド鎖を化学的にキャップする工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、ブロック基を除去し、それによって、成長しているオリゴヌクレオチド鎖を非ブロック化する工程を含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも10,000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の表面および基板の第2表面の間の流体連通を提供する少なくとも100,000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の表面および基板の第2表面の間の流体連通を提供する少なくとも1,000,000のビアを含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

10

【0046】

また別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを構築する方法を提供する。該方法は、第1時点で、コンピューター可読非一時的媒体に、遺伝子のリストを入力する工程であって、該リストが少なくとも100の遺伝子を含み、該遺伝子が少なくとも500bpである、工程、遺伝子のリストの90%以上を合成し、それによって、送達可能な遺伝子で遺伝子ライブラリを構築する工程、遺伝子ライブラリを表わす配列決定ライブラリを準備する工程、配列情報を得る工程、配列情報に基づいて少なくとも送達可能な遺伝子のサブセットを選択する工程、および第2時点で選択された送達可能な遺伝子を送達する工程を含み、ここで、第2時点は、第1時点とは1か月未満離れている。

20

【0047】

本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、配列情報は次世代配列決定を介して得られる。配列情報は、サンガー配列決定によって得られる。幾つかの実施形態では、該方法は、第2時点で少なくとも1つの遺伝子を送達する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子は、1/3000未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、3000bpに1未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセットは、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、該方法は、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって、遺伝子のリストを構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ

30

40

50

燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも500の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも5000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも1 kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも2 kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも3 kbである。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは25日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは5日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは2日未満離れている。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

10

【0048】

本明細書には、幾つかの実施形態において、核酸合成のためのマイクロ流体デバイスが提供され、該マイクロ流体デバイスは、対向面間にmのマイクロ流体接続部のnのグルーピングを含む実質的に平面の基板部を含み、ここで、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の各1つは、第1チャンネルおよび第2チャンネルを含み、nのグルーピングの各々内の第1チャンネルは、すべてのmのマイクロ流体接続部に共通しており、複数のマイクロ流体接続部は、基板の最小の寸法にわたって実質的に平面の基板部に及んでおり、およびnおよびmは、少なくとも2である。幾つかの実施形態では、第2チャンネルは、該デバイスへのオリゴヌクレオチドの付着を促進することができるコーティングで官能化される。幾つかの実施形態では、該デバイスは、nのグルーピングのkにおいて第2チャンネルに付けられる第1オリゴヌクレオチドをさらに含む。幾つかの実施形態では、kは、1である。幾つかの実施形態では、該デバイスは、nのグルーピングのlに付けられる第2オリゴヌクレオチドをさらに含む。幾つかの実施形態では、lは、1である。幾つかの実施形態では、1グルーピングにおけるグルーピングはどれも、kのグルーピングにはない。

20

【0049】

幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも10のヌクレオチド長、25のヌクレオチド長、50のヌクレオチド長、75のヌクレオチド長、100のヌクレオチド長、125のヌクレオチド長、150のヌクレオチド長、または200のヌクレオチド長である。

30

【0050】

幾つかの実施形態では、第1および第2のオリゴヌクレオチドは、少なくとも2つのヌクレオチド、3つのヌクレオチド、4つのヌクレオチド、5つのヌクレオチド、または10のヌクレオチド、異なる。

【0051】

幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部は、長くて5 mm、1.5 mm、1.0 mm、または0.5 mm長である。幾つかの実施形態では、nのグルーピングの各々内の第1チャンネルは、長くて5 mm、1.5 mm、1.0 mm、または0.5 mm長である。幾つかの実施形態では、nのグルーピングの各々内の第1チャンネルは、少なくとも0.05 mm、0.75 mm、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm、または0.4 mm長である。幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の各々における第2チャンネルは、長くて0.2 mm、0.1 mm、0.05 mm、0.04 mm、または0.03 mm長である。幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の各々における第2チャンネルは、少なくとも0.001 mm、0.005 mm、0.01 mm、0.02 mm、または0.03 mm長である。幾つかの実施形態では、nのグルーピングの各々における第1チャンネルの断面は、少なくとも0.01 mm、0.025 mm、0.05 mm、または0.075 mmである、幾つかの実施形態では、nのグルーピングの各々における第1チャンネルの断面は、長くて1 mm、0.5 mm、0.25 mm、0.1 mm、または0.075 mmである。幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の各々における第2チャンネルの断面は、少なくとも0.001 mm、0.05 mm、0.01 mm、0

40

50

． 0 1 5 mm、または 0 . 0 2 mm である。幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の各々における第 2 チャネルの断面は、長くて 0 . 2 5 mm、0 . 1 2 5 mm、0 . 0 5 0 mm、0 . 0 2 5 mm、0 . 0 2 mm である。幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の各々における第 2 チャネルの断面での標準偏差は、断面の平均の 2 5 %、2 0 %、1 5 %、1 0 %、5 %、または 1 % 未満である。幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の第 2 チャネルの少なくとも 9 0 % における断面での偏差は、多くて 2 5 %、2 0 %、1 5 %、1 0 %、5 %、または 1 % である。

【 0 0 5 2 】

幾つかの実施形態では、 n は、少なくとも 1 0、2 5、5 0、1 0 0、1 0 0 0、または 1 0 0 0 0 である。幾つかの実施形態では、 m は、少なくとも 3、4、または 5 である。

10

【 0 0 5 3 】

幾つかの実施形態では、基板は、少なくとも 5 %、1 0 %、2 5 %、5 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % のシリコンを含む。

【 0 0 5 4 】

幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の第 2 チャネルの少なくとも 9 0 % は、表面エネルギーを増大させる部分で官能化される。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、7 5、5 0、3 0、または 2 0 度未満の水接触角に対応するレベルまで増大される。

【 0 0 5 5 】

20

幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の第 2 チャネルの少なくとも 9 0 % に対するアスペクト比は、1、0 . 5、または 0 . 3 未満である。幾つかの実施形態では、 n のグルーピングにおける第 1 チャネルの少なくとも 9 0 % に対するアスペクト比は、0 . 5、0 . 3、または 0 . 2 未満である。

【 0 0 5 6 】

幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の少なくとも 1 0 %、2 5 %、5 0 %、7 5 %、9 0 %、または 9 5 % の全長は、実質的に平面の基板の最小の寸法の 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、1 0 0 %、2 0 0 %、5 0 0 %、または 1 0 0 0 % 以内である。

【 0 0 5 7 】

30

幾つかの実施形態では、該デバイスの実質的に平面の部分は、S O I ウェーハから作られる。

【 0 0 5 8 】

別の態様では、本発明は、核酸増幅の方法に関し、該方法は、(a) 各々が異なる標的配列を含む、 n の環状化した一本鎖核酸を含むサンプルを提供する工程、(b) n の環状化した一本鎖核酸の m の上で少なくとも 1 つのアダプターハイブリダイゼーション配列にハイブリダイズ可能な第 1 アダプターを提供する工程、(c) m の環状化した一本鎖核酸をテンプレートとして使用して第 1 アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、 m の一本鎖アンプリコン核酸を生成する工程であって、 m の一本鎖アンプリコン核酸の各々が、そのテンプレートからの標的配列の複数のレプリカを含む、工程、(d) 第 1 アダプターにハイブリダイズ可能な第 1 補助オリゴヌクレオチドを提供する工程、および (e) 複数の切断部位で m の一本鎖アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第 1 薬剤を提供し、それによって、 m の環状化した一本鎖核酸において標的核酸の複数の一本鎖レプリカを生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、 n または m は、少なくとも 2 である。幾つかの実施形態では、 n または m は、少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 5、2 0、2 5、5 0、7 5、1 0 0、1 5 0、2 0 0、3 0 0、4 0 0、または 5 0 0 である。幾つかの実施形態において、 m は、 n 未満である。幾つかの実施形態では、 n の環状化した一本鎖核酸を含むサンプルは、少なくとも n の直鎖状一本鎖核酸を提供することによって形成され、その各々は、異なる標的配列の 1 つを含む且つ n の直鎖状一本鎖核酸を環状化し、それによって、 n の環状化した一本鎖核酸を生成する

40

50

。幾つかの実施形態では、第1アダプターは、nの直鎖状一本鎖核酸の両端に同時にハイブリダイズ可能である。幾つかの実施形態では、nの直鎖状一本鎖核酸における異なる標的配列は、第1および第2のアダプターハイブリダイゼーション配列に挟まれる。幾つかの実施形態では、少なくともnの直鎖状一本鎖核酸は、新規オリゴヌクレオチド合成によって生成される。幾つかの実施形態では、nの直鎖状一本鎖核酸の各々における第1アダプターハイブリダイゼーション配列は、2つまでのヌクレオチド塩基分、異なる。幾つかの実施形態では、第1または第2のアダプターハイブリダイゼーション配列は、少なくとも5つのヌクレオチド長である。幾つかの実施形態では、第1または第2のアダプターハイブリダイゼーション配列は、長くて75、50、45、40、35、30、または25のヌクレオチド長である。幾つかの実施形態では、nの直鎖状一本鎖核酸の端部は、第1アダプターが直鎖状一本鎖核酸の両端に同時にハイブリダイズされるときに、第1アダプター上の隣接した塩基と対になる。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、アダプターハイブリダイゼーション配列が、mの環状化した一本鎖核酸レプリカの残りの配列部分の少なくとも5%から切り離されるような位置である。幾つかの実施形態では、少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列以外のmの環状化した一本鎖核酸レプリカの配列の少なくとも5%は、切断されないままである。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列の外側にある。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、標的配列から独立している。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、第1アダプターまたは第1補助オリゴヌクレオチドの配列内の少なくとも1つの配列要素によって決定される。幾つかの実施形態では、配列要素は、制限エンドヌクレアーゼのための認識部位を含む。幾つかの実施形態では、第1補助オリゴヌクレオチドまたは第1アダプターオリゴヌクレオチドは、IIS型制限エンドヌクレアーゼのための認識部位を含む。幾つかの実施形態では、認識部位は、切断部位から少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のヌクレオチド、離れている。幾つかの実施形態では、複数の切断部位は、一本鎖核酸と二本鎖核酸の接合部にある。幾つかの実施形態では、二本鎖核酸は、第1アダプターおよび第1補助オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、一本鎖核酸は、mの異なる標的配列から本質的に成る。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて95%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて90%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて80%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて50%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの一本鎖アンプリコン核酸の生成には、鎖置換増幅を含む。幾つかの実施形態では、第1補助オリゴヌクレオチドは、アフィニティータブを含む。幾つかの実施形態では、アフィニティータブは、ビオチンまたはビオチン誘導体を含む。幾つかの実施形態では、該方法は、二本鎖核酸をサンプルから単離する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、単離する工程は、アフィニティー精製、クロマトグラフィー、またはゲル精製を含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、制限エンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、少なくとも2つの制限エンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、IIS型制限エンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、ニッキングエンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、少なくとも2つのニッキングエンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、MlyI、SclI、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyDI、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjiI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Ps

10

20

30

40

50

p6I、MnII、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AclI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb. BsrDI、Nb. BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl11108I、UbaPI、Nt. AlwI、Nt. BsmAI、Nt. BstNBI、およびNt. BspQI、およびそれらの変異体から成る群から選択される少なくとも1つの酵素を含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、リストされた第1薬剤および変異体のいずれかとして、同じ機能を本質的に含むか、同じ又は本質的に同じ認識配列を認識するか、あるいは同じ又は本質的に同じ切断部位を切断する。幾つかの実施形態では、少なくとも2つの制限酵素は、MlyIおよびBciVIまたはBfuCIおよびMlyIを含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、(a) サンプルを複数の分画へと分割する工程、(b) nの異なる環状化一本鎖核酸のkの上で少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列にハイブリダイズ可能な第2アダプターを少なくとも1つの分画に提供する工程、(c) kの環状化した一本鎖核酸をテンプレートとして使用して第2アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、kの一本鎖アンプリコン核酸を生成する工程であって、第2一本鎖アンプリコン核酸が、そのテンプレートからの標的配列の複数のレプリカを含む、工程、(d) 第2アダプターにハイブリダイズ可能な第2補助オリゴヌクレオチドを提供する工程、および(e) 第2の複数の切断部位でkの一本鎖アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第2薬剤を提供し、それによって、kの環状化した一本鎖核酸において標的核酸の複数の一本鎖レプリカを生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2のアダプターは、同じである。幾つかの実施形態では、第1および第2の補助オリゴヌクレオチドは、同じである。幾つかの実施形態では、第1および第2の薬剤は、同じである。幾つかの実施形態では、k+mは、n未満である。幾つかの実施形態では、kは、少なくとも2である。幾つかの実施形態では、nの環状化一本鎖核酸を含むサンプルは、一本鎖核酸増幅によって形成される。幾つかの実施形態では、一本鎖核酸増幅は、(a) 少なくともmの環状化一本鎖前駆体核酸を含むサンプルを提供すること、(b) mの環状化一本鎖前駆体核酸にハイブリダイズ可能な第1前駆体アダプターを提供すること、(c) mの環状化した一本鎖前駆体核酸をテンプレートとして使用して第1前駆体アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、mの一本鎖前駆体アンプリコン核酸を生成する工程であって、一本鎖前駆体アンプリコン核酸が、mの環状化した一本鎖前駆体核酸の複数のレプリカを含む、工程、(d) 第1前駆体アダプターにハイブリダイズ可能な第1前駆体補助オリゴヌクレオチドを提供する工程、および(e) 複数の切断部位で第1一本鎖前駆体アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第1前駆体薬剤を提供し、それによって、mの直鎖状前駆体核酸を生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、mの直鎖状前駆体核酸を環状化する工程を含み、それによって、mの環状化した一本鎖前駆体核酸の複数のレプリカを形成する。幾つかの実施形態では、mの環状化した一本鎖前駆体核酸は、少なくとも10、100、250、500、750、1000、1500、2000、3000、4000、5000、10000倍、またはそれ以上、一本鎖レプリカにおいて増幅される。幾つかの実施形態では、mの環状化した一本鎖核酸の少なくとも1つは、約または多くて約100nM、10nM、1nM、50pM、1pM、100fM、10fM、1fM、またはそれ以下の濃度である。幾つかの実施形態では、環状化は、ライゲーションを含む。幾つかの実施形態では、ライゲーションは、T4 DNAリガーゼ、T3 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、および9N DNAリガーゼから成る群から選択されるリガーゼの使用を含む。

【0059】

またさらなる態様では、本発明は、様々な実施形態において、キットに関し、該キットは、(a) 第1アダプター、(b) 第1アダプターにハイブリダイズ可能な第1補助オリゴヌクレオチド；(C) リガーゼ、および(d) Mly I、Sch I、Alw I、Bcc I、Bce A I、Bsm A I、Bsm F I、Fok I、Hga I、Ple I、Sfa N I、Bfu A I、Bsa I、Bsp M I、Btg Z I、Ear I、Bsp Q I、Sap I、Sge I、Bce F I、Bsl F I、Bso M A I、Bst 71 I、Faq I、Ace I I I、Bbv I I、Bve I、Lgu I、Bfu C I、Dpn I I、Fat I、Mbo I、Mlu C I、Sau 3 A I、Tsp 509 I、Bss K I、Psp G I、Sty D 4 I、Tsp 45 I、Aox I、Bsc F I、Bsp 143 I、Bss M I、Bse E N I I、Bst M B I、Kzo 9 I、Ned I I、Sse 9 I、Tas I、Tsp E I、Ajn I、Bst S C I、Eco R I I、Mae I I I、Nmu C I、Psp 6 I、Mnl I、Bsp C N I、Bsr I、Bts C I、Hph I、Hpy A V、Mbo I I、Acu I、Bci V I、Bmr I、Bpm I、Bpu E I、Bse R I、Bsg I、Bsm I、Bsr D I、Bts I、Eci I、Mme I、Nme A I I I、Hin 4 I I、Tsc A I、Bce 83 I、Bmu I、Bsb I、Bsc C I、Nla I I I、Hpy 99 I、Tsp R I、Fae I、Hin 1 I I、Hsp 92 I I、Set I、Tai I、Tsc I、Tsc A I、Tse F I、Nb. Bsr D I、Nb. Bts I、Asp C N I、Bsc G I、Bsp N C I、Eco H I、Fin I、Tsu I、Uba F 11 I、Unb I、Vpa k 11 A I、Bsp G I、Drd I I、Pfl 11108 I、Uba P I、Nt. Alw I、Nt. Bsm A I、Nt. Bst N B I、およびNt. Bsp Q I、およびそれらの変異体から成る群から選択される少なくとも1つの酵素を含む、第1切断試薬を含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、リストされた第1薬剤および変異体のいずれかとして、同じ機能を本質的に含むか、同じ又は本質的に同じ認識配列を認識するか、あるいは同じ又は本質的に同じ切断部位を切断する。幾つかの実施形態では、キットはさらに、第2切断試薬を含む。幾つかの実施形態では、第2切断試薬は、Mly I、Sch I、Alw I、Bcc I、Bce A I、Bsm A I、Bsm F I、Fok I、Hga I、Ple I、Sfa N I、Bfu A I、Bsa I、Bsp M I、Btg Z I、Ear I、Bsp Q I、Sap I、Sge I、Bce F I、Bsl F I、Bso M A I、Bst 71 I、Faq I、Ace I I I、Bbv I I、Bve I、Lgu I、Bfu C I、Dpn I I、Fat I、Mbo I、Mlu C I、Sau 3 A I、Tsp 509 I、Bss K I、Psp G I、Sty D 4 I、Tsp 45 I、Aox I、Bsc F I、Bsp 143 I、Bss M I、Bse E N I I、Bst M B I、Kzo 9 I、Ned I I、Sse 9 I、Tas I、Tsp E I、Ajn I、Bst S C I、Eco R I I、Mae I I I、Nmu C I、Psp 6 I、Mnl I、Bsp C N I、Bsr I、Bts C I、Hph I、Hpy A V、Mbo I I、Acu I、Bci V I、Bmr I、Bpm I、Bpu E I、Bse R I、Bsg I、Bsm I、Bsr D I、Bts I、Eci I、Mme I、Nme A I I I、Hin 4 I I、Tsc A I、Bce 83 I、Bmu I、Bsb I、Bsc C I、Nla I I I、Hpy 99 I、Tsp R I、Fae I、Hin 1 I I、Hsp 92 I I、Set I、Tai I、Tsc I、Tsc A I、Tse F I、Nb. Bsr D I、Nb. Bts I、Asp C N I、Bsc G I、Bsp N C I、Eco H I、Fin I、Tsu I、Uba F 11 I、Unb I、Vpa k 11 A I、Bsp G I、Drd I I、Pfl 11108 I、Uba P I、Nt. Alw I、Nt. Bsm A I、Nt. Bst N B I、およびNt. Bsp Q I、およびそれらの変異体から成る群から選択される酵素を含む。幾つかの実施形態では、第2薬剤は、リストされた第2薬剤および変異体のいずれかとして、同じ機能を本質的に含むか、同じ又は本質的に同じ認識配列を認識するか、あるいは同じ又は本質的に同じ切断部位を切断する。幾つかの実施形態では、第1切断試薬は、Mly Iを含む。幾つかの実施形態では、第2切断試薬は、Bci V IまたはBfu C Iを含む。

【0060】

また別の態様では、本発明は、核酸増幅の方法に関し、該方法は、(a) 各々が異なる標的配列を含む、nの環状化した一本鎖核酸を含むサンプルを提供する工程、(b) nの

10

20

30

40

50

環状化した一本鎖核酸のmの上で少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列にハイブリダイズ可能な第1アダプターを提供する工程、(c) mの環状化した一本鎖核酸をテンプレートとして使用して第1アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、mの一本鎖アンプリコン核酸を生成する工程であって、mの一本鎖アンプリコン核酸の各々が、そのテンプレートからの標的配列の複数のレプリカを含む、工程、(d) mの一本鎖アンプリコン核酸上の第1薬剤のための二本鎖認識部位を生成する工程、および(e) 複数の切断部位でmの一本鎖アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第1薬剤を提供し、それによって、mの環状化した一本鎖核酸において標的核酸の複数の一本鎖レプリカを生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、二本鎖認識部位は、二本鎖認識部位の第1鎖上の第1アダプターの第1部分および二本鎖認識部位の第2鎖上の第1アダプターの第2部分を含む。幾つかの実施形態では、アダプターは、パルンドローム配列を含む。幾つかの実施形態では、二本鎖認識部位は、第1アダプターの第1および第2の部分の互いに対してハイブリダイズさせることによって生成される。幾つかの実施形態では、mの一本鎖アンプリコン核酸は、複数の二本鎖の自己ハイブリダイズした領域を含む。

10

【0061】

またさらなる態様では、本発明は、長い核酸分子を生成するための方法に関し、該方法は、(a) 重複する相補的配列を有している核酸を含む、表面上で固定化した複数の核酸を提供する工程、(b) 前記複数の核酸を溶液へと放出する工程、および(c) i) 複数のハイブリダイズされた核酸を形成するための前記重複する相補的配列のハイブリダイゼーション；およびii) 長い核酸分子を合成するための前記ハイブリダイズされた核酸の伸長またはライゲーション、を促進する条件を提供する工程を含む。

20

【0062】

別の態様では、本発明は、1つ以上の基板を処理することができる自動化システムに関し、該自動化システムは、基板上の化学種を含む微小滴を噴霧するためのインクジェットプリントヘッド、微小滴を特定部位に選択的に付着させるためのプリントヘッドに隣接した基板をスキャンするためのスキャニング転送装置(s c a n n i n g t r a n s p o r t)、1つ以上の選択された流体に基板をさらすことによって微小滴が付着される基板を処理するためのフローセル、および基板が付着のためにプリントヘッドに隣接して位置付けられるときにいつもプリントヘッドに対して正確に基板を並べるためのアライメントユニットを含み、フローセル中の処理のために基板をプリントヘッドとフローセルとの間に移動させるための処理転送装置(t r e a t i n g t r a n s p o r t)を含まず、ここで、前記処理転送装置および前記スキャニング転送装置は、異なる要素である。

30

【0063】

また別の態様では、本発明は、1つ以上の基板を処理することができる、基板上でオリゴヌクレオチドを合成するための自動化システムに関し、該自動化システムは、基板上にヌクレオシドまたは活性化したヌクレオシドを含む溶液を噴霧するためのインクジェットプリントヘッド、ヌクレオシドを特定部位に選択的に付着させるためのプリントヘッドに隣接した基板をスキャンするためのスキャニング転送装置、1つ以上の選択された流体に基板をさらすことによって単量体が付着される基板を処理するためのフローセル、基板が付着のためにプリントヘッドに隣接して位置付けられるときにいつもプリントヘッドに対して正確に基板を並べるためのアライメントユニットを含み、フローセル中の処理のために基板をプリントヘッドとフローセルとの間に移動させるための処理転送装置を含まず、ここで、前記処理転送装置および前記スキャニング転送装置は、異なる要素である。

40

【0064】

またさらなる態様では、本発明は、自動化システムに関し、該自動化システムは、基板上の化学種を含む微小滴を噴霧するためのインクジェットプリントヘッド、微小滴を特定部位に選択的に付着させるためのプリントヘッドに隣接した基板をスキャンするためのスキャニング転送装置、1つ以上の選択された流体に基板をさらすことによって微小滴が付着される基板を処理するためのフローセル、および基板が付着のためにプリントヘッドに

50

隣接して位置付けられるときにいつもプリントヘッドに対して正確に基板を並べるためのアライメントユニットを含み、ここで、該自動化システムは、フローセル中の処理のために基板をプリントヘッドとフローセルとの間に移動させるための処理転送装置を含まない。

【0065】

引用による組み込み

本明細書で言及されるすべての公報、特許、および特許出願は、個々の公報、特許、または特許出願が引用によって組み込まれるように具体的且つ個別に示されるのと同じ程度まで、引用によって本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

10

【0066】

本発明の新しい特徴は、特に添付の特許請求の範囲内に明記される。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される、具体例を明記する後述する詳細な説明を引用することによって、および以下の添付図面によって得られるであろう。

【0067】

【図1A】図1Aは、遺伝子合成およびナノリアクター技術を概説する例のプロセスを実証する。図1Aは、インクジェットプリンターを使用する基板上のオリゴヌクレオチド合成のための例のプロセスを例証する。

【図1B】図1Bは、遺伝子合成およびナノリアクター技術を概説する例のプロセスを実証する。図1Bは、分解された筐体、またはナノリアクターにおける、遺伝子増幅の例のプロセスを例証する。

20

【図1C】図1Cは、遺伝子合成およびナノリアクター技術を概説する例のプロセスを実証する。図1Cは、平行したオリゴヌクレオチド合成および遺伝子アセンブリのためのマイクロ流体反応に関連する複数のウェーハの使用の例を例証する。

【図2A】図2Aは、典型的な業務プロセスフローを実証するブロック図である。

【図2B】図2Bは、典型的な業務プロセスフローを実証するブロック図である。合成遺伝子のクローニングはスキップされてもよい。

【図2C】図2Cは、典型的な業務プロセスフローを実証するブロック図である。図2Cでは、合成遺伝子は、輸送前にクローニングされる。

【図3】図3は、試薬付着のためのプリンター、例えばインクジェットプリンターを含むオリゴヌクレオチド合成のためのシステム、基板（ウェーハ）、複数方向にシステム要素のアライメントを概説する概略図、および試薬フローのための典型的な構成のの典型的な概要を実証する。

30

【図4】図4は、基板（オリゴヌクレオチドのウェーハリアクター）に組み込まれた設計マイクロ構造の例を例証する。

【図5】図5は、図4に例証されたマイクロ構造への試薬付着のための典型的なプロセスを実証するダイアグラムである。表面の官能化のための選択された領域は、湿潤条件下でより小さな官能化されたウェルへの試薬の展着を可能にする。

【図6A】図6Aは、図4に例証されたマイクロ構造をさらに例示する実例である。

【図6B】図6Bは、マイクロ構造のための様々な代替的設計の実例である。

40

【図6C】図6Cは、基板（ウェーハ）上のマイクロ構造のためのレイアウト設計を例証する。

【図7】図7は、キャップ要素上のリアクターキャップの典型的なレイアウトを例証する。

【図8】図8は、輸送までの遺伝子合成のための典型的なプロセスワークフローを実証するダイアグラムである。

【図9】Aは、蓋が開いたいる又は閉じている典型的なフローセルの実例を示す。Bは、典型的なフローセルおよび廃棄物コレクターアセンブリの断面図を例証する。Cは、典型的なフローセルおよび廃棄物コレクターアセンブリの拡大した断面図を例証する。

【図10】Aは、単一の1-5mmの溝、198mmの直径を有する、単一の溝真空チャ

50

ックの例を例証する。Bは、基板（ウェーハ）と真空チャック、および随意的、受け取り要素（receiving element）へと組み込まれた熱制御要素との間の焼結金属インサートを例証する。Cは、Aで例証された単一の溝真空チャックの断面図を例証する。

【図11】図11は、オリゴヌクレオチド合成のための典型的な適用標準のホスホラミダイト化学作用を例証する。

【図12】図12は、ポリメラーゼ鎖集合（PCA）の典型的な適用を例証する。

【図13】図13は、より短いオリゴヌクレオチド（例えば約50kb）に対してより長いオリゴヌクレオチド（例えば約300bp）を使用する利点を実証するダイアグラムである。より長いオリゴヌクレオチドは、エラーが減少した遺伝子産物のアセンブリに使用することができる。

10

【図14】図14は、PCAおよび遺伝子産物へオリゴヌクレオチドのアセンブリのためのギブソン法の典型的な組み合わせた適用を実証するダイアグラムである。

【図15】図15は、エラー率がより高い遺伝子合成産物に対する適用に特に適したエラー補正方法を実証するダイアグラムである。

【図16】図16は、エラー率がより低い遺伝子合成産物に対する適用に特に適したエラー補正方法を実証するダイアグラムである。

【図17】図17は、次世代配列決定（NGS）を含む、分子的にバーコード化された配列決定ライブラリおよび精度管理（QC）プロセスの生成のためのパドロックプローブの使用を実証するダイアグラムである。

20

【図18】図18は、254μmの中心上に256のノズルを備えるシリコンオリフィスプレート有している10のインクジェットヘッド、および100μmの浮上高さを有する、インクジェットアセンブリの例を例証する。

【図19】図19は、本発明の例の実施形態に関して使用することができるコンピューターシステムの例を例証する。

【図20】図20は、本発明の例の実施形態に関して使用することができるコンピューターシステム2000の第1例の構造を例証するブロック図である。

【図21】図21は、本発明の例の実施形態に関して使用することができる、複数のコンピューターシステム、複数の携帯電話および個人用携帯情報端末、ならびにネットワーク接続ストレージ（NAS）を組み込むように構成されたネットワーク2100を実証するダイアグラムである。

30

【図22】図22は、本発明の例の実施形態に関して使用することができる共有仮想アドレスメモリ空間を使用するマルチプロセッサコンピューターシステム2200のブロック図である。

【図23】図23は、基板（例えばシリコンウェーハ）上のマイクロ構造の製造のためのフロントエンド処理を構成する典型的な工程を実証するダイアグラムである。

【図24】図24は、基板（例えばシリコンウェーハ）上のマイクロ構造表面を官能化するためのバックエンド処理を構成する典型的な工程を実証するダイアグラムである。

【図25A】図25Aは、高密度のグルーピングを含むクラスターの異なる図を描写する。

40

【図25B】図25Bは、高密度のグルーピングを含むクラスターの異なる図を描写する。

【図25C】図25Cは、高密度のグルーピングを含むクラスターの異なる図を描写する。

【図25D】図25Dは、実質的に平面の基板部を含むマイクロ流体デバイスのダイアグラムの異なる図を描写する。

【図25E】図25Eは、実質的に平面の基板部を含むマイクロ流体デバイスのダイアグラムの異なる図を描写する。

【図25F】図25Fは、108の反応ウェルを有する実質的に平面の基板部およびラベルのための指定領域を含むマイクロ流体デバイスのダイアグラムのデバイス図を描写する

50

。

【図 2 5 G】図 2 5 G は、1 0 9 のグルーピングを含むクラスターのデバイス図を描写する。

【図 2 6 A】図 2 6 A は、1 1 のウェルを含むナノリアクターの列を示す、ナノリアクターのダイアグラムの断面図を描写する。

【図 2 6 B】図 2 6 B は、1 0 8 の持ち上げた (r a i s e d) ウェルを含むナノリアクターのダイアグラムのデバイス図を描写する。詳細 F は、ナノリアクターの 1 つのウェルの詳細な図を描写する。

【図 2 6 C】図 2 6 C は、図 2 6 B で示されるナノリアクターダイアグラムの角度がついたデバイス図を描写する。

10

【図 2 6 D】図 2 6 D は、ナノリアクターのダイアグラムのハンドル図を描写する。詳細 H は、ナノリアクターのハンドル側の基準マーキングの詳細図を描写する。

【図 2 6 E】図 2 6 E は、1 0 8 のウェルおよびラベルを含むナノリアクターのダイアグラムのデバイス図を描写する。

【図 2 7】図 2 7 は、異なる官能基を持つ典型的なオリゴヌクレオチド合成デバイスの設計特徴を詳しく例証する。

【図 2 8】図 2 8 は、図 1 5 における典型的なデバイスのためのフロントエンドの製造プロセスのためのワークフローを例証する。

【図 2 9】図 2 9 は、異なる官能化のための図 1 5 の典型的なオリゴヌクレオチド合成デバイスのバックエンドの製造のための典型的なベースラインプロセスを例証する。

20

【図 3 0】図 3 0 は、核酸合成のために制御された密度の活性基を有する官能化した表面を例証する。

【図 3 1】図 3 1 は、本明細書に記載される方法に従って製造されたデバイスの画像を示す。

【図 3 2】図 3 2 は、典型的なナノリアクターデバイスの設計詳細を例証する。

【図 3 3】図 3 3 は、図 2 0 に記載される典型的なデバイスのフロントエンドの製造のために典型的なベースラインプロセスを例証する。

【図 3 4】図 3 4 は、官能化のための図 2 0 の典型的なナノリアクターデバイスのバックエンドの製造のための典型的なベースラインプロセスを例証する。

【図 3 5】図 3 5 は、本明細書に記載されるように製造されたナノリアクターデバイスにおけるナノウェルを例証する。B は、A で例証されたナノウェルのクローズアップを例証する。

30

【図 3 6】A - F は、異なる官能化のための様々な構成を例証する。各図において、明るい陰影線は活性面を示し、一方で、暗線は非活性面を示す。A は、一様に官能化された表面を例証する。B - F は、様々な構成で異なる官能基を持つ表面を例証する。

【図 3 7】A - F は、デバイスの官能化のためのプロセスを例証する。

【図 3 8】図 3 8 は、レジスト適用の典型的な例を描写し、ここでレジストは、小さな構造へと引き込まれ、鋭い先端 (s h a r p e d g e s) によって停止される。

【図 3 9】A - B は、典型的な実施形態におけるレジスト適用の停止またはウィッキング (w i c k) のいずれかのための基礎となる構造の使用を例証する。

40

【図 4 0】A - C は、典型的な異なる官能化構成でのリソグラフィー後のレジストパターンを例証する。A は、リソグラフィー後のレジストパターンの明視野図を例証する。B は、リソグラフィー後のレジストパターンの暗視野図を例証する。C は、リソグラフィー後のレジストパターンの横断面概略図を例証する。

【図 4 1】A - C は、別の典型的な異なる官能化構成でのリソグラフィー後のレジストパターンを例証する。A は、リソグラフィー後のレジストパターンの明視野図を例証する。B は、リソグラフィー後のレジストパターンの暗視野図を例証する。C は、リソグラフィー後のレジストパターンの横断面概略図を例証する。

【図 4 2】A - C は、フルオロシランでの官能化後のレジスト剥離後を例証する。A は、明視野図を例証する。B は、暗視野図を例証する。C は、横断面概略図を例証する。

50

【図43】A-Cは、DMSOを完全に充填した、典型的なオリゴヌクレオチド合成デバイス（「ケラチンチップ」）を例証する。Aは、DMSOを完全に充填したケラチンチップの明視野図を例証する。親水性および疎水性の領域が示される。Bは、DMSOを完全に充填したケラチンチップの暗視野図を例証する。Cは、リボルバーの自発的湿潤を示す、DMSOを完全に充填したケラチンチップの横断面概略図を例証する。

【図44】A-Fは、図36に例証された構成6のための典型的なプロセスフローを概説する。

【図45】Aは、オリゴヌクレオチド合成デバイスからのスポットサンプリング構成を示す。Bは、Aにおける5つのスポットの各々に対応するBioAnalyzerデータを示す。

10

【図46】図46は、シリコンオリゴヌクレオチド合成デバイス上で合成された表面抽出された100量体オリゴヌクレオチドのBioAnalyzerデータを示す。

【図47】図47は、PCR増幅後にシリコンオリゴヌクレオチド合成デバイス上で合成された表面抽出された100量体オリゴヌクレオチドのBioAnalyzerデータを示す。

【図48】図48は、スポット8から取られたサンプルのための配列アラインメントを表わし、ここで、「x」は一塩基欠失を示し、「星印」は単一の塩基変異を示し、「+」はサンガー配列決定における低質スポットを示す。

【図49】図49は、スポット7から取られたサンプルのための配列アラインメントを表わし、ここで、「x」は一塩基欠失を示し、「星印」は単一の塩基変異を示し、「+」はサンガー配列決定における低質スポットを示す。

20

【図50】Aは、抽出後の三次元のオリゴヌクレオチドデバイス上で合成された100量体オリゴヌクレオチドに対するBioAnalyzer結果を提供する。Bは、PCR増幅後の三次元のオリゴヌクレオチドデバイス上で合成された100量体オリゴヌクレオチドに対するBioAnalyzer結果を提供する。

【図51】図51は、3Dオリゴヌクレオチドデバイス上で合成された100量体オリゴヌクレオチドのPCR増幅されたサンプルに対する配列アラインメントマップを表わす。

【図52】図52は、CorrectASEを使用する2ラウンドのエラー補正の適用による補正結果を表わす。

【図53】A-Cは、官能化後の典型的な異なる官能化構成での表面の官能化パターンを例証する。Aは、明視野図を例証する。Bは、暗視野図を例証する。Cは、官能化パターンおよび疎水性領域を避けて膨張する表面の液体の横断面概略図を例証する。

30

【図54】図54は、ナノリアクターデバイスの官能化のための典型的なワークフローを描写する。洗浄後に、レジスト付着、官能化および、最終的にレジスト剥離が続く。

【図55】図55は、プロット法に従ってオリゴヌクレオチド合成デバイスから個々のナノリアクターウェルへと移された多くのオリゴヌクレオチドに対するBioAnalyzer結果を描写する。

【図56】A-Bは、代替的なフローセル設計を描写する。Aは、フローセルの線源/線ドレイン（line drain）の設計を描写する。Bは、フローセルの点源/点ドレイン（point drain）の設計を描写する。

40

【図57】図57は、50umの間隙を有する構成で取り付けられた、オリゴヌクレオチド合成デバイスおよびナノリアクターデバイスを例証する。典型的な実施形態では、これらのデバイスは、10分間この構成で維持される。

【図58】A-Bは、オリゴヌクレオチド合成デバイスからナノリアクターデバイスへの、拡散による、理論に縛られることのない、経時的なオリゴの再分布を示す。Aは、リボルバーチャネル中の液体で濃縮されたオリゴを示し、ナノリアクターチャンバーにおいてはオリゴヌクレオチドをほとんど又は全く示さない。Bは、Aに対する後の時点でリボルバーチャンバーおよびナノリアクターチャンバーにおいて液体を介して一様に分布されたオリゴヌクレオチドを図式化する。

【図59】図59は、PCA反応の前後に遺伝子アセンブリに使用されるナノリアクター

50

ウェルのアレイを示す。

【図60A】ナノリアクターデバイスの様々なウェルにおける遺伝子のアセンブリの結果を描写する。図60Aは、オリゴが合成されたデバイスを描写する。ウェル1-10がマーキングされる。各ウェルにおいて遺伝子に対応するピークは、ウェル番号をラベル付けされる。

【図60B】ナノリアクターデバイスの様々なウェルにおける遺伝子のアセンブリの結果を描写する。ウェル1-10がマーキングされる。図60Bは、図60Aにおいてウェルに集められた遺伝子の分析を描写する。各ウェルにおいて遺伝子に対応するピークは、ウェル番号をラベル付けされる。

【図60C】ナノリアクターデバイスの様々なウェルにおける遺伝子のアセンブリの結果を描写する。ウェル1-10がマーキングされる。各ウェルにおいて遺伝子に対応するピークは、ウェル番号をラベル付けされる。図60Cは、図60Bで分析されたオリゴの電気泳動を描写する。

10

【図61】A-Bは、本開示と一致する高容量のオリゴヌクレオチド合成デバイスのブロック図を提示する。Aは、本明細書に記載されるようなブロックの、完全な、角度がついた図を提示する。Bは、本明細書に記載されるようなブロックを通る断面切片の角度がついた図を提示する。

【図62】図62は、表面積を増大させる、その表面に一連のポストを有している、本開示と一致する別の高容量のオリゴヌクレオチド合成デバイスのブロック図を描写する。

【図63】図63は、ローリングサークル増幅を使用して増幅した一本鎖核酸の電気泳動を描写し、ここで、増幅産物は、切断試薬の様々な組み合わせで切断される。

20

【図64】A-Fは、一本鎖核酸の増幅のための方法を表わす。

【図65】A-Fは、一本鎖核酸の増幅のための方法を表わし、これは、図64に例証される方法に関連し得る。

【発明を実施するための形態】

【0068】

本開示の全体にわたって、本発明の様々な態様が、範囲様式で提示され得る。範囲様式での記載が、単に利便性および簡潔性の目的であることが理解されるべきであり、本発明の範囲に対する柔軟性がない制限として解釈されるべきではない。したがって、範囲の記載は、文脈が明らかに他に指示しない限り、下限の単位の少数第1位までのその範囲内で個々の数値と同様にすべての考えられ得る部分範囲を具体的に開示したと考えられるべきである。例えば、1乃至6などの範囲の記載は、1乃至3、1乃至4、1乃至5、2乃至4、2乃至6、3〜6乃至などの他に、例えば、1.1、2.3、5、および5.9などの、その範囲内の個々の値などの部分範囲を具体的に開示したと考えられるべきである。これは範囲の幅にかかわらず適用される。これらの介入する範囲の上限および下限は、より小さな範囲内に独立して含まれてもよく、また、定められた範囲内のあらゆる具体的に除外された限度に従って、本発明内に包含される。定められた範囲が上限および下限の1つ又はその両方を含む場合、これらの含まれた上限および下限のいずれかまたは両方を除く範囲もまた、文脈が明らかに他に指示しない限り、本発明内に包含される。

30

【0069】

40

一態様では、本発明は、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを提供する。遺伝子ライブラリは、遺伝子の集合体を含む。幾つかの実施形態では、集合体は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満のエラー率を有する少なくとも0.5kbの長さであり得る、少なくとも100の異なる予め選択された合成遺伝子を含む。別の態様では、本発明はまた、遺伝子の集合体を含む遺伝子ライブラリを提供する。集合体は、各々が少なくとも0.5kbの長さであり得る、少なくとも100の異なる予め選択された合成遺伝子を含み得る。予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満のエラー率を含み得る。所望の予め決められた配列は、典型的にユーザー、例えばコンピューター化されたシステムを使用してデータを入力するユーザーによって、任意の方法によって供給され得

50

る。様々な実施形態では、合成された核酸は、幾つかの場合において、例えば、次世代配列決定方法を使用して、合成された核酸の少なくとも一部分を配列決定することによって、これらの予め決められた配列と比較される。本明細書に記載される遺伝子ライブラリのいずれかに関連する幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、5000bpに1未満のエラー率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも0.05%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも0.5%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満のエラー率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、エラーがないか又はエラーが略ない。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満の欠失率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満の挿入率を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、遺伝子を含む予め決められた配列と比較して、3000bpに1未満の置換率を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、各合成遺伝子の少なくとも10のコピーをさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、各合成遺伝子の少なくとも100のコピーをさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、各合成遺伝子の少なくとも1000のコピーをさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子の集合体は、少なくとも500の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、集合体は、少なくとも5000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、集合体は、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、少なくとも1kbである。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、少なくとも2kbである。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子は、少なくとも3kbである。幾つかの実施形態では、予め決められた配列は、予め選択された合成遺伝子と比較して、追加で20bp未満を含む。幾つかの実施形態では、予め決められた配列は、予め選択された合成遺伝子と比較して、追加で15bp未満を含む。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の少なくとも1つは、少なくとも0.1%、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の各々は、少なくとも0.1%、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の少なくとも1つは、少なくとも10%、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の各々は、少なくとも10%、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の少なくとも1つは、少なくとも2つの塩基対分、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、合成遺伝子の各々は、少なくとも2つの塩基対分、他の合成遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、遺伝子の予め選択された配列と比較して、20000bpに1未満のエラー率を有する2kb未満である合成遺伝子をさらに含む。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセットは、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子の集合体の第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリは、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって遺伝子の集合体を構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の集合体の第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリは、 100 m^3 未満である空間内にある。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリは、 1 m^3 未満である空間内にある。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリは、 1 m^3 未満である空間内にある。

【0070】

10

20

30

40

50

別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを構築する方法を提供する。該方法は、第1時点前にコンピューター可読非一時的媒体に、少なくとも遺伝子の第1リストおよび遺伝子の第2リストを入力する工程であって、遺伝子が、少なくとも500bpであり、結合リストへとコンパイルされたときに、結合リストが少なくとも100の遺伝子を含む、工程、および第2時点前に結合リスト中の遺伝子の90%以上を合成し、それによって、送達可能な遺伝子で遺伝子ライブラリを構築する工程を含む。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは1か月未満離れている。

【0071】

本明細書で提供されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、本明細書に記載されるような方法は、第2時点で少なくとも1つの遺伝子を送達する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子は、1/3000未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子の結合リスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、3000bpに1未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子の結合リスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセット中の遺伝子は、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストの第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかは、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって、遺伝子の第1リスト、第2リストまたは結合リストを構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストの第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストは、少なくとも500の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストは、少なくとも1000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の結合リストは、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも1kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも2kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも3kbである。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは25日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは5日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは2日未満離れている。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0072】

別の態様では、遺伝子ライブラリを構築する方法は、本明細書で提供される。該方法は、第1時点で、コンピューター可読非一時的媒体に、遺伝子のリストを入力する工程、遺伝子のリストの90%以上を合成し、それによって、送達可能な遺伝子で遺伝子ライブラリを構築する工程、および第2時点で送達可能な遺伝子を送達する工程を含む。幾つかの実施形態では、リストは少なくとも100の遺伝子を含み、遺伝子は少なくとも500bpであり得る。さらにまた幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは1か月未満離れている。

【0073】

10

20

30

40

50

本明細書で提供されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような方法は、第2時点で少なくとも1つの遺伝子を送達する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子は、1/3000未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、3000bpに1未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセット中の遺伝子は、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリを構築する方法は、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって、遺伝子のリストを構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

10

20

【0074】

本明細書で提供されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、遺伝子のリストは、少なくとも500の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも5000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも1kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも2kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも3kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子ライブラリを構築する方法に記載されるような第2時点は、第1時点とは25日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは5日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは2日未満離れている。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

30

【0075】

別の態様では、本発明はまた、基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、a)ヌクレオチド結合に適した化学部分で官能化される分解された場所を基板に提供する工程、およびb)場所に特異的な予め決められた配列に従って、毎時少なくとも12のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合し、それによって、nの塩基対長である複数のオリゴヌクレオチドを合成する工程を含む。基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法に関連した様々な実施形態が、本明細書に記載される。

40

【0076】

本明細書で提供されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法のいずれかにおいて、幾つかの実施形態では、該方法は、毎時少なくとも15のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド

50

鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、毎時少なくとも20のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、毎時少なくとも25のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/500bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/1000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/2000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/500bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/1000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/2000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。

【0077】

本明細書で提供されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、構築ブロックは、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、またはウリジン基、あるいは修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ジヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ホスホラミダイトを含む。幾つかの実施形態では、n量体オリゴヌクレオチドのnは、少なくとも100である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも200である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも300である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも400である。幾つかの実施形態では、表面は、少なくとも100,000の分解された場所を含み、複数の成長しているオリゴヌクレオチドの少なくとも2つは、互いに異なり得る。

【0078】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法は、結合前に基板を真空乾燥する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ブロッキング基を含む。幾つかの実施形態では、ブロッキング基は、酸不安定性DMTを含む。幾つかの実施形態では、酸不安定性DMTは、4,4'-ジメトキシトリチルを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法は、酸化または硫化をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法は、分離されたオリゴヌクレオチド鎖を化学的にキャップする工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法は、ブロッキング基を除去し、それによって、成長しているオリゴヌクレオチド鎖を非ブロック化する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、真空乾燥工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、酸化工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、キャップ工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、結合工程間の基板の位置は、非ブロック化工程間の基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも10,000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも100,000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第

1 表面と基板の第 2 表面との間の流体連通を提供する少なくとも 1, 0 0 0, 0 0 0 のビアを含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0079】

本発明の別の態様では、一連の併発反応を行うためのシステムが、本明細書で提供される。該システムは、複数の分解された場所を有する第 1 表面、および複数の分解されたリアクターキャップを有するキャップ要素を含む。幾つかの実施形態では、該システムは、複数の分解されたリアクターキャップを、第 1 表面とキャップ要素との間に仮シールを形成する第 1 表面上の複数の分解された場所と並べ、それによって、第 1 表面上の場所を各リアクターキャップに関係するリアクターへと少なくとも 2 つの場所の群に物理的に分割する。幾つかの実施形態では、各リアクターは、第 1 セットの試薬を保持する。

10

【0080】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行うためのシステムのいずれかに関連する幾つかの実施形態では、第 1 表面からの放出後に、リアクターキャップは、第 1 セットの試薬の少なくとも一部分を保持する。幾つかの実施形態では、一部分は、約 3 0 % である。幾つかの実施形態では、一部分は、約 9 0 % である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、支持体表面に作られたマイクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、 mm^2 当たり少なくとも 1 の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、 mm^2 当たり少なくとも 1 0 の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、 mm^2 当たり少なくとも 1 0 0 の密度である。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも 2 つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも 2 つのチャンネルは、異なる幅を有する 2 つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも 2 つのチャンネルは、異なる長さを有する 2 つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも 1 つは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも 1 つは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも 1 つは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも 1 つは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、該システムは、 mm^2 当たり少なくとも 0.1 の密度で複数の分解された場所を有する第 2 表面をさらに含む。幾つかの実施形態では、該システムは、 mm^2 当たり少なくとも 1 の密度で複数の分解された場所を有する第 2 表面をさらに含む。幾つかの実施形態では、該システムは、 mm^2 当たり少なくとも 1 0 の密度で複数の分解された場所を有する第 2 表面をさらに含む。

20

30

【0081】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行うためのシステムのいずれに関連する幾つかの実施形態では、第 1 表面の分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、第 2 表面の分解された場所は、第 2 反応に対する試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第 1 または第 2 の表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\text{ }\mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\text{ }\mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0\text{ }\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\text{ }\mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所における分解された場所は、少なくとも $0.001\text{ }\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の密度で外周の名目のアーク長さを含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所における分解された場所は、少なくとも $0.01\text{ }\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の密度で外周の名目のアーク長さを含む。幾つかの実施形態では、第 1 表面の複数の分解された場所における分解された場所は、高エネルギー表面を含む。幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 の表面は、与えられた液体とは異なる表面張力を含む。幾つかの実施形態では、高い表面エネルギーは、20 度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、シリコン、ポリスチレン、アガ

40

50

ロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体基板上に位置付けられる。幾つかの実施形態では、キャップ要素は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイスまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0082】

また別の態様では、本発明はまた、一連の筐体を提供する。一連の筐体は、リアクターキャップを含む第1基板および第2基板を含む、複数の分解されたリアクター、および各リアクター中の少なくとも2つの分解された場所を含む。幾つかの場合では、分解されたリアクターは、可剥性シールで分離される。幾つかの場合では、リアクターキャップは、第1基板からの第2基板の放出後にリアクターの中身の少なくとも一部分を保持する。幾つかの実施形態では、第2基板上のリアクターキャップは、 mm^2 当たり少なくとも0.1の密度を有している。幾つかの実施形態では、第2基板上のリアクターキャップは、 mm^2 当たり少なくとも1の密度を有している。幾つかの実施形態では、第2基板上のリアクターキャップは、 mm^2 当たり少なくとも10の密度を有している。

【0083】

本明細書で提供されるような一連の筐体に関連する幾つかの実施形態では、リアクターキャップは、リアクターの中身の少なくとも30%を保持する。幾つかの実施形態では、リアクターキャップは、リアクターの中身の少なくとも90%を保持する。幾つかの実施形態では、分解された場所は、少なくとも $2/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、分解された場所は、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも5つの分解された場所をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも20の分解された場所をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも50の分解された場所をさらに含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の筐体は、各リアクター中に少なくとも100の分解された場所をさらに含む。

【0084】

本明細書に記載されるような一連の筐体に関連する幾つかの実施形態では、分解された場所は、支持体表面に作られたマイクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる幅を有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる長さを有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $100\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $50\text{ }\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャンネルの少なくとも1つは、直径が $100\text{ }\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $0.01\text{ }\mu\text{m}/\text{平方}\text{ }\mu\text{m}$ の密度を有している少なくとも2つのチャンネルの外周の名目のアーク長さを含む。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $0.001\text{ }\mu\text{m}/\text{平方}\text{ }\mu\text{m}$ の密度を有している少なくとも2つのチャンネルの外周の名目のアーク長さを含む。幾つかの実施形態では、分解されたリアクターは、可剥性シールで分離される。幾つかの実施形態では、可剥性シールは、キャピラリーバーストバルブを含む。

【0085】

本明細書に記載されるような一連の筐体に関連する幾つかの実施形態では、第1基板の複数の分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、第2基板の複数の分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第1または第2の表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティ

ングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、第1基板の複数の分解された場所は、高エネルギー表面を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2の基板は、与えられた液体とは異なる表面張力を含む。幾つかの実施形態では、高い表面エネルギーは、20度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所またはリアクターキャップは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体基板上に位置付けられる。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイまたはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

10

【0086】

さらにまた別の態様では、本発明はまた、一連の併発反応を行う方法を提供する。該方法は、(a) 第1表面に複数の分解された場所を提供する工程、(b) キャップ要素に複数の分解されたリアクターキャップを提供する工程、(c) 複数の分解されたリアクターキャップを、第1表面とキャップ要素との間に仮シールを形成する第1表面上の複数の分解された場所と並べ、それによって、第1表面上の場所を少なくとも2つの場所の群に物理的に分割する工程、(d) 第1反応を行い、それによって、第1セットの試薬を形成する工程、および(e) 第1表面からキャップ要素を放出する工程を含み、ここで、各リアクターキャップは、第1反応容積中に第1セットの試薬の少なくとも一部分を保持する。幾つかの実施形態では、一部分は、約30%である。幾つかの実施形態では、一部分は、約90%である。

20

【0087】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法はさらに、(f) 第2表面に複数の分解された場所を提供する工程、(g) 複数の分解されたリアクターキャップを、第2表面とキャップ要素との間に仮シールを形成する第2表面上の複数の分解された場所と並べ、それによって、第2表面上の場所を物理的に分割する工程、(h) 第1セットの試薬の一部分を使用して第2反応を行い、それによって、第2セットの試薬を形成する工程、および(i) 第2表面からキャップ要素を放出する工程を含み、ここで、各リアクターキャップは、第2反応容積中に第2セットの試薬の少なくとも一部分を保持することができる。幾つかの実施形態では、一部分は、約30%である。幾つかの実施形態では、一部分は、約90%である。

30

【0088】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法のいずれかの実施において、複数の分解された場所は、第1表面上に mm^2 当たり少なくとも1の密度を有することができる。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第1表面上に mm^2 当たり少なくとも10の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第1表面上に mm^2 当たり少なくとも100の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、キャップ要素上に mm^2 当たり少なくとも0.1の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、キャップ要素上に mm^2 当たり少なくとも1の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、キャップ要素上に mm^2 当たり少なくとも10の密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第2表面上に mm^2 当たり0.1を超える密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第2表面上に mm^2 当たり1を超える密度を有している。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、第2表面上に mm^2 当たり10を超える密度を有している。本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法のいずれかの実施において、本明細書に記載されるような(e) および(i) における放出工程などの表面工程からのキャップ要素の放出は、異なる速度で行うことができる。幾つかの実施形態では、第1表面

40

50

の分解された場所は、第1反応に対する試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、第2表面の分解された場所は、第2反応に対する試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第1または第2の表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45 \mu\text{m}^2$ の表面積を有する。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 25bp である。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 200bp である。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 300bp である。幾つかの実施形態では、第1表面の分解された場所は、高エネルギー表面を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2の表面は、与えられた液体とは異なる表面張力を含む。幾つかの実施形態では、高い表面エネルギーは、 20 度未満の水接触角に対応する。

【0089】

本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法に関連する幾つかの実施形態では、複数の分解された場所または分解されたリアクターキャップは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体基板上に位置付けられる。幾つかの実施形態では、第1および第2の反応容積は、異なる。幾つかの実施形態では、第1または第2の反応は、ポリメラーゼサイクリングアセンブリを含む。幾つかの実施形態では、第1または第2の反応は、酵素的遺伝子合成、アニーリングおよびライゲーション反応、ハイブリッド遺伝子を介する2つの遺伝子の同時合成、ショットガンライゲーションおよび共ライゲーション、挿入遺伝子合成、DNAの一本鎖を介する遺伝子合成、テンプレート向けのライゲーション、リガーゼ連鎖反応、マイクロアレイ媒介性の遺伝子合成、固相アセンブリ、Sloning構築ブロック技術、またはRNAライゲーション媒介性遺伝子合成を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法はさらに、キャップ要素を冷却する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法はさらに、第1表面を冷却する工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような一連の併発反応を行う方法はさらに、第2表面を冷却する工程を含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイまたはシステムのいずれかと組み合わせられることが留意される。

【0090】

別の態様では、本発明は、官能化された表面を有する基板を提供する。官能化された表面を有する基板は、複数の分解された場所を有する固体担体を含むことができる。幾つかの実施形態では、分解された場所は、固体担体の表面エネルギーを増大させる部分で官能化される。幾つかの実施形態では、分解された場所は、マイクロチャンネル上で局所化される。

【0091】

本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板に関連する幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、 1nl 未満の容積を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、 $0.036 \mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1 \mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25 \mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45 \mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所における分解された場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態において、試薬のコーティ

ンは、基板に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、 $100\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、 $100\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、直径が $50\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルの少なくとも1つは、直径が $100\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、高い表面エネルギーは、 20 度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、固体担体は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロース酸ポリマー、ポリアクリルアミド、PDMSおよび、ガラスから成る群から選択される物質を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度である。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

10

【0092】

別の態様では、本発明はまた、官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、(a)少なくとも1つのインクジェットポンプによって第1試薬の少なくとも1滴を複数の場所の第1場所に適用する工程、(b)基板に負圧を加える工程、および(c)少なくとも1つのインクジェットポンプによって第2試薬の少なくとも1滴を第1場所に適用する工程を含む。

【0093】

本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成するための方法のいずれかの実施において、第1および第2の試薬は、異なり得る。幾つかの実施形態では、第1場所は、その表面エネルギーを増大させる部分で官能化される。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、複数の場所は、基板表面に作られたマイクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャネルは、異なる幅を有する2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャネルは、異なる長さを有する2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、 $100\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、 $1000\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が $50\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が $100\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、基板表面は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。

20

30

【0094】

本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成するための方法に関連する幾つかの実施形態では、第1試薬及び/又は第2試薬の滴下の容積は、少なくとも 2pl である。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、約 40pl である。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、多くて 100pl である。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、少なくとも $0.01\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーチ長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、少なくとも $0.001\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーチ長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、官能化された表面は、基板の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、基板の周囲の圧力は、 1mTorr 未満に低下される。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意され

40

50

る。

【0095】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、第1滴下から生じる少なくとも第1構築ブロックを第1場所上の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ブロッキング基を含む。幾つかの実施形態では、ブロッキング基は、酸不安定性DMTを含む。幾つかの実施形態では、酸不安定性DMTは、4, 4'-ジメトキシトリチルを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、酸化または硫化を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、分離されたオリゴヌクレオチド鎖を化学的にキャップする工程を含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、ブロッキング基を除去し、それによって、成長しているオリゴヌクレオチド鎖を非ブロック化する工程を含む。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、結合工程の間に基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、酸化工程の間に基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、キャップ工程の間に基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、負圧適用中の基板の位置は、非ブロック化工程の間に基板の位置から10cm以内にある。幾つかの実施形態では、第1場所は、基板表面に作られたマイクロ構造上に存在する。幾つかの実施形態では、酸化工程のための少なくとも1つの試薬は、少なくとも1つの試薬を含む溶液でマイクロ構造を満たすことによって提供される。幾つかの実施形態では、キャップ工程のための少なくとも1つの試薬は、少なくとも1つの試薬を含む溶液でマイクロ構造を満たすことによって提供される。幾つかの実施形態では、第1場所は、基板表面に作られたマイクロ構造上に存在し、非ブロック化工程のための少なくとも1つの試薬は、少なくとも1つの試薬を含む溶液でマイクロ構造を満たすことによって提供され得る。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、密閉チャンバー内の基板を封入する工程を含む。幾つかの実施形態では、密閉チャンバーは、第1場所からの液体のパーズを可能にする。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法はさらに、液体を第1場所に動作可能に連結されるドレインに通して排水する工程を含む。幾つかの実施形態では、基板に負圧を加えた後に、基板上の含水量は、1ppm未満である。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、20度未満の水接触角に対応して増大される。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0096】

また別の態様では、本発明は、複数の分解された場所に試薬を付着させる方法を提供する。該方法は、インクジェットポンプを介して第1試薬の少なくとも1滴を複数の場所の第1場所に適用する工程、およびインクジェットポンプを介して第2試薬の少なくとも1滴を複数の分解された場所の第2場所に適用する工程を含む。幾つかの実施形態では、第2場所は、第1場所に隣接している。さらに幾つかの実施形態では、第1および第2の試薬は、異なる。さらにまた幾つかの実施形態では、第1および第2の場所は、支持体表面に作られたマイクロ構造上に存在する。また幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、100μmの深さを超える少なくとも1つのチャンネルを含む。

【0097】

本明細書に記載されるような複数の分解された場所に試薬を付着させる方法のいずれかの実施において、幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネルは、異なる幅を有する2つのチャンネルを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも2つのチャンネル

は、異なる長さを有する2つのチャネルを含む。幾つかの実施形態では、第1場所は、第2試薬の0.1%未満を受け、第2場所は、第1試薬の0.1%未満を受ける。幾つかの実施形態では、場所は、少なくとも $0.01\mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、場所は、少なくとも $0.001\mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2の場所は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態において、試薬のコーティンは、基板に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、 $100\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、 $1000\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が $50\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が $100\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、支持体表面は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、少なくとも2 p lである。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、約40 p lである。幾つかの実施形態では、滴下の容積は、多くて100 p lである。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0098】

さらにまた別の態様では、本発明は、マイクロ流体システムを提供する。マイクロ流体システムは、 mm^2 当たり少なくとも10の密度で複数のマイクロウェルを有する第1表面、および複数のマイクロウェルの1つの内部の液滴を含む。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルの1つの内部の液滴は、約1–1000の範囲でレイノルズ数を有している。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、 mm^2 当たり少なくとも1の密度である。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、 mm^2 当たり少なくとも10の密度である。

【0099】

本明細書で提供されるようなマイクロ流体システムに関連する幾つかの実施形態では、マイクロ流体システムはさらに、インクジェットポンプを含む。幾つかの実施形態では、液滴は、インクジェットポンプによって付着される。幾つかの実施形態では、液滴は、第1マイクロウェルの寸法の下半分において移動する。幾つかの実施形態では、液滴は、第1マイクロウェルの寸法の中部3分の1において移動する。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、 mm^2 当たり少なくとも100の密度である。幾つかの実施形態では、第1マイクロウェルの寸法は、液滴より大きい。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $100\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $1000\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $50\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $100\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、少なくとも2 p lである。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、約40 p lである。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、多くて100 p lである。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルの各々は、少なくとも1つのマイクロチャネルに流体接続される。幾つかの実施形態では、少なくとも1つのマイクロチャネルは、表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、高い表面エネルギーは、20度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体担体上で形成される。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、少なくとも $0.01\mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、 $0.001\mu\text{m}/$

μm^2 の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。幾つかの実施形態では、液滴は、オリゴヌクレオチド合成を可能にする試薬を含む。幾つかの実施形態では、試薬は、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログである。

10

【0100】

別の態様では、本発明は、複数のマイクロウェルに液滴を付着させる方法を提供する。該方法は、インクジェットポンプを介して少なくとも1滴を複数のマイクロウェルの第1マイクロウェルに適用する工程を含む。幾つかの場合では、複数のマイクロウェルの1つの内部の液滴は、約 $1-1000$ の範囲でレイノルズ数を有している。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルは、少なくとも 1mm^2 の密度を有する。また幾つかの場合では、複数のマイクロウェルは、少なくとも $10/\text{mm}^2$ の密度を有する。

【0101】

本明細書で提供されるような複数のマイクロウェルに液滴を付着させる方法のいずれかの実施において、複数のマイクロウェルは、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度を有することができる。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $100\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、 $1000\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $50\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、直径が $100\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、液滴は、少なくとも $2\text{m}/\text{秒}$ の速度で適用される。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、少なくとも 2p l である。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、約 40p l である。幾つかの実施形態では、液滴の容積は、多くて 100p l である。幾つかの実施形態では、複数のマイクロウェルの各々は、少なくとも1つのマイクロチャネルに流体接続される。幾つかの実施形態では、少なくとも1つのマイクロウェルは、表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、高い表面エネルギーは、 20 度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、マイクロウェルは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体担体上で形成される。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、少なくとも $0.01\mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルは、少なくとも $0.001\mu\text{m}^2\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、マイクロウェルの内部の液滴は、マイクロウェルの中部3分の1において移動する。幾つかの実施形態では、マイクロウェルの内部の液滴は、マイクロウェルの下半分において移動する。幾つかの実施形態では、液滴は、オリゴヌクレオチド合成を可能にする試薬を含む。幾つかの実施形態では、試薬は、ヌクレオチドまたはヌクレオチドアナログである。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

20

30

40

【0102】

別の態様では、本発明はまた、分割の方法を提供する。分割の方法は、第1の複数の分

50

解された場所で液体を含む第1表面を第2の複数の分解された場所を含む第2表面と接触させる工程、液体の所望の画分が第1の複数の分解された場所から第2の複数の分解された場所まで移され得るように放出の速度を決定する工程、および前記速度で第1表面から第2表面を引き離す工程を含む。幾つかの実施形態では、第1表面は、液体との第1表面張力を含み、第2表面は、液体との第2表面張力を含むことができる。

【0103】

本明細書で提供されるような分割の方法のいずれかの実施において、第1表面の一部分は、表面張力を増大させる部分でコーティングされ得る。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、第1表面の表面張力は、20度未満の水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、第2表面の表面張力は、90度を超える水接触角に対応する。幾つかの実施形態では、第1表面は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、少なくとも $0.01\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所が、少なくとも $0.001\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0\mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45\mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、第1の複数の分解された場所は、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、第1の複数の分解された場所は、少なくとも $100/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、第1または第2の表面は、液体の少なくとも一部分を保持するマイクロチャネルを含む。幾つかの実施形態では、第1または第2の表面は、液体の少なくとも一部分を保持するナノリアクターを含む。幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるような分割の方法は、第3表面を第3の複数の分解された場所と接触させる工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、液体は、核酸を含む。幾つかの実施形態では、所望の画分は、30%を超える。幾つかの実施形態では、所望の画分は、90%を超える。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0104】

また別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載されるような混合の方法を提供する。該方法は、(a)作られた複数のマイクロ構造を含む第1基板を提供する工程、(b)複数の分解されたリアクターキャップを含む第2基板を提供する工程、(c)複数の第1リアクターキャップを第1基板中のnのマイクロ構造から液体を受けるように構成することができるように第1基板と第2基板を並べる工程、および(d)液体をnのマイクロ構造から第1リアクターキャップへと送達し、それによって、混合物を形成するnのマイクロ構造から液体を混合する工程を含む。

【0105】

本明細書に記載されるような混合の方法のいずれかの実施において、複数の分解されたリアクターキャップは、少なくとも $0.1/\text{mm}^2$ の密度であり得る。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、少なくとも $10/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、複数のマイクロ構造の各々は、異なる幅の少なくとも2つのチャネルを含むことができる。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、 $100\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、 $1000\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が $50\mu\text{m}$ より長い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、直径が $100\mu\text{m}$ より短い。幾つかの実施形態では、チャネルの少なくとも1つは、表面エネルギーを増大さ

せる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロースポリマー、ポリアクリルアミド、PDMS、およびガラスから成る群から選択される物質を含む固体担体上で形成される。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも $0.01 \mu\text{m}/\text{平方}\mu\text{m}$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、マイクロチャンネルは、少なくとも $0.001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ の外周の名目のアーク長さの密度を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1 \mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.25 \mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、部分でコーティングされた表面は、第1表面の平面の表面積の $1.0 \mu\text{m}^2$ 当たり少なくとも $1.45 \mu\text{m}^2$ の名目の表面積を含む。幾つかの実施形態では、複数のマイクロ構造は、試薬のコーティングを含む。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、第1表面に共有結合される。幾つかの実施形態では、試薬のコーティングは、オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $1/\text{mm}^2$ の密度である。幾つかの実施形態では、マイクロ構造は、少なくとも $10/\text{mm}^2$ の密度である。

【0106】

本明細書に記載されるような混合の方法に関連する幾つかの実施形態では、複数の第1リアクターキャップを第1基板中の n のマイクロ構造から液体を受けるように構成することができるよう第1基板と第2基板を並べる、工程(c)の後に、第1基板と第2基板との間に $100 \mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、工程(c)の後、第1基板と第2基板との間に $50 \mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、工程(c)の後、第1基板と第2基板との間に $20 \mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、工程(c)の後、第1基板と第2基板との間に $10 \mu\text{m}$ 未満の間隙がある。幾つかの実施形態では、混合物は、部分的に間隙へと広がる。幾つかの実施形態では、混合の方法はさらに、第1および第2の基板をともにより近づけることによって、間隙を密閉する工程を含む。幾つかの実施形態では、2つのチャンネルの1つは、 20 度未満の水接触角に対応する表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。幾つかの実施形態では、部分は、化学的に不活性な部分である。幾つかの実施形態では、送達は、圧力によって実行される。幾つかの実施形態では、混合物の容積は、リアクターキャップの容積より大きい。幾つかの実施形態では、液体は、核酸を含む。幾つかの実施形態において、 n は、少なくとも 10 である。幾つかの実施形態において、 n は、少なくとも 25 である。幾つかの実施形態では、混合物を形成する、液体が混合されるマイクロ構造の数である、 n は、少なくとも 50 であり得る。幾つかの実施形態において、 n は、少なくとも 75 である。幾つかの実施形態において、 n は、少なくとも 100 である。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0107】

また別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載されるような基板上で n 量体オリゴヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、ヌクレオチド結合に適した化学部分で官能化される分解された場所を基板に提供する工程、および場所に特異的な予め決められた配列に従って、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合し、それによって、 n の塩基対長である複数のオリゴヌクレオチドを合成する工程を含む。

【0108】

本明細書に記載されるような基板上で n 量体オリゴヌクレオチドを合成する方法のいずれかの実施において、該方法はさらに、毎時少なくとも 12 のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに

、毎時少なくとも15のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、毎時少なくとも20のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、毎時少なくとも25のヌクレオチドの速度で、各々が分解された場所の1つに存在する複数の成長しているオリゴヌクレオチド鎖に少なくとも2つの構築ブロックを結合する工程を含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/500bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/1000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの分解された場所は、1/2000bp未満のエラー率を有する場所に特異的な予め決められた配列から逸脱するn量体オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/500bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/1000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。幾つかの実施形態では、基板上的複数のオリゴヌクレオチドは、1/2000bp未満のエラー率でそれぞれの場所に特異的な予め決められた配列から逸脱する。

【0109】

本明細書に記載されるような基板上でn量体オリゴヌクレオチドを合成する方法に関連する幾つかの実施形態では、構築ブロックは、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、またはウリジン基、あるいは修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、修飾ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ジヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ホスホラミダイトを含む。幾つかの実施形態において、nは、少なくとも100である。幾つかの実施形態では、nは、少なくとも200である。幾つかの実施形態において、nは、少なくとも300である。幾つかの実施形態において、nは、少なくとも400である。幾つかの実施形態では、基板は、少なくとも100、000の分解された場所を含み、複数の成長しているオリゴヌクレオチドの少なくとも2つは、互いに異なる。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、結合前に基板を真空乾燥する工程を含む。幾つかの実施形態では、構築ブロックは、ブロッキング基を含む。幾つかの実施形態では、ブロッキング基は、酸不安定性DMTを含む。幾つかの実施形態では、酸不安定性DMTは、4，4'-ジメトキシトリチルを含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、酸化または硫化を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、分離されたオリゴヌクレオチド鎖を化学的にキャップする工程を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、ブロッキング基を除去し、それによって、成長しているオリゴヌクレオチド鎖を非ブロック化する工程を含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも10，000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも100，000のビアを含む。幾つかの実施形態では、基板は、基板の第1表面と基板の第2表面との間の流体連通を提供する少なくとも1，000，000のビアを含む。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0110】

また別の態様では、本発明はまた、本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを構築する方法を提供する。該方法は、第1時点で、コンピューター可読非一時的媒体に、遺伝子のリストを入力する工程であって、該リストが少なくとも100の遺伝子を含み、該遺伝子が少なくとも500bpである、工程、遺伝子のリストの90%以上を合成し、そ

れによって、送達可能な遺伝子で遺伝子ライブラリを構築する工程、遺伝子ライブラリを表わす配列決定ライブラリを準備する工程、配列情報を得る工程、配列情報に基づいて少なくとも送達可能な遺伝子のサブセットを選択する工程、および第2時点で選択された送達可能な遺伝子を送達する工程を含み、ここで、第2時点は、第1時点とは1か月未満離れている。

【0111】

本明細書に記載されるような遺伝子ライブラリを構築する方法のいずれかの実施において、配列情報は次世代配列決定を介して得られる。配列情報は、サンガー配列決定によって得られる。幾つかの実施形態では、該方法は、第2時点で少なくとも1つの遺伝子を送達する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも0.1%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも10%、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の少なくとも1つは、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、遺伝子の各々は、遺伝子ライブラリにおいて少なくとも2つの塩基対分、他の遺伝子とは異なる。幾つかの実施形態では、予め選択された合成遺伝子の少なくとも90%は、エラーがない。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子は、1/3000未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子の少なくとも90%は、3000bpに1未満のエラー率を含み、結果として、遺伝子のリスト中の遺伝子の配列から逸脱する配列が生成される。幾つかの実施形態では、送達可能な遺伝子のサブセットは、ともに共有結合される。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第1サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第1代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、該方法は、1つ以上の代謝最終産物の選択をさらに含み、それによって、遺伝子のリストを構築する。幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子のリストの第2サブセットは、1つ以上の代謝最終産物で第2代謝経路の構成要素をコード化する。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも500の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも5000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、リストは、少なくとも10000の遺伝子を含む。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも1kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも2kbである。幾つかの実施形態では、遺伝子は、少なくとも3kbである。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは25日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは5日未満離れている。幾つかの実施形態では、第2時点は、第1時点とは2日未満離れている。本明細書に記載される実施形態のいずれかが、本発明で提供される方法、デバイス、アレイ、基板またはシステムのいずれかと組み合わせられ得ることが留意される。

【0112】

本明細書には、幾つかの実施形態において、核酸合成のためのマイクロ流体デバイスが提供され、該マイクロ流体デバイスは、対向面間にmのマイクロ流体接続部のnのグルーピングを含む実質的に平面の基板部を含み、ここで、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の各1つは、第1チャンネルおよび第2チャンネルを含み、nのグルーピングの各々内の第1チャンネルは、すべてのmのマイクロ流体接続部に共通しており、複数のマイクロ流体接続部は、基板の最小の寸法にわたって実質的に平面の基板部に及んでおり、およびnおよびmは、少なくとも2である。幾つかの実施形態では、第2チャンネルは、該デバイスへのオリゴヌクレオチドの付着を促進することができるコーティングで官能化される。幾つかの実施形態では、該デバイスは、nのグルーピングのkにおいて第2チャンネルに付けられる第1オリゴヌクレオチドをさらに含む。幾つかの実施形態において、kは、1である。幾つかの実施形態では、該デバイスは、nのグルーピングのlに付けられる第2オリゴヌクレオチ

ドをさらに含む。幾つかの実施形態では、 l は、 1 である。幾つかの実施形態では、 1 グルーピングにおけるグルーピングはどれも、 k のグルーピングにはない。

【0113】

幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも 10 のヌクレオチド長、 25 のヌクレオチド長、 50 のヌクレオチド長、 75 のヌクレオチド長、 100 のヌクレオチド長、 125 のヌクレオチド長、 150 のヌクレオチド長、または 200 のヌクレオチド長である。

【0114】

幾つかの実施形態では、第 1 および第 2 のオリゴヌクレオチドは、少なくとも 2 つのヌクレオチド、 3 つのヌクレオチド、 4 つのヌクレオチド、 5 つのヌクレオチド、または 10 のヌクレオチド、異なる。

10

【0115】

幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部は、長くて 5 mm 、 1.5 mm 、 1.0 mm 、または 0.5 mm 長である。幾つかの実施形態では、 n のグルーピングの各々内の第 1 チャンネルは、長くて 5 mm 、 1.5 mm 、 1.0 mm 、または 0.5 mm 長である。幾つかの実施形態では、 n のグルーピングの各々内の第 1 チャンネルは、少なくとも 0.05 mm 、 0.75 mm 、 0.1 mm 、 0.2 mm 、 0.3 mm 、または 0.4 mm 長である。幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の各々における第 2 チャンネルは、長くて 0.2 mm 、 0.1 mm 、 0.05 mm 、 0.04 mm 、または 0.03 mm 長である。幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の各々における第 2 チャンネルは、少なくとも 0.001 mm 、 0.005 mm 、 0.01 mm 、 0.02 mm 、または 0.03 mm 長である。幾つかの実施形態では、 n のグルーピングの各々における第 1 チャンネルの断面は、少なくとも 0.01 mm 、 0.025 mm 、 0.05 mm 、または 0.075 mm である、幾つかの実施形態では、 n のグルーピングの各々における第 1 チャンネルの断面は、長くて 1 mm 、 0.5 mm 、 0.25 mm 、 0.1 mm 、または 0.075 mm である。幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の各々における第 2 チャンネルの断面は、少なくとも 0.001 mm 、 0.05 mm 、 0.01 mm 、 0.015 mm 、または 0.02 mm である。幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の各々における第 2 チャンネルの断面は、長くて 0.25 mm 、 0.125 mm 、 0.050 mm 、 0.025 mm 、 0.02 mm である。幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の各々における第 2 チャンネルの断面での標準偏差は、断面の平均の 25% 、 20% 、 15% 、 10% 、 5% 、または 1% 未満である。幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の第 2 チャンネルの少なくとも 90% における断面での偏差は、多くて 25% 、 20% 、 15% 、 10% 、 5% 、または 1% である。

20

30

【0116】

幾つかの実施形態では、 n は、少なくとも 10 、 25 、 50 、 100 、 1000 、または 10000 である。幾つかの実施形態では、 m は、少なくとも 3 、 4 、または 5 である。

【0117】

幾つかの実施形態では、基板は、少なくとも 5% 、 10% 、 25% 、 50% 、 80% 、 90% 、 95% 、または 99% のシリコンを含む。

40

【0118】

幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の第 2 チャンネルの少なくとも 90% は、表面エネルギーを増大させる部分で官能化される。幾つかの実施形態では、表面エネルギーは、 75 、 50 、 30 、または 20 度未満の水接触角に対応するレベルまで増大される。

【0119】

幾つかの実施形態では、 $n \times m$ のマイクロ流体接続部の第 2 チャンネルの少なくとも 90% に対するアスペクト比は、 1 、 0.5 、または 0.3 未満である。幾つかの実施形態では、 n のグルーピングにおける第 1 チャンネルの少なくとも 90% に対するアスペクト比は

50

、0.5、0.3、または0.2未満である。

【0120】

幾つかの実施形態では、 $n * m$ のマイクロ流体接続部の少なくとも10%、25%、50%、75%、90%、または95%の全長は、実質的に平面の基板の最小の寸法の10%、20%、30%、40%、50%、100%、200%、500%、または1000%以内である。

【0121】

幾つかの実施形態では、該デバイスの実質的に平面の部分は、SOIウェーハから作られる。

【0122】

別の態様では、本発明は、核酸増幅の方法に関し、該方法は、(a) 各々が異なる標的配列を含む、 n の環状化した一本鎖核酸を含むサンプルを提供する工程、(b) n の環状化した一本鎖核酸の m の上で少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列にハイブリダイズ可能な第1アダプターを提供する工程、(c) m の環状化した一本鎖核酸をテンプレートとして使用して第1アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、 m の一本鎖アンプリコン核酸を生成する工程であって、 m の一本鎖アンプリコン核酸の各々が、そのテンプレートからの標的配列の複数のレプリカを含む、工程、(d) 第1アダプターにハイブリダイズ可能な第1補助オリゴヌクレオチドを提供する工程、および(e) 複数の切断部位で m の一本鎖アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第1薬剤を提供し、それによって、 m の環状化した一本鎖核酸において標的核酸の複数の一本鎖レプリカを生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、 n または m は、少なくとも2である。幾つかの実施形態では、 n または m は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、300、400、または500である。幾つかの実施形態において、 m は、 n 未満である。幾つかの実施形態では、 n の環状化した一本鎖核酸を含むサンプルは、少なくとも n の直鎖状一本鎖核酸を提供することによって形成され、その各々は、異なる標的配列の1つを含む且つ n の直鎖状一本鎖核酸を環状化し、それによって、 n の環状化した一本鎖核酸を生成する。幾つかの実施形態では、第1アダプターは、 n の直鎖状一本鎖核酸の両端に同時にハイブリダイズ可能である。幾つかの実施形態では、 n の直鎖状一本鎖核酸における異なる標的配列は、第1および第2のアダプターハイブリダイゼーション配列に挟まれる。幾つかの実施形態では、少なくとも n の直鎖状一本鎖核酸は、新規オリゴヌクレオチド合成によって生成される。幾つかの実施形態では、 n の直鎖状一本鎖核酸の各々における第1アダプターハイブリダイゼーション配列は、2つまでのヌクレオチド塩基分、異なる。幾つかの実施形態では、第1または第2のアダプターハイブリダイゼーション配列は、少なくとも5つのヌクレオチド長である。幾つかの実施形態では、第1または第2のアダプターハイブリダイゼーション配列は、長くて75、50、45、40、35、30、または25のヌクレオチド長である。幾つかの実施形態では、 n の直鎖状一本鎖核酸の端部は、第1アダプターが直鎖状一本鎖核酸の両端に同時にハイブリダイズされるときに、第1アダプター上の隣接した塩基と対になる。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、アダプターハイブリダイゼーション配列が、 m の環状化した一本鎖核酸レプリカの残りの配列部分の少なくとも5%から切り離されるような位置である。幾つかの実施形態では、少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列以外の m の環状化した一本鎖核酸レプリカの配列の少なくとも5%は、切断されないままである。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列の外側にある。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、標的配列から独立している。幾つかの実施形態では、複数の切断部位の位置は、第1アダプターまたは第1補助オリゴヌクレオチドの配列内の少なくとも1つの配列要素によって決定される。幾つかの実施形態では、配列要素は、制限エンドヌクレアーゼのための認識部位を含む。幾つかの実施形態では、第1補助オリゴヌクレオチドまたは第1アダプターオリゴヌクレオチドは、IIS型制限エンドヌクレアーゼのための認識部位を含む。幾つかの実施形態では、認識部

10

20

30

40

50

位は、切断部位から少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のヌクレオチド、離れている。幾つかの実施形態では、複数の切断部位は、一本鎖核酸と二本鎖核酸の接合部にある。幾つかの実施形態では、二本鎖核酸は、第1アダプターおよび第1補助オリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態では、一本鎖核酸は、mの異なる標的配列から本質的に成る。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて95%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて90%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて80%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの異なる標的配列は、多くて50%の対での類似性を有している。幾つかの実施形態では、mの一本鎖アンプリコン核酸の生成には、鎖置換増幅を含む。幾つかの実施形態では、第1補助オリゴヌクレオチドは、アフィニティータブを含む。幾つかの実施形態では、アフィニティータブは、ビオチンまたはビオチン誘導体を含む。幾つかの実施形態では、該方法は、二本鎖核酸をサンプルから単離する工程をさらに含む。幾つかの実施形態では、単離する工程は、アフィニティー精製、クロマトグラフィー、またはゲル精製を含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、制限エンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、少なくとも2つの制限エンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、IIS型制限エンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、ニッキングエンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、少なくとも2つのニッキングエンドヌクレアーゼを含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤が、MlyI、SclI、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyDI、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseEIII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjlI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Psp6I、MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AclI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb. BsrDI、Nb. BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I、UbaPI、Nt. AlwI、Nt. BsmAI、Nt. BstNBI、およびNt. BspQI、およびそれらの変異体から成る群から選択される少なくとも1つの酵素を含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、リストされた第1薬剤および変異体のいずれかとして、同じ機能を本質的に含むか、同じ又は本質的に同じ認識配列を認識するか、あるいは同じ又は本質的に同じ切断部位を切断する。幾つかの実施形態では、少なくとも2つの制限酵素は、MlyIおよびBciVIまたはBfuCIおよびMlyIを含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、(a) サンプルを複数の分画へと分割する工程、(b) nの異なる環状化一本鎖核酸のkの上で少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列にハイブリダイズ可能な第2アダプターを少なくとも1つの分画に提供する工程、(c) kの環状化した一本鎖核酸をテンプレートとして使用して第2アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、kの一本鎖アンプリコン核酸を生成する工程であって、第2一本鎖アンプリコン核酸が、そのテンプレートからの標的配列の複数のレプリカを含む、工程、(d) 第2アダプターにハイブリダイズ可能な第2補助オリゴヌクレオチドを提供する工程、および(e) 第2の複数の切断部位でkの一本鎖アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第2薬剤を提供し、それによって、kの環状化した一本鎖核

10

20

30

40

50

酸において標的核酸の複数の一本鎖レプリカを生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、第1および第2のアダプターは、同じである。幾つかの実施形態では、第1および第2の補助オリゴヌクレオチドは、同じである。幾つかの実施形態では、第1および第2の薬剤は、同じである。幾つかの実施形態では、 $k+m$ は、 n 未満である。幾つかの実施形態では、 k は、少なくとも2である。幾つかの実施形態では、 n の環状化一本鎖核酸を含むサンプルは、一本鎖核酸増幅によって形成される。幾つかの実施形態では、一本鎖核酸増幅は、(a) 少なくとも m の環状化一本鎖前駆体核酸を含むサンプルを提供すること、(b) m の環状化一本鎖前駆体核酸にハイブリダイズ可能な第1前駆体アダプターを提供すること、(c) m の環状化した一本鎖前駆体核酸をテンプレートとして使用して第1前駆体アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、 m の一本鎖前駆体アンプリコン核酸を生成する工程であって、一本鎖前駆体アンプリコン核酸が、 m の環状化した一本鎖前駆体核酸の複数のレプリカを含む、工程、(d) 第1前駆体アダプターにハイブリダイズ可能な第1前駆体補助オリゴヌクレオチドを提供する工程、および(e) 複数の切断部位で第1一本鎖前駆体アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第1前駆体薬剤を提供し、それによって、 m の直鎖状前駆体核酸を生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、該方法はさらに、 m の直鎖状前駆体核酸を環状化する工程を含み、それによって、 m の環状化した一本鎖前駆体核酸の複数のレプリカを形成する。幾つかの実施形態では、 m の環状化した一本鎖前駆体核酸は、少なくとも10、100、250、500、750、1000、1500、2000、3000、4000、5000、10000倍、またはそれ以上、一本鎖レプリカにおいて増幅される。幾つかの実施形態では、 m の環状化した一本鎖核酸の少なくとも1つは、約または多くて約100 nM、10 nM、1 nM、50 pM、1 pM、100 fM、10 fM、1 fM、またはそれ以下の濃度である。幾つかの実施形態では、環状化は、ライゲーションを含む。幾つかの実施形態では、ライゲーションは、T4 DNAリガーゼ、T3 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、および9N DNAリガーゼから成る群から選択されるリガーゼの使用を含む。

【0123】

またさらなる態様では、本発明は、様々な実施形態において、キットに関し、該キットは、(a) 第1アダプター、(b) 第1アダプターにハイブリダイズ可能な第1補助オリゴヌクレオチド；(C) リガーゼ、および(d) Mly I、Scl I、Alw I、Bcc I、Bce A I、Bsm A I、Bsm F I、Fok I、Hga I、Ple I、Sfa N I、Bfu A I、Bsa I、Bsp M I、Btg Z I、Ear I、Bsp Q I、Sap I、Sge I、Bce F I、Bsl F I、Bso M A I、Bst 71 I、Faq I、Ace I I I、Bbv I I、Bve I、Lgu I、Bfu C I、Dpn I I、Fat I、Mbo I、Mlu C I、Sau 3 A I、Tsp 509 I、Bss K I、Psp G I、Sty D 4 I、Tsp 45 I、Aox I、Bsc F I、Bsp 143 I、Bss M I、Bse E N I I、Bst M B I、Kzo 9 I、Ned I I、Sse 9 I、Tas I、Tsp E I、Ajn I、Bst S C I、Eco R I I、Mae I I I、Nmu C I、Psp 6 I、Mnl I、Bsp C N I、Bsr I、Bts C I、Hph I、Hpy A V、Mbo I I、Acu I、Bci V I、Bmr I、Bpm I、Bpu E I、Bse R I、Bsg I、Bsm I、Bsr D I、Bts I、Eci I、Mme I、Nme A I I I、Hin 4 I I、Tsc A I、Bce 83 I、Bmu I、Bsb I、Bsc C I、Nla I I I、Hpy 99 I、Tsp R I、Fae I、Hin 1 I I、Hsp 92 I I、Set I、Tai I、Tsc I、Tsc A I、Tse F I、Nb. Bsr D I、Nb. Bts I、Asp C N I、Bsc G I、Bsp N C I、Eco H I、Fin I、Tsu I、Unb I、Vpak 11 A I、Bsp G I、Drd I I、Pfl 11108 I、Uba P I、Nt. Alw I、Nt. Bsm A I、Nt. Bst N B I、およびNt. Bsp Q I、およびそれらの変異体から成る群から選択される少なくとも1つの酵素を含む、第1切断試薬を含む。幾つかの実施形態では、第1薬剤は、リストされた第1薬剤および変異体のいずれかとして、同じ機能を本質的に含むか、同じ又は本質的に同じ認識配列を認識するか、あるいは同じ又は本質的に同じ切

10

20

30

40

50

断部位を切断する。幾つかの実施形態では、キットはさらに、第2切断試薬を含む。幾つかの実施形態では、第2切断試薬は、Mly I、Scl I、Alw I、Bcc I、Bce AI、Bsm AI、Bsm FI、Fok I、Hga I、Ple I、Sfa NI、Bfu AI、Bsa I、Bsp MI、Btg ZI、Ear I、Bsp QI、Sap I、Sge I、Bce FI、Bsl FI、Bso MAI、Bst 71 I、Faq I、Ace I II、Bbv I I、Bve I、Lgu I、Bfu CI、Dpn I I、Fat I、Mbo I、Mlu CI、Sau 3 AI、Tsp 509 I、Bss KI、Psp GI、Sty D4 I、Tsp 45 I、Aox I、Bsc FI、Bsp 143 I、Bss MI、Bse EN I I、Bst MBI、Kzo 9 I、Ned I I、Sse 9 I、Tas I、Tsp EI、Ajn I、Bst SCI、Eco RI I、Mae I I I、Nmu CI、Psp 6 I、Mnl I、Bsp CN I、Bsr I、Bts CI、Hph I、Hpy AV、Mbo I I、Acu I、Bci VI、Bmr I、Bpm I、Bpu EI、Bse RI、Bsg I、Bsm I、Bsr DI、Bts I、Eci I、Mme I、Nme A I I I、Hin 4 I I、Tsc AI、Bce 83 I、Bmu I、Bsb I、Bsc CI、Nla I I I、Hpy 99 I、Tsp RI、Fae I、Hin 1 I I、Hsp 92 I I、Set I、Tai I、Tsc I、Tsc AI、Tse FI、Nb. Bsr DI、Nb. Bts I、Asp CN I、Bsc GI、Bsp NC I、Eco HI、Fin I、Tsu I、Uba F11 I、Unb I、Vpak 11 AI、Bsp GI、Drd I I、Pfl 11108 I、Uba PI、Nt. Alw I、Nt. Bsm AI、Nt. Bst NBI、および Nt. Bsp QI、およびそれらの変異体から成る群から選択される酵素を含む。幾つかの実施形態では、第2薬剤は、リストされた第2薬剤および変異体のいずれかとして、同じ機能を本質的に含むか、同じ又は本質的に同じ認識配列を認識するか、あるいは同じ又は本質的に同じ切断部位を切断する。幾つかの実施形態では、第1切断試薬は、Mly Iを含む。幾つかの実施形態では、第2切断試薬は、Bci VIまたはBfu CIを含む。

【0124】

また別の態様では、本発明は、核酸増幅の方法に関し、該方法は、(a) 各々が異なる標的配列を含む、nの環状化した一本鎖核酸を含むサンプルを提供する工程、(b) nの環状化した一本鎖核酸のmの上で少なくとも1つのアダプターハイブリダイゼーション配列にハイブリダイズ可能な第1アダプターを提供する工程、(c) mの環状化した一本鎖核酸をテンプレートとして使用して第1アダプターを伸長するのに適切な条件を提供し、それによって、mの一本鎖アンプリコン核酸を生成する工程であって、mの一本鎖アンプリコン核酸の各々が、そのテンプレートからの標的配列の複数のレプリカを含む、工程、(d) mの一本鎖アンプリコン核酸上の第1薬剤のための二本鎖認識部位を生成する工程、および(e) 複数の切断部位でmの一本鎖アンプリコン核酸を切断するのに適した条件下で第1薬剤を提供し、それによって、mの環状化した一本鎖核酸において標的核酸の複数の一本鎖レプリカを生成する工程、を含む。幾つかの実施形態では、二本鎖認識部位は、二本鎖認識部位の第1鎖上の第1アダプターの第1部分および二本鎖認識部位の第2鎖上の第1アダプターの第2部分を含む。幾つかの実施形態では、アダプターは、パリンδροーム配列を含む。幾つかの実施形態では、二本鎖認識部位は、第1アダプターの第1および第2の部分の互いに対してハイブリダイズさせることによって生成される。幾つかの実施形態では、mの一本鎖アンプリコン核酸は、複数の二本鎖の自己ハイブリダイズした領域を含む。

【0125】

またさらなる態様では、本発明は、長い核酸分子を生成するための方法に関し、該方法は、(a) 重複する相補的配列を有している核酸を含む、表面上で固定化した複数の核酸を提供する工程、(b) 前記複数の核酸を溶液へと放出する工程、および(c) i) 複数のハイブリダイズされた核酸を形成するための前記重複する相補的配列のハイブリダイゼーション；および ii) 長い核酸分子を合成するための前記ハイブリダイズされた核酸の伸長またはライゲーション、を促進する条件を提供する工程を含む。

【0126】

別の態様では、本発明は、1つ以上の基板を処理することができる自動化システムに関し、該自動化システムは、基板上の化学種を含む微小滴を噴霧するためのインクジェットプリントヘッド、微小滴を特定部位に選択的に付着させるためのプリントヘッドに隣接した基板をスキャンするためのスキャニング転送装置、1つ以上の選択された流体に基板をさらすことによって微小滴が基板を処理するためのフローセル、および基板付着させるが付着のためにプリントヘッドに隣接して位置付けられるときにいつもプリントヘッドに対して正確に基板を並べるためのアライメントユニットを含み、フローセル中の処理のために基板をプリントヘッドとフローセルとの間に移動させるための処理転送装置を含まず、ここで、前記処理転送装置および前記スキャニング転送装置は、異なる要素である。

【0127】

また別の態様では、本発明は、1つ以上の基板を処理することができる、基板上でオリゴヌクレオチドを合成するための自動化システムに関し、該自動化システムは、基板上にヌクレオシドまたは活性化したヌクレオシドを含む溶液を噴霧するためのインクジェットプリントヘッド、ヌクレオシドを特定部位に選択的に付着させるためのプリントヘッドに隣接した基板をスキャンするためのスキャニング転送装置、1つ以上の選択された流体に基板をさらすことによって単量体が付着される基板を処理するためのフローセル、および基板が付着のためにプリントヘッドに隣接して位置付けられるときにいつもプリントヘッドに対して正確に基板を並べるためのアライメントユニットを含み、フローセル中の処理のために基板をプリントヘッドとフローセルとの間に移動させるための処理転送装置を含まず、ここで、前記処理転送装置および前記スキャニング転送装置は、異なる要素である。

【0128】

またさらなる態様では、本発明は、自動化システムに関し、該自動化システムは、基板上の化学種を含む微小滴を噴霧するためのインクジェットプリントヘッド、微小滴を特定部位に選択的に付着させるためのプリントヘッドに隣接した基板をスキャンするためのスキャニング転送装置、1つ以上の選択された流体に基板をさらすことによって微小滴が基板を処理するためのフローセル、および基板が付着のためにプリントヘッドに隣接して位置付けられるときにいつもプリントヘッドに対して正確付着させるに基板を並べるためのアライメントユニットを含み、ここで、該自動化システムは、フローセル中の処理のために基板をプリントヘッドとフローセルとの間に移動させるための処理転送装置を含まない。

【0129】

上述のことを念頭におき、説明の目的のために、図1-2において組成物、システムおよび方法で具体化された本発明を示す図面に対して特に引用がなされる。方法、システムおよび組成物が、構成において、および本発明の様々な実施形態における個別部分の詳細において変更し得ることが認識される。さらに、方法は、詳細および事象または作用の順番において変更し得る。様々な実施形態では、本発明は、主として、核酸、特に、DNAオリゴマーおよびポリヌクレオチドとの使用に関して記載される。しかしながら、本発明が、RNAまたは他の核酸、ペプチド、タンパク質、または他の対象の分子を含む、様々な異なるタイプの分子とともに使用され得ることが理解されるべきである。対象のこれらのより大きな分子の各々に適切な構築ブロックは、当該技術分野に既知である。

【0130】

本発明は、核酸、ポリペプチド、タンパク質およびそれらの組み合わせを含む、対象の分子のライブラリの調製およびの合成に有用な組成物、システムおよび方法を提供する。様々な実施形態では、本発明は、平行してマイクロ、ナノ、またはピコリットルの規模の反応を実行するための、静的および動的なウェーハ、例えば、シリコン基板から製造されるものの使用を熟慮する。さらに、分解された容量で複数の反応を関連付けることを可能にするために、平行した流体のマイクロ、ナノ、またはピコリットルの操作にもこれは当てはまり得る。流体の操作は、流動、組み合わせ、混合、分画、滴剤の生成、加熱、縮合、蒸発、密封、成層、加圧、乾燥、または当該技術分野に既知の他の適切な流体操作を含み得

る。様々な実施形態では、ウェーハは、表面に組み込まれる、流体操作のための構造を提供する。形状およびサイズを変える特徴は、ウェーハ基板の内部で又はそれを介して設計され得る。本発明の方法および組成物は、様々な実施形態において、本明細書にさらに詳細に例証させる、生体分子の合成に特定して設計されたデバイスを利用する。特に、本発明は、時間、投与量および温度などの反応条件を正確に管理することによって、例えば、標準のホスホラミダイト化学作用および適切な遺伝子アセンブリ技術を使用して、長い、高品質のオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを含む、大きい、高密度のライブラリの新規合成に備える。

【0131】

ここで図1Cを参照すると、様々な実施形態中の本発明は、流体操作のための1つ以上の静的または動的なウェーハの使用を熟考する。ウェーハは、本明細書でさらに記載されるように多くの適切な物質、例えば、シリコン、から構築され得る。ナノリアクターのウェーハは、複数の特徴部(features)で液体を受ける且つ保持するように構成され得る。追加のウェーハ、例えばインサイツの合成反応に使用されるものは、液体を収集及び／又は混合するためにナノリアクターのウェーハと接触させられ得る。ナノリアクターは、複数の追加のウェーハから液体を収集し得る。典型的に、ナノリアクターのウェーハが接触させられるときに、ナノリアクターは、追加のウェーハ上に1つ以上の分解された場所と並べられる。試薬および溶媒は、接触前にナノリアクター内に提供され得る。代替的に、ナノリアクターは、追加のウェーハと接触する前に空であり得る。幾つかの実施形態では、ナノリアクターは、DNA合成ウェーハの1つ以上の分解された場所をにおいて合成されたオリゴヌクレオチドを収集する。これらのオリゴヌクレオチドは、ナノリアクター内のより長い遺伝子へと集められ得る。ナノリアクターは、任意の適切な手段、例えばキャピラリーバーストバルブ、圧力、接着、または当該技術分野に既知の他の適切な密封手段によって、追加のウェーハのアラインメントおよび接触後に密封され得る。シールは、可剥性であり得る。ナノリアクターのウェーハ内の反応は、密閉された容量で行われ得、例えば、PCRまたはPCAで適用されるように、周期的温度変化を含み得る。等温増幅などの等温反応はさらに、本発明の範囲内にある。DNA合成ウェーハは、正確な管理の下、表面上またその内部で分解された場所でオリゴヌクレオチドのインサイツの合成を行うように構成され得る。インクジェットプリントヘッドは、合成、例えば合成ウェーハの分解された場所上への標準のホスホラミダイト合成のための試薬の液滴の送達に利用され得る。複数の分解された場所に共通の他の試薬は、大量に送られ得る。幾つかの実施形態では、DNA合成ウェーハは、本明細書でさらに別記されるように、DNAオリゴヌクレオチド以外の分子のインサイツの合成のために合成ウェーハと交換される。したがって、本発明は、複数の小さな容積での反応条件の正確な管理を介する、高品質でのオリゴヌクレオチドおよび長い遺伝子の大きなライブラリの速い合成を熟慮する。本発明のさらなる恩恵は、当該技術分野で既知の従来の合成方法と比較した試薬使用の減少である

【0132】

様々な方法は、低いエラー率の遺伝子ライブラリの新規合成のために熟考される。図2A-Cは、平行した長い配列を有する大きな、高品質の遺伝子ライブラリの合成のための本発明の方法および組成物の典型的な適用を例証する。様々な実施形態では、静的および動的なウェーハは、プロセスフロー中の複数の反応を可能にする。例えば、典型的にDNA合成ウェーハ上のインサイツでのオリゴヌクレオチド合成の後、より長い配列への合成されたオリゴヌクレオチドの、ポリメラーゼサイクリングアセンブリ(PCA)などの、遺伝子アセンブリ反応が続き得る。組み立てられた配列は、例えばPCRによって増幅され得る。本明細書に記載される又は当該技術分野に既知の適切なエラー訂正反応は、標的配列から逸脱する組み立てられた配列の数を最小限にするために使用され得る。ライブラリの配列決定が構築され得、産物の画分が、次世代配列決定(NGS)などの配列のために等分され得る。

【0133】

図2A-Cに例証されるような遺伝子合成プロセスは、要求者の必要に応じて調節され

得る。最初の配列決定工程、例えばN G Sから得た結果に従って、許容可能なエラー率を有する組み立てられた遺伝子は、例えばプレート上で、要求者に輸送され得る（図2 B）。本発明の方法および組成物によって、約1 / 10 k b未満のエラー率を容易に達成することが可能であるが、本明細書でさらに詳しく別記されるように、代案のエラー閾値は設定され得る。より高い純度を達成するために、新規合成された／組み立てられた配列は、単一のコロニーから精製されてクローニングされ得る。正確な所望の配列の同一性は、配列決定、例えばN G Sによって試験され得る。随意に、例えば、サンガー配列決定などの別の配列決定方法を介して、配列決定情報の精度に対するより高い信頼度が得られ得る。確認された配列は、例えばプレート上で、要求者に輸送され得る（図2 C）。配列決定ライブラリの生成のための方法が、本明細書でさらに詳しく別記される。

10

【0134】

基板／ウェーハ

一態様では、作られた、本明細書に記載される方法のいずれかによって作られた官能化された表面を有する基板および官能化された表面を有する基板上でオリゴヌクレオチドを合成する方法が、本明細書に記載される。基板は、複数の分解された場所を有する固体担体を含むことができる。複数の分解された場所は、任意の幾何学的形状、配向または組織を有し得る。分解された場所は、任意のスケールスケール（例えば、ミクロスケールまたはナノスケール）であり得るか、または基板表面に作られたマイクロ構造を包含し得る。分解された場所は、少なくとも一寸法を有するマイクロチャンネル上で局所化される。基板の個々の分解された場所は、互いに流体的に切り離され得る、例えば、第1オリゴヌクレオチドの合成のための第1の分解された場所は、基板の2つの表面間の第1ビア上にあり得、第2オリゴヌクレオチドの合成のための第2の分解された場所は、基板の2つの表面間の第2ビア上にあり得、第1および第2のビアは、基板内に流体接続されていないが、基板の同じ2つの表面から始まる且つ終了する。幾つかの場合では、分解された場所のマイクロ構造は、2-Dまたは3-Dでマイクロチャンネルまたはマイクロウェルになり得る。「3-D」マイクロチャンネルは、マイクロチャンネルのキャビティが相互接続され得るか又は固体担体内に伸長し得ることを意味する。マイクロチャンネルまたはマイクロウェル内では、任意の幾何学的形状、配向または組織を有する、第2マイクロ構造または特徴部が存在し得る。二次的特徴部の表面は、二次的特徴部の表面の表面エネルギーを減少させることができる部分で官能化され得る。オリゴヌクレオチドを合成するための試薬の液滴は、マイクロチャンネルまたはマイクロウェルへと付着され得る。マイクロウェルは、本明細書で使用されているように、液体を保持することができるマイクロ流体スケールの構造を指す。様々な実施形態では、マイクロウェルは、各端部上の流体開口部を通る、上端部と下端部との間の液体の流れを可能にし、それ故、マイクロチャンネルのように作用する。これらの文脈では、マイクロウェルおよびマイクロチャンネルという用語は、明細書の全体にわたって交換可能に使用される。

20

30

【0135】

図3は、本明細書に記載されるような第1基板、および随意に、第2基板を含むオリゴヌクレオチド合成のためのシステムの例を例証する。インクジェットプリンターのプリンターヘッドは、第1基板の位置に対するX-Y方向に移動することができる。第2基板は、第1基板で密封するためにZ方向に移動することができ、分解されたリアクターを形成する。合成されたオリゴヌクレオチドは、第1基板から第2基板に送達され得る。別の態様では、本発明はまた、オリゴヌクレオチドアセンブリのためのシステムに関する。オリゴヌクレオチドアセンブリのためのシステムは、ウェーハハンドリングのためのシステムを含むことができる。図4は、本発明の様々な実施形態による、基板のレイアウト設計のための例を例証する。基板は、複数のマイクロウェルを含むことができ、マイクロウェルは、均一のピッチ、例えば1.5 mmのピッチで配置され得る。代替的に、複数のピッチは、レイアウトの異なる方向で選ばれ得る、例えば、マイクロ構造の列は、第1ピッチによって定義することができ、各列内で、マイクロ構造は、第2ピッチによって分離され得る。ピッチは、任意の適切なサイズ、例えば、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0

40

50

． 6、0． 7、0． 75、0． 8、0． 9、1、1． 1、1． 2、1． 3、1． 4、1． 5、1． 6、1． 7、1． 8、1． 9、2、2． 1、2． 2、2． 3、2． 4、2． 5、2． 6、2． 7、2． 8、2． 9、3、3． 5、4、4． 5、または5 mmを含み得る。マイクロウェルは、任意の適切な寸法、例えば図4に例証されるような80 μm の直径、または10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、または500 μm を含む、任意の適切な直径を有して設計され得、マイクロウェルは、複数のより小さなマイクロウェルに接続され得る。より小さなマイクロウェルの表面は、選択された領域で官能化され得、試薬の液体が、例えば、高エネルギーの表面官能化を介して流れ込むこと促進する。図4に例証されるように、より小さなマイクロウェルの直径は、約20 μm 、あるいは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、または80 μm を含む、任意の適切な直径であり得る。図5は、試薬の液滴がインクジェットプリンターによってマイクロウェルへと付着されるときにの事例を例証する。液体の液滴は、より小さなマイクロウェル上に広がり、それに充填することができ、これは、幾つかの場合において、隣接面と比較してマイクロウェルの表面の高エネルギーの表面修飾によって促進される。

10

【0136】

官能化された表面を有する基板上に高密度の分解された場所を有していることが、小さなデバイスを有する及び／又は大多数の分子を小さなデバイスで合成する及び／又は大多数の異なる分子を合成するのに望ましいかもしれない。基板の官能化された表面は、分解された場所の任意の適切な密度（例えば、合成プロセスのための時間を考慮に入れて、またはオリゴヌクレオチド、遺伝子、またはライブラリ当たりのコストを考慮して、オリゴヌクレオチドを、合成される与えられた数の合計の異なるオリゴヌクレオチドと合成するのに適切な密度）を含み得る。幾つかの実施形態では、表面は、1 mm^2 当たり、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約50、約75、約100、約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1500、約2000、約3000、約4000、約5000、約6000、約7000、約8000、約9000、約10000、約20000、約40000、約60000、約80000、約100000、または約500000の部位の分解された場所の密度を有している。幾つかの実施形態では、表面は、1 mm^2 当たり、少なくとも約50、少なくとも約75、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1000、少なくとも約1500、少なくとも約2000、少なくとも約3000、少なくとも約4000、少なくとも約5000、少なくとも約6000、少なくとも約7000、少なくとも約8000、少なくとも約9000、少なくとも約10000、少なくとも約20000、少なくとも約40000、少なくとも約60000、少なくとも約80000、少なくとも約100000、または少なくとも約500000の部位の分解された場所の密度を有している。基板の分解された場所は、任意の異なる組織を有することができる。例えば、限定なしで、分解された場所は、接近してクラスター化され得、1つ以上の円形領域、長方形領域、楕円領域、不規則領域などを形成する。一態様では、分解された場所は、密接に詰められ、低量の相互汚染を有しているか又は相互汚染を有していない（例えば、1つの分解された場所へと付着される試薬の液滴は、別の最も近い分解された場所へと付着される試薬の液滴と実質的に混合しない）。基板の分解された場所の組織は、各小領域または全体領域が、流体接続条件下で認められるのと同じ湿度、圧力またはガス含有量、または実質的に類似した湿度、圧力またはガス含有量を有することができるように、ともに包含されて、制御された湿度、圧力またはガス含有量を有する密封されたキャビティを作り出すことを可能にするように設計

20

30

40

50

され得る。基板上の分解された場所のための異なる設計の幾つかの例は、図6A-Cに例証される。例えば、図6Bのbは、穴のアレイ (Array of Holes) と呼ばれるレイアウトの設計であり、図6Bのcは、花 (Flowers) と呼ばれるレイアウトの設計であり、図6Bのdは、照準器 (Gunsight) と呼ばれるレイアウトの設計であり、および図6Bのeは、放射花 (Radial Flower) と呼ばれるレイアウトの設計である。図6Cは、97.765の μm のステンシル上の一連のマイクロウェルで覆われた基板の設計を例証する。図6Cで例証されるようなマイクロウェルは、アイランドへとクラスター化される。マイクロウェルは、インクジェットヘッドからの試薬を充填され得る。

【0137】

基板上の分解された場所の各々は、当該技術分野で既知の任意の形状、または当該技術分野で既知の方法によって作ることができる形状を有することができる。例えば、分解された場所の各々は、円形、矩形、楕円形、または不規則形状である面積を有することができる。幾つかの実施形態では、分解された場所は、液体が大気泡を作り出すことなく容易に流れることを可能にする形状であり得る。幾つかの実施形態では、分解された場所は、円形であり得、約、または少なくとも約1マイクロメートル (μm)、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、11 μm 、12 μm 、13 μm 、14 μm 、15 μm 、16 μm 、17 μm 、18 μm 、19 μm 、20 μm 、25 μm 、30 μm 、35 μm 、40 μm 、45 μm 、50 μm 、55 μm 、60 μm 、65 μm 、70 μm 、75 μm 、80 μm 、85 μm 、90 μm 、95 μm 、100 μm 、110 μm 、120 μm 、130 μm 、140 μm 、150 μm 、160 μm 、170 μm 、180 μm 、190 μm 、200 μm 、250 μm 、300 μm 、350 μm 、400 μm 、450 μm 、500 μm 、550 μm 、600 μm 、650 μm 、700 μm または750 μm 、あるいはそれら未満であり得る直径を有する。分解された場所は、単分散のサイズ分布を有し得、すなわち、ミクロ構造はすべて、略同じ幅、高さ、及び／又は長さを有し得る。代替的に、分解された場所は、限られた数の形状及び／又はサイズを有し得、例えば、分解された場所は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、またはそれ以上の異なる形状で表わされ得、その各々は単分散のサイズを有している。幾つかの実施形態では、同じ形状は、複数の単分散のサイズ分布、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20またはそれ以上の単分散のサイズ分布で繰り返され得る。単分散の分布は、モードの25%、20%、15%、10%、5%、3%、2%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%未満またはそれより小さな標準偏差を有するユニモジューラ分布で反映され得る。

【0138】

高密度の分解された場所を有している基板は、典型的に、小面積内の分解された場所を結果としてもたらす。結果的に、それは、小さなマイクロチャネルをもたらしすることができる。マイクロチャネルは、異なる容量で試薬の付着した液滴を包含することができる。マイクロチャネルは、本発明の様々な実施形態のための十分に大きな表面積及び／又は容積を可能にする任意の適切な寸法を有することができる。一態様では、マイクロチャネルの容積は、マイクロチャネルに付着される液滴中の試薬がオリゴヌクレオチド合成の間に十分に消耗されないような適切な大きさである。これらの態様では、とりわけ、ウェル構造の容積は、オリゴヌクレオチドが合成され得る期間または密度を誘導することができる。

【0139】

分解された場所の各々は、本明細書に記載される本発明の様々な実施形態に従って反応を行うための任意の適切な面積を有することができる。幾つかの場合では、複数の分解された場所は、基板の表面積全体の任意の適切なパーセンテージを占めることができる。幾つかの場合では、分解された場所の面積は、基板に組み込まれたマイクロチャネルまたはマイクロウェルの断面積であり得る。幾つかの実施形態では、複数のミクロ構造または分解された場所は直接、基板の表面の約、または少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、1

6 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、または95 %、あるいはそれら未満を占めることができる。幾つかの実施形態では、複数の分解された座は、合計面積の約、または少なくとも約10 mm²、11 mm²、12 mm²、13 mm²、14 mm²、15 mm²、16 mm²、17 mm²、18 mm²、19 mm²、20 mm²、25 mm²、30 mm²、35 mm²、40 mm²、50 mm²、75 mm²、100 mm²、200 mm²、300 mm²、400 mm²、500 mm²、600 mm²、700 mm²、800 mm²、900 mm²、1000 mm²、1500 mm²、2000 mm²、3000 mm²、4000 mm²、5000 mm²、7500 mm²、10000 mm²、15000 mm²、20000 mm²、25000 mm²、30000 mm²、35000 mm²、40000 mm²、50000 mm²、60000 mm²、70000 mm²、80000 mm²、90000 mm²、100000 mm²、200000 mm²、300000 mm²、またはそれら未満あるいはそれら以上を占めることができる。

【0140】

基板に組み込まれたマイクロ構造は、マイクロチャネルまたはマイクロウェルを含み得、ここでマイクロ構造は、基板の上面または底面から始まり、幾つかの場合において、典型的に対抗する表面に流体接続される。用語「上(top)」および「底(bottom)」は、任意の与えられた時間での重力に対する基板の位置に必ずしも関連していないが、一般に、利便性および明確性のために使用される。マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、任意の適切な深さ又は長さを有することができる。幾つかの場合では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの深さ又は長さは、基板の表面(及び/又は固体担体の底部)から固体担体の上部まで測定される。幾つかの場合では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの深さ又は長さは、固体担体の厚さとおおよそ等しい。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、約、または少なくとも約1マイクロメートル(μm)、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、15 μm 、20 μm 、25 μm 、30 μm 、35 μm 、40 μm 、45 μm 、50 μm 、55 μm 、60 μm 、65 μm 、70 μm 、75 μm 、80 μm 、85 μm 、90 μm 、95 μm 、100 μm 、125 μm 、150 μm 、175 μm 、200 μm 、300 μm 、400 μm または500 μm 、あるいはそれら以上の深さまたは長さである。マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、本明細書に記載される本発明の実施形態に適した外周の長さを有することができる。幾つかの場合では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの外周は、断面積、例えば前記マイクロチャネルまたはマイクロウェルを通る流体の流動方向に垂直である断面積の外周として測定される。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、約、または少なくとも約1マイクロメートル(μm)、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、15 μm 、20 μm 、25 μm 、30 μm 、31 μm 、35 μm 、40 μm 、45 μm 、50 μm 、55 μm 、60 μm 、65 μm 、70 μm 、75 μm 、80 μm 、85 μm 、90 μm 、95 μm 、100 μm 、125 μm 、150 μm 、175 μm 、200 μm 、300 μm 、400 μm または500 μm 、あるいはそれら未満の外周を有する。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの名目のアーク長さの密度は、平面基板面積の μm^2 当たりの適切なアーク長さを有することができる。本明細書に記載されるように、アーク長さの密度は、平面基板の表面積当たりのマイクロチャネルまたはマイクロウェルの断面の外周の長さを指す。例えば、限定なしで、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの名目のアーク長さの密度は、少なくとも0.001、0.002、0.003、0.004、0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.015、0.02、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1 $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ 、またはそれ以上であり得る。幾つかの実

施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの名目のアーク長さの密度は、 $0.036 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ であり得る。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの名目のアーク長さの密度は、少なくとも $0.001 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ であり得る。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルの名目のアーク長さの密度は、少なくとも $0.01 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ であり得る。さらに、例えば、適切な部分での表面コーティングによる、本明細書に記載される反応に適したマイクロチャネルまたはマイクロウェルの名目の表面積は、最大限にされ得る。本明細書に記載されるような適切な部分でコーティングされるマイクロチャネルまたはマイクロウェルの表面積は、表面へのオリゴヌクレオチドの付着を促進することができる。幾つかの実施形態では、オリゴヌクレオチド合成などの、本明細書に記載される反応に適したマイクロチャネルまたはマイクロウェルの名目の表面積は、平面基板面積の少なくとも 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.6 、 0.7 、 0.8 、 0.9 、 1 、 1.05 、 1.1 、 1.15 、 1.2 、 1.25 、 1.3 、 1.35 、 1.4 、 1.45 、 1.5 、 1.55 、 1.6 、 1.65 、 1.7 、 1.75 、 1.8 、 1.85 、 1.9 、 1.95 、 2 、 2.1 、 2.2 、 2.3 、 2.4 、 2.5 、 2.6 、 2.7 、 2.8 、 2.9 、 3 、 3.5 、 4 、 4.5 、または $5 \mu\text{m}^2$ である。

【0141】

マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、本明細書に記載される方法および組成物に適した任意の容積を有することができる。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、約 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 150 、 200 、 250 、 300 、 350 、 400 、 450 、 500 、 550 、 600 、 650 、 700 、 750 、 800 、 850 、 900 、または 950 ピコリットル (p1) 未満、約 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 110 、 120 、 130 、 140 、 150 、 160 、 170 、 180 、 190 、 200 、 250 、 300 、 350 、 400 、 450 、 500 、 550 、 600 、 650 、 700 、 750 、 800 、 850 、 900 、 950 、または 990 ナノリットル (n1) 未満、約 0.5 マイクロリットル (μl) 未満、約 $1 \mu\text{l}$ 未満、約 $1.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $2 \mu\text{l}$ 未満、約 $2.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $3 \mu\text{l}$ 未満、約 $3.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $4 \mu\text{l}$ 未満、約 $4.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $5 \mu\text{l}$ 未満、約 $5.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $6 \mu\text{l}$ 未満、約 $6.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $7 \mu\text{l}$ 未満、約 $7.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $8 \mu\text{l}$ 未満、約 $8.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $9 \mu\text{l}$ 未満、約 $9.5 \mu\text{l}$ 未満、約 $10 \mu\text{l}$ 未満、約 $11 \mu\text{l}$ 未満、約 $12 \mu\text{l}$ 未満、約 $13 \mu\text{l}$ 未満、約 $14 \mu\text{l}$ 未満、約 $15 \mu\text{l}$ 未満、約 $16 \mu\text{l}$ 未満、約 $17 \mu\text{l}$ 未満、約 $18 \mu\text{l}$ 未満、約 $19 \mu\text{l}$ 未満、約 $20 \mu\text{l}$ 未満、約 $25 \mu\text{l}$ 未満、約 $30 \mu\text{l}$ 未満、約 $35 \mu\text{l}$ 未満、約 $40 \mu\text{l}$ 未満、約 $45 \mu\text{l}$ 未満、約 $90 \mu\text{l}$ 未満の約 $85 \mu\text{l}$ 未満の約 $80 \mu\text{l}$ 未満の約 $75 \mu\text{l}$ 未満の約 $70 \mu\text{l}$ 未満の約 $65 \mu\text{l}$ 未満の約 $60 \mu\text{l}$ 未満の約 $55 \mu\text{l}$ 未満の約 50 未満 μl 、約 $95 \mu\text{l}$ 未満、または約 $100 \mu\text{l}$ 未満、である容積を有している。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、約 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 150 、 200 、 250 、 300 、 350 、 400 、 450 、 500 、 550 、 600 、 650 、 700 、 750 、 800 、 850 、 900 、または 950 ピコリットル (p1) 以上、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 50 、 60 、 70 、 80 、 90 、 100 、 110 、 120 、 130 、 140 、 150 、 160 、 170 、 180 、 190 、 200 、 250 、 300 、 350 、 400 、 450 、 500 、 550 、 600 、 650 、 700 、 750 、 800 、 850 、 900 、 950 、または 990 ナノリットル (n1) 以上、約 0.5 マイクロリットル (μl)、約 $1 \mu\text{l}$ 、約 $1.5 \mu\text{l}$ 、約 $2 \mu\text{l}$ 、約 $2.5 \mu\text{l}$ 、約 $3 \mu\text{l}$ 、約 $3.5 \mu\text{l}$ 、約 $4 \mu\text{l}$ 、約 $4.5 \mu\text{l}$ 、約 $5 \mu\text{l}$ 、約 $5.5 \mu\text{l}$ 、約 $6 \mu\text{l}$ 、約 $6.5 \mu\text{l}$ 、約 $7 \mu\text{l}$ 、約 $7.5 \mu\text{l}$ 、約 $8 \mu\text{l}$ 、約 $8.5 \mu\text{l}$ 、約 $9 \mu\text{l}$ 、約 $9.5 \mu\text{l}$ 、約 $10 \mu\text{l}$ 、約 $11 \mu\text{l}$ 、約 $12 \mu\text{l}$ 、約 $13 \mu\text{l}$ 、約 $14 \mu\text{l}$ 、約 $15 \mu\text{l}$ 、約 $16 \mu\text{l}$ 、約 $17 \mu\text{l}$ 、約 $18 \mu\text{l}$ 、約 $19 \mu\text{l}$ 、約 $20 \mu\text{l}$ 、約 $25 \mu\text{l}$ 、約 $30 \mu\text{l}$ 、約 $35 \mu\text{l}$ 、約 $40 \mu\text{l}$ 、約 45

10

20

30

40

50

μl 、約 $50\mu\text{l}$ 、約 $55\mu\text{l}$ 、約 $60\mu\text{l}$ 、約 $65\mu\text{l}$ 、約 $70\mu\text{l}$ 、約 $75\mu\text{l}$ 、約 $80\mu\text{l}$ 、約 $85\mu\text{l}$ 、約 $90\mu\text{l}$ 、約 $95\mu\text{l}$ 、または約 $100\mu\text{l}$ 以上、である容積を有している。

【0142】

マイクロチャネルまたはマイクロウェルは、1未満のアスペクト比を有することができる。本明細書で使用されるように、用語「アスペクト比」は、チャネルの深さに対するチャネルの幅の比率を指す。したがって、1未満のアスペクト比を有するチャネルは、その幅よりも深く、一方で、1を超えるアスペクト比を有するチャネルは、その深さよりも幅が広い。幾つかの態様では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルのアスペクト比は、約0.5、約0.2、約0.1、または約0.05以下であり得る。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはマイクロウェルのアスペクト比は、約0.1であり得る。幾つかの実施形態では、マイクロチャネルまたはチャネルのアスペクト比は、約0.05であり得る。本明細書に記載されるマイクロ構造、例えば、1、0.1または0.05未満のアスペクト比を有するマイクロチャネルまたはマイクロウェルは、1、2、3、4、5、6またはそれ以上の角、曲がり角などを有するチャネルを含み得る。本明細書に記載されるマイクロ構造は、特定の分解された場所内に包含されるすべてのマイクロチャネルまたはマイクロウェル、例えば1つ以上の介入するチャネル、これらのチャネルの幾つか、単一のチャネル、およびさらに1つ以上のマイクロチャネルまたはマイクロウェルの一部分または複数の部分に関して、記載されるアスペクト比、例えば1、0.1または0.05未満を含み得る。低いアスペクト比のマイクロチャネルを作り出す他の設計およびする方法は、米国特許第5,842,787号に記載され、これは、引用によって本明細書に組み込まれる。

【0143】

複数の分解された場所を有する基板上のマイクロチャネルまたはマイクロウェルなどのマイクロ構造は、本明細書に記載されるか、さもなければ当該技術分野に既知の任意の方法（例えば、微細加工プロセス）によって製造され得る。本明細書に開示される基板を製造するのに使用され得る微細加工プロセスは、限定しないが、リソグラフィ；湿式化学、乾燥、およびフォトリソグラフィ除去などの、エッチング技術；マイクロ流体装置／ラボオンチップ、光学的MEMS（MOEMSとも呼ばれる）、RF MEMS、Power MEMS、およびBioMEMS技術を含む微小電気機械（MEMS）技術、および深掘り反応性イオンエッチング（DRIE）；微小電気機械（NEMS）技術；シリコンの熱酸化；電気めっきおよび無電解めっき；ホウ素、リン、ヒ素、およびアンチモン拡散などの拡散プロセス；イオン注入；蒸発（フィラメント、電子ビーム、閃光、およびシャドーイングおよびステップカバレッジ）などフィルム付着、スパッタリング、化学蒸着（CVD）、エピタキシー（気相、液相、および分子線）、電気めっき、スクリーン印刷、およびラミネーションなどの、膜蒸着、を含む。一般に、Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988)；Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990)；Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998；Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997)を参照。

【0144】

一態様では、複数の分解された場所を有する基板は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して製造され得る。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所を有する基板の

材料は、二酸化ケイ素などの半導体基材であり得る。基板の材料はまた、砒化ガリウム（GaAs）、チョクラスキー法を介して生成された半導体などの、他の化合物ⅢⅢⅤまたはⅢⅢⅤ材料であり得る（Grovenor, C. (1989). Microelectronic Materials. CRC Press. pp. 113-123）。該材料は、その表面に接する溶液に対する反応性オキシド（OH）基の被覆を示す、硬い、平らな表面を提示することができる。これらのオキシド基は、続くシリル化プロセスのための付着点になり得る。代替的に、酸化ケイ素のエッチング特性を模倣する親油性および疎水性の表面物質が、付着され得る。窒化ケイ素および炭化ケイ素の表面も、本発明の様々な実施形態に従って、適切な基板の製造のために利用され得る。

【0145】

10

幾つかの実施形態では、保護層が基板上に付着され得、これは反応性オキシド基を有するかもしれないし、有さないかもしれない。保護層は、窒化ケイ素（Si₃N₄）またはポリイミドを含むことができる。幾つかの例では、フォトリソグラフィ工程は、分解された場所が保護層に生ずるところで、領域を定義するために使用することができる。

【0146】

複数の分解された場所があるを有する基板を生成する方法は、基板で始めることができる。基板（例えば、シリコン）は、限定されないが、金属などの導電層を含む、その上に配される任意数の層を有することができる。導電層は、幾つかの例においてアルミニウムであり得る。幾つかの場合では、基板は、保護層（例えば、窒化チタン）を有することができる。幾つかの場合では、基板は、高い表面エネルギーを有する化学層を有することができる。層は、例えば、化学蒸着（CVD）、原子層蒸着（ALD）、プラズマ増強CVD（PECVD）、プラズマ増強ALD（PEALD）、金属有機CVD（MOCVD）、熱線CVD（HWCVD）、潜在性CVD（iCVD）、改質CVD（MCVD）、蒸着（OVD）、外部蒸着（VAD）および物理蒸着（例えば、スパッタ蒸着、蒸着（evaporative deposition））などの、様々な蒸着技術の助力で付着され得る。

20

【0147】

幾つかの場合では、酸化物層が、基板上に付着される。幾つかの例では、酸化物層は、二酸化ケイ素を含むことができる。二酸化ケイ素は、テトラエチルオルトシリケート（TEOS）、高密度プラズマ（HDP）、またはその任意の組み合わせを使用して付着され得る。

30

【0148】

幾つかの例では、二酸化ケイ素は、低温技術を使用して付着され得る。幾つかの場合では、プロセスは、酸化ケイ素の低温化学蒸着である。温度は、一般に、チップ上の予め存在する金属が損傷されないほど十分に低い。蒸着温度は、約50℃、約100℃、約150℃、約200℃、約250℃、約300℃、約350℃などであり得る。幾つかの実施形態では、蒸着温度は、約50℃、約100℃、約150℃、約200℃、約250℃、約300℃、または約300℃などを下回る。蒸着は、任意の適切な圧力で行われ得る。幾つかの例では、蒸着プロセスは、RFプラズマエネルギーを使用する。

【0149】

40

幾つかの場合では、酸化物は、乾燥した熱成長酸化物の手順（例えば、1,000℃近い又は超える温度を使用するもの）によって付着される。幾つかの場合では、酸化ケイ素は、湿り蒸気プロセスによって生成される。

【0150】

二酸化ケイ素は、本明細書にさらに詳しく別記される適切なマイクロ構造の製造に適した厚さにまで付着され得る。

【0151】

二酸化ケイ素は、任意の適切な厚さにまで付着され得る。幾つかの実施形態では、二酸化ケイ素層は、少なくとも又は少なくとも約1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm

50

、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、125 nm、150 nm、175 nm、200 nm、300 nm、400 nm、500 nm、1 μ m、1.1 μ m、1.2 μ m、1.3 μ m、1.4 μ m、1.5 μ m、1.6 μ m、1.7 μ m、1.8 μ m、1.9 μ m、2.0 μ m、またはそれ以上の厚さを有し得る。二酸化ケイ素層は、大きくて又は大きくて約2.0 μ m、1.9 μ m、1.8 μ m、1.7 μ m、1.6 μ m、1.5 μ m、1.4 μ m、1.3 μ m、1.2 μ m、1.1 μ m、1.0 μ m、500 nm、400 nm、300 nm、200 nm、175 nm、150 nm、125 nm、100 nm、95 nm、90 nm、85 nm、80 nm、75 nm、70 nm、65 nm、60 nm、55 nm、50 nm、45 nm、40 nm、35 nm、30 nm、25 nm、20 nm、15 nm、10 nm、9 nm、8 nm、7 nm、6 nm、5 nm、4 nm、3 nm、2 nm、1 nm、またはそれ以下の厚さを有し得る。二酸化ケイ素層は、1.0 nm-2.0 μ m、1.1-1.9 μ m、1.2-1.8 nm、1.3-1.7 μ m、1.4-1.6 μ mの間の厚さを有し得る。当業者は、二酸化ケイ素層が、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にある厚さ、例えば、1.5-1.9 μ mを有し得ることを認識するだろう。二酸化ケイ素は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にある厚さを有し得る。分解された場所（例えば、マイクロチャネルまたはマイクロウェル）は、当該技術分野で既知の様々な製造技術を使用して、二酸化ケイ素基板において作り出され得る。そのような技術は、半導体製造技術を含み得る。幾つかの場合では、分解された場所は、半導体産業に使用されるものなどのフォトリソグラフィ技術を使用して作り出される。例えば、フォトレジスト（例えば、電磁放射線にさらされたときに特性を変化させる物質）は、任意の適切な厚さにまで（例えば、ウェーハのスピニングによって）二酸化ケイ素上にコーティングされ得る。フォトレジストを含む基板は、電磁放射線源にさらされ得る。分解された場所の領域を定義するべく、フォトレジストの部分からの放射を遮蔽するために、マスクが使用され得る。フォトレジストは、ネガ型レジストまたはポジ型レジスト（例えば、分解された場所の領域は、電磁放射線にさらされ得るか、または分解された場所以外の領域は、マスクによって定義されるように電磁放射線にさらされ得る）であり得る。分解された場所が作り出されるべき位置に重なる領域は、二酸化ケイ素層において分解された場所の位置および分布に対応するパターンを定義するために、電磁放射線にさらされる。フォトレジストは、分解された場所に対応するパターンを定義するマスクを通して電磁放射線にさらされ得る。次に、フォトレジストのさらされた部分は、例えば、洗浄操作（例えば脱イオン水）の助力により除去することができる。その後、マスクの除去された部分は、基板をエッチングする且つ分解された場所のパターンを二酸化ケイ素層へと移すために、化学エッチング液にさらされ得る。エッチング液は、例えば、硫酸（ H_2SO_4 ）などの酸を含むことができる。二酸化ケイ素層は、異方性の方法でエッチングされ得る。本明細書に記載される方法を使用して、DRIEなどの高い異方性の製造方法は、基板の表面に対して垂直から約 $\pm 3^\circ$ 、 2° 、 1° 、 0.5° 、 0.1° 未満、またはそれ以下逸脱する側壁を有する基板上で又は基板内で、合成の場所を含むマイクロウェルまたはマイクロチャネルなどのマイクロ構造を作り出すために適用され得る。約10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、 0.5 、 0.1 μ m未満またはそれ以下のアンダーカット値（Undercut values）が達成され得、結果的に、高度に均一なマイクロ構造がもたらされる。

【0152】

分解された場所が形成される領域で二酸化ケイ素をエッチングするために、様々なエッチング手順が使用され得る。エッチングは、等方性エッチング（すなわち、一方向に沿ったエッチング速度は、垂直方向に沿ったエッチング速度に略等しいか又は等しい）、または異方性エッチング（すなわち、一方向に沿ったエッチング速度は、垂直方向に沿ったエッチング速度未満である）、あるいはその変形であり得る。エッチング技術は、KOH、TMAH、EDPなどの湿式シリコンエッチングおよび乾燥したプラズマエッチング（例えばDRIE）の両方であり得る。その両方は、相互接続によってマイクロ構造のウェー

10

20

30

40

50

ハをエッチングするために使用されてもよい。

【0153】

幾つかの場合では、異方性エッチングは、分解された場所の容積の大部分を除去する。約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%を含む、任意の適切なパーセンテージの分解された場所の容積が除去され得る。幾つかの場合では、物質の少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、異方性エッチングで除去される。幾つかの場合では、物質の多くて約60%、多くて約70%、多くて約80%、多くて約90%、または多くて約95%が、異方性エッチングで除去される。幾つかの実施形態では、異方性エッチングは、基板を通るすべての二酸化ケイ素物質を除去するわけではない。等方性エッチングは、幾つかの実施形態に従って、基板を通るすべての物質を除去して、穴を作り出すために使用される。

10

【0154】

幾つかの場合では、ウェルは、分解された場所を定義するためにフォトリソグラフィ工程を使用してエッチングされ、ハイブリッドのドライーウェットのエッチングが続く。フォトリソグラフィ工程は、二酸化ケイ素をフォトレジストでコーティングすること、およびフォトレジストを分解された場所を定義するパターンを有するマスク（またはレチクル）に通して電磁放射線にさらすことを含むことができる。幾つかの例では、ハイブリッドドライーウェットのエッチングは、（a）フォトリソグラフィ工程によってフォトレジストにおいて定義された分解された場所の領域中で大量の二酸化ケイ素を除去するためにドライエッチングすること、（b）基板を洗浄こと、および（c）分解された場所の領域において基板から残りの二酸化ケイ素を除去するためにウェットエッチングすること、を含む。

20

【0155】

基板は、プラズマエッチングの化学作用、または例えば、 H_2O_2 、 O_2 、 O_3 、 H_2SO_4 、または H_2O_2 と H_2SO_4 の組み合わせなどの、それらの組み合わせなどの、酸化剤への露出の助力によって洗浄され得る。洗浄は、残りのポリマーを除去すること、ウェットエッチングを遮断することができる物質を除去すること、またはその組み合わせを含むことができる。幾つかの例では、洗浄は、プラズマ洗浄である。洗浄工程は、任意の適切な期間（例えば15乃至20秒）を進めることができる。一例では、洗浄は、100 mT、200 W、20 G、20 O_2 の設定を有するApplied Materials eMAX-CTマシンによって20秒間行うことができる。

30

【0156】

ドライエッチングは、略垂直に（例えば基板の方に）エッチングするが、水平または略水平（例えば、基板と平行）にはエッチングしない異方性エッチングであり得る。幾つかの例では、ドライエッチングは、 CF_4 、 CHF_3 、 C_2F_6 、 C_3F_6 、またはその任意の組み合わせなどの、フッ素ベースのエッチング液でエッチングすることを含む。一例では、エッチングは、100 mT、1000 W、20 G、および50 CF_4 の設定を有するApplied Materials eMAX-CTマシンによって400秒間行われる。本明細書に記載される基板は、深掘り反応性イオンエッチング（DRIE）によってエッチングされ得る。DRIEは、典型的に高アスペクト比で、ウェーハ／基板において深部に浸透する、急傾斜の穴およびトレンチを作り出すために使用される高度に異方性のエッチングプロセスである。基板は、高速のDRIEのための2つの主要な技術：低温およびボッシュ（Bosch）を使用してエッチングされ得る。DRIEを適用する方法は、米国特許第5501893号に記載され、これは引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0157】

ウェットエッチングは、あらゆる方向の物質を除去する等方性エッチングであり得る。幾つかの例では、ウェットエッチングは、フォトレジストをアンダーカットする（undercuts）。フォトレジストのアンダーカットは、フォトレジストを後の工程でより除去し易くすることができる（例えばフォトレジスト「リフトオフ（lift off）」

50

」)。一実施形態では、ウェットエッチングは、緩衝化酸化物エッチング（BOE）である。幾つかの場合では、湿式酸化物エッチングが、エッチング速度を遅くするために（例えば、フッ化アンモニウムで）緩衝化され得るフッ化水素酸塩基によって室温で行われる。エッチング速度は、エッチングされているフィルムおよびHF及び／又はNH₄Fの特定濃度に依存し得る。酸化物層を完全に除去するのに必要とされるエッチング時間は、典型的には、経験的に決定される。一例では、エッチングは、15：1のBOE（緩衝化酸化物エッチング）により22℃で行われる。

【0158】

二酸化ケイ素層は、下位の材料層までエッチングされ得る。例えば、二酸化ケイ素層は、窒化チタン層までエッチングされ得る。

10

【0159】

一態様では、複数の分解された場所を有する基板を調製するための方法は、（a）分解された場所を定義するためにフォトリソグラフィ工程、（b）フォトリソグラフィ工程によって定義された分解された場所の領域において大量の二酸化ケイ素を除去するためのドライエッチング、および（c）分解された場所の領域において基板から残りの二酸化ケイ素を除去するためのウェットエッチングを使用して、マイクロウェルまたはマイクロチャネルなどの分解された場所を、コーティングされた二酸化ケイ素層を含むシリコン基板などの基板へとエッチングする工程を含む。幾つかの場合では、該方法は、残りのポリマーを除去する工程、ウェットエッチングを遮断することができる物質を除去する工程、またはその組み合わせをさらに含む。該方法は、プラズマクリーニング工程を含むことができる。

20

【0160】

幾つかの実施形態では、フォトレジストは、幾つかの場合において、フォトリソグラフィ工程またはハイブリッドのドライウェットのエッチングに従って、二酸化ケイ素から除去されない。金属を、後の工程で二酸化ケイ素層の上部表面上ではなく、選択的に分解された場所へと配向するために、フォトレジストが残され得る。幾つかの場合では、基板は、金属（例えば、アルミニウム）でコーティングされ、ウェットエッチングは、金属上の特定の成分、例えば金属を腐食から保護するもの（例えば、窒化チタン（TiN））を除去しない。しかしながら、幾つかの場合において、フォトレジスト層は、化学機械平坦化（CMP）の助力などで除去され得る。

30

【0161】

基板の異なる官能化

本明細書に記載されるように、表面、例えばシリコンウェーハの表面の官能化は、物質の表面性質が表面上の化学種の付着によって改質される任意のプロセスを指し得る。官能化を達成するための共通の方法は、化学蒸着によるオルガノシラン分子の付着である。それはまた、湿式シリル化プロセスで行うことができる。

【0162】

「選択的領域付着」または「選択的領域官能化」と一般に呼ばれる異なる官能化は、少なくとも1つの領域が、同じ構造上の他の領域とは異なる表面または化学的性質を有する、一体構造上で2つ以上の別の領域を生成する任意のプロセスを指し得る。化学的性質は、限定されないが、表面エネルギー、化学的終端（chemical termination）、化学部分の表面濃度などを含む。異なる領域は隣接し得る。

40

【0163】

能動型の官能化は、DNA合成、あるいはDNAまたはタンパクの結合などの、幾つかの下流の生成工程に生じる表面の官能化を指し得る。したがって、本明細書に別記されるか、さもなければ当該技術分野に既知の適切な官能化方法は、表面に生じる特定の下流の生成工程を可能にするために選択される。

【0164】

受動型の官能化は、それらの領域を作用面積の原理機能（principle function）で無効性にする表面の官能化を指し得る。例えば、能動型の官能化がDNA

50

を結合するよう設計される場合、受動型の官能化された領域は、DNAを結合しない。

【0165】

フォトレジストは、典型的に、フォトリソグラフィーなどの、標準の工業的プロセスに一般に使用され、パターン化したコーティングを形成する、感光性物質を指す。それは、液体として適用されるが、混合物中の揮発性溶媒が蒸発すると、基板上で凝固する。それは、スピンコーティングプロセスにおいて薄膜（1 μm乃至100 μm）として平面基板に適用され得る。それは、マスクまたはレチクルを通して光にさらされることによってパターン化され得、現像薬（developer）におけるその溶解速度を変化させる。それは、「正」（光曝露は溶解を増加させる）、または「負」（光曝露は溶解を減少させる）であり得る。それは、下位基板を改質する（エッチングなど）後の工程のための障壁層として有用である犠牲層として使用され得る。一旦その改質が完了すると、レジストが除去される。

10

【0166】

フォトリソグラフィーは、基板をパターン化するためのプロセスを指し得る。共通の基本プロセスは、1）フォトレジストを基板に適用する工程、2）幾つかの領域では不透明であり、他の領域では透明である2値マスクに通してレジストを光にさらす工程、およびその後、3）レジストを現像し、結果的にどの領域がさらされたかに基づいたレジストのパターン化につながる工程を含む。現像後、パターン化されたレジストは、エッチング、イオン注入、または蒸着などの続く処理工程のためのマスクとして機能する。処理工程後、レジストは、例えば、プラズマ剥離または湿式化学的除去を介して典型的に除去される。

20

【0167】

様々な実施形態では、フォトレジストを使用する方法が利用され、ここで、フォトレジストは、異なる官能化を有する基板の製造を促進する。

【0168】

一連の製造工程は、異なる官能化プロセスのベースラインを形成し得、ここで、個々の工程は、本発明の様々な実施形態に従って、表面上の所望の官能化パターンを達成するために、修正され得るか、削除され得るか、または追加の工程を補足され得る。最初に、標的表面の初期の調製が、例えば、化学洗浄によって達成され得、初期の活性面または非活性面の官能化を含み得る。

30

【0169】

第2に、フォトレジストの適用は、様々な異なる技術によって達成され得る。様々な実施形態では、構造の異なる部分へレジストの流れは、構造の設計によって、例えば、鋭いステップ先端（sharp step edges）などの構造の様々なポイントで流体の固有のピン留め特性を利用することによって制御される。一旦レジストの輸送溶媒が蒸発すると、フォトレジストは固体膜を残す。

【0170】

第3に、フォトリソグラフィーは、基板の特定の特定地域のレジストを除去するために随意に使用されてもよく、その結果、それらの領域はさらに改質され得る。

【0171】

第4に、例えば、酸素プラズマを使用する、典型的に、短いプラズマ洗浄工程である、プラズマデスクラム（plasma descum）が、レジストが取り除かれた領域における残存する有機汚染物質の除去を促進するために使用され得る。

40

【0172】

第5に、表面は官能化され、一方で、レジストに覆われた領域は、あらゆる能動型または受動型の官能化から保護される。本明細書に記載される又は当該技術分野に既知の表面の化学的性質を変化させる任意の適切なプロセスは、表面を官能化するために使用され得る（例えば、オルガノシランの化学蒸着）。典型的に、これは、結果として、官能化種の自己集合単分子層（SAM）の付着をもたらす。

【0173】

50

第6に、レジストは、例えば、適切な有機溶媒中の溶解、プラズマエッチング、曝露および現像などによって剥離および除去され得、それによって、レジストによって覆われた基板の領域をさらす。幾つかの実施形態では、官能化基を除去しない又は官能化された表面を損傷しない方法が、レジスト剥離のために選択される。

【0174】

第7に、能動型または受動型の官能化に伴う第2官能化工程が、随意に行われ得る。幾つかの実施形態では、第1官能化工程によって官能化された領域は、第2官能化工程で使用する官能基の付着を遮断する。

【0175】

様々な実施形態では、異なる官能化は、DNAが合成されるチップ上の領域の空間的制御を促進する。幾つかの実施形態では、異なる官能化は、チップの流体特性を制御するために改善された柔軟性を提供する。幾つかの実施形態では、オリゴがオリゴヌクレオチド合成デバイスからナノウェルデバイスに移されるプロセスは、それ故、異なる官能化によって改善される。幾つかの実施形態では、異なる官能化は、デバイス、例えばナノリアクターまたはオリゴヌクレオチド合成デバイスの製造を提供し、ここで、ウェルまたはチャネルの壁は、本明細書に別記されるように、比較的親水性であり、外部表面は、本明細書に別記されるように、比較的疎水性である。

【0176】

図36は、本発明の様々な実施形態によるマイクロ流体デバイスへの異なる官能化の典型的な適用を例証する。能動型および受動型の官能化領域は、示されるように、別々に陰影が付けられる。特に、いわゆるリボルバーパターンを形成する互いに接続する第1チャネル（ピア）および第2チャネルは、三次元で異なる官能化を例証するために、これらの例において使用される。これらの典型的な基板内の三次元の特徴部の具体的なレイアウトは、レジストの適用を制御する助けとなる少数のガイドラインを例外として、官能化プロセスにとってそれほど重要ではない。

【0177】

図37は、図37のB-Dで例証される異なる官能化パターンの生成のための典型的なワークフローを例証する。したがって、基板は、最初に、例えばピラニア洗浄を使用して、洗浄され得、その後、O₂プラズマ曝露（図37のA）が続く。フォトレジストは、第2チャネル（別名、リボルバー；図37のB）を組み込むデバイス層に適用され得る。フォトリソグラフィ及び／又はプラズマデスカム工程が、パターンのための適切なマスクを使用して、基板上のフォトレジストの所望のパターンを生成するために使用され得る（図37のC）。マスクパターンは、フォトレジストがとどまる及び取り除かれる場所を管理するために変更され得る。例えば、フルオロシラン、炭化水素シラン、または表面を不動態化する有機質層を形成する任意の基を用いる、官能化工程は、デバイス上の受動的に官能化された領域を定義するために行われ得る（図37のD）。レジストは、本明細書に別記されるか、さもなければ当該技術分野に既知の適切な方法を使用して剥離され得る（図37のE）。一旦レジストが除去されると、露出された領域は、所望の異なる官能化パターンを残す能動型の官能化の対象となり得る（図37のF）。

【0178】

様々な実施形態では、本明細書に記載される方法および組成物は、選択的領域における改質された表面性質の生成のためのフォトレジストの適用に関し、ここで、フォトレジストの適用は、フォトレジストの空間的分布を画定する基板の流体特性に依存する。理論に縛られることなく、適用された流体に関連する表面張力効果は、フォトレジストの流れを定義し得る。例えば、レジスト溶剤が蒸発する前に、表面張力及び／又は毛管作用の効果は、制御された方法で小さな構造へのフォトレジストの引き込みを促進し得る（図38）。一実施形態では、レジスト接触ポイントは、鋭い先端によってピン留めされ、それによって、流体の進行を制御する。下位構造は、製造および官能化のプロセスの間にフォトレジストを適用するために使用される所望のフローパターンに基づいて設計され得る。溶媒が蒸発した後に残された固体の有機質層は、続く製造プロセスの工程を進めるために使用

され得る。

【0179】

基板は、隣接する流路へのウィッキング効果 (wicking effects) を促進または阻害することによって、流体の流れを制御するように設計され得る。例えば、図39のAは、上縁と底縁との間の重なりを避ける設計を例証し、これは、レジストの特定の配置を可能にする上部構造中の流体の維持を促進する。対照的に、図39のBは、代替的な設計を例証し、ここで上縁および底縁は重なり、底部構造への適用された流体のウィッキングにつながる。したがって、適切な設計は、レジストの所望の適用に依存して選択され得る。

【0180】

図40は、フォトリソグラフィ後の図40のCにおける例証された小型ディスクフォトレジストパターンに従う抵抗にさせられるデバイスの明視野 (A) および暗視野 (B) の画像を例証する。

【0181】

図41は、フォトリソグラフィ後の図41のCにおける例証されたフルディスクフォトレジストパターンに従う抵抗にさせられるデバイスの明視野 (A) および暗視野 (B) の画像を例証する。

【0182】

図42は、受動型の官能化およびレジストの剥離後の図42のCにおけるパターンに従って官能化されるデバイスの明視野 (A) および暗視野 (B) の画像を例証する。

【0183】

図43は、ジメチルスルホキシド (DMSO) を流体として使用する図43のCにおけるパターンに従って、明視野 (A) および暗視野 (B) の画像で異なる官能基を持つ表面の異なる流体特性を例証する。リボルバーの自発的湿潤は、疎水性領域に囲まれたリボルバー内の親水性表面を使用して達成された。

【0184】

図44は、図36のFで例証された異なる官能化パターンの生成のための別の典型的なワークフローを例証する。したがって、基板は、最初に、例えばピラニア洗浄を使用して洗浄され得、その後、 O_2 プラズマ曝露が続く (図44のA)。例えば、フルオロシラン、炭化水素シラン、または表面を不動態化し得る有機質層を形成することができる任意の基を用いる、官能化工程は、デバイス上の受動的に官能化された領域を定義するために行われ得る (図44のB)。フォトレジストは、第2チャネル (別名、リボルバー; 図44のC) を組み込むデバイス層に適用され得る。フォトリソグラフィ及び/又はエッチング工程が、パターンのための適切なマスクを使用して、基板上のフォトレジストの所望のパターンを生成するために使用され得る (図44のD)。マスクパターンは、フォトレジストがとどまる及び取り除かれる場所を管理するために変更され得る。レジストは、本明細書に別記されるか、さもなければ当該技術分野に既知の適切な方法を使用して剥離され得る (図44のE)。一旦レジストが除去されると、露出された領域は、所望の異なる官能化パターンを残す能動型の官能化の対象となり得る (図44のF)。

【0185】

別の実施形態では、官能化ワークフローは、レジストがビア (底部) 側適用される且つビアおよびリボルバーへと入る (flow down) ように設計される。外側表面上の露出された領域は、官能化の対象となり得る。レジストは、例えば、フォトリソグラフィまたはエッチングを使用してデバイスの背面 (底部) 側から除去され得、図36のEに記載されるパターンにつながる露出された領域の能動型の官能化を可能にする。

【0186】

また別の実施形態では、重なり設計は、図39のBで示されるように、ビアとリボルバーチャネルの縁の間で選択され得る。レジストは、流体をビアへとウィッキングする前面 (上部) 側から適用され得る。受動型の官能化、レジストの剥離、その後の能動型の官能化は、図36のEで例証されたパターンの製造につながるだろう。

10

20

30

40

50

【0187】

実質的に平面の基板部を含む典型的なマイクロ流体デバイスは、図25Dでダイアグラムとして示される。ダイアグラムの断面は、図25Eで示される。基板は、複数のクラスターを含み、ここで、各クラスターは、流体接続部の複数のグルーピングを含む。各グルーピングは、第1チャンネルから伸長する複数の第2チャンネルを含む。図25Aは、高密度のグルーピングを含むクラスターのデバイス図である。図25Cは、図25Aのクラスターのハンドル図である。図25Bは、図25Aの断面図である。

【0188】

グルーピングのクラスターは、任意数の配座に配され得る。図25Aでは、グルーピングは、円状のパターンでクラスターを形成するために、オフセット列（offset rows）に配される。図25Cは、典型的なマイクロ流体デバイス上のそのような複数のクラスターの配置を描写する。幾つかの実施形態では、個々のクラスターは、その内部が凸集合を形成する個々のクラスター領域内に包含される。幾つかの実施形態では、個々のクラスター領域は、互いに重複していない。個々のクラスター領域は、円または他の適切な多角形、例えば、三角形、正方形、長方形、平行四辺形、六角形などであり得る。2503によって表わされるように、3列のグルーピング間の典型的な距離は、各グルーピングの中心から測定すると、約0.05mm乃至約1.25mmであり得る。2、3、4、5列またはそれ以上の列のグルーピング間の距離は、約または少なくとも約0.05mm、0.1mm、0.15mm、0.2mm、0.25mm、0.3mm、0.35mm、0.4mm、0.45mm、0.5mm、0.55mm、0.6mm、0.65mm、0.7mm、0.75mm、0.8mm、0.9mm、1mm、1.1mm、1.2mm、1.2mm、または1.3mmであり得る。2、3、4、5列またはそれ以上の列のグルーピング間の距離は、約または長くて約1.3mm、1.2mm、1.1mm、1mm、0.9mm、0.8mm、0.75mm、0.65mm、0.6mm、0.55mm、0.5mm、0.45mm、0.4mm、0.35mm、0.3mm、0.25mm、0.2mm、0.15mm、0.1mm、0.05mm、またはそれ以下であり得る。2、3、4、5列またはそれ以上の列のグルーピング間の距離は、0.05-1.3mm、0.1-1.2mm、0.15-1.1mm、0.2-1mm、0.25-0.9mm、0.3-0.8mm、0.35-0.8mm、0.4-0.7mm、0.45-0.75mm、0.5-0.6mm、0.55-0.65mm、または0.6-0.65mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.05mm-0.8mm）。2506によって表わされるように、各々のグルーピングの中心から測定されるように、グルーピングの列における2つのグルーピング間の典型的な距離は、各グルーピングの中心から測定すると、約0.02mm乃至約0.5mmであり得る。グルーピングの列における2つのグルーピング間の距離は、約または少なくとも約0.02mm、0.04mm、0.06mm、0.08mm、0.1mm、0.12mm、0.14mm、0.16mm、0.18mm、0.2mm、0.22mm、0.24mm、0.26mm、0.28mm、0.3mm、0.32mm、0.34mm、0.36mm、0.38mm、0.4mm、0.42mm、0.44mm、0.46mm、0.48mm。または0.5mmであり得る。グルーピングの列における2つのグルーピング間の距離は、約または長くて約0.5mm、0.48mm、0.46mm、0.44mm、0.42mm、0.4mm、0.38mm、0.36mm、0.34mm、0.32mm、0.3mm、0.28mm、0.26mm、0.24mm、0.22mm、0.2mm、0.18mm、0.16mm、0.14mm、0.12mm、0.1mm、0.08mm、0.06mm、0.04mm、または0.2mm、あるいはそれ以下であり得る。2つのグルーピング間の距離は、0.02-0.5mm、0.04-0.4mm、0.06-0.3mm、または0.08-0.2mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.04mm-0.2mm）。

【0189】

10

20

30

40

50

各グルーピングの第1および第2のチャンネルの長さおよび幅は、実験条件に従って最適化され得る。幾つかの実施形態では、2504によって表わされる、グルーピング中の第1チャンネルの断面は、約または少なくとも約0.01mm、0.015mm、0.02mm、0.025mm、0.03mm、0.035mm、0.04mm、0.045mm、0.05mm、0.055mm、0.06mm、0.065mm、0.07mm、0.075mm、0.08mm、0.085mm、0.09mm、0.1mm、0.15mm、0.2mm、0.25mm、0.3mm、0.35mm、0.4mm、0.45mm、または0.5mmであり得る。幾つかの実施形態では、グルーピング中の第1チャンネルの断面は、約または長くて約0.5mm、0.45mm、0.4mm、0.35mm、0.3mm、0.25mm、0.2mm、0.15mm、0.1mm、0.09mm、0.085mm、0.08mm、0.075mm、0.07mm、0.065mm、0.06mm、0.055mm、0.05mm、0.045mm、0.04mm、0.035mm、0.03mm、0.025mm、0.02mm、0.015mm、または0.01mm、あるいはそれ以下であり得る。グルーピング中の第1チャンネルの断面は、0.01-0.5mm、0.02-0.45mm、0.03-0.4mm、0.04-0.35mm、0.05-0.3mm、0.06-0.25、または0.07-0.2mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.04mm-0.2mm）。幾つかの実施形態では、2505によって表わされる、グルーピング中の第2チャンネルの断面は、約または少なくとも約0.001mm、0.002mm、0.004mm、0.006mm、0.008mm、0.01mm、0.012mm、0.014mm、0.016mm、0.018mm、0.02mm、0.025mm、0.03mm、0.035mm、0.04mm、0.045mm、0.05mm、0.055mm、0.06mm、0.065mm、0.07mm、0.075mm、または0.08mmであり得る。幾つかの実施形態では、グルーピング中の第2チャンネルの断面は、約または長くて約0.08mm、0.075mm、0.07mm、0.065mm、0.06mm、0.055mm、0.05mm、0.045mm、0.04mm、0.035mm、0.03mm、0.025mm、0.02mm、0.018mm、0.016mm、0.014mm、0.012mm、0.01mm、0.008mm、0.006mm、0.004mm、0.002mm、0.001mm、またはそれ以下であり得る。グルーピング中の第2チャンネルの断面は、0.001-0.08mm、0.004-0.07mm、0.008-0.06mm、0.01-0.05mm、0.015-0.04mm、0.018-0.03mm、または0.02-0.025mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.008mm-0.04mm）。図25Bは、11のグルーピングの列を含むクラスターの典型的な断面を描写する。幾つかの実施形態では、各グルーピング中の第2チャンネルの高さは、約または少なくとも約0.005mm、0.008mm、0.01mm、0.015mm、0.02mm、0.025mm、0.03mm、0.04mm、0.05mm、0.06mm、0.07mm、0.08mm、0.1mm、0.12mm、0.14mm、0.16mm、0.18mm、または0.2mm長である。幾つかの実施形態では、各グルーピング中の、2501として示される、第2チャンネルの高さは、約または長くて約0.2mm、0.18mm、0.16mm、0.14mm、0.12mm、0.1mm、0.08mm、0.07mm、0.06mm、0.05mm、0.04mm、0.03mm、0.025mm、0.02mm、0.015mm、0.01mm、0.008mm、または0.005mm長である。各グルーピング中の第2チャンネルの高さは、0.005-0.2mm、0.008-0.18mm、0.01-0.16mm、0.015-0.1mm、0.02-0.08mm、または0.025-0.04mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.01mm-0.04mm）。幾つかの実施形態では、2502として示される、各グルーピング内の第1チャンネルの高さは、約または長くて約5mm、4.5mm、4mm、3.5mm、3mm、2.5mm

10

20

30

40

50

m、2 mm、1.5 mm、1.0 mm、0.8 mm、0.5 mm、0.4 mm、0.375 mm、0.35 mm、0.3 mm、0.275 mm、0.25 mm、0.225 mm、0.2 mm、0.175 mm、0.15 mm、0.125 mm、0.1 mm、0.075 mm、または0.05 mmである。幾つかの実施形態では、2502として示される、各グルーピング内の第1チャンネルの高さは、約または少なくとも約0.05 mm、0.075 mm、0.1 mm、0.125 mm、0.15 mm、0.175 mm、0.2 mm、0.225 mm、0.25 mm、0.275 mm、0.3 mm、0.325 mm、0.35 mm、0.375 mm、0.4 mm、0.5 mm、0.8 mm、1.0 mm、1.5 mm、2 mm、2.5 mm、3 mm、3.5 mm、4 mm、4.5 mm、または5 mmである。各グルーピング内の第1チャンネルの高さは、0.05－5 mm、0.075－4 mm、0.1－3 mm、0.15－2 mm、0.2－1 mm、または0.3－0.8 mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.1 mm－1 mm）。

【0190】

図25Dで示されるように、グルーピングのクラスターは、マイクロ流体デバイスの実質的に平面の基板部の単一の反応ウェルにおける配置に適した配座に配され得る。図25Dは、108の反応ウェルを含むマイクロ流体デバイスの実質的に平面の基板部のダイアグラムであり、ここで、各反応ウェルは複数のグルーピングを含む。基板は、限定されないが、約2から約250の間の任意の数を含む、任意数のウェルを含み得る。幾つかの実施形態では、ウェルの数は、約2乃至約225のウェル、約2乃至約200のウェル、約2乃至約175のウェル、約2乃至約150のウェル、約2乃至約125のウェル、約2乃至約100のウェル、約2乃至約75のウェル、約2乃至約50のウェル、約2乃至約25のウェル、約25乃至約250のウェル、約50乃至約250のウェル、約75乃至約250のウェル、約100乃至約250のウェル、約125乃至約250のウェル、約150乃至約250のウェル、約175乃至約250のウェル、約200乃至約250のウェル、または約225乃至約250のウェルを含む。当業者は、ウェル数がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば25－125）。さらに、各ウェルは、限定されないが、約2から約250のグルーピングの間の任意数を含む、任意数のグルーピングのクラスターを含むことができる。幾つかの実施形態では、クラスターは、約2乃至約225のグルーピング、約2乃至約200のグルーピング、約2乃至約175のグルーピング、約2乃至約150のグルーピング、約2乃至約125のグルーピング、約2乃至約100のグルーピング、約2乃至約75のグルーピング、約2乃至約50のグルーピング、約2乃至約25のグルーピング、約25乃至約250のグルーピング、約50乃至約250のグルーピング、約75乃至約250のグルーピング、約100乃至約250のグルーピング、約125乃至約250のグルーピング、約150乃至約250のグルーピング、約175乃至約250のグルーピング、約200乃至約250のグルーピング、または約225乃至約250のグルーピングを含む。当業者は、グルーピングの数がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば25－125）。一例として、図25Dで示される基板の108のウェルの各々は、図25Aで示される109のグルーピングのクラスターを含むことができ、結果として、マイクロ流体デバイスの実質的に平面の基板部に11, 772のグルーピングが存在する。

【0191】

図25Dは、0, 0 (X, Y) 軸によって示される参照の起点 (origin of reference) を含み、ここで、マイクロ流体デバイスの典型的な実質的に平面の基板部の左下角が図示される。幾つかの実施形態では、起点から測定されるように、2508として表わされる、実質的に平面の基板の幅は、一寸法に沿って約5 mm乃至約150 mmである。幾つかの実施形態では、起点から測定されるように、2519として表わされる、実質的に平面の基板の幅は、別寸法に沿って約5 mm乃至約150 mmである。幾つかの実施形態では、任意の寸法での基板の幅は、約5 mm乃至約125 mm、約5 mm

乃至約100mm、約5mm乃至約75mm、約5mm乃至約50mm、約5mm乃至約25mm、約25mm乃至約150mm、約50mm乃至約150mm、約75mm乃至約150mm、約100mm乃至約150mm、または約125mm乃至約150mmである。当業者は、幅がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば25-100mm）。図25Dで示される実質的に平面の基板部は、グルーピングの108のクラスターを含む。クラスターは、任意の構成で配され得る。図25Dでは、クラスターは、正方形を形成する列で配される。配置にかかわらず、XまたはY軸上で測定されるように、クラスターは、起点から約0.1mm乃至約149mmの距離で始まり得る。長さ2518および2509は、それぞれ、XおよびY軸上のクラスターの中心の最も遠い距離を表わす。長さ2517および2512は、それぞれ、XおよびY軸上のクラスターの中心の最も近い距離を表わす。幾つかの実施形態では、クラスターは、2つのクラスター間に繰り返される距離が存在するように配される。2507および2522によって示されるように、2つのクラスター間の距離は、約0.3mm乃至約9mm離れているかもしれない。幾つかの実施形態では、2つのクラスター間の距離は、約または少なくとも約0.3mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.7mm、0.8mm、0.9mm、1mm、1.2mm、1.4mm、1.6mm、1.8mm、2mm、2.2mm、2.4mm、2.6mm、2.8mm、3mm、3.2mm、3.4mm、3.6mm、3.8mm、4mm、4.2mm、4.4mm、4.6mm、4.8mm、5mm、5.2mm、5.4mm、5.6mm、5.8mm、6mm、6.2mm、6.4mm、6.6mm、6.8mm、7mm、7.2mm、7.4mm、7.6mm、7.8mm、8mm、8.2mm、8.4mm、8.6mm、8.8mm、または9mmである。幾つかの実施形態では、2つのクラスター間の距離は、約または長くて約9mm、8.8mm、8.6mm、8.4mm、8.2mm、8mm、7.8mm、7.6mm、7.4mm、7.2mm、7mm、6.8mm、6.6mm、6.4mm、6.2mm、6mm、5.8mm、5.6mm、5.4mm、5.2mm、5mm、4.8mm、4.6mm、4.4mm、4.2mm、4mm、3.8mm、3.6mm、3.4mm、3.2mm、3mm、2.8mm、2.6mm、2.4mm、2.2mm、2mm、1.8mm、1.6mm、1.4mm、1.2mm、1mm、0.9mm、0.8mm、0.7mm、0.6mm、0.5mm、0.4mm、または0.3mmである。2つのクラスター間の距離は、0.3-9mm、0.4-8mm、0.5-7mm、0.6-6mm、0.7-5mm、0.7-4mm、0.8-3mm、または0.9-2mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.8mm-2mm）。

【0192】

基準マークは、システムの他の構成要素とのそのようなデバイスのアラインメントを促進するために本明細書に記載されるマイクロ流体デバイスの上に置かれ得る。本発明のマイクロ流体デバイスは、1つ以上の基準マーク、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の基準マークを有し得る。図25Dで示される典型的なマイクロ流体デバイスの実質的に平面の基板部は、デバイスをシステムの他の構成要素と並べるのに有用な3つの基準マークを含む。基準マークは、マイクロ流体デバイスの実質的に平面の基板部内の任意の位置に位置付けられ得る。2513および2516によって示されるように、基準マークは、起点の近くに位置付けられ得、ここで、基準マークは、どのクラスターよりも起点に接近している。幾つかの実施形態では、基準マークは、2511および2521によって示されるように、基板部の縁の近くに位置付けられ、ここで、縁からの距離は、それぞれ、2510および2520によって示される。基準マークは、基板部の縁から約0.1mmから約10mmに位置付けられ得る。幾つかの実施形態では、基準マークは、基板部の縁から、約または少なくとも約0.1mm、0.2mm、0.3mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.7mm、0.8mm、0.9mm、1mm、1.2mm、1.4mm、1.6mm、1.8mm、2mm、2.2mm、2.4mm、2.6mm、2.8mm、3mm、3.2mm、3.4mm、3.6mm、3.8mm

、4 mm、4. 2 mm、4. 4 mm、4. 6 mm、4. 8 mm、5 mm、5. 2 mm、5. 4 mm、5. 6 mm、5. 8 mm、6 mm、6. 2 mm、6. 4 mm、6. 6 mm、6. 8 mm、7 mm、7. 2 mm、7. 4 mm、7. 6 mm、7. 8 mm、8 mm、8. 2 mm、8. 4 mm、8. 6 mm、8. 8 mm、9 mm、または10 mmに位置付けられ得る。幾つかの実施形態では、基準マークは、基板部から、約または長くて約10 mm、9 mm、8. 8 mm、8. 6 mm、8. 4 mm、8. 2 mm、8 mm、7. 8 mm、7. 6 mm、7. 4 mm、7. 2 mm、7 mm、6. 8 mm、6. 6 mm、6. 4 mm、6. 2 mm、6 mm、5. 8 mm、5. 6 mm、5. 4 mm、5. 2 mm、5 mm、4. 8 mm、4. 6 mm、4. 4 mm、4. 2 mm、4 mm、3. 8 mm、3. 6 mm、3. 4 mm、3. 2 mm、3 mm、2. 8 mm、2. 6 mm、2. 4 mm、2. 2 mm、2 mm、1. 8 mm、1. 6 mm、1. 4 mm、1. 2 mm、1 mm、0. 9 mm、0. 8 mm、0. 7 mm、0. 6 mm、0. 5 mm、0. 4 mm、0. 3 mm、0. 2 mm、または0. 1 mmに位置付けられる。基準マークは、基板の縁から、0. 1－10 mm、0. 2－9 mm、0. 3－8 mm、0. 4－7 mm、0. 5－6 mm、0. 1－6 mm、0. 2－5 mm、0. 3－4 mm、0. 4－3 mm、または0. 5－2 mmの間に位置付けられ得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0. 1 mm－5 mm）。基準マークは、クラスターに近い距離に位置付けられ得、ここで、典型的なXおよびY軸の距離は、それぞれ、2515および2514によって示される。幾つかの実施形態では、クラスターと基準マークとの間の距離は、約または少なくとも約0. 001 mm、0. 005 mm、0. 01 mm、0. 02 mm、0. 03 mm、0. 04 mm、0. 05 mm、0. 06 mm、0. 07 mm、0. 08 mm、0. 09 mm、0. 1 mm、0. 2 mm、0. 3 mm、0. 4 mm、0. 5 mm、0. 6 mm、0. 7 mm、0. 8 mm、0. 9 mm、1 mm、1. 2 mm、1. 5 mm、1. 7 mm、2 mm、2. 2 mm、2. 5 mm、2. 7 mm、3 mm、3. 5 mm、4 mm、4. 5 mm、5 mm、5. 5 mm、6 mm、6. 5 mm、または8 mmである。幾つかの実施形態では、クラスターと基準マークとの間の距離は、約または長くて約8 mm、6. 5 mm、6 mm、5. 5 mm、5 mm、4. 5 mm、4 mm、3. 5 mm、3 mm、2. 7 mm、2. 5 mm、2. 2 mm、2 mm、1. 7 mm、1. 5 mm、1. 2 mm、1 mm、0. 9 mm、0. 8 mm、0. 7 mm、0. 6 mm、0. 5 mm、0. 4 mm、0. 3 mm、0. 2 mm、0. 1 mm、0. 09 mm、0. 08 mm、0. 07 mm、0. 06 mm、0. 05 mm、0. 04 mm、0. 03 mm、0. 02 mm、0. 01 mm、0. 005 mm、または0. 001 mmである。クラスターと基準マークとの間の距離は、0. 001－8 mm、0. 01－7 mm、0. 05－6 mm、0. 1－5 mm、0. 5－4 mm、0. 6－3 mm、0. 7－2 mm、または0. 8－1. 7 mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0. 5 mm－2 mm）。

【0193】

図25Eは、図25Dで示される典型的なマイクロ流体デバイスの実質的に平面の基板部の断面を描写する。断面は、11のグルーピングの列を示し、その各々は、グルーピングのクラスターを含み、ここで各グルーピングは、第1チャンネルから伸長する複数の第2チャンネルを含む。2523によって例証されるように、グルーピングの全体長さは、約0. 05 mm乃至約5 mm長であり得る。幾つかの実施形態では、グルーピングの全体長さは、約または少なくとも約0. 05 mm、0. 06 mm、0. 07 mm、0. 08 mm、0. 09 mm、0. 1 mm、0. 2 mm、0. 3 mm、0. 4 mm、0. 5 mm、0. 6 mm、0. 7 mm、0. 8 mm、0. 9 mm、1 mm、1. 2 mm、1. 5 mm、1. 7 mm、2 mm、2. 2 mm、2. 5 mm、2. 7 mm、3 mm、3. 2 mm、3. 5 mm、3. 7 mm、4 mm、4. 2 mm、4. 5 mm、4. 7 mm、または5 mmである。幾つかの実施形態では、グルーピングの全体長さは、約または長くて約5 mm、4. 7 mm、4. 5 mm、4. 2 mm、4 mm、3. 7 mm、3. 5 mm、3. 2 mm、3 mm、2. 7 mm、2. 5 mm、2. 2 mm、2 mm、1. 7 mm、1. 5 mm、1. 2 mm、1

mm、0.9 mm、0.8 mm、0.7 mm、0.6 mm、0.5 mm、0.4 mm、0.3 mm、0.2 mm、0.1 mm、0.09 mm、0.08 mm、0.07 mm、0.06 mm、または0.05 mm、あるいはそれ以下である。グルーピングの全体長さは、0.05-5 mm、0.06-4 mm、0.07-3 mm、0.08-2 mm、0.09-1 mm、0.1-0.9 mm、0.2-0.8 mm、または0.3-0.7 mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.1 mm-0.7 mm）。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスは、マイクロ流体デバイス中のクラスターの典型的なレイアウトを描写する図25Fで例証されるように、ラベルまたはシリアルラベルのための位置を有し得る。距離2603によって例証されるように、ラベルは、基板の縁の近くに位置付けられ得る。幾つかの実施形態では、ラベルは、基板の縁から約0.1 mm乃至約10 mmに位置付けられる。幾つかの実施形態では、ラベルは、基板の縁から、約または少なくとも約0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm、0.4 mm、0.5 mm、0.6 mm、0.7 mm、0.8 mm、0.9 mm、1 mm、1.2 mm、1.4 mm、1.6 mm、1.8 mm、2 mm、2.2 mm、2.4 mm、2.6 mm、2.8 mm、3 mm、3.2 mm、3.4 mm、3.6 mm、3.8 mm、4 mm、4.2 mm、4.4 mm、4.6 mm、4.8 mm、5 mm、5.2 mm、5.4 mm、5.6 mm、5.8 mm、6 mm、6.2 mm、6.4 mm、6.6 mm、6.8 mm、7 mm、7.2 mm、7.4 mm、7.6 mm、7.8 mm、8 mm、8.2 mm、8.4 mm、8.6 mm、8.8 mm、9 mm、または10 mmに位置付けられる。幾つかの実施形態では、ラベルは、基板の縁から、約または長くて約10 mm、9 mm、8.8 mm、8.6 mm、8.4 mm、8.2 mm、8 mm、7.8 mm、7.6 mm、7.4 mm、7.2 mm、7 mm、6.8 mm、6.6 mm、6.4 mm、6.2 mm、6 mm、5.8 mm、5.6 mm、5.4 mm、5.2 mm、5 mm、4.8 mm、4.6 mm、4.4 mm、4.2 mm、4 mm、3.8 mm、3.6 mm、3.4 mm、3.2 mm、3 mm、2.8 mm、2.6 mm、2.4 mm、2.2 mm、2 mm、1.8 mm、1.6 mm、1.4 mm、1.2 mm、1 mm、0.9 mm、0.8 mm、0.7 mm、0.6 mm、0.5 mm、0.4 mm、0.3 mm、0.2 mm、または0.1 mmに位置付けられる。距離は、0.1-10 mm、0.2-9 mm、0.3-8 mm、0.4-7 mm、0.5-6 mm、0.6-5 mm、0.7-4 mm、0.8-3 mm、0.9-2 mm、または1.5 mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.5 mm-2 mm）。ラベルは、2602によって例証されるように、起点から約0.1 mm乃至約20 mmの位置で始まり得る。2601によって例証されるように、ラベルは、約1 mm乃至約32 mmの長さを有し得る。

【0194】

高質量オリゴヌクレオチド合成のための大サイズのビアを有するウェーハ

幾つかの実施形態では、本発明は、表面上のオリゴヌクレオチド合成に対する制御された流路および物質移動経路のための方法およびシステムを提供する。本明細書で提供されるシステムおよび方法の利点は、オリゴヌクレオチド合成の間の、制御された、物質移動経路、化学暴露時間、および洗浄効率のための構造および更にそれらの分布のレベルの改善を可能にすることである。さらに、本明細書に記載される方法およびシステムは、成長しているオリゴヌクレオチドによる排除体積が、成長しているオリゴヌクレオチドに利用可能な又は適した最初に利用可能な体積の50、45、40、35、30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1%以上を、またはそれ以下を占めないほど十分な、成長しているオリゴヌクレオチドに対する体積を提供することなどによって、奏効率の増大を可能にする。さらに、本明細書に記載される方法およびシステムは、80量体乃至100、120、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500量体を超える、またはそれより長いオリゴマーの成長のための十分な構造を可能にする。

【0195】

したがって、本明細書に記載される方法およびシステムは、小さな平行流路の集合体などの、これらの利点を達成するための解決策を提供する。小さなビアなどの構造は、「リボルバーパターン」で見られるものなどの、より小さな構造を供給するために使用され得る（図56のB）。内部表面上に低い表面エネルギー表面を有する構造によって、気体が壁にくっついてしまう（hang up）かもしれない。気泡は、オリゴヌクレオチド合成サイクルまたは遺伝子アセンブリに使用される続く水性工程（aqueous steps）中に流量および流れの均一性を妨げ得る。したがって、オリゴヌクレオチド合成に適応させる構造は、本明細書に別記されるように増大した表面エネルギーを有する表面を含み得る。

10

【0196】

幾つかの実施形態では、本発明の方法およびシステムは、オリゴヌクレオチド合成に対する基板を製造するためのシリコンウェーファーのプロセスを利用する。そのような基板は、インクジェットなどの蒸着装置を介して物質蒸着にアクセス可能な一連の部位を有し得る。本発明の様々な実施形態に従って製造された基板は、それらの平面を通して複数のそのような部位の中で共有される流れ（flood）化学作用工程を支持し得る。様々な実施形態では、デバイスは、水性試薬が大きなレリーフ（relief）に注入される且つプールされることを可能にする（図61）。

【0197】

様々な実施形態では、大きなビアを有するそのようなオリゴヌクレオチド合成デバイスは、標準のシリコン・オン・インシュレーター（SOI）のシリコンウェーハ上で作り出される。オリゴヌクレオチド合成デバイスは、少なくとも又は少なくとも約10マイクロメートル（ μm ）、11 μm 、12 μm 、13 μm 、14 μm 、15 μm 、16 μm 、17 μm 、18 μm 、19 μm 、20 μm 、25 μm 、30 μm 、35 μm 、40 μm 、45 μm 、50 μm 、55 μm 、60 μm 、65 μm 、70 μm 、75 μm 、80 μm 、85 μm 、90 μm 、95 μm 、100 μm 、110 μm 、120 μm 、130 μm 、140 μm 、150 μm 、160 μm 、170 μm 、180 μm 、190 μm 、200 μm 、250 μm 、300 μm 、350 μm 、400 μm 、450 μm 、500 μm 、550 μm 、600 μm 、650 μm 、700 μm 、750 μm 、800 μm 、850 μm 、900 μm 、950 μm 、1000 μm 、またはそれ以上の全幅を有し得る。オリゴヌクレオチド合成デバイスは、長くて又は長くて約1000 μm 、900 μm 、850 μm 、750 μm 、700 μm 、650 μm 、600 μm 、550 μm 、500 μm 、450 μm 、400 μm 、350 μm 、300 μm 、250 μm 、200 μm 、190 μm 、180 μm 、170 μm 、160 μm 、150 μm 、140 μm 、130 μm 、120 μm 、110 μm 、100 μm 、95 μm 、90 μm 、85 μm 、80 μm 、75 μm 、70 μm 、65 μm 、60 μm 、55 μm 、50 μm 、45 μm 、40 μm 、35 μm 、30 μm 、25 μm 、20 μm 、19 μm 、18 μm 、17 μm 、16 μm 、15 μm 、14 μm 、13 μm 、12 μm 、11 μm 、10 μm 、またはそれ以下の全幅を有し得る。オリゴヌクレオチド合成デバイスは、10-1000 μm 、11-950 μm 、12-900 μm 、13-850 μm 、14-800 μm 、15-750 μm 、16-700 μm 、17-650 μm 、18-600 μm 、19-550 μm 、20-500 μm 、25-450 μm 、30-400 μm 、35-350 μm 、40-300 μm 、45-250 μm 、50-200 μm 、55-150 μm 、60-140 μm 、65-130 μm 、70-120 μm 、75-110 μm 、70-100 μm 、75-80 μm 、85-90 μm 、または90-95 μm の間である全幅を有し得る。当業者は、オリゴヌクレオチド合成デバイスの全幅がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば20-80 μm ）。オリゴヌクレオチドデバイスの全幅は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る。それは、ハンドル層およびデバイス層に細分され得る。デバイスのすべてまたは一部は、二酸化ケイ素層で覆われ得る。幾つかの実施形態では、二酸化ケイ素層は、少なくとも又は少なくとも約

20

30

40

50

1 nm、2 nm、3 nm、4 nm、5 nm、6 nm、7 nm、8 nm、9 nm、10 nm、15 nm、20 nm、25 nm、30 nm、35 nm、40 nm、45 nm、50 nm、55 nm、60 nm、65 nm、70 nm、75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、125 nm、150 nm、175 nm、200 nm、300 nm、400 nm、500 nm、1 μ m、1.1 μ m、1.2 μ m、1.3 μ m、1.4 μ m、1.5 μ m、1.6 μ m、1.7 μ m、1.8 μ m、1.9 μ m、2.0 μ m、またはそれ以上の厚さを有し得る。二酸化ケイ素層は、大きくて又は大きくて約2.0 μ m、1.9 μ m、1.8 μ m、1.7 μ m、1.6 μ m、1.5 μ m、1.4 μ m、1.3 μ m、1.2 μ m、1.1 μ m、1.0 μ m、500 nm、400 nm、300 nm、200 nm、175 nm、150 nm、125 nm、100 nm、95 nm、90 nm、85 nm、80 nm、75 nm、70 nm、65 nm、60 nm、55 nm、50 nm、45 nm、40 nm、35 nm、30 nm、25 nm、20 nm、15 nm、10 nm、9 nm、8 nm、7 nm、6 nm、5 nm、4 nm、3 nm、2 nm、1 nm、またはそれ以下の厚さを有し得る。二酸化ケイ素層は、1.0 nm–2.0 μ m、1.1–1.9 μ m、1.2–1.8 nm、1.3–1.7 μ m、1.4–1.6 μ mの間の厚さを有し得る。当業者は、二酸化ケイ素層が、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にある厚さ、例えば、1.5–1.9 μ mを有し得ることを認識するだろう。二酸化ケイ素は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にある厚さを有し得る。

10

【0198】

20

デバイス層は、本明細書に別記されるように、複数の小さな穴などの、オリゴヌクレオチド成長に適した複数の構造を含み得る（図61）。デバイス層は、少なくとも又は少なくとも約1マイクロメートル（ μ m）、2 μ m、3 μ m、4 μ m、5 μ m、6 μ m、7 μ m、8 μ m、9 μ m、10 μ m、11 μ m、12 μ m、13 μ m、14 μ m、15 μ m、16 μ m、17 μ m、18 μ m、19 μ m、20 μ m、25 μ m、30 μ m、35 μ m、40 μ m、45 μ m、50 μ m、55 μ m、60 μ m、65 μ m、70 μ m、75 μ m、80 μ m、85 μ m、90 μ m、95 μ m、100 μ m、200 μ m、300 μ m、400 μ m、500 μ m、またはそれ以上の厚さを有し得る。デバイス層は、大きくて又は大きくて約500 μ m、400 μ m、300 μ m、200 μ m、100 μ m、95 μ m、90 μ m、85 μ m、80 μ m、75 μ m、70 μ m、65 μ m、60 μ m、55 μ m、50 μ m、45 μ m、40 μ m、35 μ m、30 μ m、25 μ m、20 μ m、19 μ m、18 μ m、17 μ m、16 μ m、15 μ m、14 μ m、13 μ m、12 μ m、11 μ m、10 μ m、9 μ m、8 μ m、7 μ m、6 μ m、5 μ m、4 μ m、3 μ m、2 μ m、1 μ m、またはそれ以下の厚さを有し得る。デバイス層は、1–100 μ m、2–95 μ m、3–90 μ m、4–85 μ m、5–80 μ m、6–75 μ m、7–70 μ m、8–65 μ m、9–60 μ m、10–55 μ m、11–50 μ m、12–45 μ m、13–40 μ m、14–35 μ m、15–30 μ m、16–25 μ m、17–20 μ m、18–19 μ mの間に厚さを有し得る。当業者は、デバイス層の厚さがこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば20–60 μ m）。デバイス層の厚さは、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る。ハンドル層及び／又はデバイス層は、深さ特性を含み得る。そのような深さ特性は、深掘り反応性イオンエッチングなどの適切なMEMS技術を使用して製造され得る。一連のエッチングは、所望のデバイス形状を構築するために使用され得る。エッチングの1つは、より長く持続し、絶縁体層を貫通することを可能にされ得る。したがって、デバイスの全幅に及ぶ通路が構築され得る。そのような通路は、実質的に平面の基板などの基板の1つの表面から流体を通すために使用され得る。

30

40

【0199】

幾つかの実施形態では、デバイス層は、デバイス層を貫通する、少なくとも2つから500までの部位、少なくとも2つから約250までの部位、少なくとも2つから約200までの部位、少なくとも2つから約175までの部位、少なくとも2つから約150まで

50

の部位、少なくとも2つから約125までの部位、少なくとも2つから約100までの部位、少なくとも2つから約75までの部位、少なくとも2つから約50までの部位、少なくとも2つから約25までの部位、または少なくとも2つから約250までの部位を有する。幾つかの実施形態では、デバイス層は、少なくとも又は少なくとも約、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、350、400、450、500、またはそれ以上の部位を有する。当業者は、デバイス層を貫通する部位の数がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば75－150部位）。デバイス層は、少なくとも又は少なくとも約2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、11 μm 、12 μm 、13 μm 、14 μm 、15 μm 、16 μm 、17 μm 、18 μm 、19 μm 、20 μm 、25 μm 、30 μm 、35 μm 、40 μm 、45 μm 、50 μm 、55 μm 、60 μm 、65 μm 、70 μm 、75 μm 、80 μm 、85 μm 、90 μm 、95 μm 、100 μm 、またはそれ以上の厚さであり得る。デバイス層は、大きくて又は大きくて約100 μm 、95 μm 、90 μm 、85 μm 、80 μm 、75 μm 、70 μm 、65 μm 、60 μm 、55 μm 、50 μm 、45 μm 、40 μm 、35 μm 、30 μm 、25 μm 、20 μm 、19 μm 、18 μm 、17 μm 、16 μm 、15 μm 、14 μm 、13 μm 、12 μm 、11 μm 、10 μm 、9 μm 、8 μm 、7 μm 、6 μm 、5 μm 、4 μm 、3 μm 、2 μm 、1 μm 、またはそれ以下の厚さであり得る。デバイス層は、1－100 μm 、2－95 μm 、3－90 μm 、4－85 μm 、5－80 μm 、6－75 μm 、7－70 μm 、8－65 μm 、9－60 μm 、10－55 μm 、11－50 μm 、12－45 μm 、13－40 μm 、14－35 μm 、15－30 μm 、16－25 μm 、17－20 μm 、18－19 μm の間である任意の厚さを有することができる。当業者は、デバイス層がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得る厚さを有することができることを認識する（例えば4－100 μm ）。

【0200】

デバイス層の厚さは、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る。ハンドル層は、デバイス層中の特徴部に隣接するウェーハへとエッチングされたより大きな領域を有し得る。ハンドル層は、少なくとも又は少なくとも約10 μm 、11 μm 、12 μm 、13 μm 、14 μm 、15 μm 、16 μm 、17 μm 、18 μm 、19 μm 、20 μm 、25 μm 、30 μm 、35 μm 、40 μm 、45 μm 、50 μm 、55 μm 、60 μm 、65 μm 、70 μm 、75 μm 、80 μm 、85 μm 、90 μm 、95 μm 、100 μm 、110 μm 、120 μm 、130 μm 、140 μm 、150 μm 、160 μm 、170 μm 、180 μm 、190 μm 、200 μm 、250 μm 、300 μm 、350 μm 、400 μm 、450 μm 、500 μm 、550 μm 、600 μm 、650 μm 、700 μm 、750 μm 、800 μm 、850 μm 、900 μm 、950 μm 、1000 μm 、またはそれ以上の厚さを有し得る。ハンドル層は、大きくて又は大きくて約1000 μm 、950 μm 、900 μm 、850 μm 、800 μm 、750 μm 、700 μm 、650 μm 、600 μm 、550 μm 、500 μm 、450 μm 、400 μm 、350 μm 、300 μm 、250 μm 、200 μm 、150 μm 、100 μm 、95 μm 、90 μm 、85 μm 、80 μm 、75 μm 、70 μm 、65 μm 、60 μm 、55 μm 、50 μm 、45 μm 、40 μm 、30 μm 、25 μm 、20 μm 、19 μm 、18 μm 、17 μm 、16 μm 、15 μm 、14 μm 、13 μm 、12 μm 、11 μm 、10 μm 、9 μm 、8 μm 、7 μm 、6 μm 、5 μm 、4 μm 、3 μm 、2 μm 、1 μm 、またはそれ以下の厚さを有し得る。ハンドル層は、10－1000 μm 、11－950 μm 、12－900 μm 、13－850 μm 、14－800 μm 、15－750 μm 、16－700 μm 、17－650 μm 、18－600 μm 、19－550 μm 、20－500 μm 、25－450 μm 、30－400 μm 、35－350 μm 、40－300 μm 、45－250 μm 、50－200 μm 、55－150 μm 、60－140 μm 、65－130 μm 、70－120 μm 、75－110 μm 、70－100 μm 、7

5-80 μm 、85-90 μm 、または90-95 μm の間である任意の厚さを有することができる。当業者は、ハンドル層がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得る厚さを有し得ることを認識する（例えば20-350 μm ）。ハンドル層の厚さは、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にある。

【0201】

ハンドル層におけるエッチングされた領域は、基板に埋め込まれたウェル様の構造を形成し得る。幾つかの実施形態では、ハンドル層内でエッチングされた領域は、少なくとも又は少なくとも約100 μm 、101 μm 、102 μm 、103 μm 、104 μm 、105 μm 、106 μm 、107 μm 、108 μm 、109 μm 、110 μm 、120 μm 、130 μm 、140 μm 、150 μm 、160 μm 、170 μm 、180 μm 、190 μm 、200 μm 、250 μm 、300 μm 、350 μm 、400 μm 、450 μm 、500 μm 、550 μm 、600 μm 、650 μm 、700 μm 、750 μm 、800 μm 、850 μm 、900 μm 、950 μm 、または1000 μm 、あるいはそれ以上の厚さを有し得る。ハンドル層内でエッチングされた領域は、大きくて又は大きくて約1000 μm 、950 μm 、900 μm 、850 μm 、800 μm 、750 μm 、700 μm 、650 μm 、600 μm 、550 μm 、500 μm 、450 μm 、400 μm 、350 μm 、300 μm 、250 μm 、200 μm 、190 μm 、180 μm 、170 μm 、160 μm 、150 μm 、140 μm 、130 μm 、120 μm 、110 μm 、109 μm 、108 μm 、107 μm 、106 μm 、105 μm 、104 μm 、103 μm 、102 μm 、101 μm 、100 μm 、またはそれ以下の任意の厚さを有し得る。ハンドル層内でエッチングされた領域は、100-1000 μm 、101-950 μm 、102-900 μm 、103-850 μm 、104-800 μm 、105-750 μm 、106-700 μm 、107-650 μm 、108-600 μm 、109-550 μm 、110-500 μm 、120-450 μm 、130-400 μm 、140-350 μm 、150-300 μm 、160-250 μm 、170-200 μm 、180-190 μm 、190-180 μm の間である任意の厚さを有し得る。当業者は、ハンドル層がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得る厚さを有し得ることを認識する（例えば200-300 μm ）。

【0202】

ハンドル層内でエッチングされた領域の形状は、矩形であり得るか又は曲線から成り得る。

【0203】

幾つかの実施形態では、ハンドル層内の大きなエッチングされた領域は、オリゴヌクレオチド合成サイクル、及び／又は気体へのオリゴヌクレオチド放出などの、オリゴヌクレオチド放出の間の、気相から液相までの容易な移行を可能にする。

【0204】

高表面積合成部位を有する基板

様々な実施形態では、本明細書に記載される方法およびシステムは、高質量のオリゴヌクレオチドの合成のためのオリゴヌクレオチド合成デバイスに関する。合成は平行して行われ得る。例えば、少なくとも又は少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、1000、10000、50000、100000、またはそれ以上のオリゴヌクレオチドは、平行して合成され得る。平行して合成され得るオリゴヌクレオチドの総数は、2-100000、3-50000、4-10000、5-1000、6-900、7-850、8-800、9-750、10-700、11-650、12-600、13-550、14-500、15-450、16-400、17-350、18-300、19-250、20-200、21-150、22-100、23-50、

24-45、25-40、30-35の間であり得る。当業者は、平行して合成されたオリゴヌクレオチドの総数がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば25-100）。平行して合成されたオリゴヌクレオチドの総数は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る。デバイス内で合成されたオリゴヌクレオチドの総モル質量またはオリゴヌクレオチドの各々のモル質量は、少なくとも又は少なくとも約10、20、30、40、50、100、250、500、750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000の、25000、50000、75000、100000ピコモル、またはそれ以上であり得る。デバイス内のオリゴヌクレオチドの各々の長さまたはその平均長は、少なくとも又は少なくとも約10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、300、400、500のヌクレオチド、またはそれ以上であり得る。デバイス内のオリゴヌクレオチドの各々の長さまたはその平均長は、長くて又は長くて約500、400、300、200、150、100、50、45、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14の、13、12、11、10のヌクレオチド、またはそれ以下であり得る。デバイス内のオリゴヌクレオチドの各々の長さまたはその平均長は、10-500、9-400、11-300、12-200、13-150、14-100、15-50、16-45、17-40、18-35、19-25の間であり得る。当業者は、デバイス内のオリゴヌクレオチドの各々の長さまたはその平均長がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば100-300）。デバイス内のオリゴヌクレオチドの各々の長さまたはその平均長は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る。

【0205】

様々な実施形態では、図62で例証されるように、基板の表面を、上げ特徴部及び／又は下げ特徴部（raised and/or lower features）で構築することによって、高表面積が達成される。上げ特徴部または下げ特徴部は、鋭い又は丸みのある縁を有し得、矩形、円形などの、任意の所望の幾何学的形状の断面（幅）を有し得る。それらは、基板表面の全体またはその一部分に沿ってチャンネルを形成し得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、少なくとも又は少なくとも約1:20、2:20、3:20、4:20、5:20、6:20、10:20、15:20、20:20、20:10、20:5、20:1、またはそれ以上のアスペクト比を有し得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、多くて又は多くて約20:1、20:5、20:10、20:20、20:15、20:10、20:10、6:20、5:20、4:20、3:20、2:20、1:20、またはそれ以下のアスペクト比を有し得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、1:20-20:1、2:20-20:5、3:20-20:10、4-20:20:15、5:20-20:20、6:20-20:20の間であるアスペクト比を有し得る。当業者は、上げ特徴部または下げ特徴部がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得るアスペクト比を有し得ることを認識する（例えば3:20-4:20）。上げ特徴部または下げ特徴部は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあるアスペクト比を有し得る。

【0206】

上げ特徴部または下げ特徴部は、少なくとも又は少なくとも約10ナノメートル（nm）、11nm、12nm、20nm、30nm、100nm、500nm、1000nm、10000nm、100000nm、1000000nm、またはそれ以上の断面を有し得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、少なくとも又は大きくて又は大きくて約1000000nm、1000000nm、10000nm、1000nm、500nm、100nm、30nm、20nm、12nm、11nm、10nm、またはそれ以下の断面を有し得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、10nm-1000000nm、11nm-1000000nm、12nm-10000nm、20nm-1000nm、30nm-500nmの間である断面を有し得る。当業者は、上げ特徴部または下げ特徴部がこれらの値

のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得る断面を有し得ることを認識する（例えば 10 nm－100 nm）。上げ特徴部または下げ特徴部は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にある断面を有し得る。

【0207】

上げ特徴部または下げ特徴部は、少なくとも又は少なくとも約 10 ナノメートル（nm）、11 nm、12 nm、20 nm、30 nm、100 nm、500 nm、1000 nm、10000 nm、100000 nm、1000000 nm、またはそれ以上の高さを有し得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、長くて又は長くて約 1000000 ナノメートル（nm）、100000 nm、10000 nm、1000 nm、500 nm、100 nm、30 nm、20 nm、12 nm、11 nm、10 nm、またはそれ以下の高さを有し得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、10 nm－1000000 nm、11 nm－1000000 nm、12 nm－100000 nm、20 nm－1000 nm、30 nm－500 nm の間である高さを有し得る。当業者は、上げ特徴部または下げ特徴部がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得る高さを有し得ることを認識する（例えば 10 nm－1000 nm）。上げ特徴部または下げ特徴部は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にある高さを有し得る。個々の上げ特徴部または下げ特徴部は、少なくとも又は少なくとも約 5 ナノメートル（nm）、10 nm、11 nm、12 nm、20 nm、30 nm、100 nm、500 nm、1000 nm、10000 nm、100000 nm、1000000 nm、またはそれ以上の距離、隣接する上げ特徴部または下げ特徴部から分離され得る。個々の上げ特徴部または下げ特徴部は、距離によって隣接の高くしているか低下した特徴部から分離されるかもしれない、長くて又は長くて約 1000000 ナノメートル（nm）、100000 nm、10000 nm、1000 nm、500 nm、100 nm、30 nm、20 nm、12 nm、11 nm、10 nm、5 nm、またはそれ以下の距離、隣接する上げ特徴部または下げ特徴部から分離され得る。上げ特徴部または下げ特徴部は、5－1000000 nm、10－1000000 nm、11－100000 nm、12－1000 nm、20－500 nm、30－100 nm の間である高さを有し得る。当業者は、個々の上げ特徴部または下げ特徴部が、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得る距離、隣接する上げ特徴部または下げ特徴部から分離され得ることを認識する（例えば 100－1000 nm）。個々の上げ特徴部または下げ特徴部は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にある距離、隣接する上げ特徴部または下げ特徴部から分離され得る。幾つかの実施形態では、2つの上げ特徴部または下げ特徴部間の距離は、上げ特徴部または下げ特徴部の断面（幅）または平均断面の、少なくとも又は少なくとも約 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0 倍、それ以上である。2つの上げ特徴部または下げ特徴部間の距離は、上げ特徴部または下げ特徴部の断面（幅）または平均断面の、多くて又は多くて約 10.0、5.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1 倍、またはそれ以下である。2つの上げ特徴部または下げ特徴部間の距離は、上げ特徴部または下げ特徴部の断面（幅）または平均断面の、0.1－10、0.2－5.0、1.0－3.0 倍であり得る。当業者は、2つの上げ特徴部または下げ特徴部間の距離が、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内の上げ特徴部または下げ特徴部の断面（幅）または平均断面の、任意の倍数であり得ることを認識する（例えば 5－10 倍）。2つの上げ特徴部または下げ特徴部間の距離は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る。

【0208】

幾つかの実施形態では、上げ特徴部または下げ特徴部の群は、互いに分離される。上げ特徴部または下げ特徴部の群の外周は、異なるタイプの構造上の特徴部または異なる官能化によってマーキングされ得る。上げ特徴部または下げ特徴部の群は、単一のオリゴヌクレオチドの合成に向けられ得る。上げ特徴部または下げ特徴部の群は、断面において、少なくとも又は少なくとも約 10 μ m、11 μ m、12 μ m、13 μ m、14 μ m、15 μ m

m、20 μ m、50 μ m、70 μ m、90 μ m、100 μ m、150 μ m、200 μ m、またはそれより広い領域に及び得る。上げ特徴部または下げ特徴部の群は、断面において、長くて又または長くて約200 μ m、150 μ m、100 μ m、90 μ m、70 μ m、50 μ m、20 μ m、15 μ m、14 μ m、13 μ m、12 μ m、11 μ m、10 μ m、またはそれより狭い領域に及び得る。上げ特徴部または下げ特徴部の群は、断面において、10-200 μ m、11-150 μ m、12-100 μ m、13-90 μ m、14-70 μ m、15-50 μ m、13-20 μ mの間の幅である領域に及び得る。当業者は、上げ特徴部または下げ特徴部の群が、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にある領域に及び得ることを認識する（例えば12-200 μ m）。上げ特徴部または下げ特徴部の群は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る領域に及び得る。

10

【0209】

様々な実施形態では、基板上の上げ特徴部または下げ特徴部は、オリゴヌクレオチド合成に利用可能な総面積を、少なくとも又は少なくとも約1.1、1.2、1.3、1.4、2、5、10、50、100、200、500、1000倍、またはそれ以上増大させる。基板上の上げ特徴部または下げ特徴部は、オリゴヌクレオチド合成に利用可能な総面積を、1.1-1000、1.2-500、1.3-200、1.4-100、2-50、5-10倍増大させる。当業者は、基板上の上げ特徴部または下げ特徴部が、オリゴヌクレオチド合成に利用可能な総面積を、これらの値のいずれかに制約される任意の倍数間で増大させ得ることを認識する（例えば20-80倍）。基板上の上げ特徴部または下げ特徴部は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲内にあり得る因子によってオリゴヌクレオチド合成に利用可能な総面積を増大させる。

20

【0210】

大きなオリゴヌクレオチド合成表面を使用する本発明の方法およびシステムは、長くて又は長くて約20分、15分、14分、13分、12分、11分、10分、1分、40秒、30秒、またはそれ以下ヌクレオチド付加のサイクル時間で、多くのオリゴヌクレオチドの平行合成を可能にする。大きなオリゴヌクレオチド合成表面を使用する本発明の方法およびシステムは、30秒-20分、40秒-10分、1分-10分の間のヌクレオチド付加のサイクル時間で、多くのオリゴヌクレオチドの平行合成を可能にする。当業者は、大きなオリゴヌクレオチド合成表面を使用する本発明の方法およびシステムが、これらの値のいずれかの間のヌクレオチド付加のサイクル時間で、多くのオリゴヌクレオチドの平行合成を可能にすることを認識する（例えば30秒-10分）。大きなオリゴヌクレオチド合成表面を使用する本発明の方法およびシステムは、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲間のヌクレオチド付加のサイクル時間で、多くのオリゴヌクレオチドの平行合成を可能にする。

30

【0211】

基板上で合成された各オリゴヌクレオチドの欠失、挿入、または置換などの個々のタイプのエラーに対する、基板上で合成されたオリゴヌクレオチドの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上に対する、あるいは基板平均に対する全エラー率またはエラー率は、高くて又は高くて約1:100、1:500、1:1000、1:10000、1:20000、1:30000、1:40000、1:50000、1:60000、1:70000、1:80000、1:90000、1:100000、またはそれ以下であり得る。基板上で合成された各オリゴヌクレオチドの欠失、挿入、または置換などの個々のタイプのエラーに対する、基板上で合成されたオリゴヌクレオチドの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上に対する、あるいは基板平均に対する全エラー率またはエラー率は、1:100と1:10000、1:500と1:30000の間であり得る。当業者は、基板上で合成された各オリゴヌクレオチドの欠

40

50

失、挿入、または置換などの個々のタイプのエラーに対する、基板上で合成されたオリゴヌクレオチドの少なくとも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上に対する、あるいは基板平均に対する全エラー率またはエラー率が、これらの値のいずれかの間であり得ることを認識する（例えば1:500と1:10000）。基板上で合成された各オリゴヌクレオチドの欠失、挿入、または置換などの個々のタイプのエラーに対する、基板上で合成されたオリゴヌクレオチドの少なくとも少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上に対する、あるいは基板平均に対する全エラー率またはエラー率は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲間であり得る。

10

【0212】

上に記載されるような高表面積および管理された流れを有する基板を作り出すために、標準のシリコンウェーファースのプロセスが利用され得、化学暴露の迅速な交換を可能にする。オリゴヌクレオチド合成基板は、少なくとも又は少なくとも約20量体、25量体、30量体、50量体、100量体、200量体、250量体、300量体、400量体、500量体を超えるか、またはそれ以上のオリゴマー鎖が、例えば、排除体積効果が原因で、オリゴヌクレオチドが成長するとともに、全体のチャンネルまたは孔の寸法に実質的な影響を与えることなく合成されることを可能にするのに十分な分離によって一連の構造とともに作り出され得る。オリゴヌクレオチド合成基板は、多くて又は多くて約500量体、200量体、100量体、50量体、30量体、25量体、20量体を超える、またはそれ以下のオリゴマー鎖が、例えば、排除体積効果が原因で、オリゴヌクレオチドが成長するとともに、全体のチャンネルまたは孔の寸法に実質的な影響を与えることなく合成されることを可能にするのに十分な分離によって一連の構造とともに作り出され得る。オリゴヌクレオチド合成基板は、少なくとも又は少なくとも約20量体、50量体、75量体、100量体、125量体、150量体、175量体、200量体、250量体、300量体、400量体、500量体、またはそれ以上のオリゴマー鎖が、例えば、排除体積効果が原因で、オリゴヌクレオチドが成長するとともに、全体のチャンネルまたは孔の寸法に実質的な影響を与えることなく合成されることを可能にするのに十分な分離によって一連の構造とともに作り出され得る。当業者は、オリゴヌクレオチド合成基板が、これらの値のいずれかの間（20-300量体、200量体）を超えオリゴマー鎖が、例えば、排除体積効果が原因で、オリゴヌクレオチドが成長するとともに、全体のチャンネルまたは孔の寸法に実質的な影響を与えることなく合成されることを可能にするのに十分な分離によって一連の構造とともに作り出され得ることを認識する。

20

30

【0213】

図62は、一連の構造を有する本発明の実施形態による典型的な基板を示す。特徴部間の距離は、少なくとも又は少なくとも約5nm、10nm、20nm、100nm、1000nm、10000nm、100000nm、1000000nmを超え得るか、またはそれ以上であり得る。特徴部間の距離は、多くて又は多くて約1000000nm、100000nm、10000nm、1000nm、100nm、20nm、10nm、5nmを超え得るか、またはそれ以下であり得る。特徴部間の距離は、5-1000000nm、10-1000000nm、20-10000nm、100-1000nmの間であり得る。当業者は、特徴部の間の距離が、これらの値のいずれかの間であり得ることを認識する（例えば20-1000nm）。特徴部間の距離は、範囲のエンドポイントとして機能する値のいずれかによって定義された任意の範囲間であり得る。一実施形態では、特徴部間の距離は、200nmを超える。特徴部は、時間反応性イオンエッチングプロセスを利用するプロセスなどの、本明細書に別記されるか、さもなければ当該技術分野に既知の任意の適切なMEMSプロセスによって作り出される得る。そのような半導体製造プロセスは、典型的に、200nm、100nm、50nm、40nm、30nm、25nm、20nm、10nm、5nmより小さい、またはそれ以下の特徴サイズを作り出すこと

40

50

ができる。当業者は、200nm未満の特徴サイズが、これらの値のいずれかの間であり得るあることを認識する（例えば20-100nm）。特徴サイズは、範囲のエンドポイントとして機能するこれら値のいずれかによって定義された任意の範囲内であり得る。一実施形態では、一連の40μmの広いポストは、合成に利用可能な表面積の約2倍である30μmの深さでエッチングされる。

【0214】

一連の上げ特徴部または下げ特徴部は、分離され得、それによって、高度に複雑で密なライブラリ生成のためのホスホラミダイト化学作用の物質蒸着を可能にする。分離は、より大きな構造によって、またはオリゴヌクレオチド合成のための能動領域および受動領域を生成する表面の異なる官能化によって達成され得る。代替的に、個々のオリゴヌクレオチドの合成のための位置は、特定条件下の表面に対する切断可能および非切断のオリゴヌクレオチドの付着の領域を作り出すことによって、互いに分離され得る。インクジェットプリンターなどのデバイスは、個々のオリゴヌクレオチド合成位置に試薬を付着させるために使用され得る。異なる官能化はまた、基板表面にわたる疎水性を交互にし、それによって、付着した試薬の水滴（beading）または湿りを引き起こし得る水接触角の効果を作り出すことを達成することができる。より大きな構造を利用することで、隣接するスポットの試薬による飛び散り（splashing）および個々のオリゴヌクレオチド合成位置の相互汚染を減少させることができる。

【0215】

リアクター

別の態様では、一連の筐体が本明細書に記載されている。一連の筐体は、リアクターキャップを含む第1基板および第2基板を含む、複数の分解されたリアクターを含むことができる。幾つかの場合では、少なくとも2つの分解された場所が、各リアクターに包含される。分解されたリアクターは、可剥性シールで分離され得る。リアクターキャップは、第1基板からの第2基板の放出でリアクターの中身を保持し得る。複数の分解されたリアクターは、mm²当たり少なくとも1の密度での任意の適切な密度であり得る。複数のリアクターキャップは、1つの部分でコーティングされ得る。部分は、化学的に不活性な又は化学的に活性な部分であり得る。リアクターキャップ上にコーティングされる部分は、オリゴヌクレオチドの付着を最小限にすることができる部分であり得る。化学部分のタイプは、本明細書にさらに詳しく別記される。

【0216】

幾つかの実施形態では、本明細書に記載されるリアクターキャップは、キャップ要素基板の表面上の上部hが開いた筐体に関連し得る。例えば、リアクターキャップは、基板表面の上部で外に突出するシリンダーに類似し得る。リアクターキャップの内径は、約、または少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、115、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、または500μm、あるいはそれら未満であり得る。リアクターキャップの外径は、約、または少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、115、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、または600μm、あるいはそれら未満であり得る。シリンダーの縁は、約、または少なくとも約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、または400μm、あるいはそれら未満の幅を有することができる。内側で測定されたリアクターキャップの高さは、約、または少なくとも約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、50、60、70、80、90、または100μm、あるいはそれら未満であり得る。図7は、キャップ要素上のリアクターキャッ

プの典型的な実施形態を例証する。

【0217】

縁面などのリアクターキャップ表面のすべて又は一部分は、本明細書でさらに詳しく別記される、さもなければ当該技術分野で既知の適切な表面改質方法を使用して改質され得る。幾つかの場合では、表面不規則性が操作される。化学的な表面の改質および不規則性は、縁の水接触角を調節するように働き得る。類似した表面処理も、シール、例えば両面シールを形成するリアクターキャップの近位にもたらされる基板の表面上に適用され得る。キャピラリーバーストバルブは、本明細書にさらに詳しく別記されるように、2つの表面間で利用され得る。表面処理は、キャピラリーバーストバルブを含むそのようなシールの正確な制御に有用であり得る。

10

【0218】

基板に包含されるリアクターキャップは、当該技術分野で既知の任意の形状または設計であり得る。リアクターキャップは、リアクターの中身を囲むことができる大容量のキャビティを包含し得る。リアクターの中身は、隣接した基板上の複数の分解された場所から生じ得る。リアクターキャップは、円形、楕円形、矩形、または不規則形状であり得る。リアクターキャップは、鋭い角を有し得る。幾つかの場合では、リアクターキャップは、任意の大気泡の保持を最小限にする且つリアクターの中身のより優れた混合を促進するために、丸い角を有し得る。リアクターキャップは、リアクターの中身の移動または混合の制御を許可する任意の形状、組織、または設計で作られ得る。リアクターキャップは、本出願に記載されるような基板上の分解された場所と類似した設計であり得る。幾つかの実施形態では、リアクターキャップは、大気泡を作り出さずことなく液体が容易に流れ込むことを可能にする形状であり得る。幾つかの実施形態では、リアクターキャップは、約、または少なくとも約1マイクロメートル(μm)、2 μm 、3 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、11 μm 、12 μm 、13 μm 、14 μm 、15 μm 、16 μm 、17 μm 、18 μm 、19 μm 、20 μm 、25 μm 、30 μm 、35 μm 、40 μm 、45 μm 、50 μm 、55 μm 、60 μm 、65 μm 、70 μm 、75 μm 、80 μm 、85 μm 、90 μm 、95 μm 、100 μm 、110 μm 、120 μm 、130 μm 、140 μm 、150 μm 、160 μm 、170 μm 、180 μm 、190 μm 、200 μm 、250 μm 、300 μm 、350 μm 、400 μm 、450 μm 、500 μm 、550 μm 、600 μm 、650 μm 、700 μm 、または750 μm 、あるいはそれら未満であり得る直径である、円形を有することができる。リアクターキャップは、単分散のサイズ分布を有し得、すなわち、ミクロ構造はすべて、およそ同じ幅、高さ、及び／又は長さを有し得る。代替的に、リアクターキャップは、限られた数の形状及び／又はサイズを有し得、例えば、リアクターキャップは、各々が単分散のサイズを有している、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、またはそれ以上の異なる形状で表わされ得る。幾つかの実施形態では、同じ形状は、複数の単分散のサイズ分布、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、またはそれ以上の単分散のサイズ分布で繰り返され得る。単分散の分布は、モードの25%、20%、15%、10%、5%、3%、2%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%未満またはそれより小さな標準偏差を有するユニモジュラー分布で反映され得る。

20

30

40

【0219】

リアクターキャップの各々は、本明細書に記載される本発明の様々な実施形態に従って反応を行うための任意の適切な面積を有することができる。幾つかの場合では、複数のリアクターキャップは、基板の表面積全体の任意の適切なパーセンテージを占めることができる。幾つかの実施形態では、複数のリアクターキャップは、基板の表面の、約、または少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、あるいはそれら未満を占めることができる

50

。幾つかの実施形態では、リアクターキャップは、総面積の、約、または少なくとも約 0.1 mm^2 、 0.15 mm^2 、 0.2 mm^2 、 0.25 mm^2 、 0.3 mm^2 、 0.35 mm^2 、 0.4 mm^2 、 0.45 mm^2 、 0.5 mm^2 、 0.55 mm^2 、 0.6 mm^2 、 0.65 mm^2 、 0.7 mm^2 、 0.75 mm^2 、 0.8 mm^2 、 0.85 mm^2 、 0.9 mm^2 、 0.95 mm^2 、 1 mm^2 、 2 mm^2 、 3 mm^2 、 4 mm^2 、 5 mm^2 、 6 mm^2 、 7 mm^2 、 8 mm^2 、 9 mm^2 、 10 mm^2 、 11 mm^2 、 12 mm^2 、 13 mm^2 、 14 mm^2 、 15 mm^2 、 16 mm^2 、 17 mm^2 、 18 mm^2 、 19 mm^2 、 20 mm^2 、 25 mm^2 、 30 mm^2 、 35 mm^2 、 40 mm^2 、 50 mm^2 、 75 mm^2 、 100 mm^2 、 200 mm^2 、 300 mm^2 、 400 mm^2 、 500 mm^2 、 600 mm^2 、 700 mm^2 、 800 mm^2 、 900 mm^2 、 1000 mm^2 、 1500 mm^2 、 2000 mm^2 、 3000 mm^2 、 4000 mm^2 、 5000 mm^2 、 7500 mm^2 、 10000 mm^2 、 15000 mm^2 、 20000 mm^2 、 25000 mm^2 、 30000 mm^2 、 35000 mm^2 、 40000 mm^2 、 50000 mm^2 、 60000 mm^2 、 70000 mm^2 、 80000 mm^2 、 90000 mm^2 、 100000 mm^2 、 200000 mm^2 、 300000 mm^2 、またはそれら以上を占めることができる。分解されたリアクター、分解された場所、およびリアクターキャップは、任意の密度であり得る。幾つかの実施形態では、表面は、 1 mm^2 当たり、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約50、約75、約100、約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1500、約2000、約3000、約4000、約5000、約6000、約7000、約8000、約9000、約10000、約20000、約40000、約60000、約80000、約100000、または約500000の部位の分解されたリアクター、分解された場所、またはリアクターキャップの密度を有することができる。幾つかの実施形態では、表面は、 1 mm^2 当たり、少なくとも約50、少なくとも約75、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも1000、少なくとも約1500、少なくとも約2000、少なくとも約3000、少なくとも約4000、少なくとも約5000、少なくとも約6000、少なくとも約7000、少なくとも約8000、少なくとも約9000、少なくとも約10000、少なくとも約20000、少なくとも約40000、少なくとも約60000、少なくとも約80000、少なくとも約100000、または少なくとも約500000の部位の分解されたリアクター、分解された場所、またはリアクターキャップの密度を有する。

【0220】

隣接した基板表面上の分解された場所の密度を考慮に入れて、リアクターキャップの密度、分布、および形状は、各リアクター中の好ましい数の分解された場所と並んで構成されるように設計され得る。複数の分解されたリアクターの各々は、多くの分解された場所を含むことができる。例えば、限定することなく、各リアクターは、約、または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、あるいはそれら未満の分解された場所を含むことができる。幾つかの場合では、各リアクターは、少なくとも100の分解された場所を含むことができる。

【0221】

分解された場所またはリアクターキャップは、一連の複数の筐体内に構成されて、支持体表面へと作られるマイクロ構造上に存在することができる。マイクロ構造は、本明細書の他の段落に記載されるように、当該技術分野に既知の方法によって製造され得る。マイクロ構造は、2Dまたは3Dで任意の形状および設計を有しているマイクロチャネルまたはマイクロウェルであり得る。マイクロ構造（例えば、マイクロチャネルまたはマイクロウェル）

は、互いに流体連通している少なくとも2つのチャンネルを含み得る。例えば、マイクロチャンネルは、相互接続され得、それによって、流体が真空吸引などの与えられた条件で浸み込むことを可能にする。個々のマイクロ構造は、個々に対処可能且つ分解可能であり得、その結果、2つの分解された場所の中身は、混合されずに維持される。マイクロチャンネルは、任意の組み合わせで流体連通において少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10のチャンネルを含むことができ、流体の制御された混合、連通、または分布を可能にする。マイクロチャンネルの接続性は、マイクロ流体設計の分野で知られる弁システムによって制御され得る。例えば、基板の流体制御層は、基板の流体連通層の上部に直接作られ得る。異なるマイクロ流体の弁システムは、Marc A. Unger et al, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography," Science, vol. 288, no. 7, pp. 113-116, April 2000、および David C. Duffy et al., "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," Analytical Chemistry, vol. 70, no. 23, pp. 4974-4984, December 1998に記載される。

【0222】

分解された場所またはリアクターキャップは、一連の複数の筐体内に構成されて、マイクロチャンネルまたはチャンネルなどのマイクロ構造上に存在することができる。隣接した基板表面上の分解された場所のマイクロチャンネルの寸法および設計は、本明細書に別記される。マイクロ構造は、流体連通している少なくとも2つのチャンネルを含み得、ここで、少なくとも2つのチャンネルは、異なる幅を有する少なくとも2つのチャンネルを含むことができる。幾つかの場合では、少なくとも2つのチャンネルは、同じ幅、あるいは同じ又は異なる幅の組み合わせを有することができる。例えば、限定することなく、チャンネルまたはマイクロチャンネルの幅は、約、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100 μm 、あるいはそれら未満であり得る。チャンネルまたはマイクロチャンネルは、分解された場所の流体連通を可能にする任意の長さを有することができる。少なくとも1つのチャンネルは、約、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100 μm 、あるいはそれら未満の長さ、または外周に対する表面積の比率を含むことができる。少なくとも1つのチャンネルは、円形である断面積を有することでき、約、または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、55、50、45、60、65、70、75、80、85、90、95、または100 μm 、あるいはそれら未満の断面積の半径を含むことができる。

【0223】

本明細書に記載されるように、一連の筐体は、リアクターキャップを含む第1基板および第2基板を含む、複数の分解されたリアクターを含むことができる。分解されたリアクターは、第1基板上に第2基板を組み合わせる又はキャップすることによって形成され得、ともに密封され得る。シールは、両面または片面であり得る。好ましい実施形態では、シールは、両面または可剥性である。分解されたリアクターを密封すると、増幅または他の下流の反応に必要なとされるオリゴヌクレオチドまたは試薬などのリアクターの中身は、分解されたリアクター内で放出され、混合され得る。分解されたリアクターは、可剥性シールで分離され得、ここで、リアクターキャップは、第1基板からの第2基板の放出でリアクターの中身のすべて又は一部分を保持することができる。第1基板および第2基板の

材料に依存して、シールは、第1基板と第2基板との間の両面シールを可能にするように別に設計され得、分解されたリアクターを形成する。シールを形成するとき、第1基板および第2基板は、直接、物理的に接触することができる。幾つかの場合では、第1基板および第2基板は、それぞれの表面が、ナノリアクターのまわりで又は2つのナノリアクター間ですぐに、直接物理的に接触することなく近接することができる。シールは、キャピラリーバーストバルブを含むことができる。シールを形成するときの第1基板と第2基板との間の距離は、約、または少なくとも約0.1 μ m、0.2 μ m、0.3 μ m、0.4 μ m、0.5 μ m、0.6 μ m、0.7 μ m、0.8 μ m、0.9 μ m、1 μ m、1.1 μ m、1.2 μ m、1.3 μ m、1.4 μ m、1.5 μ m、1.6 μ m、1.7 μ m、1.8 μ m、1.9 μ m、2 μ m、2.5 μ m、3 μ m、3.5 μ m、4 μ m、4.5 μ m、5 μ m、5.5 μ m、6 μ m、6.5 μ m、7 μ m、7.5 μ m、8 μ m、8.5 μ m、9 μ m、9.5 μ m、または10 μ m、あるいはそれら未満であり得る。シールは、キャピラリーバーストバルブを含むことができる。

10

【0224】

幾つかの場合では、分解された筐体は、圧力放出孔を含み得る。圧力放出孔は、第1基板と第2基板の分離を可能にし得る。圧力放出システムを備えるマイクロ流体システムの設計は、欧州特許出願第EP 1987275 A1号に記載され、その全体が、引用によって本明細書に組み込まれる。

【0225】

基板上の複数の分解されたリアクターキャップは、本明細書に記載されるか、さもなければ当該技術分野に既知の任意の方法（例えば、微細加工プロセス）によって製造され得る。本明細書に開示される複数のリアクターキャップまたはリアクターで基板を製造するのに使用され得る微細加工プロセスは、限定しないが、リソグラフィ；湿式化学、乾燥、およびフォトリソ除去などの、エッチング技術；マイクロ流体装置／ラボオンチップ、光学的MEMS（MOEMSとも呼ばれる）、RF MEMS、Power MEMS、およびBioMEMS技術を含む微小電気機械（MEMS）技術、および深掘り反応性イオンエッチング（DRIE）；微小電気機械（NEMS）技術；シリコンの熱酸化；電気めっきおよび無電解めっき；ホウ素、リン、ヒ素、およびアンチモン拡散などの拡散プロセス；イオン注入；蒸発（フィラメント、電子ビーム、閃光、およびシャドーイングおよびステップカバレッジ）などフィルム付着、スパッタリング、化学蒸着（CVD）、エピタキシー（気相、液相、および分子線）、電気めっき、スクリーン印刷、およびラミネーションなどの、膜蒸着、を含む。一般に、Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988)；Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990)；Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998；Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997)を参照。

20

30

40

【0226】

一態様では、複数の分解されたリアクターキャップを有する基板は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して製造され得る。幾つかの実施形態では、複数のリアクターキャップを有する基板の材料は、二酸化ケイ素などの半導体基材であり得る。基板の材料はまた、GaAs、チョクラルスキー法を介して生成された半導体などの、他の化合物III-VまたはII-VI材料であり得る（Grovenor, C. (1989). Microelectronic Materials. CRC Press. pp. 11

50

3-123)。該材料は、その表面に接する溶液に対する反応性オキシド(OH)基の被覆を示す、硬い、平らな表面を提示することができる。これらのオキシド基は、続くシリル化プロセスのための付着点になり得る。代替的に、酸化ケイ素のエッチング特性を模倣する親油性および疎水性の表面物質が、付着され得る。窒化ケイ素および炭化ケイ素の表面も、本発明の様々な実施形態に従って、適切な基板の製造のために利用され得る。

【0227】

幾つかの実施形態では、保護層が基板上に付着され得、これは反応性オキシド基を有するかもしれないし、有さないかもしれない。保護層は、窒化ケイ素(Si₃N₄)またはポリイミドを含むことができる。幾つかの例では、フォト平版工程は、分解された場所が保護層に生ずるところで、領域を定義するために使用することができる。

10

【0228】

複数のリアクターキャップを有する基板を生成する方法は、基板で始めることができる。基板(例えば、シリコン)は、限定されないが、金属などの導電層を含む、その上に配される任意数の層を有することができる。導電層は、幾つかの例においてアルミニウムであり得る。幾つかの場合では、基板は、保護層(例えば、窒化チタン)を有することができる。幾つかの場合では、基板は、高い表面エネルギーを有する化学層を有することができる。層は、例えば、化学蒸着(CVD)、原子層蒸着(ALD)、プラズマ増強CVD(PECVD)、プラズマ増強ALD(PEALD)、金属有機CVD(MOCVD)、熱線CVD(HWCVD)、潜在性CVD(iCVD)、改質CVD(MCVD)、蒸着(OVD)、外部蒸着(VAD)および物理蒸着(例えば、スパッタ蒸着、蒸着)などの

20

【0229】

幾つかの場合では、酸化物層が、基板上に付着される。幾つかの例では、酸化物層は、二酸化ケイ素を含むことができる。二酸化ケイ素は、テトラエチルオルトシリケート(TEOS)、高密度プラズマ(HDP)、またはその任意の組み合わせを使用して付着され得る。

【0230】

幾つかの例では、二酸化ケイ素は、低温技術を使用して付着され得る。幾つかの場合では、プロセスは、酸化ケイ素の低温化学蒸着である。温度は、一般に、チップ上の予め存在する金属が損傷されないほど十分に低い。蒸着温度は、約50℃、約100℃、約150℃、約200℃、約250℃、約300℃、約350℃などであり得る。幾つかの実施形態では、蒸着温度は、約50℃、約100℃、約150℃、約200℃、約250℃、約300℃、または約300℃などを下回る。蒸着は、任意の適切な圧力で行われ得る。幾つかの例では、蒸着プロセスは、RFプラズマエネルギーを使用する。

30

【0231】

幾つかの場合では、酸化物は、乾燥した熱成長酸化物の手順(例えば、1,000℃近い又は超える温度を使用するもの)によって付着される。幾つかの場合では、酸化ケイ素は、湿り蒸気プロセスによって生成される。

【0232】

二酸化ケイ素は、本発明の他の段落に記載されるような所望量のオリゴヌクレオチドまたは他の下流の反応を増幅するのに適切であり得る、付着される且つ混合されるべき大量の試薬を含む、複数の分解されたリアクターを形成することができる、リアクターキャップの形成に適した厚さにまで付着され得る。

40

【0233】

二酸化ケイ素は、任意の適切な厚さにまで付着され得る。幾つかの実施形態では、二酸化ケイ素は、約、または少なくとも約1ナノメートル(nm)、約2nm、約3nm、約4nm、約5nm、約6nm、約7nm、約8nm、約9nm、約10nm、約15nm、約20nm、約25nm、約30nm、約35nm、約40nm、約45nm、約50nm、約55nm、約60nm、約65nm、約70nm、約75nm、約80nm、約85nm、約90nm、約95nm、約100nm、約125nm、約150nm、約1

50

75 nm、約200 nm、約300 nm、約400 nm、または約500 nm、あるいはそれら未満の厚さである。

【0234】

リアクターキャップは、当該技術分野で既知の様々な製造技術を使用して、二酸化ケイ素基板において作り出され得る。そのような技術は、半導体製造技術を含み得る。幾つかの場合では、リアクターキャップは、半導体産業に使用されるものなどのフォトリソグラフィ技術を使用して作り出される。例えば、フォトレジスト（例えば、電磁放射線にさらされたときに特性を変化させる物質）は、任意の適切な厚さにまで（例えば、ウェーハのスピンコーティングによって）二酸化ケイ素上にコーティングされ得る。フォトレジストを含む基板は、電磁放射線源にさらされ得る。分解された場所の領域を定義するべく、フォトレジストの部分からの放射を遮蔽するために、マスクが使用され得る。フォトレジストは、ネガ型レジストまたはポジ型レジスト（例えば、リアクターキャップの領域は、電磁放射線にさらされ得るか、またはリアクターキャップ以外の領域は、マスクによって定義されるように電磁放射線にさらされ得る）であり得る。リアクターキャップが作り出されるべき位置に重なる領域は、二酸化ケイ素層においてリアクターキャップの位置および分布に対応するパターンを定義するために、電磁放射線にさらされる。フォトレジストは、リアクターキャップに対応するパターンを定義するマスクを通して電磁放射線にさらされ得る。次に、フォトレジストのさらされた部分は、例えば、洗浄操作（例えば脱イオン水）の助力により除去することができる。その後、マスクの除去された部分は、基板をエッチングする且つリアクターキャップのパターンを二酸化ケイ素層へと移すために、化学エッチング液にさらされ得る。エッチング液は、例えば、硫酸（ H_2SO_4 ）などの酸を含むことができる。二酸化ケイ素層は、異方性の方法でエッチングされ得る。本明細書に記載される方法を使用して、DRIEなどの高い異方性の製造方法は、基板の表面に対して垂直から約 $\pm 3^\circ$ 、 2° 、 1° 、 0.5° 、 0.1° 未満、またはそれ以下逸脱する側壁を有する基板上で又は基板内で、リアクターキャップなどのマイクロ構造を作り出すために適用され得る。約10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.1 μm 未満またはそれ以下のアンダーカット値が達成され得、結果的に、高度に均一なマイクロ構造がもたらされる。

【0235】

リアクターキャップが形成される領域で二酸化ケイ素をエッチングするために、様々なエッチング手順が使用され得る。エッチングは、等方性エッチング（すなわち、一方向に沿ったエッチング速度は、垂直方向に沿ったエッチング速度に等しい）、または異方性エッチング（すなわち、一方向に沿ったエッチング速度は、垂直方向に沿ったエッチング速度未満である）、あるいはその変形であり得る。エッチング技術は、KOH、TMAH、EDPなどの湿ったシリコンエッチングおよび乾燥したプラズマエッチング（例えばDRIE）の両方であり得る。その両方は、相互接続によってマイクロ構造のウェーハをエッチングするために使用されてもよい。

【0236】

幾つかの場合では、異方性エッチングは、リアクターキャップの容積の大部分を除去する。約60%、約70%、約80%、約90%、または約95%を含む、任意の適切なパーセンテージのリアクターキャップの容積が除去され得る。幾つかの場合では、物質の少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、異方性エッチングで除去される。幾つかの場合では、物質の多くて約60%、多くて約70%、多くて約80%、多くて約90%、または多くて約95%が、異方性エッチングで除去される。幾つかの実施形態では、異方性エッチングは、基板を通してすべての二酸化ケイ素物質を除去するわけではない。等方性エッチングは、幾つかの例において、基板を通るすべての二酸化ケイ素物質を除去し、穴を作り出す。

【0237】

幾つかの場合では、リアクターキャップは、リアクターキャップを定義するためにフォトリソグラフィ工程を使用してエッチングされ、ハイブリッドのドライーウェットのエ

ッチングが続く。フォトリソグラフィ工程は、二酸化ケイ素をフォトレジストでコーティングすること、およびフォトレジストをリアクターキャップを定義するパターンを有するマスク（またはレチクル）に通して電磁放射線にさらすことを含むことができる。幾つかの例では、ハイブリッドドライウェットのエッチングは、（a）フォトリソグラフィ工程によってフォトレジストにおいて定義されたリアクターキャップの領域中で大量の二酸化ケイ素を除去するためにドライエッチングすること、（b）基板を洗浄こと、および（c）リアクターキャップの領域において基板から残りの二酸化ケイ素を除去するためにウェットエッチングすること、を含む。

【0238】

基板は、プラズマエッチングの化学作用、または例えば、 H_2O_2 、 O_2 、 O_3 、 H_2SO_4 、または H_2O_2 と H_2SO_4 の組み合わせなどの、それらの組み合わせなどの、酸化剤への露出の助力によって洗浄され得る。洗浄は、残りのポリマーを除去すること、ウェットエッチングを遮断することができる物質を除去すること、またはその組み合わせを含むことができる。幾つかの例では、洗浄は、プラズマ洗浄である。洗浄工程は、任意の適切な期間（例えば15乃至20秒）進めることができる。一例では、洗浄は、100 mT、200 W、20 G、20 O_2 の設定を有するApplied Materials eMAX-CTマシンによって20秒間行うことができる。

【0239】

ドライエッチングは、略垂直に（例えば基板の方に）エッチングするが、水平または略水平（例えば、基板と平行）にはエッチングしない異方性エッチングであり得る。幾つかの例では、ドライエッチングは、 CF_4 、 CHF_3 、 C_2F_6 、 C_3F_6 、またはその任意の組み合わせなどの、フッ素ベースのエッチング液でエッチングすることを含む。一例では、エッチングは、100 mT、1000 W、20 G、および50 CF_4 の設定を有するApplied Materials eMAX-CTマシンによって400秒間行われる。本明細書に記載される基板は、深掘り反応性イオンエッチング（DRIE）によってエッチングされ得る。DRIEは、典型的に高アスペクト比で、ウェーハ／基板において深部に浸透する、急傾斜の穴およびトレンチを作り出すために使用される高度に異方性のエッチングプロセスである。基板は、高速のDRIEのための2つの主要な技術：低温およびボッシュを使用してエッチングされ得る。DRIEを適用する方法は、米国特許第5501893号に記載され、これは引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0240】

ウェットエッチングは、あらゆる方向の物質を除去する等方性エッチングであり得る。幾つかの例では、ウェットエッチングは、フォトレジストをアンダーカットする。フォトレジストのアンダーカットは、フォトレジストを後の工程でより除去し易くすることができる（例えばフォトレジスト「リフトオフ」）。一実施形態では、ウェットエッチングは、緩衝化酸化物エッチング（BOE）である。幾つかの場合では、湿った酸化物エッチングが、エッチング速度を遅くするために（例えば、フッ化アンモニウムで）緩衝化されるフッ化水素酸塩基によって室温で行われる。エッチング速度は、エッチングされているフィルムおよびHF及び／又は NH_4F の特定濃度に依存し得る。酸化物層を完全に除去するのに必要とされるエッチング時間は、典型的には、経験的に決定される。一例では、エッチングは、15：1のBOE（緩衝化酸化物エッチング）により22℃で行われる。

【0241】

二酸化ケイ素層は、下位の材料層までエッチングされ得る。例えば、二酸化ケイ素層は、窒化チタン層までエッチングされ得る。

【0242】

一態様では、複数のリアクターキャップを有する基板を調製するための方法は、（a）分解された場所を定義するためにフォトリソグラフィ工程、（b）フォトリソグラフィ工程によって定義されたリアクターキャップの領域において大量の二酸化ケイ素を除去するためのドライエッチング、および（c）リアクターキャップの領域において基板から

残りの二酸化ケイ素を除去するためのウェットエッチングを使用して、リアクターキャップのキャビティを、コーティングされた二酸化ケイ素層を含むシリコン基板などの基板へとエッチングする工程を含む。幾つかの場合では、該方法は、残りのポリマーを除去する工程、ウェットエッチングを遮断することができる物質を除去する工程、またはその組み合わせをさらに含む。該方法は、プラズマ洗浄工程を含むことができる。

【0243】

幾つかの実施形態では、フォトレジストは、幾つかの場合において、フォトリソグラフィ工程またはハイブリッドのドライーウェットのエッチングに従って、二酸化ケイ素から除去されない。金属を、後の工程で二酸化ケイ素層の上部表面上ではなく、選択的にリアクターキャップへと配向するために、フォトレジストが残され得る。幾つかの場合では、基板は、金属（例えば、アルミニウム）でコーティングされ、ウェットエッチングは、金属上の特定の成分、例えば金属を腐食から保護するもの（例えば、窒化チタン（TiN））を除去しない。しかしながら、幾つかの場合において、フォトレジスト層は、化学機械平坦化（CMP）の助力などで除去され得る。

【0244】

典型的なナノリアクターは、図26A-Dにおいて様々な図で示される。このナノリアクターは、ナノリアクターのベースから個々に持ち上げられた108のウェルを含む。ナノリアクターの断面は、図26Aで示される。ナノリアクターのデバイス図は、図26Bおよび図26Cで示される。ナノリアクターのハンドル図は、図26Dで示される。ナノリアクターは、複数の特徴部において液体を受ける且つ保持するように構成され得る。図26A-Eのナノリアクターは、任意数の108のウェルにおいて液体を保持するように設計される。ナノリアクターは、図25A-Gに例証されるものなどの、基板と接触せられ得る及び／又は並べられ得る。ナノリアクターのウェルは、図26A-Eに示される構成に限定されず、任意の構成での任意数のウェルが、ナノリアクター内に配され得る。幾つかの実施形態では、ナノリアクターのウェルは、基板構成と並ぶ構成で配される。2701によって表わされるように、ナノリアクターの高さは、約または少なくとも約0.1mm、0.2mm、0.3mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.7mm、0.8mm、0.9mm、1mm、1.5mm、2mm、2.5mm、3mm、3.5mm、4mm、4.5mm、5mm、5.5mm、6mm、6.5mm、7mm、7.5mm、8mm、8.5mm、9mm、9.5mm、または10mmであり得る、幾つかの実施形態では、ナノリアクターの高さは、約または長くて約10mm、9.5mm、9mm、8.5mm、8mm、7.5mm、7mm、6.5mm、6mm、5.5mm、5mm、4.5mm、4mm、3.5mm、3mm、2.5mm、2mm、1.5mm、1mm、0.9mm、0.8mm、0.7mm、0.6mm、0.5mm、0.4mm、0.3mm、0.2mm、または0.1mm、あるいはそれ以下であり得る。幾つかの実施形態では、ナノリアクターの高さは、0.1-10mm、0.2-9mm、0.3-8mm、0.4-7mm、0.5-6mm、0.6-5mm、0.7-4mm、0.8-3mm、または0.9-2mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.2mm-0.8mm）。2702によって表わされるように、ナノリアクターのウェルの高さは、約または少なくとも約0.1mm、0.2mm、0.3mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.7mm、0.8mm、0.9mm、1mm、1.5mm、2mm、2.5mm、3mm、3.5mm、4mm、4.5mm、5mm、5.5mm、6mm、6.5mm、7mm、7.5mm、8mm、8.5mm、9mm、9.5mm、または10mmであり得る。幾つかの実施形態では、ナノリアクターのウェルの高さは、約または長くて約10mm、9.5mm、9mm、8.5mm、8mm、7.5mm、7mm、6.5mm、6mm、5.5mm、5mm、4.5mm、4mm、3.5mm、3mm、2.5mm、2mm、1.5mm、1mm、0.9mm、0.8mm、0.7mm、0.6mm、0.5mm、0.4mm、0.3mm、0.2mm、または0.1mm、あるいはそれ以下であり得る。幾つかの実施形態では、ナノリアクターのウェルの高さは、0.1-10mm、0.2

10

20

30

40

50

− 9 mm、0. 3 − 8 mm、0. 4 − 7 mm、0. 5 − 6 mm、0. 6 − 5 mm、0. 7 − 4 mm、0. 8 − 3 mm、または0. 9 − 2 mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0. 1 mm − 0. 6 mm）。

【0245】

図26Bは、0, 0 (X, Y) 軸によって示される参照の起点を含み、ここで、典型的なナノリアクターの左上角が図示される。幾つかの実施形態では、2703によって表わされるナノリアクターの幅は、起点から測定すると、一寸法に沿って約5 mm乃至約150 mmである。幾つかの実施形態では、2704によって表わされるナノリアクターの幅は、起点から測定すると、別寸法に沿って約5 mm乃至約150 mmである。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのナノリアクターの幅は、約5 mm乃至約125 mm、約5 mm乃至約100 mm、約5 mm乃至約75 mm、約5 mm乃至約50 mm、約5 mm乃至約25 mm、約25 mm乃至約150 mm、約50 mm乃至約150 mm、約75 mm乃至約150 mm、約100 mm乃至約150 mm、または約125 mm乃至約150 mmである。当業者は、幅がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば5 − 25 mm）。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのナノリアクターの幅は、約または少なくとも約5 mm、10 mm、15 mm、20 mm、25 mm、30 mm、40 mm、50 mm、60 mm、70 mm、80 mm、90 mm、100 mm、110 mm、120 mm、130 mm、140 mm、または150 mmである。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのナノリアクターの幅は、約または長くて約150 mm、140 mm、130 mm、120 mm、110 mm、100 mm、90 mm、80 mm、70 mm、60 mm、50 mm、50 mm、40 mm、30 mm、25 mm、20 mm、15 mm、10 mm、または5 mm、あるいはそれ以下である。

【0246】

図26Bで示されるナノリアクターは、108のウェルを含む。ウェルは、任意の構成で配され得る。図26Bでは、ウェルは、正方形を形成する列で配される。配置にかかわらず、ウェルは、XまたはY軸上で測定されるように、起点から約0. 1 mm乃至約149 mmの距離で始まり、起点から約1 mm乃至約150 mmの距離で終了し得る。長さ2706および2705は、それぞれ、起点からのXおよびY軸上のウェルの中心の最も遠い距離を表わす。長さ2710および2709は、それぞれ、起点からのXおよびY軸上のウェルの中心の最も近い距離を表わす。幾つかの実施形態では、起点からの任意の寸法でのウェルの中心の最も遠い距離は、約または少なくとも約1 mm、5 mm、10 mm、15 mm、20 mm、25 mm、30 mm、40 mm、50 mm、60 mm、70 mm、80 mm、90 mm、100 mm、110 mm、120 mm、130 mm、140 mm、または150 mmである。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのウェルの中心の最も遠い距離は、約または長くて約150 mm、140 mm、130 mm、120 mm、110 mm、100 mm、90 mm、80 mm、70 mm、60 mm、50 mm、50 mm、40 mm、30 mm、25 mm、20 mm、15 mm、10 mm、5 mm、1 mm、またはそれ以下である。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのウェルの中心の最も遠い距離は、約5 mm乃至約125 mm、約5 mm乃至約100 mm、約5 mm乃至約75 mm、約5 mm乃至約50 mm、約5 mm乃至約25 mm、約25 mm乃至約150 mm、約50 mm乃至約150 mm、約75 mm乃至約150 mm、約100 mm乃至約150 mm、または約125 mm乃至約150 mmである。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば5 − 25 mm）。幾つかの実施形態では、起点からの任意の寸法でのウェルの中心の最も近い距離は、約または少なくとも約0. 1 mm、0. 2 mm、0. 3 mm、0. 4 mm、0. 5 mm、0. 6 mm、0. 7 mm、0. 8 mm、0. 9 mm、1 mm、2 mm、3 mm、4 mm、5 mm、10 mm、15 mm、20 mm、25 mm、30 mm、40 mm、50 mm、60 mm、70 mm、80 mm、90 mm、100 mm、110 mm、120 mm、130 mm、140 mm、または149 mmである、幾つかの実施形態では、任意の寸法でのウェルの中心の最

も近い距離は、約または長くて約149mm、140mm、130mm、120mm、110mm、100mm、90mm、80mm、70mm、60mm、50mm、50mm、40mm、30mm、25mm、20mm、15mm、10mm、5mm、4mm、3mm、2mm、1mm、0.9mm、0.8mm、0.7mm、0.6mm、0.5mm、0.4mm、0.3mm、0.2mm、0.1mm、またはそれ以下である。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのウェルの中心の最も近い距離は、約0.1mm乃至約125mm、約0.5mm乃至約100mm、約0.5mm乃至約75mm、約0.5mm乃至約50mm、約0.5mm乃至約25mm、約1mm乃至約50mm、約1mm乃至約40mm、約1mm乃至約30mm、約1mm乃至約20mm、または約1mm乃至約5mmである。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.1mm－5mm）。

10

【0247】

ナノリアクターのウェルは、ナノリアクターの縁からの任意の距離に位置付けられ得る。ナノリアクターのウェルと縁との間の典型的な距離は、2707および2708によって示される。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのナノリアクターのウェルの中心と縁との間の距離は、約または少なくとも約0.1mm、0.2mm、0.3mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.7mm、0.8mm、0.9mm、1mm、2mm、3mm、4mm、5mm、10mm、15mm、20mm、25mm、30mm、40mm、50mm、60mm、70mm、80mm、90mm、100mm、110mm、120mm、130mm、140mm、または149mmである。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのナノリアクターのウェルの中心と縁との間の距離は、約または長くて約149mm、140mm、130mm、120mm、110mm、100mm、90mm、80mm、70mm、60mm、50mm、50mm、40mm、30mm、25mm、20mm、15mm、10mm、5mm、4mm、3mm、2mm、1mm、0.9mm、0.8mm、0.7mm、0.6mm、0.5mm、0.4mm、0.3mm、0.2mm、0.1mm、またはそれ以下である。幾つかの実施形態では、任意の寸法でのナノリアクターのウェルの中心と縁との間の距離は、約0.1mm乃至約125mm、約0.5mm乃至約100mm、約0.5mm乃至約75mm、約0.5mm乃至約50mm、約0.5mm乃至約25mm、約1mm乃至約50mm、約1mm乃至約40mm、約1mm乃至約30mm、約1mm乃至約20mm、または約1mm乃至約5mmである。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0.1mm－5mm）。

20

30

【0248】

幾つかの実施形態では、ウェルは、2つのウェル間に繰り返される距離が存在するように配される。2711および2712によって示されるように、2つのウェル間の距離は、約0.3mm乃至約9mm離れているかもしれない。幾つかの実施形態では、2つのウェル間の距離は、約または少なくとも約0.3mm、0.4mm、0.5mm、0.6mm、0.7mm、0.8mm、0.9mm、1mm、1.2mm、1.4mm、1.6mm、1.8mm、2mm、2.2mm、2.4mm、2.6mm、2.8mm、3mm、3.2mm、3.4mm、3.6mm、3.8mm、4mm、4.2mm、4.4mm、4.6mm、4.8mm、5mm、5.2mm、5.4mm、5.6mm、5.8mm、6mm、6.2mm、6.4mm、6.6mm、6.8mm、7mm、7.2mm、7.4mm、7.6mm、7.8mm、8mm、8.2mm、8.4mm、8.6mm、8.8mm、または9mmである。幾つかの実施形態では、2つのウェル間の距離は、約または長くて約9mm、8.8mm、8.6mm、8.4mm、8.2mm、8mm、7.8mm、7.6mm、7.4mm、7.2mm、7mm、6.8mm、6.6mm、6.4mm、6.2mm、6mm、5.8mm、5.6mm、5.4mm、5.2mm、5mm、4.8mm、4.6mm、4.4mm、4.2mm、4mm、3.8mm、3.6mm、3.4mm、3.2mm、3mm、2.8mm、2.6mm、2.4mm、2.2mm、2mm、1.8mm、1.6mm、1.4mm、1.2mm、1mm、0.9mm、0

40

50

． 8 mm、0． 7 mm、0． 6 mm、0． 5 mm、0． 4 mm、または0． 3 mmである。2つのウェル間の距離は、0． 3－9 mm、0． 4－8 mm、0． 5－7 mm、0． 6－6 mm、0． 7－5 mm、0． 7－4 mm、0． 8－3 mm、または0． 9－2 mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0． 8 mm－2 mm）。

【0249】

幾つかの実施形態では、2721によって示されるような、ウェルの内部の断面は、約または少なくとも約0． 3 mm、0． 4 mm、0． 5 mm、0． 6 mm、0． 7 mm、0． 8 mm、0． 9 mm、1 mm、1． 2 mm、1． 4 mm、1． 6 mm、1． 8 mm、2 mm、2． 2 mm、2． 4 mm、2． 6 mm、2． 8 mm、3 mm、3． 2 mm、3． 4 mm、3． 6 mm、3． 8 mm、4 mm、4． 2 mm、4． 4 mm、4． 6 mm、4． 8 mm、5 mm、5． 2 mm、5． 4 mm、5． 6 mm、5． 8 mm、6 mm、6． 2 mm、6． 4 mm、6． 6 mm、6． 8 mm、7 mm、7． 2 mm、7． 4 mm、7． 6 mm、7． 8 mm、8 mm、8． 2 mm、8． 4 mm、8． 6 mm、8． 8 mm、または9 mmである。幾つかの実施形態では、ウェルの内部の断面は、約または長くて約9 mm、8． 8 mm、8． 6 mm、8． 4 mm、8． 2 mm、8 mm、7． 8 mm、7． 6 mm、7． 4 mm、7． 2 mm、7 mm、6． 8 mm、6． 6 mm、6． 4 mm、6． 2 mm、6 mm、5． 8 mm、5． 6 mm、5． 4 mm、5． 2 mm、5 mm、4． 8 mm、4． 6 mm、4． 4 mm、4． 2 mm、4 mm、3． 8 mm、3． 6 mm、3． 4 mm、3． 2 mm、3 mm、2． 8 mm、2． 6 mm、2． 4 mm、2． 2 mm、2 mm、1． 8 mm、1． 6 mm、1． 4 mm、1． 2 mm、1 mm、0． 9 mm、0． 8 mm、0． 7 mm、0． 6 mm、0． 5 mm、0． 4 mm、または0． 3 mmである。ウェルの内部の断面は、0． 3－9 mm、0． 4－8 mm、0． 5－7 mm、0． 6－6 mm、0． 7－5 mm、0． 7－4 mm、0． 8－3 mm、または0． 9－2 mmの間の範囲であり得る。当業者は、断面がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0． 8 mm－2 mm）。幾つかの実施形態では、2720によって示されるような、ウェルの縁を含む、ウェルの断面は、約または少なくとも約0． 3 mm、0． 4 mm、0． 5 mm、0． 6 mm、0． 7 mm、0． 8 mm、0． 9 mm、1 mm、1． 2 mm、1． 4 mm、1． 6 mm、1． 8 mm、2 mm、2． 2 mm、2． 4 mm、2． 6 mm、2． 8 mm、3 mm、3． 2 mm、3． 4 mm、3． 6 mm、3． 8 mm、4 mm、4． 2 mm、4． 4 mm、4． 6 mm、4． 8 mm、5 mm、5． 2 mm、5． 4 mm、5． 6 mm、5． 8 mm、6 mm、6． 2 mm、6． 4 mm、6． 6 mm、6． 8 mm、7 mm、7． 2 mm、7． 4 mm、7． 6 mm、7． 8 mm、8 mm、8． 2 mm、8． 4 mm、8． 6 mm、8． 8 mm、または9 mmである。幾つかの実施形態では、ウェルの縁を含む、ウェルの断面は、約または長くて約9 mm、8． 8 mm、8． 6 mm、8． 4 mm、8． 2 mm、8 mm、7． 8 mm、7． 6 mm、7． 4 mm、7． 2 mm、7 mm、6． 8 mm、6． 6 mm、6． 4 mm、6． 2 mm、6 mm、5． 8 mm、5． 6 mm、5． 4 mm、5． 2 mm、5 mm、4． 8 mm、4． 6 mm、4． 4 mm、4． 2 mm、4 mm、3． 8 mm、3． 6 mm、3． 4 mm、3． 2 mm、3 mm、2． 8 mm、2． 6 mm、2． 4 mm、2． 2 mm、2 mm、1． 8 mm、1． 6 mm、1． 4 mm、1． 2 mm、1 mm、0． 9 mm、0． 8 mm、0． 7 mm、0． 6 mm、0． 5 mm、0． 4 mm、または0． 3 mmである。ウェルの縁を含む、ウェルの断面は、0． 3－9 mm、0． 4－8 mm、0． 5－7 mm、0． 6－6 mm、0． 7－5 mm、0． 7－4 mm、0． 8－3 mm、または0． 9－2 mmの間の範囲であり得る。当業者は、断面がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0． 8 mm－2 mm）。

【0250】

ナノリアクターは、限定されないが、約2から約250の間の任意の数を含む、任意数のウェルを含み得る。幾つかの実施形態では、ウェルの数は、約2乃至約225のウェル、約2乃至約200のウェル、約2乃至約175のウェル、約2乃至約150のウェル、

10

20

30

40

50

約 2 乃至約 1 2 5 のウェル、約 2 乃至約 1 0 0 のウェル、約 2 乃至約 7 5 のウェル、約 2 乃至約 5 0 のウェル、約 2 乃至約 2 5 のウェル、約 2 5 乃至約 2 5 0 のウェル、約 5 0 乃至約 2 5 0 のウェル、約 7 5 乃至約 2 5 0 のウェル、約 1 0 0 乃至約 2 5 0 のウェル、約 1 2 5 乃至約 2 5 0 のウェル、約 1 5 0 乃至約 2 5 0 のウェル、約 1 7 5 乃至約 2 5 0 のウェル、約 2 0 0 乃至約 2 5 0 のウェル、または約 2 2 5 乃至約 2 5 0 のウェルを含む。当業者は、ウェル数がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば 2 5 - 1 2 5）。

【0 2 5 1】

基準マークは、システムの他の構成要素、例えばマイクロ流体デバイスまたはマイクロ流体デバイスの構成要素とのナノリアクターのアラインメントを促進するために、本明細書に記載されるナノリアクター上に置かれ得る。本発明のナノリアクターは、1つ以上の基準マーク、例えば 2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の基準マークを有し得る。図 2 5 B で示されるナノリアクターのデバイス図は、デバイスをシステムの他の構成要素と並べるのに有用な 3 つの基準マークを含む。基準マークは、ナノリアクター内の任意の位置に位置付けられ得る。2 7 1 6 および 2 7 1 7 によって示されるように、基準マークは、起点の近くに位置付けられ得、ここで、基準マークは、どのクラスターよりも起点に接近している。幾つかの実施形態では、基準マークは、2 7 1 3 によって示されるように、ナノリアクターの縁の近くに位置付けられ、ここで、縁からの距離は、2 7 1 4 および 2 7 1 5 によって示される。基準マークは、ナノリアクターの縁から約 0 . 1 mm から約 1 0 mm に位置付けられ得る。幾つかの実施形態では、基準マークは、ナノリアクターの縁から、約または少なくとも約 0 . 1 mm、0 . 2 mm、0 . 3 mm、0 . 4 mm、0 . 5 mm、0 . 6 mm、0 . 7 mm、0 . 8 mm、0 . 9 mm、1 mm、1 . 2 mm、1 . 4 mm、1 . 6 mm、1 . 8 mm、2 mm、2 . 2 mm、2 . 4 mm、2 . 6 mm、2 . 8 mm、3 mm、3 . 2 mm、3 . 4 mm、3 . 6 mm、3 . 8 mm、4 mm、4 . 2 mm、4 . 4 mm、4 . 6 mm、4 . 8 mm、5 mm、5 . 2 mm、5 . 4 mm、5 . 6 mm、5 . 8 mm、6 mm、6 . 2 mm、6 . 4 mm、6 . 6 mm、6 . 8 mm、7 mm、7 . 2 mm、7 . 4 mm、7 . 6 mm、7 . 8 mm、8 mm、8 . 2 mm、8 . 4 mm、8 . 6 mm、8 . 8 mm、9 mm、または 1 0 mm に位置付けられる。幾つかの実施形態では、基準マークは、ナノリアクターの縁から、約または長くて約 1 0 mm、9 mm、8 . 8 mm、8 . 6 mm、8 . 4 mm、8 . 2 mm、8 mm、7 . 8 mm、7 . 6 mm、7 . 4 mm、7 . 2 mm、7 mm、6 . 8 mm、6 . 6 mm、6 . 4 mm、6 . 2 mm、6 mm、5 . 8 mm、5 . 6 mm、5 . 4 mm、5 . 2 mm、5 mm、4 . 8 mm、4 . 6 mm、4 . 4 mm、4 . 2 mm、4 mm、3 . 8 mm、3 . 6 mm、3 . 4 mm、3 . 2 mm、3 mm、2 . 8 mm、2 . 6 mm、2 . 4 mm、2 . 2 mm、2 mm、1 . 8 mm、1 . 6 mm、1 . 4 mm、1 . 2 mm、1 mm、0 . 9 mm、0 . 8 mm、0 . 7 mm、0 . 6 mm、0 . 5 mm、0 . 4 mm、0 . 3 mm、0 . 2 mm、または 0 . 1 mm に位置付けられる。基準マークは、ナノリアクターの縁から、0 . 1 - 1 0 mm、0 . 2 - 9 mm、0 . 3 - 8 mm、0 . 4 - 7 mm、0 . 5 - 6 mm、0 . 1 - 6 mm、0 . 2 - 5 mm、0 . 3 - 4 mm、0 . 4 - 3 mm、または 0 . 5 - 2 mm の間に位置付けられ得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば 0 . 1 mm - 5 mm）。基準マークは、ウェルに近い距離に位置付けられ得、ここで、典型的な X および Y 軸の距離は、それぞれ、2 7 1 9 および 2 7 1 8 によって示される。幾つかの実施形態では、ウェルと基準マークとの間の距離は、約または少なくとも約 0 . 0 0 1 mm、0 . 0 0 5 mm、0 . 0 1 mm、0 . 0 2 mm、0 . 0 3 mm、0 . 0 4 mm、0 . 0 5 mm、0 . 0 6 mm、0 . 0 7 mm、0 . 0 8 mm、0 . 0 9 mm、0 . 1 mm、0 . 2 mm、0 . 3 mm、0 . 4 mm、0 . 5 mm、0 . 6 mm、0 . 7 mm、0 . 8 mm、0 . 9 mm、1 mm、1 . 2 mm、1 . 5 mm、1 . 7 mm、2 mm、2 . 2 mm、2 . 5 mm、2 . 7 mm、3 mm、3 . 5 mm、4 mm、4 . 5 mm、5 mm、5 . 5 mm、6 mm、6 . 5 mm、または 8 mm である。幾つかの実施形態では、ウェルと基準マークとの間の距離は、約または長くて約 8 mm、6

10

20

30

40

50

． 5 mm、6 mm、5． 5 mm、5 mm、4． 5 mm、4 mm、3． 5 mm、3 mm、2． 7 mm、2． 5 mm、2． 2 mm、2 mm、1． 7 mm、1． 5 mm、1． 2 mm、1 mm、0． 9 mm、0． 8 mm、0． 7 mm、0． 6 mm、0． 5 mm、0． 4 mm、0． 3 mm、0． 2 mm、0． 1 mm、0． 0 9 mm、0． 0 8 mm、0． 0 7 mm、0． 0 6 mm、0． 0 5 mm、0． 0 4 mm、0． 0 3 mm、0． 0 2 mm、0． 0 1 mm、0． 0 0 5 mm、または0． 0 0 1 mmである。ウェルと基準マークとの間の距離は、0． 0 0 1－8 mm、0． 0 1－7 mm、0． 0 5－6 mm、0． 1－5 mm、0． 5－4 mm、0． 6－3 mm、0． 7－2 mm、または0． 8－1． 7 mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば0． 5 mm－2 mm）。

10

【0 2 5 2】

図2 6 Dで示されるナノリアクターのハンドル図は、システムの他の構成要素により機器を並べるのに役立つ4つの基準マークを含む。基準マークはナノリアクター内の任意の位置に位置し得る。基準マークHの詳細な図に2 7 2 2および2 7 2 3により示されるように、基準マークはナノリアクターの角の近くでハンドル側面に位置し得る。基準マークはナノリアクターの角から約0． 1 mm乃至約1 0 mmに位置し得る。幾つかの実施形態において、基準マークは、ナノリアクターの角から、約または少なくとも約、0． 1 mm、0． 2 mm、0． 3 mm、0． 4 mm、0． 5 mm、0． 6 mm、0． 7 mm、0． 8 mm、0． 9 mm、1 mm、1． 2 mm、1． 4 mm、1． 6 mm、1． 8 mm、2 mm、2． 2 mm、2． 4 mm、2． 6 mm、2． 8 mm、3 mm、3． 2 mm、3． 4 mm、3． 6 mm、3． 8 mm、4 mm、4． 2 mm、4． 4 mm、4． 6 mm、4． 8 mm、5 mm、5． 2 mm、5． 4 mm、5． 6 mm、5． 8 mm、6 mm、6． 2 mm、6． 4 mm、6． 6 mm、6． 8 mm、7 mm、7． 2 mm、7． 4 mm、7． 6 mm、7． 8 mm、8 mm、8． 2 mm、8． 4 mm、8． 6 mm、8． 8 mm、9 mmまたは1 0 mmに位置する。幾つかの実施形態において、基準マークは、ナノリアクターの角から、約または最大で約、1 0 mm、9 mm、8． 8 mm、8． 6 mm、8． 4 mm、8． 2 mm、8 mm、7． 8 mm、7． 6 mm、7． 4 mm、7． 2 mm、7 mm、6． 8 mm、6． 6 mm、6． 4 mm、6． 2 mm、6 mm、5． 8 mm、5． 6 mm、5． 4 mm、5． 2 mm、5 mm、4． 8 mm、4． 6 mm、4． 4 mm、4． 2 mm、4 mm、3． 8 mm、3． 6 mm、3． 4 mm、3． 2 mm、3 mm、2． 8 mm、2． 6 mm、2． 4 mm、2． 2 mm、2 mm、1． 8 mm、1． 6 mm、1． 4 mm、1． 2 mm、1 mm、0． 9 mm、0． 8 mm、0． 7 mm、0． 6 mm、0． 5 mm、0． 4 mm、0． 3 mm、0． 2 mmまたは0． 1 mmに位置する。基準マークは、ナノリアクターの角から0． 1－1 0 mm、0． 2－9 mm、0． 3－8 mm、0． 4－7 mm、0． 5－6 mm、0． 1－6 mm、0． 2－5 mm、0． 3－4 mm、0． 4－3 mmまたは0． 5－2 mmに位置し得る。当業者は、距離が任意のこれらの値（例えば0． 1 mm－5 mm）による任意の範囲内であり得る、ということを確認している。基準マークは機能に適した任意の幅を有し得る。幾つかの実施形態において、2 7 2 4および2 7 2 5によって例証されるように、基準マークの幅は、約または少なくとも約、0． 1 mm、0． 2 mm、0． 3 mm、0． 4 mm、0． 5 mm、0． 6 mm、0． 7 mm、0． 8 mm、0． 9 mm、1 mm、1． 2 mm、1． 4 mm、1． 6 mm、1． 8 mm、2 mm、2． 2 mm、2． 4 mm²、6 mm²、8 mm³ mm、3． 2 mm、3． 4 mm、3． 6 mm、3． 8 mm、4 mm、4． 2 mm、4． 4 mm、4． 6 mm、4． 8 mm、5 mm、5． 2 mm、5． 4 mm、5． 6 mm、5． 8 mm、6 mm、6． 2 mm、6． 4 mm、6． 6 mm、6． 8 mm、7 mm、7． 2 mm、7． 4 mm、7． 6 mm、7． 8 mm、8 mm、8． 2 mm、8． 4 mm、8． 6 mm、8． 8 mm、9 mm、または1 0 mmである。幾つかの実施形態において、基準マークの幅は、約または最大で約、1 0 mm、9 mm、8． 8 mm、8． 6 mm、8． 4 mm、8． 2 mm、8 mm、7． 8 mm、7． 6 mm、7． 4 mm、7． 2 mm、7 mm、6． 8 mm、6． 6 mm、6． 4 mm、6． 2 mm、6 mm、5． 8 mm、5． 6 mm、5． 4 mm、5． 2 mm、5 mm、4． 8 mm、4． 6 mm

20

30

40

50

m、4.4 mm、4.2 mm、4 mm、3.8 mm、3.6 mm、3.4 mm、3.2 mm、3 mm、2.8 mm、2.6 mm、2.4 mm、2.2 mm、2 mm、1.8 mm、1.6 mm、1.4 mm、1.2 mm、1 mm、0.9 mm、0.8 mm、0.7 mm、0.6 mm、0.5 mm、0.4 mm、0.3 mm、0.2 mmまたは0.1 mmである。基準マークの幅は、0.1-10 mm、0.2-9 mm、0.3-8 mm、0.4-7 mm、0.5-6 mm、0.1-6 mm、0.2-5 mm、0.3-4 mm、0.4-3 mmまたは0.5-2 mmの範囲であってもよい。当業者は、幅が任意のこれらの値（例えば0.1 mm-5 mm）により結び付けられる任意の範囲内であり得る、ということを認識している。2726によって示されるように、基準マークの断面は任意の適切なサイズでありうる。幾つかの実施形態において、基準マークの断面は、約または少なくとも約、0.001 mm、0.002 mm、0.004 mm、0.006 mm、0.008 mm、0.01 mm、0.012 mm、0.014 mm、0.016 mm、0.018 mm、0.02 mm、0.025 mm、0.03 mm、0.035 mm、0.04 mm、0.045 mm、0.05 mm、0.055 mm、0.06 mm、0.065 mm、0.07 mm、0.075 mm、0.08 mm、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm、0.4 mm、または0.5 mmである。幾つかの実施形態において、基準マークの断面は、約または最大で約、0.5 mm、0.4 mm、0.3 mm、0.2 mm、0.1 mm、0.08 mm、0.075 mm、0.07 mm、0.065 mm、0.06 mm、0.055 mm、0.05 mm、0.045 mm、0.04 mm、0.035 mm、0.03 mm、0.025 mm、0.02 mm、0.018 mm、0.016 mm、0.014 mm、0.012 mm、0.01 mm、0.008 mm、0.006 mm、0.004 mm、0.002 mm、0.001 mm、またはそれ未満である。基準マークの断面は、0.001-0.5 mm、0.004-0.4 mm、0.008-0.3 mm、0.01-0.2 mm、0.015-0.1 mm、0.018-0.1 mm、または0.02-0.05 mmの間の範囲であり得る。当業者は、断面が任意のこれらの値（例えば0.02 mm-0.1 mm）により結び付けられる任意の範囲内であり得る、ということを認識している。

【0253】

いくつかの実施形態において、ナノリアクターは、ナノリアクターのウェルのレイアウトの一例を示す図26Eに例示されるように、ラベルまたはシリアルラベルの位置を有し得る。幾つかの実施形態において、ラベルは、シリアルナンバーである。距離2728および2727によって例証されるように、ラベルはナノリアクターの端部の近くに位置し得る。幾つかの実施形態において、ラベルの任意の部分は、ナノリアクターの端部から約0.1 mm乃至約10 mmに位置する。幾つかの実施形態において、ラベルの任意の部分は、ナノリアクターの端部から、約または少なくとも約、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm、0.4 mm、0.5 mm、0.6 mm、0.7 mm、0.8 mm、0.9 mm、1 mm、1.2 mm、1.4 mm、1.6 mm、1.8 mm、2 mm、2.2 mm、2.4 mm²、6 mm²、8 mm³ mm、3.2 mm、3.4 mm、3.6 mm、3.8 mm、4 mm、4.2 mm、4.4 mm、4.6 mm、4.8 mm、5 mm、5.2 mm、5.4 mm、5.6 mm、5.8 mm、6 mm、6.2 mm、6.4 mm、6.6 mm、6.8 mm、7 mm、7.2 mm、7.4 mm、7.6 mm、7.8 mm、8 mm、8.2 mm、8.4 mm、8.6 mm、8.8 mm、9 mmまたは10 mmに位置している。幾つかの実施形態では、ラベルの任意の部分は、ナノリアクターの端部から、約または最大で約、10 mm、9 mm、8.8 mm、8.6 mm、8.4 mm、8.2 mm、8 mm、7.8 mm、7.6 mm、7.4 mm、7.2 mm、7 mm、6.8 mm、6.6 mm、6.4 mm、6.2 mm、6 mm、5.8 mm、5.6 mm、5.4 mm、5.2 mm、5 mm、4.8 mm、4.6 mm、4.4 mm、4.2 mm、4 mm、3.8 mm、3.6 mm、3.4 mm、3.2 mm、3 mm、2.8 mm、2.6 mm、2.4 mm、2.2 mm、2 mm、1.8 mm、1.6 mm、1.4 mm、1.2 mm、1 mm、0.9 mm、0.8 mm、0.7 mm、0.6 mm、0.5 mm、0.4 mm、0.3 mm、0.2 mm、または0.1 mmに位置している。距離は、0.1-10 mm、0.2-9 mm、

10

20

30

40

50

0.3-8mm、0.4-7mm、0.5-6mm、0.6-5mm、0.7-4mm、0.8-3mm、0.9-2mmまたは1.5mmの間の範囲であり得る。当業者は、距離が任意のこれらの値（例えば0.5-2mm）による任意の範囲内であり得る、ということ認識している。ラベルは、2726によって例証されるように、約1mmから約25mmまで含む任意の長さを有し得る。幾つかの実施形態において、ラベルの長さは、約または少なくとも約、1mm、5mm、10mm、15mm、20mm、25mm、30mm、40mm、50mm、60mm、70mm、80mm、90mm、100mm、110mm、120mm、130mm、140mmまたは150mmである。幾つかの実施形態において、ラベルの長さは、約または少なくとも約、150mm、140mm、130mm、120mm、110mm、100mm、90mm、80mm、70mm、60mm、50mm、50mm、40mm、30mm、25mm、20mm、15mm、10mm、5mm、1mmまたはそれ未満である。幾つかの実施形態において、ラベルの長さは、約または少なくとも約、5mmから約125mm、約5mmから約100mmまで、約5mmから約75mmまで、約5mmから約50mmまで、約5mmから約25mmまで、約25mmから約150mmまで、約50mmから約150mmまで、約75mmから約150mmまで、約100mmから約150mmまで、または約125mmから約150mmまでである。当業者は、長さが任意のこれらの値（例えば5-25mm）による任意の範囲内であり得る、ということ認識している。

【0254】

材料

基板、固体担体または微細構造またはリアクターは、その中に本明細書に記載されている様々な材料（本明細書に記載されている本発明の方法および組成物に適している）から生成され得る。特定の実施形態において、本発明を包含する基板／固体担体を生成する材料は、オリゴヌクレオチドの低レベルの結合を示す。いくつかの状態において、可視光および／またはUV光に対して透明である材料が使用され得る。十分に伝導性の材料、例えば、本明細書に記載されている基板／固形分のすべてまたは一部分にわたって均一の電場を形成し得るもの、が利用され得る。幾つかの実施形態において、こうした材料は電気接地（electric ground）に接続され得る。幾つかの場合において、基板または固体担体は、熱伝導性または熱絶縁性であり得る。材料は、一連のオリゴヌクレオチド合成反応など化学的または生化学的な反応を支援するために、熱耐性および化学耐性であり得る。可撓性材料について、対象の材料は、次のものを含み得る：ナイロン、修飾および非修飾の、ニトロセルロース、ポリプロピレンなど。剛性材について、対象の特定の材料は次のものを含む：ガラス；石英ガラス；シリコン、プラスチック（例えばポリテトラフルオロエチレン）、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、およびその混合など；金属（例えば金、白金など）。基板、固体担体またはリアクターは、シリコン、ポリスチレン、アガロース、デキストラン、セルロース酸ポリマー、ポリアクリルアミド、ポリジメチルシロキサン（PDMS）およびからガラスから成る群から選択される材料から生成され得る。基板／固体担体またはマイクロ構造、そのリアクターは、本明細書中にリストされる材料の組み合わせ、または当該技術分野で既知の他の適切な材料により生成され得る。

【0255】

表面の修飾

様々な実施形態において、表面の修飾は、基板表面または基板表面の選択された部位または領域の、一以上の化学的および／又は物理的な性質を変化させるためのアディティブ法またはサブトラクティブ法によって、化学的および／又は物理的な変更のために利用される。例えば、表面修飾は、（1）表面の湿潤性（wetting properties）を変化させる工程、（2）表面を官能化する工程、すなわち、表面官能基を提供し、修飾し、または置換する工程、（3）表面を脱官能化する工程、すなわち、表面官能基を除去する工程、（4）その他に、表面の化学成分を、例えばエッチングを介して変更する工程、（5）表面の粗さを増加させるか低下させる工程、（6）表面上のコーティング、例

えば、表面の湿潤性とは異なる湿潤性を示すコーティングを提供する工程、及び／又は（7）表面上に微粒子を蓄積させる工程を含み得る。

【0256】

基板表面、または、オリゴヌクレオチドあるいは他の部分が蓄積される分解された場所
は、滑らか又は実質的に平面であり得、窪みまたは隆起などの異常を有し得る。表面は、
所望の方法で表面の特性を修飾するのに役立つ化合物の一以上の異なる層で修飾され得る。
対象の層のこうした修飾は次のものを含んでいる：金属、金属酸化物、ポリマー、小さ
な有機分子などの無機および有機の層。対象のポリマー層は、次のもの層を含む：ペプチ
ド、タンパク質、核酸またはそのミメティック（例えばペプチド核酸など）；多糖類、リン
脂質、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリ尿素、ポリアミド、ポリ
エチレンアミン、ポリアリーレン硫化物（polyarylene sulfides）、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセタート（polyacetates）など、また
は、本明細書に記載されているか、その他に当該技術分野で既知の他の適切な化合物、
ここで、ポリマーは、ヘテロまたはホモポリマーであってもよく、それに取り付けられる
別個の機能性部分（例えば、コンジュゲート）があってもなくてもよい。固体担体の基板
またはコーティングの表面改質の他の材料および方法、米国特許第6,773,888号
および米国特許出願公開第2007/0054127号、それらは本明細書中に引用によ
って全体に組み入れられる。

10

【0257】

分解された場所は、固体担体の表面エネルギーを増大するか縮小することができる部分
により官能化され得る。部分は、化学的に不活性か、または代替的に、所望の化学反応を
支援するのに適した部分であり得る。表面の、表面エネルギー、または疎水性は、表面上
に付けるためのオリゴヌクレオチドの親和性を決定し得る。基板を調製する方法は：（a）
二酸化ケイ素を含む表面を有する基板を提供する工程；および（b）本明細書に記載さ
れるか、そうでなければ、その他に当該技術分野で既知の適切なシリル化剤（例えば有機
官能性の（有機官能性）アルコキシシラン分子）を用いて表面をシリル化する工程、を含
む。幾つかの場合において、有機官能性のアルコキシシラン分子は、ジメチルクロロオ
クトデシル（オクトデシル）ーシラン、メチルジクロロオクトデシルーシラン、トリク
ロロオクトデシルーシラン、トリメチルーオクトデシルーシラン、トリエチルーオクト
デシルーシランまたはその任意の組み合わせであり得る。

20

30

【0258】

基板の表面は、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、低い表面エネルギーを有
するように調整されよいされてもよい。表面エネルギーを低下させると、オリゴヌクレオ
チドが表面に付着するのを促進し得る。表面は、表面エネルギーを低減し得る分子の部分
の共有結合を可能にするように官能化され得、その結果、湿潤性（wettability）が低減され得る。
幾つかの実施形態において、表面の官能化は、表面エネルギーおよび湿潤性の増大を可能にする。

【0259】

幾つかの実施形態において、基板の表面は、典型的には基板の表面上に存在する反応性
の親水性部分を介して、基板表面にシラン結合するのに有効な反応条件下で、シランの混
合物を含む誘導体化組成物と接触する。シラン化は、一般的に、有機官能性のアルコキシ
シラン分子と自己集合を介して表面を被覆するために使用することができる。多様なシラ
ン官能化試薬が、当該技術分野で現在知られているように、例えば表面エネルギーを低下
または増大させるように、さらに使用され得る。有機官能性のアルコキシシランは、その
有機官能基に応じて分類される。シロキサン官能化試薬の非限定的な例としては、アミン
が中間の官能化を必要としない（シロキサンアミノアルキル、（ジボランで官能化し、過
酸化水素によってアルコールを酸化する、シリル化表面）、ジオール（ジヒドロキシアル
キル）シロキサン（シリル化表面、及びジオール加水分解）ヒドロキシシロキサン、グリ
シドキシシラン（3-グリシドキシプロピルジメチルエトキシシラン、グリシドキシトリ
メトキシシラン）、メルカプトシラン（3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン、3

40

50

ー 4 エポキシシクロヘキシルエチルトリメトキシシランまたは 3-メルカプトメチル-ジメトキシシラン)、ピシクロヘプテニルトリクロシラン、ブチルデアルデヒド-トリメトキシシラン、または二量体二次アミノアルキルシロキサンを含む。ヒドロキシルアルキルシロキサンは、3-ヒドロキシプロピル、または 8-ヒドロキシ、7-OCT-1 エニルトリクロクロクロシランを含む。ジオール (ジヒドロキシ) シロキサンには、グリシジルトリメトキシシラン (2, 3-ジヒドロキシ) プロピル等がある。アミノアルキルシロキサンは、3-アミノプロピル (3-アミノプロピルトリエトキシシラン、3-アミノプロピルジエトキシメチルシラン、3-アミノプロピルジメチルエトキシシラン、または 3-アミノプロピルトリメトキシシラン)、3-アミノプロピルトリメトキシシランを含む。二量体二次アミノアルキルシロキサンは、ビス (シリルキシルプロピル) アミン、ビス (3-トリメトキシシリル) を含む。二量体の第二のアミノアルキルシロキサンは、ビス (シリルオキシルプロピル) アミンへ変わる (3-トリメトキシシリルプロピルアミンになりえる。さらに、多くの代替の機能的にされた表面は、現在の発明の中で使用することができる。限定されない例は、次のものを含む。1. ポリエチレン/ポリプロピレン (ガンマ線照射またはクロム酸酸化より官能化され、およびヒドロキシルアルキル表面に対して還元した) ; 2. 高度に架橋されたポリスチレン-ジビニルベンゼン (クロロメチル化によって誘導され、ベンジルアミンの官能基の表面をアミノ化した) ; 3. ナイロン (末端のアミノヘキシル基は直接反応的である) ; または 4. エッチングされ、還元されたポリテトラフルオロエチレン。他の方法および官能化剤は、米国特許第 5501893 号に記載され、これは引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。官能化している群の混合物は、任意の異なる比率であり得る。例えば、混合物は、限定なしで、少なくとも 2 つの異なるタイプの官能化剤 (例えばシラン) を含み得る。少なくとも 2 つのタイプの表面の機能化薬剤 (例えばシラン) の比率は、混合物中において、約 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 6、1 : 7、1 : 8、1 : 9、1 : 10、2 : 3、2 : 5、2 : 7、2 : 9、2 : 11、2 : 13、2 : 15、2 : 17、2 : 19、3 : 5、3 : 7、3 : 8、3 : 10、3 : 11、3 : 13、3 : 14、3 : 16、3 : 17、3 : 19、4 : 5、4 : 7、4 : 9、4 : 11、4 : 13、4 : 15、4 : 17、4 : 19、5 : 6、5 : 8、5 : 9、5 : 11、5 : 12、5 : 13、5 : 14、5 : 16、5 : 17、5 : 18、5 : 19、6 : 7、6 : 11、6 : 13、6 : 17、6 : 19、7 : 8、7 : 9、7 : 10、7 : 11、7 : 12、7 : 13、7 : 15、7 : 16、7 : 18、7 : 19、8 : 9、8 : 11、8 : 13、8 : 15、8 : 17、8 : 19、9 : 10、9 : 13、9 : 14、9 : 16、9 : 17、9 : 19、10 : 11、10 : 13、10 : 17、10 : 19、11 : 12、11 : 13、11 : 14、11 : 15、11 : 16、11 : 17、11 : 18、11 : 19、11 : 20、12 : 13、12 : 17、12 : 19、13 : 14、13 : 15、13 : 16、13 : 17、13 : 18、13 : 19、13 : 20、14 : 15、14 : 17、14 : 19、15 : 16、15 : 17、15 : 19、16 : 17、16 : 19、17 : 18、17 : 19、17 : 20、18 : 19、19 : 20、または 2 つの群の所望の表面表示 (surface representation) を達成する他の比率であり得る。理論により拘束されることなしに、表面表示が混合物中の 2 つの群の割当に高度に比例するであろうことが理解される。本発明の方法および組成物による他の適切な溶媒のための所望の表面張力、湿潤性、水接触角または接触角は、官能化剤の比率の提供により達成され得る。また、混合物中の薬剤は、本発明の方法及び組成物に応じて所望のレベルまで反応性基の表面密度を希釈して、下流の反応に適当な反応性及び不活性の成分から選択され得る。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチド合成反応において成長しているオリゴヌクレオチドを形成するために反応する表面官能基の画分の密度は、約 0.005、0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、7.0、10.0、15.0、20.0、50.0、75.0、100.0 $\mu\text{Mol}/\text{m}^2$ 、またはこれら未満、またはこれ

10

20

30

40

50

らより大きい。

【0260】

様々な実施形態において、表面は、より高い表面エネルギーを有するか、または反動的な親水性の部分のコーティングによってより親水性になるように、修飾される。基板表面の異なる部分の表面エネルギーを変化させることによって、堆積された試薬液の拡散は調整され得、幾つかの場合において促進される。例えば、図5は、試薬の液滴がインクジェットプリンターによってマイクロウェルへ堆積する場合を例証している。この場合において、マイクロウェルの表面が他の近くの表面と比較して高い表面エネルギーを有するので、液体の液滴は上方へ広がり、より小さいマイクロウェルを充たす。基板上の反応性の親水性の部分は、水酸基、カルボキシル基、チオール基、及び／又は置換または非置換のアミノ基であり得る。適切な材料は、限定されないが、固相化学合成に使用することができる支持体、例えば、架橋されたポリマー材料（例えばジビニルベンゼンのスチレンベースのポリマー）、アガロース（例えばSepharose（登録商標））、デキストラン（例えばSephadex（登録商標））、セルロース酸ポリマー、ポリアクリルアミド、シリカ、ガラス（特に、制御された細孔性ガラス（controlled pore glass）、または「CPG」）、セラミックスなどを含む。その支持体は商業的に入手されてもよく、それらは官能化前にコーティングされるか処置されてもよい。

10

【0261】

親水性および疎水性表面

表面エネルギー、または表面の疎水性は水接触角の測定により評価するか測定することができる。水接触角は、水滴が固体の表面に会う、滴剤表面と固体表面の間の角度である。固体表面は滑らかか、平らか、または平面の表面であり得る。それは、Youngの方程式により液体（例えば水）による固体の表面の湿潤性を定量し得る。いくつかの場合において、水接触角ヒステリシスは、いわゆる前進（最大）水接触角から後退（最小）水接触角まで観察され得る。平衡水接触角は、それらの値の中に見出すことができ、それらから計算することができる。疎水性および親水性は、水接触角を使用して相対的な定量的な事項として表され得る。90°より小さな水接触角を備える表面は、固体表面が親水性または極性であると考えることができる。90°より大きな水接触角を備える表面は、固体表面が、疎水性か無極性であると考えることができる。低い表面エネルギーを備える高度に疎水性の表面は、120°より大きな水接触角を有する。

20

30

【0262】

コーティングされた表面の表面特性は、オリゴヌクレオチド合成に適した様々な方法で調節され得る。表面は、通常のオリゴヌクレオチド合成の条件に対して不活性であるように選択され得る；例えば、固体表面は、選択された化学作用に依存して、単量体付加のあいだ、バルク溶媒界面（bulk solvent interface）に対して遊離したヒドロキシ、アミノまたはカルボキシル基を欠いていてもよい。代替的に、表面は、オリゴヌクレオチド合成の第一のサイクル又は初めの数サイクルの開始前に反応性の部分を含んでいてもよく、これらの反応性の部分は、第一の、第二の、第三の、第四の、第五の、またはそれ以降のオリゴヌクレオチド合成反応後に、測定不能な密度まですぐに枯渇し得る。表面は、さらに、例えばアセトニトリルおよびグリコールエーテルなどの有機溶媒、または水性の溶媒によって、周囲の表面に対して、十分または乏しい湿潤化のために最適化され得る。

40

【0263】

理論に束縛されるものではないが、濡れ現象は、固液界面での分子間の表面張力又は吸引力の尺度であると理解され、 $\text{ダイン}/\text{cm}^2$ の中で表現される。例えば、フルオロカーボン、典型的には、炭素-フッ素結合のユニークな極性（電気陰性度）に起因して、非常に低い表面張力を有する。密構造ラングミュア-ブロッジェット型フィルムでは、層の表面張力は、主にアルキル鎖の末端におけるフッ素の割合によって決定され得る。フィルムの場合、単一の末端トリフルオロメチル基は、ほぼパーフルオロアルキル層として親油性などの表面をレンダリングし得る。フルオロカーボン、共有基礎となる（例えば、高度

50

に架橋したポリマー)、固体誘導体化支持体に付着される場合、反応部位の密度は、ラングミュア-プロジェクトと基密度よりも低くされ得る。例えば、メチルトリメトキシシラン表面の表面張力は、約22.5 MN/Mであり得、アミノプロピルトリエトキシシラン表面/mの約35 mNとであり得る。シラン表面の他の例は、Arklesら、*The role of polarity in the structure of silanes employed in surface modification*に記載されている。臨界表面張力が45 MN/mよりも大きい場合、表面の親水性挙動は、一般的に起き得る。臨界表面張力が増加するにつれて、接触角の予想される低下は強い吸着挙動を伴う。表面の疎水性の挙動は、一般的に臨界表面張力未満が35 mN/mであるときに発生すると考えられる。第一に、臨界表面張力の減少は、表面の濡れは、炭化水素油によって、すなわち、親油性挙動に関連している。臨界表面張力が20 MN/メートル未満に低下するように、表面が炭化水素油によって湿潤レジスト疎油性と同様に疎水性の両方で考えられている。例えば、シラン表面の陽イオンは、臨界表面張力の広い範囲を生成するために使用され得る。従って、本発明の方法および組成物は、例えばシランを含んで、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、115、120 MN/M未満、またはそれら以上の表面張力を達成するように、表面コーティングを使用し得る。さらに、本発明の方法および組成物は、115、110、100、90、80、70、60、50、45、40、35、30、25、20、15、12、10、9、8、7、6 MN/m、またはそれら未満よりも大きい表面張力を達成するように、例えばシランを含むものなど、表面コーティングを使用し得る。水接触角及び表面コーティングの非限定的な例の表面張力は、例えば、シランを含むものなどであり、Arklesら (*Silanes and Other Coupling Agents, Vol. 5v: The Role of Polarity in the Structure of Silanes Employed in Surface Modification, 2009*) の表1および表2に記載されており、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。以下に表を複製する。

【0264】

【表 1 - 1】

表 1.

滑らかな表面の水接触角（度）

ヘプタデカフルオロデシルトリメトキシシラン	113-115	
ポリ（テトラフルオロエチレン	108-112	
ポリプロピレン	108	
オクタデシルジメチルクロロシラン	110	
オクタデシルトリクロロシラン	102-109	10
トリス（トリメチルシロキシ）シリルエチルジメチルクロロシラン	103-104	
オクチルジメチルクロロシラン	104	
ブチルジメチルクロロシラン	100	
トリメチルクロロシラン	90-100	
ポリエチレン	88-103	
ポリスチレン	94	
ポリ（クロロトリフルオロエチレン）	90	
ヒト皮膚	75-90	20
ダイヤモンド	87	
グラファイト	86	
ケイ素(エッチングされた)	86-88	
タルク	82-90	
キトサン	80-81	
スチール	70-75	
メトキシエトキシウンデシルトリクロロシラン	73-74	30
メタシクロプロピルトリメトキシシラン	70	
ゴールド、典型的な（金、クリーン参照）	66	
腸粘膜	50-60	
カオリン	42-46	
白金	40	
窒化ケイ素	28-30	
ヨウ化銀	17	
〔メトキシ（ポリエチレンオキシ）プロピル〕トリメトキシシラン	15-16	40
ソーダ石灰ガラス	<15	

【 0 2 6 5】

【表 1 - 2】

表 1.

滑らかな表面の水接触角 (度)

金、クリーン	<10
トリメトキシシリルプロピル置換 ポリ (エチレンイミン) , ヒドロキシクロリド	<10

注：表 1 では、シランについての接触角は、滑らかな表面上のシランの加水分解堆積を指す。
 ここでのデータは、様々な文献情報源から、および著者らの研究から描かれる。基板間の正確な比較は、試験方法の違い、または前進接触角、後退接触角、平衡接触角が報告されたかどうかを考慮しない。

10

【0 2 6 6】

【表 2 - 1】

表 2

臨界表面張力 (N/m)

ヘプタデカフルオロデシルトリクロロシラン	12	20
ポリ (テトラフルオロエチレン)	18.5	
オクタデシルトリクロロシラン	20-24	
メチルトリメトキシシラン	22.5	
ナフルオロヘキシルトリメトキシシラン	23	30
ビニルトリエトキシシラン	25	
パラフィンワックス	25.5	
エチルトリメトキシシラン	27.0	
プロピルトリメトキシシラン	28.5	40
ガラス、ソーダ石灰 (湿潤)	30.0	
ポリ (クロロトリフルオロエチレン)	31.0	
ポリプロピレン	31.0	
ポリ (プロピレンオキシド)	32	40
ポリエチレン	33.0	
トリフルオロプロピルトリメトキシシラン	33.5	
3-(2-アミノエチル) アミノプロピルトリメトキシシラン	33.5	
ポリスチレン	34	40
p-トリルトリメトキシシラン	34	

【0 2 6 7】

【表 2 - 2】

表 2

臨界表面張力 (N/m)

シアノエチルトリメトキシシラン	34	
アミノプロピルトリエトキシシラン	35	
アセトキシプロピルトリメトキシシラン	37.5	
ポリマー (メタクリル酸メチル)	39	10
ポリマー (塩化ビニル)	39	
フェニルトリメトキシシラン	40.0	
クロロプロピルトリメトキシシラン	40.5	
メルカプトプロピルトリメトキシシラン	41	
グリシドキシプロピルトリメトキシシラン	42.5	
ポリ (エチレンテレフタレート)	43	
銅 (乾燥)	44	
ポリマー (酸化エチレン)	43-45	20
アルミニウム (乾燥)	45	
ナイロン 6 / 6	45-46	
鉄 (乾燥)	46	
ガラス、ソーダ石灰 (乾燥)	47	
チタン酸化物 (アナターゼ)	91	
酸化鉄	107	
酸化錫	111	30

【0268】

水接触角を測定する法は、静的な液滴法、動的な液滴法、動的なウィルヘルミー法、単繊維ウィルヘルミー法、粉末接触角法などを含む当該技術分野で既知の任意の方法が使用され得る。幾つかの場合において、本発明において本明細書に記載されているような基板の表面、または基板の表面の一部分は、本明細書に記載されているように、曲がっていない、滑らか又は平面の、基板の関連する官能化された表面の等価物上で、疎水性か、低い表面エネルギーを有するように、または、約 90°、95°、100°、105°、110°、115°、120°、125°、130°、135°、140°、145°または 150°よりも大きいと測定される水接触角を有するように官能化または修飾され得る。本明細書に記載の官能化される表面の水接触角は、曲がっていない、滑らか又は平面のジオメトリにおける官能化された表面上の水滴の接触角を指し得る。幾つかの場合において、本発明において本明細書に記載されているような基板の表面、または基板の表面の一部分は、本明細書に記載されているように、曲がっていない、滑らか又は平面の、基板の関連する官能化された表面の等価物上で、親水性か、高い表面エネルギーを有するように、または、約 90°、85°、80°、75°、70°、65°、60°、55°、50°、45°、40°、35°、30°、25°、20°、15°、または 10°よりも大きいと測定される水接触角を有するように官能化または修飾され得る。基板の表面または基板の表面の一部分は、官能化又は修飾の前の基板の表面または基板の表面の一部分と比較し

て、より親水性または疎水性であるように官能化又は修飾され得る。

【0269】

いくつかの場合において、一つ以上の表面は、一つ以上の曲がっていない、滑らかな又は平面の同等の表面で測定して、 90° 、 85° 、 80° 、 75° 、 70° 、 65° 、 60° 、 55° 、 50° 、 45° 、 40° 、 35° 、 30° 、 25° 、 20° 、 15° または 10° より大きい、水接触角の差を有するように修飾され得る。いくつかの場合において、微細構造、チャンネル、分解された場所、決められたリアクターキャップまたは基板の他の部分の表面は、こうした構造の、曲がっていない、滑らかな又は平面の同等の表面で測定して、 90° 、 85° 、 80° 、 75° 、 70° 、 65° 、 60° 、 55° 、 50° 、 45° 、 40° 、 35° 、 30° 、 25° 、 20° 、 15° または 10° より大きい水接触角の差に対応する、異なる疎水性を有するように修飾され得る。特に明記しない限り、本明細書に記載の水接触角は、該当する表面の、曲がっていない滑らかな又は平面の等価物で得られる測定値に対応する。

10

【0270】

表面を反応基化するための他の方法は、米国特許第6,028,189号に記載され、これは引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、親水性の分解された場所は、基板内の各々の分解された場所にわたり、まず保護を適用し、または抵抗することにより生成され得る。その後、非保護領域は、反応しない表面をもたすために疎水性の薬剤でコーティングされ得る。例えば、疎水性のコーティングは、保護された円を取り巻く、露出した酸化物上に（トリデカフルオロテトラヒドロオクチル）ートリエトキシシランの化学蒸着法によって作り出される。。最後に、保護剤、あるいはレジストは、さらなる修飾およびオリゴヌクレオチド合成のための基板の位置の領域を露出して除去され得る。いくつかの実施形態では、そのような保護されていない領域の最初の修飾はさらなる修飾に抵抗することができ、それらの表面機能を保つが、新たに保護されていない領域は、続く修正工程にさらされ得る。

20

【0271】

複数の並列のマイクロ流体反応

別の態様では、1セットのシステムおよび並列反応を実施するための方法が、本明細書に記載されている。システムは、密閉できる、例えば相互に解放可能に密閉できる、2つ以上の基板を含み得、密閉の際に個別に対処可能な反応容積または複数の反応器を形成する。リアクターの新しいセットは、別の基板から最初の基板を解放し3番めの基板とそれを並べることにより形成され得る。それぞれの基板は所望の反応のために、試薬（例えばオリゴヌクレオチド、酵素、バッファー、溶媒）を運び得る。いくつかの実施形態では、システムは、第一の適切な密度での複数の分解された場所の第一の表面、および、第二の適切な密度での複数の分解されたリアクターキャップを含む。システムは、第1の表面とキャップ要素との間に仮シールを形成する、第1の表面上に分解された場所の複数の分解されたリアクターキャップを整列させ得る。整列した基板間の仮シールは、第一の表面上の場所を、約、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95の、100、125、150、200またはそれら未満の、またはそれらより多い場所の群に、物理的に分割し得る。本明細書に記載されている1セットの並発反応は、本発明の方法および組成物によって行われ得る。第一の適切な密度での複数の分解された場所を伴う第一の表面、および、第二の適切な密度での複数の分解されたリアクターキャップを伴うキャップ要素は、整列させることができ、システムは、第一の表面とキャップ要素との間に仮シールを形成する、第一の表面上に分解された場所の複数の解決されたリアクターキャップを整列させ、それにより、第一の表面上の場所を、約、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95の、100、125、150、200またはそれら未満の、またはそれらより多い場所の群に、物理的に分

30

40

50

割し得る。第一の反応が行われ、試薬の第一のセットを形成する。キャップ要素は、第一の表面から解放され得る。解放に際して、リアクターキャップは各々、以前にシールした反応容量における試薬の第一のセットの少なくとも一部を保持し得る。複数の分解された場所は 1 mm^2 あたり、約、少なくとも約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 50、約 75、約 100、約 200、約 300、約 400、約 500、約 600、約 700、約 800、約 900、約 1000、約 1500、約 2000 年、約 3000、約 4000、約 5000、約 6000、約 7000、約 8000、約 9000、約 10000、約 20000、約 40000、約 60000、約 80000、約 100000、または約 500000、あるいはそれら未満であり得る。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、 1 mm^2 当たり約、少なくとも約 100、またはそれ未満の密度であり得る。幾つかの実施形態では、複数の分解されたリアクターキャップは、 1 mm^2 当たり約、少なくとも約 1、またはそれ未満の密度であり得る。幾つかの実施形態では、複数のリアクターキャップは 1 mm^2 あたり、約、少なくとも約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 50、約 75、約 100、約 200、約 300、約 400、約 500、約 600、約 700、約 800、約 900、約 1000、約 1500、約 2000 年、約 3000、約 4000、約 5000、約 6000、約 7000、約 8000、約 9000、約 10000、約 20000、約 40000、約 60000、約 80000、約 100000、または約 500000、あるいはそれら未満であり得る。本明細書に記載の方法は、第三の密度で複数の分解された場所を伴う第二の表面を提供する工程、第二の表面上の複数の分解された場所を伴う複数の分解されたリアクターキャップを整列させる工程、および、第二の表面とキャップ要素との間に、典型的には一時的または解放可能な、シールを形成する工程を含む。新たに形成されるシールは、第二の表面上の場所を、約、少なくとも約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 の、100、125、150、200 またはそれら未満の、またはそれらより多い場所の群に、物理的に分割し得る。第二の反応は、試薬の第一のセットの一部を随意に使用して行われてもよく、それによって試薬の第二のセットを形成する。キャップ要素は、第二の表面から解放され得る。解放に際して、リアクターキャップは各々、以前にシールした第二の反応容量における試薬の第二のセットの少なくとも一部を保持し得る。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所を伴う第二の表面は、 1 mm^2 あたり、少なくとも約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 15、約 20、約 25、約 30、約 35、約 40、約 50、約 75、約 100、約 200、約 300、約 300、約 400、約 500、約 600、約 700、約 800、約 900、約 1000、約 1500、約 2000 年、約 3000、約 4000、約 5000、約 6000、約 7000、約 8000、約 9000、約 10000、約 20000、約 40000、約 60000、約 80000、約 100000、または約 500000、あるいはそれら未満であり得る。実施形態の種々のシステム、方法および器具使用が、本明細書に記載されている。

【0272】

システム・アセンブリは、任意の数の動的なウェーハおよび任意の数の静的なウェーハを含むことができる。例えば、システムは、行中の 3 つの基板および列中の 4 つの基板を含むことができる。輸送システムは、3 つの静的なウェーハ（あるいは基板）および 1 つの動的なウェーハ（あるいは基板）を含み得る。動的なウェーハは、複数の複数の静的なウェーハ間を移動するか輸送され得る。動的なウェーハは、3 つの静的に取り付けられたウェーハ間で輸送され得る。幾つかの実施形態において、動的なウェーハは、約 50、100、150、200 または 250 mm の直径、またはその 2、4、6 または 8 倍高い値を有しうる。動的なウェーハは、温度制御された真空チャックに取り付けられ得る。本発明のシステムは、動的なウェーハが Z 方向に動くことができる構成を可能にし、それは、約 0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2 または $3\text{ }\mu\text{m}$ 、またはそれら

未満の z 位置の制御によって、第二のウェーハ表面に直面するウェーハの表面に垂直な方向であり得、および、ウェーハの $t h e t a_{-} z$ 、互いに直面する2つのウェーハの表面の法線間の角度を、例えば公差の範囲内で静的ウェーハ上の別のパターンと動的なウェーハ上のパターンとを一致させることによって合わせることができる。ウェーハ位置決め公差は、 $x-y$ 平面の回転角の差において、約、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450または500マイクロラジアン、またはそれら未満であり得る。ウェーハ位置決め公差は、 $x-y$ 平面の回転角の差において、約50マイクロラジアン、またはそれら未満であり得る。ウェーハ位置決め公差は、 x 方向の距離で約、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15 μm またはそれら未満であり得る。ウェーハ位置決め公差は、 y 方向の距離で約、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15 μm またはそれら未満であり得る。ウェーハ位置決め公差は、 z 方向の $x-y$ 平面の回転角において、約、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10マイクロラジアンまたはそれら未満であり得る。幾つかの実施形態において、ウェーハ位置決め公差は、 z 方向の $x-y$ 平面の回転角において、約5マイクロラジアン、またはそれら未満であり得る。幾つかの実施形態において、ウェーハ位置決め公差は、 z 方向の距離で約、0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5または5 μm 、またはそれら未満であり得る。幾つかの実施形態において、ウェーハ位置決め公差は、 z 方向の距離において、約0.5 μm の距離、またはそれら未満であり得る。

【0273】

いくつかの場合において、並行反応のセットを実施するためのシステムおよび方法は、複数の分解された場所、及び／又は複数の分解されたリアクターキャップを伴うキャップ要素を伴う、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九または第十の表面をさらに含む。第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九または第十の表面は並べることができ、二つの表面の間で仮シールと対応するキャップ要素を形成することができ、それにより表面上の場所及び／またはリアクターを物理的に分割することができる。第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九または第十の反応は、前の反応（すなわち試薬の第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九のセットの反応）から保持される試薬の一部を使用して行われ得、それによって、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九または第十の試薬を形成する。本明細書に記載されるキャップ要素の各々は、その対応する表面から解放され得、ここでリアクターキャップは、少なくとも別の反応容積の試薬の以前のセットの一部を保持することができる。いくつかの場合において、複数の分解された場所を備える第二の表面は、少なくとも2 $/mm^2$ の密度であり得る。幾つかの実施形態では、複数の分解された場所は、1 mm^2 あたり、約、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約50、約75、約100、約200、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1500、約2000年、約3000、約4000、約5000、約6000、約7000、約8000、約9000、約10000、約20000、約40000、約60000、約80000、約100000、または約500000、あるいはそれら未満の場所の密度を有する。各回で保持される試薬の一部は、異なり得、実行される反応に依存して、所望の部分になるように制御され得る。

【0274】

本発明は、様々な実施形態において、複数の分解された場所を備える第一の表面と、複数の分解されたリアクターキャップを含む、1セットの並発反を行なうためのシステムを企図する。本明細書の他の場所でさらに詳細に記載されるように、複数の分解された場所、および複数の解決リアクターキャップを備えるキャップ要素が、複数の分解されたリアクター形成するために組み合わせられる。幾つかの場合において、第一の基板の第一の表面の分解された場所が、試薬のコーティングを含み得る。第二の基板の第二の表面の分

解された場所は、試薬のコートティングを含み得る。幾つかの実施形態において試薬のコートティングは、第一または第二の表面に共有結合で連結され得る。幾つかの場合において、第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九または第十の表面があるとき、各表面はそれぞれ試薬のコートティングを含み得る。

【0275】

第一の表面または第二の表面上の試薬のコートティングは、オリゴヌクレオチドを含み得る。オリゴヌクレオチドは、本明細書にさらに記載されるような、例えば、少なくとも25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300bpまたはこれより長い任意の長さであり得る。リアクターキャップを備えた分解された場所を密閉する際、試薬のコートティング内に含まれるオリゴヌクレオチドは、解放され得る。様々な反応、例えば、オリゴヌクレオチド増幅反応、PCA、配列決定ライブラリの生成、またはエラー訂正を、複数の分解されたリアクター内部で行なうことができる。

10

【0276】

オリゴヌクレオチドは、本明細書の他の箇所でさらに詳細に記載されるような、および当該技術分野において既知のような様々な適切な方法によって、例えば当該技術分野において周知である酵素的切断によって、コートティングされた表面から解放され得る。当該技術分野において既知の他の開裂の方法は、Miy Iなどの制限酵素、または他の酵素、または、限定されないが、ウラシルDNA、グリコシラーゼ(UDG)およびDNAエンドヌクレアーゼI Vなどの、一本鎖または二本鎖DNAを切断できる酵素の組み合わせの使用を含む。当該技術分野で既知の他の開裂方法も、限定されないが、DNA分子の化学的な(塩基不安定性の)切断または表面からの光学的な(光不安定性による)切断を含んで、本発明中で有利に使用され得る。PCRまたは他の増幅反応も、それらが基板に係留されている一方、オリゴヌクレオチドをコピーすることにより遺伝子合成のための構築成分(building material)を生成するために利用され得る。オリゴヌクレオチドを放出する方法は、全体が参照によって本明細書に組込まれる国際公開第2007137242号および米国特許第5,750,672号に記載されている。

20

【0277】

いくつかの場合において、第一の表面からのキャップ要素の解放、および第二の表面からのキャップ要素の解放は、異なる速度で行われ得る。対応する表面からキャップ要素を解放する際に保持される試薬の部分の量は、速度またはキャッピング要素の表面エネルギーと対応する表面によって制御され得る。いくつかの場合において、第一または第二の表面は、異なる表面張力、表面エネルギー、または水など与えられた液体との疎水性を含む。幾つかの実施形態では、第一の表面の分解された場所は、高い表面エネルギー、表面張力または疎水性を含む。キャッピング要素および対応する表面の、表面エネルギー、又は疎水性の差は、解放時に保持される試薬の部分の制御するためのパラメータであり得る。第一の容積および第二の反応は異なり得る。

30

【0278】

いくつかの場合において、分解されたリアクターの外の圧力が、分解されたリアクターの内部の圧力より大きくてもよい。他の場合では、分解されたリアクターの外の気圧が、分解されたリアクターの内部の圧力未満であってもよい。分解されたリアクターの内部および分解されたリアクターの外側の気圧の差(あるいは圧力差)は、分解されたリアクターの仮封に影響し得る。第一の表面および第二の表面の表面エネルギーまたは疎水性の修飾によって、圧力差は、第一の表面と第二の表面のリアクターキャップとの間のギャップ内の曲線または直線の空気/液体の界面を結果として生じ得る。更に、表面からキャップ要素を解放するために必要とされる力は、圧力差および異なる表面エネルギーによって制御することができる。幾つかの場合において、表面は、キャップする要素が表面から容易に解放されることができるよう、差異の表面エネルギーおよび圧力差を有するために変更することができる。

40

【0279】

50

第一または第二の反応、または第二の反応の後の任意の反応は、の本明細書に記載の、または当該技術分野で既知の任意の適切な反応のように、様々な分子のアッセイまたは生化学的なアッセイを含み得る。幾つかの実施形態では、第1または第2の反応は、ポリメラーゼサイクリングアセンブリを含み得る。幾つかの実施形態では、第1または第2の反応は、酵素的遺伝子合成、アニーリングおよび連結反応、ハイブリッド遺伝子を介する2つの遺伝子の同時合成、ショットガン連結および共連結、挿入遺伝子合成、DNAの一本鎖を介する遺伝子合成、テンプレート向けの連結、リガーゼ連鎖反応、マイクロアレイ媒介性の遺伝子合成、固相アセンブリ、S l o n i n g 構築ブロック技術、またはRNA連結媒介性遺伝子合成を含み得る。1セットの並発反応を行なう反応または方法は、促進するかもしれない、キャップ要素を冷却する工程、または第一の表面（第二の表面）を冷却する工程を含む。

10

【0280】

本明細書に記載のシステムを使用する本発明の方法および組成物の一般的なプロセスのワークフローが、図8に例証される。

【0281】

補助器具使用

1つの様相では、本発明は、オリゴヌクレオチド合成のためのシステムおよび方法に係する。オリゴヌクレオチドの合成用のシステムは、走査堆積システム（*s c a n n i n g d e p o s i t i o n s y s t e m*）を含むかもしれない。オリゴヌクレオチド合成用のシステムは、複数のプリントヘッド（*p r i n t h e a d*）を典型的には含んで、官能化された表面、および複数の分解された場所およびインクジェットプリンターが有する第一の基板（例えばオリゴヌクレオチド合成ウェーハ）を含み得る。各プリントヘッドは、第一の基体（例えばホスホラミダイト合成用のヌクレオチド・構築ブロック）の分解された場所において行なわれる反応のための様々な構築ブロックのうちの1つを置くように典型的に構成される。オリゴヌクレオチド合成ウェーハの分解された場所は、さらに詳しく本明細書に別記されるようなマイクロチャンネル中に存在し得る。基板は、分解された場所内の反応用の必要な試薬（例えばトルエン中の酸化剤）または溶媒（例えばアセトニトリル）を包含しているものなどの、連続的な流れを提供することによって、フローセル内でシールされ得、それによって、合成の部位（例えばオリゴヌクレオチド合成ウェーハの分解された位置）での、投与量および濃度の正確な制御が可能となる。窒素のような不活性ガスのフローは、典型的には揮発性の基板の増強された蒸発によって基板を乾燥させるために使用され得る。種々の手段、例えば真空ソース／減圧ポンプまたは真空タンクは、乾燥を改善し、表面上の残留水分量および任意の液滴を低減するための、低減相された相対圧力（陰圧）又は真空を生成するために、使用され得る。したがって、基板またはその分解された場所をすぐに取り囲む圧力は、約100、75、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01mTorr、またはそれら未満であってもよい。

20

30

【0282】

図3は、オリゴヌクレオチド合成用のシステムの例を示す。したがって、オリゴヌクレオチド合成のウェーハは、入口マニフォールドと、必要に応じて出口マニフォールドを介して、必要なバルク試薬によるオリゴヌクレオチドの合成のための分解された場所を提供するように構成されている。大量の試薬は、d e - ブロック、アセトニトリルまたは窒素ガスなど、様々な実施形態中の複数の分解された場所の中で一般に必要なオリゴヌクレオチド合成のための任意の適切な酸化剤、試薬、支持体、溶媒、緩衝液またはガスを含み得る。インクジェットプリンターのプリントヘッドは、第一の基板の対処可能位置に対してX-Y方向に動くことができる。キャップ要素などの第二の基板は、本明細書の他の場所でさらに詳細に記載されるように、Z方向に移動することができ、必要に応じて、XおよびYの方向に、第一の基板でシールするために、複数の分解されたリアクターを形成する。あるいは、第二の基板は定着していてもよい。そのような場合、合成基板はZ方向に動いてもよく、必要に応じて、XおよびYの方向に、第二の基板を並べてシールする。合成

40

50

されたオリゴヌクレオチドは、第一の基板から第二の基板に送達され得る。適切な量の流体は、第一の基板の吸込マニフォールドおよび分解された場所を通して第二基板へ流れて、第一の基板／その分解された場所から第二の基板への試薬の送達を促進する。別の態様では、現在の本発明はウェーハ操作を含むオリゴヌクレオチドのアセンブリのためのシステムに関する。

【0283】

様々な実施形態において、本発明は、走査堆積のためのシステムを利用する。走査堆積システムは、分解された場所またはマイクロウェルに対する試薬を堆積させるために使用され得るインクジェットを含み得る。幾つかの実施形態において、走査堆積システムは有機溶媒またはインクを使用することができる。いくつかのケースでは、走査堆積システムは、シリコンウェーハ、直径が典型的には約200mmのウェーハを複数含むことができる。幾つかの場合において、システム全体は、気圧を制御された筐体中で位置し機能し得る。走査堆積システムは、作業エンベロープ、プリントヘッド・アセンブリ、フローセル・アセンブリ、および／またはサービスのエンベロープを含み得る。幾つかの場合において、プリントヘッド・アセンブリは移動することができるが、フローセル・アセンブリは定常的なままである。走査堆積システムは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、またはそれ以上の基板／ウェーハなどの1つ以上の基板／ウェーハを手入れする、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、またはそれ以上のフローセルなどの、一つ以上のフローセルを保持し得る。ウェーハはフローセル内に固定したままであり得る。幾つかの場合において、システムはthe t a__zの自動化を介して基板のアラインメントを促進し得る。作動エンベロープ(work envelope)は、走査方向の移動(scanning direction travel)を包含する領域を含むことができ、例えば、約(n-1) プリントヘッド・ピッチ+ウェーハ直径=9*20mm=380mmである。適切な作動エンベロープは、同等の構成により予見され得る。サービスエンベロープ(service envelope)は保守のために置かれたプリントヘッドを含み得る。幾つかの場合において、サービスエンベロープは、環境上、より大きなボックスから単離され得る。様々な実施形態において、本明細書に記載の方法および組成物のためのシステムは、オリゴヌクレオチド合成、オリゴヌクレオチドのアセンブリ、またはより一般的には試薬の生成のための、走査堆積システムを含む。

【0284】

複数の分解された場所および複数の分解されたリアクターキャップは、相互接続(interconnectivity)または流体連通(fluidic communications)を有する微細構造上に配置され得る。このような流体通信は、反応の異なる工程について、液滴として又は連続した流れを使用して、新たな試薬の洗浄及び灌流を可能にする。流体連通マイクロチャネルは、複数の分解された場所への、及び／又はそこからの入口及び出口、を含み得る。入口及び／又は出口は当該技術分野で任意の既知の方法で作ることができる。例えば、入り口及び／又は出口は正面の側および基板の裏で提供することができる。入り口及び／又は出口を作成する方法は、米国特許第20080308884A1号に記載されており、それは引用により全体が本明細書に組み入れられ、正面側のリソグラフとエッチング工程によって、適切な微構造の成分を作成する工程；マイクロメカニカル構造へ、及び／又はそこからの、入口及び／又は出口を提供するための、正面側の微細構造を有する正確なアラインメントで前記基板の裏面側からの穴を掘削する工程、を含み得る入口及び／又は出口は、マニフォールドによって供給された薄い間隙を流れる流体で、Hele-Shawタイプのフローセルであり得る。図9Aに示すように、本明細書に記載の基板は、フローセルの一部を形成し得る。フローセルは基板(すなわちウェーハ)の上部の蓋を滑らせることにより閉じられ得、基板の縁のまわりの圧力シールを形成する位置へと締めることができる。いくつかの実施形態では、密閉は、真空または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10気圧に対してシールするのに十分であり得る。試薬は、基板(すなわちウェーハ)の真下の薄い間隙へ差し込まれ、基板を

介して流れることができる。その後、試薬は図9Bで例証されるように、先細りの廃棄物コレクターで収集され得る。幾つかの実施形態において、最終的な溶媒による洗浄工程の後、ウェーハは排水され得、例えば、アセンブリの下部を通り、その後窒素によりパージされる。その後、チャンバーは、容積で50%、30%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、0.00001%またはそれ未満まで、残留液体や水分を減少させる任意の微細構造に残存する溶媒を乾燥するために、真空までプルダウンする (pulled down) ことができる。チャンバーは次に、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、75、100、200、300、400または1000 mTorr未満であるように、基板の周囲の圧力を減少させるために真空までプルダウンすることができる。幾つかの場合において、チャンバーは、真空工程の後に窒素を充填することができ、天盤は、システム (例えばプリンター) の補助部品のアクセスを可能にするために再度開いてスライドさせることができる (can be slid open)。幾つかの場合では、フローセルは開くことができる。図9Bで例証されるように、基板/ウェーハは、わきに置かれた (displaced sideways) 廃棄物マニフォールドを搭載され得る。この配列は、ウェーハに対するより容易なインクジェットのアksesを許可能にし得る。この時点では、試薬はマイクロウェルへ堆積し得る。幾つかの実施形態において、分解された筐体 (すなわちフローセル) の蓋は、廃棄物コレクターとして機能することができ、および試薬の液体がそこに流れることができる。図9Bおよび9C中の矢印は、試薬のための典型的なフロー方向を表わす。いくつかの場合において、試薬は基板 (例えばシリコンウェーハ) の穴を通過し、底部の薄い隙間を通過して入ることができ、図9Cに示すように、廃棄物コレクター内に収集される。いくつかの例では、ガスは、液体を排除するために、上部または下部マニフォールドを介して、例えばフローセルの底部または上部を介して、パージすることができる。出口または入口のポートは完全乾燥まで真空へ接続され得る。図10に例証されるように、真空ポートは不用の側面または入口側面に接続することができる。いくつかの具体化では、基板 (つまりウェーハ) を通る複数の圧力放出穴があり得る。複数の穴は、約1000、5000、10,000、50,000、100,000、500,000または2,000,000以上であってもよい。いくつかの場合において、複数の穴は5百万以上であり得る。いくつかの場合において、合成のための微細構造は、本明細書の他の箇所ですらに詳細に説明されるように、圧力解放孔として機能する。これらの穴は、分解された筐体が基板を乾燥させるために空にされるように、ガスがウェーハの1つの側から通り過ぎることを可能にすることができる。幾つかの場合において、例えば、空気を廃棄コレクター側から駆動された場合、廃棄コレクター側の空気圧 (Pwaste) は、入口側の空気圧 (Pinlet) と実質的に同じレベルに維持され得る。いくつかの実施形態では、廃棄物コレクターに入口マニフォールドを接続するポートが使用され得る。したがって、スキャン法、置き氾濫すること洗浄、除去および (または) 乾燥のように、ここに記述されたステップの複数のウェーハ基板を輸送せずに行なうことができる。

【0285】

第一の基板および第二の基板をシールしたことにより形成される、分解されたリアクターは、制御された湿度、空気量、蒸気圧 及び/又は圧空成形によりチャンバーで囲まれ、制御された環境によりアセンブリを形成し得る。幾つかの実施形態においてチャンバーの湿度は、飽和させることができるか、又は反応の間に分解されたリアクターから液体の蒸発を約100%失せぐことができる。例えば、幾つかの実施形態では、湿度は、約、少なくとも約100%、99.5%、99%、98.5%、98%、97.5%、97%、96.5%、96%、95.5%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%または25%、またはそれら以上まで制御され得る。

【0286】

上述の制御環境アセンブリを備えるようなものなどの、本明細書中に記載のシステムは、複数の反応器に動作可能に接続された真空装置／チャックおよび／または温度制御システムを含み得る。基板は真空チャック上に配置され得る。真空チャックは、基板の真下に位置する表面凹凸を含み得る。様々な実施形態では、表面の凹凸は、チャネル又は凹部を含み得る。真空チャックは、チャネルによって定められた空間から気体を引き込むための基板と流体連通し得る。真空装置上に基板を維持する方法は、米国特許第 8 2 4 7 2 2 1 号にさらに詳細が記載され、これは引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0287】

様々な実施形態において、基板（例えばシリコンウェーハ）は、上に記載された真空チャックなどチャック上に位置し得る。図 10 は、単一の溝真空チャックのシステム・アセンブリ、および基板と温度制御装置との間でのシンタード・メタル片を例示している。真空チャックは、基板を保持するための適切な寸法を有する単一の溝を含むことができる。幾つかの実施形態において、真空チャックは、基板が本明細書に記載される一つ以上の方法のあいだ、所定の位置に保持され得るように設計されている。実施例として図 10 A で例証される真空チャックは、直径およそ 198 mm の単一の 1-5 mm の溝を含む。いくつかの場合において、単一の溝真空チャックの設計は、基材への改善された熱伝達を提供するために使用され得る。図 10 B は、接着剤で所定の位置に固定され、基板（例えばシリコンウェーハ）や真空チャックとの間に位置している、焼結金属インサートを例証する。幾つかの実施形態において、チャックは、同じようにさらに静電チャックになりえる、

【0288】

複数の分解されたリアクターキャップは、第一の表面上の複数の分解された場所に整列され得、これによって、引用により全体が本明細書に組み入れられる米国特許第 8, 367, 016 号および欧州特許第 0 1 2 6 6 2 1 B 1 号に記載されるような、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して、第一の表面とキャップ要素との間の仮シールが形成される。例えば、x、y 及び z 寸法、および z 寸法に沿って位置する場所の深さの中心点（*locus depth center point*）を有する複数の分解された場所について、場所の深さの中心点は、基板内に埋め込まれた基準マークからの既知の z 寸法の距離に配置され得る。基板は、基準マークを検出することが可能な光学素子を含むことができる撮像システム内に配置することができる。光学装置は、z 寸法の軸方向で整列される光路を画定し得、光路に垂直な焦点面を有し得る。焦点面が光路に沿って動かされる場合、焦点面が Z の深さで実質的に面内にない場合に比べて、焦点面が Z の深さにある場合、基準マークは最大限に検出され得る。基準マークは、第一の基板（例えば複数の分解された場所を含む合成ウェーハ）及び／又は第二の基板（例えば複数のキャップ要素を含むリアクター要素）上の適切な空間配置内に、選択的に配置され得る。いくつかの実施形態では、全体的な整列の基準マークは、分解される場所に近接して形成され得る。用途に応じて、変形、代替、および修正があり得る。例えば、基準マークの二つは、分解された場所近辺内であり得、3 番目の基準マークは、基板の端部にあってもよい。別の例については、ここに記述された基板中のマイクロ構造のパターンは、非対称のパターンの中でアライメントに適している認識しうる方法で例えばそれ自体選択されるかもしれないし、アライメントに使用することができる。いくつかの場合において、基準マークは、被写界深度または他の視覚の特性について修正するためのアライメント点として役立つ。全体が本明細書に引用によって組み入れられる米国特許第 4 1 2 3 6 6 1 号には、電子ビームの位置合わせが基板上に、基準マークをそれぞれ隣接させ、しかし距離をとって分離させ、その結果、マークの立ち上がりとしち下がりのスロープはビデオ信号によって検出され得、故にアライメントが可能となる。

【0289】

システムは加熱の構成要素、冷却の構成要素、または温度制御要素（例えば熱サイクル

機器)を含んでいてもよい。様々な実施形態において、複数の分解されたリアクターとの使用のための熱サイクル機器は、PCRまたはPCA、または本明細書に記載されているかあるいは当該技術分野で既知の他の適切な核酸反応など、核酸の増幅またはアセンブリを行うように、構成され得る。温度は、リアクター内の温度が均一であるように制御され得、加熱は迅速に行われ得る。様々な実施形態において、本明細書に記載されているシステムは、例えばオリゴヌクレオチド合成、遺伝子アセンブリまたは核酸の増幅の間に、基板内のリアクターまたは個々のマイクロ構造からエンドポイントまたはリアルタイム検出のための検出構成要素を、有し得る。

【0290】

本明細書に記載の任意のシステムは、コンピューターに操作可能に連結され得、コンピューターを介して局所的にまたは遠隔で自動操作され得る。本明細書に記載されているシステム構成要素の制御のためのコンピューターおよびコンピューターシステムが、さらに本明細書に別記される。

【0291】

主要な構成—オリゴヌクレオチド

本明細書で使用されているように、用語「あらかじめ選択された配列 (preselected sequence)」、「あらかじめ定められた配列 (predefined sequence)」または「あらかじめ定められた配列 (predetermined sequence)」は、交換可能に使用される。用語は、ポリマー配列がポリマーの合成またはアセンブリの前に知られており、選択されていることを意味する。特に、本発明の様々な態様は、主に、核酸分子の合成またはアセンブリの前に既知であり選択される、核酸分子の調製、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの配列に関して、本明細書に記載されている。1つの実施形態において、オリゴヌクレオチドは短い核酸分子である。例えば、オリゴヌクレオチドは、約10から約300ヌクレオチドまで、約20から約400ヌクレオチドまで、約30から約500ヌクレオチドまで、約40から約600ヌクレオチドまで、または約600ヌクレオチドより大きな長さであり得る。当業者は、オリゴヌクレオチドの長さが、これらの任意の値 (例えば約10から約400ヌクレオチド、または約300から約400ヌクレオチドまでなど) に制限される任意の範囲内であり得ることを認識している。特定の適用によって必要とされるように、適切に短いまたは長いオリゴヌクレオチドが使用されてもよい。個々のオリゴヌクレオチドは、ライブラリ中の別のものとは異なる長さを有するように設計され得る。オリゴヌクレオチドは、比較的短い (例えば、より具体的には200、100、80、60、50、40、30、25、20、15、12、10、9、8、7、6、5または4ヌクレオチドより短い) 長さであり得る。比較的長いオリゴヌクレオチドも熟考される;いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300の、350、400、500、600ヌクレオチドと等しいか、またはこれらより長い。典型的には、オリゴヌクレオチドは一本鎖DNAまたはRNA分子である。

【0292】

本発明の一態様において、あらかじめ定められた配列を有する複数の核酸を合成するための装置が提供される。装置は、複数個の特徴部を有する支持体 (support) を含み得、該それぞれの特徴部は複数個のオリゴヌクレオチドを有する。幾つかの実施形態において、あらかじめ定められた配列がを有する複数のオリゴヌクレオチドは、固体担体の異なる個別の特徴部に固定される。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは一本鎖である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド配列の複数の縮重配列を含み得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは支持体に結合している。いくつかの実施形態では、装置は、複数のスポット又は特徴部を有する固体担体を含み、該複数のスポットの各々は、支持体に結合した複数のオリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、その3'末端を介して固体担体に共有結合で連結さ

れる。しかし、他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、その5'末端を介して固体担体に共有結合で連結される。

【0293】

幾つかの実施形態において、表面または支持体に結合されたオリゴヌクレオチドは、それらの3'末端を介して固定される。それは、3'末端によって（例えば2、3、4、5、6、7、10、15、20ヌクレオチドまたはそれより多く、5'末端より下流）（また別の例として、配列の3'側の半分、三分の一、または四分の一）（さらに別の例として、絶対的な3'末端から2、3、4、5、6、7、10、15または20ヌクレオチド未満離れて）および5'末端によって（例えば2、3、4、5、6、7、10、15、20ヌクレオチドまたはそれより多く、3'末端より上流）（また別の例として、配列の5'側の半分、三分の一、または四分の一）（さらに別の例として、絶対的な5'末端から2、3、4、5、6、7、10、15または20ヌクレオチド未満離れて）が意図されることが認識されよう。例えば、オリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列（例えば、縮重結合配列）、リンカーまたはスペーサー（例えば、ハイブリダイゼーションに関与しない部分）を介して、支持体上に固定化され得る。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、スペーサーまたは支持体からオリゴヌクレオチド配列を分離するリンカーを含む。有用なスペーサーまたはリンカーは光切断性リンカー、または他の伝統的な化学的リンカーを含む。一実施形態において、オリゴヌクレオチドは、切断可能な結合部分を介して固体担体に結合させることができる。例えば、固体担体は、オリゴヌクレオチドへの共有結合のための切断可能なリンカーを提供するために官能化され得る。リンカー部分は、長さが6以上の原子であってもよい。代替的に、切断可能部分は、オリゴヌクレオチド内であってもよく、インサートの合成の間に導入されてもよい。広範囲で多様な切断可能部分は、固相およびマイクロアレイオリゴヌクレオチド合成の技術分野で利用可能である（Pon, R., *Methods Mol. Biol.* 20:465-496 (1993); Verma et al., *Annu. Rev. Biochem.* 67:99-134 (1998); U. S. Patent Nos. 5,739,386, 5,700,642 and 5,830,655; and U. S. Patent Publication Nos. 2003/0186226 and 2004/0106728）。適切な切断可能部分は、とりわけ、ヌクレオシド塩基の保護基の性質、固体担体の選択及び／又は試薬送達様式に適合するように、選択され得る。典型的な実施形態において、固体担体から切断されたオリゴヌクレオチドは、遊離の3'-OH末端を含む。代替的に、遊離3'-OH末端はまた、オリゴヌクレオチドの切断後、化学的または酵素的処理によって得ることができる。様々な実施形態において、本発明は、溶液中への支持体または表面に結合したオリゴヌクレオチドの放出のための方法および組成物に関する。切断可能部分は、オリゴヌクレオチドを分解しない条件下で除去され得る。好ましくは、リンカーは、2つのアプローチ、つまり、脱保護工程と同じ条件下で同時に、またはその後脱保護工程の完了後にリンカー切断のための異なる条件または試薬を利用して、切断され得る。

【0294】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、溶液中にある。例えば、オリゴヌクレオチドは、異なる個別の特徴部にて、液滴またはマイクロ液滴として離散的な容積内で提供され得る。幾つかの実施形態において、約0.5 pLと約100 nLとの間の離散的な微小容積が使用され得る。しかしながら、より小さいかより大きな容量が使用されてもよい。幾つかの実施形態において、ポンプにより作動されるマイクロ構造を介するフローなどの、適切なディスペンサーまたは連続的な流れは、100 nL未満の、10 nL未満の、5 nL未満の、100 pL未満の、10 pL未満の、又は0.5 pL未満の容積を、本明細書に記載の基板の微細構造およびそれらの間に転送するために使用され得る。例えば、オリゴヌクレオチド合成ウェーハの1つ以上のマイクロ構造からの小さな容量は、オリゴヌクレオチド合成ウェーハを介して流体を押すことにより、キャップ要素のリアクターキャップへと分配され得る。

【0295】

幾つかの実施形態において、複数のヌクレオチド酸構築物は、支持体の別の特徴部で設けられる。幾つかの実施形態において、短いオリゴヌクレオチド、より長い／組み立てのポリヌクレオチドを含む核酸構築物は、部分的に二重らせんまたは二本鎖のオリゴヌクレオチドである。本明細書で使用する場合、用語「二本鎖 (duplex)」は、二本鎖である核酸分子を少なくとも部分的に指す。用語「ヌクレオシド (nucleoside)」または「ヌクレオチド (nucleotide)」は、修飾された既知のプリンおよびピリミジン塩基のみならず、他の複素環塩基を含むことを意図している。こうした修飾は、メチル化プリンまたはピリミジン、アセチル化プリンまたはピリミジン、アルキル化リボースまたは他の複素環、または本明細書に記載の又は当該技術分野において既知の他の適切な修飾を含む。さらに、用語「ヌクレオシド (nucleoside)」および「ヌクレオチド (nucleotide)」は、従来のリボース及びデオキシリボース糖のみならず他の糖も同様に含有するそれらの部分を含む。修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドはまた、糖部分の修飾を含み、例えば、ヒドロキシル基の1つ以上がハロゲン原子または脂肪族基で置換されているか、またはエーテル、アミンなどとして官能化される。

10

【0296】

本明細書に使用されているように、用語「ヌクレオシド (nucleoside)」および「ヌクレオチド (nucleotide)」は、従来のプリンおよびピリミジン塩基（例えばアデニン (A)、チミン (T)、シトシン (C)、グアニン (G) およびウラシル (U)）を含有するヌクレオシドおよびヌクレオチドのみならず、その保護形態（すなわち、ここで塩基はアセチル、ジフルオロ、トリフルオロアセチル、イソブチリル、ベンゾイル、ならびにプリンおよびピリミジンアナログなどの保護基で保護されている）を指す。適切なアナログは、当業者に既知であり、適切なテキストおよび文献に記載されている。一般的なアナログとしては、限定されないが、1-メチルアデニン、2-メチルアデニン、N6-メチルアデニン、N6-イソペンチルアデニン、2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデニン、N、N-ジメチルアデニン、8-ブロモアデニン、2-チオシトシン、3つのメチルシトシン、5-メチルシトシン、5-エチルシトシン、4-アセチルシトシン、1-メチルグアニン、2-メチルグアニン、7-メチルグアニン、2, 2-ジメチルグアニン、8-ブロモグアニン、8-クロログアニン、8-アミノグアニン、8-メチルグアニン、8-チオグアニン、5-フルオロウラシル、5-ブロムウラシル、5-クロロウラシル、5-イオドウラシル、5-エチルウラシル、5-プロピルウラシル、5-メトキシウラシル、5-ヒドロキシメチルウラシル、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-メチルアミノメチル）ウラシル、5-（カルボキシメチルアミノメチル）ウラシル、2-チオウラシル、5-メチル-2-チオウラシル、5-（2つのプロモビニル）ウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、偽ウラシル (pseudouracil)、1-メチル偽ウラシル (methyl pseudouracil)、クエオシン (quanosine)、イノシン、1-メチルイノシン、ヒポキサンチン、キサンチン、2-アミノプリン、6-ヒドロキシアミノプリン、6-チオプリンおよび2, 6-ジアミノプリンを含む。さらに、用語「ヌクレオシド (nucleoside)」および「ヌクレオチド (nucleotide)」は、従来のリボース及びデオキシリボース糖のみならず他の糖も同様に含有するそれらの部分を含む。修飾されたヌクレオシド又はヌクレオチドはまた、糖部分の修飾を含み、例えば、ヒドロキシル基の1つ以上がハロゲン原子または脂肪族基で置換されているか、またはエーテル、アミンなどとして官能化される。

20

30

40

【0297】

本明細書で使用されているように、用語「オリゴヌクレオチド (oligonucleotide)」はポリデオキシヌクレオチド（2-デオキシD-リボースを包含する）ポリリボヌクレオチド（D-リボースを包する）、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドである他のタイプのポリヌクレオチド、非ヌクレオチドの骨格（例えばPNA）を

50

包含する他のポリマーを総称し、ポリマーは、DNAおよびRNAに見られるように、塩基対形成および塩基スタッキングを可能にする構成で核酸塩基を含有する。したがってこれらの用語は、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど）を持つもの、負帯電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、及び正帯電結合（例えば、アミノアルキルホスホラミダイト、アミノアルキルホスホトリエステル）を持つものなどの、例えば一つ以上のアナログと天然に存在するヌクレオチドのヌクレオチド間修飾による置換、例えば、（ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリジンなどを含む）タンパク質などのペンダント部分を含むもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート剤（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）を含むものなど、オリゴヌクレオチド修飾の既知のタイプを含んでいる。用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」間の長さに意図した区別はなく、これらの用語は交換可能に使用される。

【0298】

用語「付けられた (attached)」例えばそれに「付けられた (attached)」部分を有する基板表面におけるように、共有結合、吸着および物理的な固定を含む。用語「結合 (binding)」、「結合された (binding)」は、用語「付けられた (attached)」と意味において同一である。

【0299】

様々な実施形態において、本発明は核酸以外の分子の化学合成など合成に関する。用語「ペプチド」、「ペプチジル」および「ペプチド性の (peptidic)」は、明細書および請求の範囲にわたって使用されるように、2つ以上のアミノ酸で構成された任意の構造を含むように意図される。大部分について、存在するアレイ中のペプチドは、約5～10,000のアミノ酸、好ましくは約5～1000アミノ酸を含む。ペプチドの全てまたは一部を形成するアミノ酸は、20個の従来の天然に存在するアミノ酸のいずれかすなわち、アラニン (A)、システイン (C)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、フェニルアラニン (F)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、リジン (L)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、アスパラギン (N)、プロリン (P)、グルタミン (Q)、アルギニン (R)、セリン (S)、スレオニン (T)、バリン (V)、トリプトファン (W)、およびチロシン (Y)、であり得る。現在の配列を形成するペプチドの分子中のアミノ酸のうちのどれでも、非従来のアミノ酸と取り替えられ得る。一般的に、保存的な置換が好まれる。保存的置換は、その特性（例えば、電荷、疎水性、立体的嵩高；例えば、ValをNvalで置換し得る）の1つ以上においてオリジナルに似た、非従来型のアミノ酸で元のアミノ酸を置換する。用語「非従来型のアミノ酸」は、従来のアミノ酸以外のアミノ酸を指し、および、例えば従来のアミノ酸の異性体および改変（例えば、D-アミノ酸）、非タンパク質アミノ酸、翻訳後修飾アミノ酸、酵素修飾アミノ酸、アミノ酸を模倣するように設計された構築物または構造（例えば、 α 、 α 二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、 β アラニン、ナフチルアラニン、3-ピリジルアラニン、4-ヒドロキシプロリン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、およびノルロイシン）、および、ペプチド骨格内の1つ以上の部位にて非従来型の結合と置換される、天然に存在するアミド-C(=O)-NH-結合（N-置換アミド、エステル、チオアミド、レトロペプチド（-NHCO-）、レトロチオアミド（-NHCS-）、スルホンアミド（-SO₂-NH-）、および／またはペプトイド（N-置換されたグリシン（(N-substituted glycine)）の結合など）を含む。従って、配列のペプチドの分子は偽ペプチドおよびペプチド模倣薬（peptidomimetics）を含んでいる。本発明のペプチドは、（a）天然に存在することができ、（b）化学合成によって生成され得、（c）組換えDNA技術により生成され得、（d）より大きな分子の生化学的または酵素的断片化によって生成され得、（e）上記（a）から（d）の方法の組み合わせから生じる方法によって生成され得、または（f）ペプチドを生成するための任意の他の

10

20

30

40

50

手段によって生成され得る。

【0300】

用語「オリゴマー」は、例えば、ヌクレオチド、アミノ酸、炭水化物等の部分を繰り返す任意のポリヌクレオチドおよびポリペプチドまたは他の化学化合物を包含することを意味する。

【0301】

いくつかの例では、装置は、特定の場所（すなわち、「アドレス（address）」）において、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、18、20、25、30、40、50、100、1,000、4,000、10,000、100,000、1,000,000またはそれ以上の異なる特徴部（または「領域」または「スポット」）を有する。機器が1つ以上の固体担体を含み得ることが認識されよう。装置の対処可能位置（addressable location）はそれぞれ、異なるオリゴヌクレオチドのような異なる構成を持ち得る。代替的に、装置の対処可能位置の群は、全くまたは実質的に同様の構成（例えばオリゴヌクレオチド）を持ち得、それは装置のマイクロ構造の他の群において保持されるものとは異なる。

【0302】

個別に対処可能な位置および／または混合集団において本発明の方法によって調製され得る各オリゴヌクレオチドの数は、5～500,000、500～500,000、1,000～500,000、5,000～500,000、10,000～500,000、20,000～500,000、30,000～500,000、5,000～250,000、5,000～100,000、5～5,000、5～50,000、5,000～800,000、5,000～1,000,000、5,000～2,000,000、10,000～2,000,000、20,000～1,000,000、30,000～2,000,000、50,000～1,000,000など、変動し得る。様々な実施形態において、各オリゴヌクレオチドの約5、10、20、50、100、500、1000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、1000000000、またはより多くのコピーを合成することができる。幾つかの場合において、オリゴヌクレオチドの100000000、1000000000、1000000000、1000000、100000、10000、1000またはより少数のコピーが合成され得る。

【0303】

オリゴヌクレオチドホスホロチオエート（OPS）は、リン酸部分における酸素原子の一つが硫黄で置換されている、修飾されたオリゴヌクレオチドである。非架橋位置において硫黄を有するホスホロチオエート（Phosphorothioates）が広く使用されている。OPSは、ヌクレアーゼによる加水分解に向かって実質的により安定である。この特性は、ヌクレアーゼへの広範囲な曝露を含むインビトロのおよびインビボの適用において、アンチセンスのオリゴヌクレオチドとして使用される、有利な候補であるように、OPSをレンダリングする。同様に、siRNAの安定性を改善するために、少なくとも1つのホスホロチオエート結合は、センス及び／又はアンチセンス鎖の3'-末端にて大抵の場合導入される。幾つかの実施形態において、本発明の方法および組成物は、OPSのデノボ／化学合成に関連する。多くのOPSの合成は、本明細書に記載されている方法および組成物を使用して、平行して行われ得る。

【0304】

一本鎖の核酸の増幅

様々な実施形態において、方法およびシステムは、一本鎖核酸の増幅に関する。従って、一本鎖核酸、例えば一本鎖DNA（ssDNA）は、単独のサンプル中で、または、同じサンプル内に複数の異なる一本鎖核酸を有する複数のサンプル中で、平行して又は多重化様式（multiplexed format）で増幅され得る。平行様式で増幅することができる複数のサンプルは、少なくとも、または少なくとも約1、2、3、4、5、10、20、25、50、55、100、150、200、250、300、350、500、550、600、650、700、750、800、850、900、95

0または1000、またはそれ以上であり得る。平行様式で増幅することができる複数のサンプルは、1乃至1000、2乃至950、3乃至900、4乃至850、5乃至800、10乃至800、20乃至750、25乃至700、30乃至650、35乃至600、40乃至550、45乃至500、50乃至450、55乃至400、60乃至350、65乃至250、70乃至200、75乃至150、80乃至100であり得る。当業者は、平行様式で増幅することができる複数のサンプルがこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば3乃至800m）。多重化増幅反応（multiplexed amplification reactions）の数は、少なくともまたは少なくとも約1、2、3、4、5、10、20、25、50、100またはそれ以上であってもよい。多重化増幅反応の数は、1乃至100と2乃至50、3乃至25、4乃至20、5乃至10の間であってもよい。当業者は、多重化増幅反応の数がこれらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば3乃至100）。

10

【0305】

同じサンプル内の異なる一本鎖核酸（different single stranded nucleic）の数は、少なくともまたは少なくとも約1、2、3、10、50、100、150、200、1000、10000、100000、またはそれ以上であり得る。同じサンプル内の異なる一本鎖核酸の数は、最大でまたは最大で約10000、100000、1000000、200、150、100、50、10、3、2、1、またはそれら未満であり得る。同じサンプル内の異なる一本鎖核酸の数は、1乃至1000000、2乃至1000000、3乃至1000000、10乃至2000、50乃至1000であり得る。当業者は、同じサンプル内の異なる一本鎖核酸の数がこれらの値のいずれかに制約される任意のこれらの範囲内にあり得ることを認識する（例えば3乃至100）。

20

【0306】

一本鎖の標的核酸は、少なくとも、または少なくとも約10、20、50、100、200、500、1000および3000、またはそれらより多くのヌクレオチド長であり得る。一本鎖の標的核酸は、最大で、または最大で約3000、1000、500、200、100、50、20、10、またはそれらより少ないヌクレオチド長であり得る。一本鎖の標的核酸は、50乃至500、75乃至450、または100乃至400のヌクレオチド長であり得る。当業者は、一本鎖の標的核酸の長さが、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば50－1000）。

30

【0307】

図64を参照すると、一本鎖の標的核酸は、1以上のアダプターハイブリダイゼーション配列（adaptor hybridization sequences）により挟まれ得る。これらのアダプターハイブリダイゼーション配列は、少なくともまたは少なくとも約12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれらより大きいヌクレオチド長であり得る。これらのアダプターハイブリダイゼーション配列は、最大でまたは最大で約20、19、18、17、16、15、14、13、12またはそれら未満のヌクレオチド長であり得る。アダプターハイブリダイゼーション配列は、15乃至20、16乃至19、17乃至18のヌクレオチド長であり得る。当業者は、アダプターハイブリダイゼーション配列が、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば15乃至17、12乃至20、または13、25）。アダプターハイブリダイゼーション配列は、サンプル内の複数の核酸によって共有され得、ここでこうした複数の一本鎖核酸は様々な一本鎖の標的核酸の領域を有する。一本鎖核酸の複数の群（各群は異なるアダプターハイブリダイゼーション配列を有する）は、サンプル内に共存し、本明細書に記載の増幅方法に従い得る。異なるアダプターハイブリダイゼーション配列は、少なくともまたは少なくとも約1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50またはそれら以上のヌクレオチドだけ、互い異なってもよい。異なるアダプターハイブリダイゼーション配列は、最大でまたは最大で約50、45、40、35、30、25、20、15、10、5、2、1またはそれら未満のヌクレオチ

40

50

ドだけ、互い異なっているいてもよい。異なるアダプターハイブリダイゼーション配列は、1乃至50、2乃至45、5乃至40、10乃至35、15乃至25、または20乃至30のヌクレオチドだけ、互いに異なっているいてもよい。当業者は、異なるアダプターハイブリダイゼーション配列が、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば2乃至50）。したがって、単一のユニバーサル・アダプター（universal adaptor）は、末端を共有する多くの一本鎖核酸に使用されてもよく、その結果ユニバーサル・アダプターはそれらのすべてとハイブリダイズ可能である。複数のアダプターは、一本鎖核酸の複数の群のサンプル中で使用され得、ここで各アダプターは、1以上の群において末端の配列にハイブリダイズ可能である。少なくともまたは少なくとも約1、2、3、4、5、10、20、25、30、50、100またはそれらより多くのアダプターが、多重化様式で使用され得る。最大でまたは最大で約100、50、30、25、20、10、5、4、3、21、1またはそれら未満のアダプターが、多重化様式で使用され得る。1乃至100、2乃至50、3乃至30、4乃至25、5乃至20の間で、アダプターは多重化様式で使用され得る。当業者は、多重化様式で使用され得るアダプターの数、これらの値のいずれかに制約される任意の範囲内にあり得ることを認識する（例えば2乃至30）。アダプター上の第一の配列は、一本鎖核酸の5'末端へハイブリダイズし得、アダプター上の第二の配列は、同じ一本鎖核酸の3'末端へハイブリダイズし得、一本鎖核酸の環状化を促進する。

10

【0308】

一本鎖核酸は、アダプターとのハイブリダイゼーションに際して環状化され得る。環状一本鎖核酸は、その5'および3'末端で連結され得、連続した円を形成する。種々の連結方法及び酵素は、本明細書の他の箇所記載されるように、そうでなければ当該技術分野において既知であるように、反応するのに適している。

20

【0309】

アダプターは、テンプレートとして環状一本鎖核酸を使用して拡張され得る。代替的に、一つ以上の異なるプライマーは、アダプターに加えてまたはその代わりに、環上のどこか他の場所にアニーリングするために使用され得、ポリメラーゼ酵素を用いて伸長され得る。ローリングサークル増幅、多重プライマーローリングサークル増幅、または任意の他の適切な伸長反応などの伸長反応は、一本鎖テンプレート核酸とアダプターハイブリダイゼーション配列の交代性の複製物を含む、一つの長く直鎖状の一本鎖増幅産物核酸の生成を促進することができる。幾つかの実施形態において、アダプターハイブリダイゼーション配列の組み合わせた複製物（replicas）はアダプター配列のコピーであるか、または8、7、6、5、4または2ヌクレオチド未満まで異なっている。これらの配列は、容易性について共に「アダプター・コピー（adaptor copies）」と呼ばれるが、それらは、テンプレートとして環を使用する伸長反応から生成された多くの異なるタイプの配列を指し得ることは理解されよう。

30

【0310】

1つ以上の補助オリゴヌクレオチド（auxiliary oligonucleotides）は、一本鎖の複製物核酸にアニーリングするように提供され得る。補助オリゴヌクレオチドは、アダプターのコピーに部分的にまたは完全に相補的であり得る。一本鎖アンプリコン核酸への補助オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、一本鎖および二本鎖領域を交互に形成し得る。一本鎖領域は、一本鎖テンプレート核酸配列の複製に対応し得る。一本鎖アンプリコン核酸への補助オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション（例えばアダプターのコピー）は、制限エンドヌクレアーゼ（例えばIIS型制限エンドヌクレアーゼ）などの切断剤（cleaving agent）の認識部位を生成することができる。切断剤の切断部位が一本鎖および二本鎖領域の接合部またはその近くに収まるように、配列は設計され得る。幾つかの場合において、一以上の切断剤による切断の際に、一本鎖標的核酸の複製の一本鎖が形成され、ここで一本鎖標的核酸は、アダプター・コピーからのどんな部分も含まないか、またはアダプター・コピーから15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1ヌクレオチドを含む

40

50

。

【0311】

補助オリゴヌクレオチドは、ビオチンまたはビオチン誘導体などアフィニティータグを有し得る。アフィニティータグは、5'末端、3'末端、またはオリゴヌクレオチドの真ん中であってもよい。サンプルからの補助オリゴヌクレオチドの精製は、ストレプトアビジン被膜ビーズ表面など精製培地、または他の適切なアフィニティー精製法でアフィニティー結合のパートナーを使用して促進されるかもしれない。切断されたアダプター・コピーまたはその部分も、補助のオリゴヌクレオチドと共に精製され得、補助オリゴヌクレオチドとそれらとのハイブリダイゼーションによって促進され得る。複数のアダプターを使用する多重化反応において、複数の補助オリゴヌクレオチドが使用され得、それぞれが、例えばアダプター・コピーの位置にて、一本鎖アンプリコン核酸の異なる群へとハイブリダイズする。HPLCまたはPAGEの精製など、代替的な精製法は、アフィニティータグをつけられたオリゴヌクレオチドと共に、またはそれなしで、使用され得る。

10

【0312】

図65を参照すると、一本鎖核酸は、切断部位がアダプターのコピー内に収まり、一本鎖の標的核酸配列の一本鎖の複製物が、フランキング領域を伴って形成されるように、配列および切断剤が選択されていることを除いて、図64に記載の方法と同様の方法で増幅され得る。こうしたフランキング領域は、オリジナルの一本鎖の標的核酸配列のフランキング領域の逆相補鎖であり得る。代替的に、切断する部位の正確な位置に依存して、それらは1つのフランキング領域からもう一方のフランキング領域へヌクレオチドを「移し」(shift)得る。そのような場合、アダプター・ヌクレオチドに対する逆相補的なオリゴヌクレオチドは、なお両端へ効果的にハイブリダイズすることができ、環状化の別のラウンドを促進する。したがって、図65に例証された方法は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30またはそれより多く、単独で、または図64に示された方法への前駆体反応として、一本鎖標的核酸を増幅するために、複数回繰り返され得る。図64に示す方法は、最後のラウンドで、フランキング領域を取り除くために使用され得、増幅された一本鎖コピーまたは一本鎖標的核酸の複製を残す。

20

【0313】

増幅された所望のオリゴヌクレオチドとアダプターオリゴヌクレオチドの一本鎖の反復ユニットを含む、ローリングサイクル増幅産物などの、伸長反応の生成物は、放たれる所望のオリゴヌクレオチドを生成するために、アダプターオリゴヌクレオチド内またはその近くで切断され得、ここで、放たれる所望のオリゴヌクレオチドは、所望のオリゴヌクレオチドの5'もしくは3'末端にアダプター・ヌクレオチドを含んでいても含んでいなくてもよい。いくつかの実施形態では、切断は、増幅された所望のオリゴヌクレオチドの一本鎖の繰り返し単位と、アダプター配列のちょうど結合で達成される。幾つかの実施形態において、アダプター配列の1つ以上の領域は、分子のバーコード、タンパク結合部位、制限エンドヌクレアーゼ部位、またはその任意の組み合わせを含む。幾つかの実施形態において、増幅産物は、制限エンドヌクレアーゼ認識部位またはその認識部位の近くで、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼにより切断され、ここで、該認識部位はアダプターオリゴヌクレオチド配列内に位置している。エンドヌクレアーゼによる開裂前に、増幅産物は、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を包含するアダプターオリゴヌクレオチド配列に相補的な配列を含む補助オリゴヌクレオチドにより、ハイブリダイズし得る。

30

40

【0314】

増幅産物はタイプIIエンドヌクレアーゼによって認識部位の5'末端で切断され得る。切断部位は、認識部位の第一のヌクレオチドから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25ヌクレオチド、またはそれ以上上流であり得る。認識部位の5'または3'末端は0、1、2、3、4、または5ヌクレオチドの突出を形成し得る。0ヌクレオ

50

チドの突出を伴って切断する平滑タイプIIエンドヌクレアーゼは、MlyIおよびSchIを含む。5'突出末端（例えば1、2、3、4、5ヌクレオチドの突出）を生成する典型的なタイプIISエンドヌクレアーゼは、限定されないが、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、プレ、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst7II、FaqI、AceIII、BbvII、BveIおよびLguIを含む。認識部位を切断し認識部位の5'部位上で除去するニッキングエンドヌクレアーゼ（Nicking endonucleases）は、限定されないが、Nb. BsrDI、Nb. BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl11108I、およびUbaPIを含む。

10

【0315】

増幅産物は、両方の鎖上の認識部位の5'末端で切断する、非タイプIISエンドヌクレアーゼにより切断され得、平滑末端を生成する。増幅産物は、一方の鎖上の認識部位の5'末端で切断する、非タイプIISエンドヌクレアーゼにより切断され得、5'突出末端を生成する。5'突出末端を生成するエンドヌクレアーゼの例は、限定されないが、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyDI、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、Ma

20

【0316】

増幅産物は、認識部位の5'末端で切断する、ニッキングエンドヌクレアーゼにより切断され得、ニックを生成する。ニッキング部位は、認識部位の第一のヌクレオチドから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25ヌクレオチド、またはそれ以上上流であり得る。例示的なニッキングエンドヌクレアーゼは、限定されないが、Nb. BsrDI、Nb. BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl11108I、およびUbaPIを含む。

30

【0317】

増幅産物はタイプIISエンドヌクレアーゼによって認識部位の3'末端で切断され得る。認識部位の5'または3'末端は0、1、2、3、4、または5ヌクレオチドの突出を形成し得る。切断部位は、認識部位の最後のヌクレオチドから1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25ヌクレオチド、またはそれ以上下流であり得る。認識部位の最後のヌクレオチドの下流0ヌクレオチドにて切断するタイプIISエンドヌクレアーゼは、MlyIおよびSchIを含む。3'突出末端（例えば1、2、3、4、5ヌクレオチドの突出）を生成する典型的なタイプIISエンドヌクレアーゼは、限定されないが、MnII、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbIおよびBscCIを含む。ある鎖上の認識部位を除去し、かつ他方の鎖上に3'突出末端または平滑末端を生成する、非タイプIIエンドヌクレアーゼは、限定されないが、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、およびTseFIを含む。認識部位を除去し、認識部位の3'末端を切断するニッキングエンドヌクレアーゼは、Nt. AlwI、Nt. BsmAI、Nt. BstNBIおよびNt. BspQIを含む。

40

【0318】

50

認識部位と切断部位の間の距離は、切断に使用された制限酵素に依存し得る。例えば、最適な反応条件下で効率的に切断し得る認識部位から、1塩基対下流または上流に位置する切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼは、限定されないが、Age I、Apa I、Asc I、Bmt I、Bsa I、BsmBI、BsrGI、Dde I、Dra I I I、Hpa I、Mse I、Pac I、Pci I、Pme I、Pvu I、Sac I I、Sap I、Sau3A I、Sca I、Sfi I、Sma I、Sph I、Stu IおよびXma Iを含む。最適な反応条件下で効率的に切断し得る認識部位から、2塩基対下流または上流に位置する切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼは、限定されないが、Age I、Apa I、Asc I、Bgl I I I、Bmt I、Bsa I、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssH I I、
 10 デイ、Dra I I I、Eag I、Hpa I、Kpn I、Mse I、Nla I I I、Pac I、Pci I、Pme I、Pst I、Pvu I、Rsa I、Sac I I、Sap I、Sau3A I、Sbf I、Sca I、Sfi I、Sma I、Sph I、Ssp I、Stu I、Sty IおよびXma Iを含む。最適な反応条件下で効率的に切断し得る認識部位から、3塩基対下流または上流に位置する切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼは、限定されないが、Age I、Apa I、Asc I、Avr I I、BamH I、Bgl I I I、Bmt I、Bsa I、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssH I I、Dde I、Dra I I I、Eag I、Fse I、Hind I I I、Hpa I、Kpn I、Mfe I、Mlu I、Mse I、Nco I、Nde I、Nhe I、Nla I I I、Nsi I、Pac I、Pci I、Pme I、Pst I、Rsa I、Sac I、Sac I I、Sa I I、Sap I、Sau3A I、Sbf I、Sca I、Sfi I、Sma I、Sph I、Ssp I、Stu I、Sty IおよびXma Iを含む。最適な反応条件下で効率的に切断し得る認識部位から、4塩基対下流または上流に位置する切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼは、限定されないが、Age I、Apa I、Asc I、Avr I I、BamH I、Bgl I I I、Bmt I、Bsa I、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssH I I、Cla I、Dde I、Dra I I I、Eag I、EcoR I、Fse I、Hind I I I、Hpa I、Kpn I、Mfe I、Mlu I、Mse I、Nco I、Nde I、Nhe I、Nla I I I、Nsi I、Pac I、Pci I、Pme I、Pst I、Pvu I、Pvu I I、Rsa I、Sac I、Sac I I、Sa I I、Sap I、Sau3A I、Sbf I、Sca I、Sfi I、Sma I、Sph I、Ssp I、Stu I、Sty I、Xho IおよびXma Iを含む。最適な反応条件下で効率的に切断し得る認識部位から、5塩基対下流または上流に位置する切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼは、限定されないが、Age I、Apa I、Asc I、Avr I I、BamH I、Bgl I I I、Bmt I、Bsa I、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssH I I、Cla I、
 20 デイ、Dra I I I、Eag I、EcoR I、EcoRV、Fse I、Hind I I I、Hpa I、Kpn I、Mfe I、Mlu I、Mse I、Nco I、Nde I、Nhe I、Nla I I I、Nsi I、Nsp I、Pac I、Pci I、Pme I、Pst I、Pvu I、Pvu I I、Rsa I、Sac I、Sac I I、Sa I I、Sap I、Sau3A I、Sbf I、Sca I、Sfi I、Sma I、Sph I、Ssp I、Stu I、Sty I、Xho IおよびXma Iを含む。最適な反応条件下で効率的に切断し得る認識部位から、5塩基対下流または上流に位置する切断部位を有する制限エンドヌクレアーゼは、限定されないが、Age I、Apa I、Asc I、Avr I I、BamH I、Bgl I I I、Bmt I、Bsa I、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssH I I、Cla I、
 30 デイ、Dra I I I、Eag I、EcoR I、EcoRV、Fse I、Hind I I I、Hpa I、Kpn I、Mfe I、Mlu I、Mse I、Nco I、Nde I、Nhe I、Nla I I I、Nsi I、Nsp I、Pac I、Pci I、Pme I、Pst I、Pvu I、Pvu I I、Rsa I、Sac I、Sac I I、Sa I I、Sap I、Sau3A I、Sbf I、Sca I、Sfi I、Sma I、Sph I、Ssp I、Stu I、Sty I、Xho IおよびXma Iを含む。

【0319】

アダプター・シーケンスは1つ以上の制限認識部位を含み得る。いくつかの実施形態において、認識部位は、少なくとも4、5または6塩基対の長さである。いくつかの実施形態において、認識部位は非回文構造である。幾つかの実施形態において、アダプターオリゴヌクレオチドは、2つ以上の認識部位を含む。2つ以上の認識部位が1つ以上の制限酵素により切断され得る。2つ以上の制限酵素による2つ以上の認識部位の切断が、バッファーおよび反応温度の最適化によって達成され、及び／又は完成され得ることは、当業者に既知である。アダプター配列中の認識部位の典型的な対は、限定されないが、Mly I－Mly I、Mly I－Nt. Alw I、Bsa I－Mly I、Mly I－BciVIおよびBfuCI－Mly Iを含む。

【0320】

遺伝子

様々な実施形態中の本発明の方法および組成物は、個々にアクセス可能な対象のポリヌクレオチドの集合を含む遺伝子ライブラリの構築を可能にする。ポリヌクレオチドは直鎖状であり得、ベクター（例えばプラスミドまたはファージ）、細胞（例えば細菌細胞）において精製されたDNAとして、または当該技術分野で既知の他の適切な形態で、維持され得る。ライブラリ・メンバー（クローン、構築物、ポリヌクレオチドなど様々に称される）は、回収および使用の様々な方法で貯蔵することができ、それは例えば、マルチウェル培養またはマイクロタイタープレート中、バイアル中、適切な細胞環境（例えば大腸菌細胞）中、適切な培地での精製されたDNA組成物（例えばStorage IsoCode IDTM DNA library card; Schleicher & Schuell BioScienceで、または当該技術分野で既知の他の適切な様々なライブラリの形態を含む。遺伝子ライブラリは、少なくとも約10、100、200、300、500、600、750、1000、1500、2000、3000、4000、5000、6000、7500、10000、15000、20000、30000、40000、50000、60000、75000、100000のメンバーまたはそれ以上を含み得る。本明細書に記載の核酸分子は、マイクロスケールの量で生成され得る。（例えば、約0.001フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約0.01フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約0.1フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約0.001フェムトモル乃至約0.1ナノモル、約0.001フェムトモル乃至約0.01ナノモル、約0.001フェムトモル乃至約0.001ナノモル、約1.0フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約1.0フェムトモル乃至約0.1ナノモル、約1.0フェムトモル乃至約0.01ナノモル、約1.0フェムトモル乃至約0.001ナノモル、約10フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約10フェムトモル乃至約0.001ナノモル、約20フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約100フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約500フェムトモル乃至約1.0ナノモル、約1ナノモル乃至約800ナノモル約40ナノモル乃至約800ナノモル約100ナノモル乃至約800ナノモル約200ナノモル乃至約800ナノモル約500ナノモル乃至約800ナノモル約100ナノモル乃至約1,000ナノモルなどの、フェムトモルからナノモルの量で）当業者は、核酸の量が、これらの任意の値（例えば約0.001フェムトモルから約1000ナノモル、または約0.001フェムトモルから約0.01フェムトモルまでなど）に制限される任意の範囲内であり得ることを認識している。一般に、核酸分子は、約0.001、0.01、0.1、1、10、100、フェムトモル、1、10、100ピコモル、1、10、100ナノモル、1マイクロモル、またはそれらより多い量で生成され得る。幾つかの実施形態において、核酸分子は、約1マイクロモル、100、10、1ナノモル、100、10、1ピコモル、100、10、1、0.1、0.01、0.001フェムトモルまたはそれ未満で生成され得る。幾つかの実施形態において、核酸分子は、約0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、500、750、1000 nMの濃度で生成され得る。幾つかの実施形態において、遺伝子ライブラリは、1000、100、10、1m³、100、10および1dm³、100、10および1cm³またはそれら未満の空間で、合成され／組み立てられ及び／又は保持される。

【0321】

個々にアクセス可能なメンバーの位置は利用可能になりえるか、または容易に決定することができる。個々にアクセス可能なメンバーは、ライブラリから容易に回収され得る。

【0322】

様々な実施形態において、本発明の方法および組成物は、合成物（すなわち、新規に合成された）遺伝子の産生を可能にする。合成遺伝子を含むライブラリは、PCA、非PCA遺伝子アセンブリ法または階層的遺伝子アセンブリなどの、本明細書の他の場所で詳細に記載される種々の方法によって構築され得、そこでは2つ以上の二本鎖ポリヌクレオチ

10

20

30

40

50

ド（「シントン（synthons）」とここで呼ばれる）を組み合わせ（「ステッチング（stitching）」して）より大きなDNA単位（すなわち、マルチシントンまたはシャーシ（multisynthons or chassis））を生成する。大きな構築物のライブラリは、少なくとも1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、400、500キロバイトの長さまたはそれ以上であるポリヌクレオチドを含んでいてもよい。大きな構成物は、約5000、10000の、20000または50000塩基対の独立して選択される上限によって制限され得る。ポリペプチド・セグメントコード化するヌクレオチド配列の任意の数の合成は、非リボソームペプチド（NRP）をコード化する配列、非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）モジュールおよび合成のバリエーションをコード化する配列、抗体など他のモジュールのタンパク質のポリペプチド・セグメント、他のタンパク質ファミリーからのポリペプチド・セグメント、調節配列などの非コードのDNAまたはRNA（例えば、プロモーター、転写因子、エンハンサー、siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、小さな核仁のRNA、microRNA、または対象の任意の機能的か構造的なDNAまたはRNAユニット）を含む。本明細書で使用される用語「遺伝子」は、コーディングまたは非コードの、長いポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドアナログの任意の型を広く指す。

【0323】

様々な実施形態において、本発明の方法および組成物は遺伝子のライブラリに関する。遺伝子ライブラリは、複数のサブセグメントを含む。1つ以上のサブセグメントでは、ライブラリの遺伝子は共有結合とともに連結され得る。1つ以上のサブセグメントでは、ライブラリの遺伝子は、1つ以上の代謝最終産物で第1の代謝経路の構成要素をコード化する。1つ以上のサブセグメントでは、ライブラリの遺伝子は、1つ以上の標的代謝性最終生成物の生成プロセスに基づいて。選択され得る幾つかの実施形態では、1つ以上の代謝最終産物は、バイオ燃料を含む。1つ以上のサブセグメントでは、ライブラリの遺伝子は、1つ以上の代謝最終産物で第2の代謝経路の構成要素をコード化する。第一および第二の代謝経路の1つ以上の最終生成物は、1つ以上の共有される最終生成物を含み得る。幾つかの場合において、第一の代謝経路は、第二の代謝経路で操作される最終生成物を含む。

【0324】

幾つかの実施形態において、ライブラリのサブセグメントは、例えばウイルス、細菌といった、合成の生体のゲノムの一部またはすべてをコード化する遺伝子を、含み、包含し、本質的に包含し得る。したがって、用語「遺伝子」、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」、「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチド・ポリマーを交換可能にを指す。限定されない限り、同じ物は、自然発生のヌクレオチドと似た方法（例えばハイブリッド形成）で機能し得る天然のヌクレオチドの既知のアナログを含む。それらは、任意の長さのヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドカリボヌクレオチドのいずれか、またはそのアナログの重合体の形式であり得る。ポリヌクレオチドは任意の三寸法構造を有し得、任意の未知または既知の機能を行い得る。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片のコード化またはノンコーディング領域、遺伝子間DNA、連鎖解析から定められた座（遺伝子座）、エキソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）、マイクロRNA（miRNA）および核小体低分子RNA、リボザイム、メッセンジャーRNA（mRNA）の逆転写または増幅によって通常得られるmRNAのDNA提示である相補的DNA（cDNA）；合成的にまたは増幅により生成されたDNA分子は、ゲノムDNA、組み換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログなど修飾されたヌクレオチドを含み得る。存在するとき、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリ

マーのアセンブリの前または後で与えられ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分によって妨げられ得る。ポリヌクレオチドは、標識化構成要素との抱合によってなど、重合の後にさらに修飾され得る。ポリヌクレオチド配列は、提供されるとき、5'から3'方向へと、その他で明示されない限り列挙される。

【0325】

用語核酸は、一本鎖の分子と同様に二本鎖または三本鎖の核酸を包含する。重複または3倍行き詰まった核酸では、核酸繊維は同一時期である必要がない（すなわち、二重らせん構造の核酸は両方の鎖の全長に沿って二重らせん構造である必要がない）。

【0326】

用語核酸はさらにメチル化および／またはキャッピングによってなど、その任意の化学的修飾も包含する。核酸修飾は、個々の核酸塩基に対する又は核酸全体に対する、付加的な電荷、分極率、水素結合、静電的相互作用および機能性を包含する化学基の付加を含み得る。こうした修飾は、2'-位糖修飾、5位ピリミジン修飾、8位プリン修飾、シトシン環外アミンでの修飾、5-ブロモウラシルの置換、骨格修飾などのイソベースイソシチジン (s o b a s e s i s o c y t i d i n e) およびイソグアニジン (i s o g u a n i d i n e) など異常な塩基対の組合せ などの、塩基修飾を含み得る。

【0327】

より具体的には、特定の実施形態において、核酸は、(2-デオキシ-D-リボースを含む) ポリデオキシリボヌクレオチド、(D-リボースを含む) ポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-またはC-グリコシドである核酸の任意の他のタイプならびに非ヌクレオチド骨格を含む他のポリマー、例えば、ポリアミド (例えば、ペプチド核酸 (PNA)) およびポリモルホリン (NeugeneとしてAnti-Virals, Inc., Corvallis, Oreg., から市販で入手可能) ポリマー、および他の合成の配列特異的核酸ポリマー を含むことができ、その結果、ポリマーは、構成においてDNAおよびRNA中に見られる塩基対形成および塩基スタッキングを可能する、核酸塩基を含む。核酸という用語はまた、連結された核酸 (LNAs) も包含し、これは米国特許第6794499号、第6670461号、第6262490号、および第6770748号に記載されており、それらのLNAの開示について、それらの全体が引用により本明細書に組み込まれている。

【0328】

本明細書で使用されているように、用語「相補的な (complementary)」は、2つのヌクレオチド間の正確な対合のための能力を指す。核酸の所定位置のヌクレオチドが別の核酸のヌクレオチドと水素結合できるとき、2つの核酸はその位置で互いに相補的であると考えられる。ヌクレオチドの一部のみが結合している2つの一本鎖核酸分子間の相補性は、「部分的 (partial)」であり得、あるいは、全相補性が一本鎖分子間に存在するときには完全であり得る。核酸鎖の間の相補性の程度は、核酸鎖の間のハイブリッド形成の効率および強さに著しい効果を有する。

【0329】

「ハイブリダイゼーション」および「アニーリング」は、ヌクレオチド残留物の塩基間の水素結合によって安定化される複合体を形成するために、1つ以上のポリヌクレオチドが反応する反応を指す。水素結合は、ワトソン-クリック型塩基対、Hoogsteen結合、あるいは他の配列特異的な方法によって生じ得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、複数本鎖の複合体、単一の自己ハイブリダイズ鎖 (self hybridizing strand) またはこれらの任意の組み合わせを形成する3つ以上の鎖を含みうる。ハイブリダイゼーション反応は、PCRの開始、または他の増幅反応、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断のように、より広範な過程における工程を構成し得る。第二配列のヌクレオチド残留物の塩基と水素結合によって安定化される第一配列は、第二配列に「ハイブリダイズすることができる (hybridizable)」と言われる。そのような場合、第二の配列も第一の配列にハイブリダイズすることができるということができる。

【0330】

ポリヌクレオチドに適用されるように用語「ハイブリダイズされた (hybridized)」は、ヌクレオチド残基物の塩基間の水素結合によって安定化される複合体中のポリヌクレオチドを指す。水素結合は、ワトソン-クリック型塩基対、Hoogsteen結合、あるいは他の配列特異的な方法によって生じ得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、複数本鎖の複合体、単一の自己ハイブリダイズ鎖 (self hybridizing strand) またはこれらの任意の組み合わせを形成する3つ以上の鎖を含みうる。ハイブリダイゼーション反応は、PCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断のように、より広範な過程における工程を構成し得る。与えられた配列によりハイブリダイズされた配列は、与えられた配列の「相補 (complement)」と呼ばれる。

10

【0331】

「特異的なハイブリダイゼーション (Specific hybridization)」は、定められたストリンジェンシー条件下のハイブリダイゼーション混合物中にある他のヌクレオチド配列に対する実質的な結合が不在の、標的ヌクレオチド配列に対する核酸の結合を指す。当業者は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを緩めることが配列ミスマッチに耐性を持たせるのを可能にすることを認識する。

【0332】

一般に、与えられた配列の「補体」は、完全にまたは実質的に相補的で、与えられた配列にハイブリダイズし得る配列である。一般に、第二の配列または第二の配列のセットにハイブリダイズ可能な第一の配列は、第二の配列または第二の配列のセットに特異的または選択的にハイブリダイズ可能であり、その結果、第二の配列または第二の配列のセットに対するハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション反応の間に非標的配列とのハイブリダイゼーションに対して優先する (例えば、当該技術分野において一般に使用されているストリンジェントな条件などの、条件の与えられたセット下で熱力学的により安定している条件)。典型的には、ハイブリダイズ可能な配列は、少なくとも約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および100%の配列の相補性を含む、25% - 100%の相補性のような、それぞれの長さのすべてまたは一部にわたって、の配列相補性の程度を共有している。

20

30

【0333】

用語「プライマー」は、核酸とハイブリダイズする (「アニーリング」とも称される) ことができ、適切なバッファー中で適温にて適切な条件下 (すなわち4つの異なるヌクレオチド三リン酸、およびDNAまたはRNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合のための薬剤の存在) でヌクレオチド (RNAまたはDNA) 重合のための開始部位として働くことができる。プライマーの適切な長さは、プライマーの意図した用途に依存するが、プライマーは長さにおいて、典型的には少なくとも7ヌクレオチド長であり、より典型的には10から30ヌクレオチドまで、さらに典型的には15から30ヌクレオチドまでの長さの範囲である。他のプライマーは多少長くなり得、例えば、30から50または40 - 70のヌクレオチド長であり得る。当業者は、プライマーの長さが、これらの任意の値 (例えば7から70、または50から70までなど) に制限される任意の範囲内であり得ることを認識している。さらに本明細書に記載されているように様々な長さのオリゴヌクレオチドは、増幅及び/又は遺伝子アセンブリ反応のためにプライマーまたは構築ブロックとして使用され得る。この文脈では、「プライマーの長さ (primer length)」は、相補的な「標的 (target)」配列にハイブリダイズし、且つヌクレオチド合成を刺激する (primes) オリゴヌクレオチドまたは核酸の部分の指す。短いプライマー分子は、一般的に、テンプレートと十分に安定なハイブリッド複合体を形成するためにより低い温度を必要とする。プライマーは、テンプレートの正確な配列を反映する必要はないが、テンプレートとハイブリダイズするために十分に相補的でなければならない。用語「プライマー部位 (primer site)」または「プライマー結合部位

40

50

(primer binding site)」は、プライマーがハイブリダイズする標的核酸のセグメントを指す。プライマー結合部位を提示する構築物は、しばしば、「プライミング読み取り構築物 (priming ready construct)」または「増幅準備構築物 (amplification ready construct)」と呼ばれる。

【0334】

プライマーは、プライマーまたはその一部が核酸内のヌクレオチド配列にハイブリダイズする場合、別の核酸にアニーリングすると言われる。プライマーが特定のヌクレオチド配列にハイブリダイズするという状態は、プライマーがそのヌクレオチド配列に完全にまたは排他的にハイブリダイズすることを示唆するようには意図されない。

10

【0335】

オリゴヌクレオチド合成

本明細書に記載の基材上に合成されたオリゴヌクレオチドは、好ましくは20, 10, 5, 1, 0.1 cm² またはそれ未満の領域において、約100より多く、好ましくは約1000より多く、より好ましくは約16, 000より多く、そして最も好ましくは50, 000または250, 000またはさらに約1, 000, 000よりも多くの異なるオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。

【0336】

約または少なくとも約100ー、150ー、200、250ー、300、350ー、またはそれより長い、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチドのようなn量体を迅速に合成する方法が、様々な実施形態において本明細書で記載される。該方法は、ヌクレオチド結合に適した化学部分で官能化される分解された場所を基板に提供する工程、標準のホスホロミダイト化学作用は、ある場合において使用され得る。したがって、少なくとも二つの構築ブロックは、少なくとも3つの速度、のように、時間あたり3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、125、150、175、200ヌクレオチドまたはそれ以上の比率など、早い比率で分解された場所の一つに各々存在する、複数の伸長するオリゴヌクレオチド鎖につながれる。幾つかの実施形態において、アデニン、グアニン、チミン、シトシンまたはウリジンの構築ブロックあるいはそのアナログ／修飾されたバージョンが、明細書の他の箇所ですらに詳細に記載されるように使用される。幾つかの場合において、加えられた構築ブロックは、ジヌクレオチド、トリヌクレオチド、または、約または少なくとも約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50またはそれより多くのヌクレオチドを含む構築ブロックなどの、より長いヌクレオチドに基づいた構築ブロックを含む。幾つかの実施形態において、nー量体オリゴヌクレオチドの大きなライブラリは、基板（例えば、約または少なくとも約100、1000、10000、100000、1000000、2000000、3000000、4000000、5000000の、オリゴヌクレオチド合成が行われる分解された場所を備える基板）上で平行して合成される。個々の場所は、互いに異なるオリゴヌクレオチド合成を行い得る。幾つかの実施形態において、ホスホロミダイト化学作用（例えば結合、キャッピング、酸化、非ブロック化の工程）の流れの間、試薬の用量は、新しい構築ブロックの結合に先立つ真空乾燥の工程など、液体および真空乾燥工程の連続的な／置き換えの流れのサイクルを通じて、正確に制御され得る。基板は、基板の第一の表面および第二の表面の間に流体連通を提供する、少なくとも約100、1000、10000、100000または1000000またはそれより多いビアなど、ビアを含みうる。基板は、ホスホロミダイト化学作用サイクル内の1またはステップの全ての間に所定の位置に保持され得、フロー試薬は基板を通過され得る。

20

30

40

【0337】

合成核酸を調製するための一般的な方法は、Caruthersの基本的な仕事に基づ

50

いており、ホスホラミダイト法として既知である (M. H. Caruthers, *Methods in Enzymology* 154, 287-313, 1987; その全体が引用により本明細書に組み込まれる)。結果として生ずる分子の配列は、合成の順序により制御され得る。H-ホスホネート法などの他の方法は、サブユニットからのポリマーの連続合成と同じ目的を果たす。

【0338】

典型的には、本発明の方法によるDNAオリゴマーの合成は、従来のホスホラミダイト化学作用によって達成され得る。核酸のホスホラミダイトベースの化学合成は、Streyer, *Biochemistry* (1988) pp 123-124 および米国特許第4,415,732号で検討されているように当業者に周知である。本発明と共に使用可能である、B-シアノエチル (CE) ホスホラミダイト・モノマーおよびCPG (制御された多孔質ガラス) 試薬は、American International Chemical (Natick Mass.)、BD Biosciences (Palo Alto Calif.) およびその他を含む多数の市販の供給源から購入され得る。

【0339】

様々な実施形態において、核酸の化学合成は、圧倒的に、固体表面にホスホラミダイト化学作用の変形を用いて行われ (Beaucage SL, Caruthers MH. *Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxy polynucleotide synthesis. Tetrahedron Lett.* 1981;22:1859-1862; Caruthers MH. *Gene synthesis machines - DNA chemistry and its uses. Science.* 1985;230:281-285.)、それらの両方は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0340】

例えば、ホスホラミダイトベースの方法が、デオキシリボ核酸及びリボ核酸ならびに核酸アナログの、豊富な塩基、バックボーンおよび糖の修飾を合成するために、使用され得、(Beaucage SL, Iyer RP. *Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. Tetrahedron.* 1992;48:2223-2311; Beigelman L, Matulic-Adamic J, Karpeisky A, Haeberli P, Sweedler D. *Base-modified phosphoramidite analogs of pyrimidine ribonucleosides for RNA structure-activity studies. Methods Enzymol.* 2000;317:39-65; Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH. *Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. Drug Discov. Today.* 2005;10:587-593; Pankiewicz KW. *Fluorinated nucleosides. Carbohydrate Res.* 2000;327:87-105; Lesnikowski ZJ, Shi J, Schinazi RF. *Nucleic acids and nucleosides containing carboranes. J. Organometallic Chem.* 1999;581:156-169; Foldesi A, Trifonova A, Kundu MK, Chattopadhyaya J. *The synthesis of deuterionucleosides. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2000;19:1615-1656; Leumann CJ. *DNA Analogs*

10

20

30

40

50

gues: from supramolecular principles to biological properties. *Bioorg. Med. Chem.* 2002;10:841-854; Petersen M, Wengel J.

LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.* 2003;21:74-81; De Mesmaeker A, Altmann K-H, Waldner A, Wendeborn S. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995;5:343-355)、それらは、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0341】

ホスホラミダイト化学作用は、固体の基板（例えばマイクロアレイ）上のDNAのインサイツの合成に適用されてきた。このような合成は、典型的には、合成サイクルの一工程の空間的制御によって達成され、これは小さな領域、例えば数平方センチメートルの小さな領域に分布するユニークな、何百から何千ものオリゴヌクレオチドが結果として生じる。オリゴヌクレオチドの合成用の領域および基板の構造はさらに、本明細書により詳しく別記される。空間的制御を達成するために使用される適切な方法は、(i) インクジェット印刷または物理的マスクによるカップリング工程の制御 (Agilent, Protogene; Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat. Biotechnol.* 2001;19:342-347; Butler JH, Cronin M, Anderson KM, Biddison GM, Chatelain F, Cummer M, Davi DJ, Fisher L, Frauendorf AW, Frueh FW, et al. In situ synthesis of oligonucleotide arrays by using surface tension. *J. Am. Chem. Soc.* 2001;123:8887-8894)

20

30

or physical masks (Southern EM, Maskos U, Elder JK. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics.* 1992;13:1008-1017.)、(ii) 光不安定性モノマーの、古典的な (Affymetrix; Pease AC, Solas D, Sullivan E J, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid dna-sequence analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1994;91:5022-5026.)、およびマスクレスの (Nimblegen; Singh-Gasson S, Green RD, Yue YJ, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, Cerrina F. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat. Biotechnol.* 1999;17:974-978)

40

フォトリスグラフィ脱保護による、5エーヒドロキシル非ブロック化工程の制御 (iii) 標準的な脱トリチル化を行うための、光生成酸のデジタル活性化 (Xeotron/Atac

50

tic; Gao XL, LeProust E, Zhang H, Srivannavit O, Gulari E, Yu PL, Nishiguchi C, Xiang Q, Zhou XC. A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:4744-4750) を含み得、それら全ては、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0342】

基板上に作られたオリゴヌクレオチドは、それらの固体表面から切断し、必要に応じて
プールすることができ、その結果、遺伝子アセンブリ、核酸増幅、配列決定ライブラリ、
shRNAのライブラリなど (Cleary MA, Kilian K, Wang YQ, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, et al.

Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. *Nature Methods.* 2004; 1:241-248)、遺伝子合成 (Richmond KE, Li MH, Rodesch MJ, Patel M, Lowe AM, Kim C, Chu LL, Venkataramaiah N, Flickinger SF, Kaysen J, et al. Amplification and assembly of chip-eluted DNA (AACED): a method for high-throughput gene synthesis. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:5011-5018; Tian J D, Gong H, Sheng NJ, Zhou XC, Gulari E, Gao XL, Church G. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. *Nature.* 2004;432:1050-1054)、および部位特異的変異誘発 (Saboulard D, Dugas V, Jaber M, Broutin J, Souteyrand E, Sylvestre J, Delcourt M. High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips. *BioTechniques.* 2005;39:363-368) のような、新しい応用が可能となり、それら全ては、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0343】

長い高品質のオリゴヌクレオチドの成功した合成は、高い段階的なカップリング収率、例えば少なくとも約99.5%である段階的なカップリング収率により、強く支持される。様々な実施形態において、本発明の方法および組成物は、98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%、99.96%、99.97%、99.98%、99.99%、またはそれ以上のカップリング収率を熟慮する。カップリング効率がより低い例えば99%未満の場合に、理論によって拘束されることなしで、シーケンスの完全性 (integrity) への影響は、典型的には2つのうち1つのシナリオに従う。キャッピングが使用される場合、低いカップリング効率は短い切断された配列によって明示されるだろう。キャッピングが使用されない場合、またはキャッピングが不成功しない場合、一塩基の欠失がオリゴヌクレオチドに生じ、結論として、1つまたは2つのヌクレオチドを欠く多くの不全の配列が形成される。5'-ヒドロキシル保護基の効率的な除去は、例えば98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%、99.96%、99.97%、99.98%、99.99%、またはそれより多くと等しいかまたは大きい、各サイクル内で100%に近接する非常に高い効率などの望ましくは高い収率にて

、長い高品質のオリゴヌクレオチドの合成をさらに支援する。この工程は、本明細書に記載される方法および組成物を用いて、試薬の用量の正確な制御ならびに他の環境パラメータによって最適化され得、その結果、所望の生成物に加えて一塩基の欠失を有するオリゴマーのファミリーを含む最終生成物の混入を回避することができる。

【0344】

さらに、長いオリゴヌクレオチドの合成のためには、最も一般的な副反応—脱プリン化を最小限にすることが重要である (Carr PA, Park JS, Lee YJ, Yu T, Zhang SG, Jacobson JM. Protein-mediated error correction for de novo dna synthesis. Nucleic Acids Res. 2004; 32: 10
e162)。脱プリン化は、典型的には、鎖延長を妨げない脱塩基部位の形成をもたらす。重大なDNA損傷は、塩基性条件下での最終的な核酸塩基の脱保護の間に生じ、それは脱塩基部位でのオリゴヌクレオチド鎖を切断する。理論に束縛されることなく、脱プリン化は、典型的にはプリン核酸塩基にマッピングすることができる短い切断された配列を生成することによって、配列の完全性に影響を及ぼし得る。したがって、オリゴヌクレオチドの高収率、高品質の合成は、非常に効率的な結合および5'-ヒドロキシル脱保護反応と組み合わされた脱プリンの制御によって支持される。高いカップリング収率及び低い脱プリンにより、長い、高品質のオリゴヌクレオチドは、低い収率を補償する大規模な精製および／またはPCR増幅を必要とせずに合成することができる。様々な実施形態において、本発明の方法および組成物は、高いカップリング収率、低い脱プリン化、及び保護基の効果的な除去を達成するための条件を提供する。 20

【0345】

様々な実施形態において、本明細書に記載の本発明の方法および組成物は、官能化された基板上、例えば当該技術分野で公知の適切な修飾を必要に応じて用いてシリル化されたウェーハ上で、標準的なホスホラミダイト化学作用に依存している。典型的にはモノマー、例えば、ホスホラミダイト化学作用のための適切な修飾を備えたモノヌクレオチド、ジヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドの付着後に、以下のステップの1つ以上が、インサイツで高品質のポリマーの段階的合成を達成するために、少なくとも一回行われ得る：1) カップリング、2) キャッピング、3) 酸化、4) 硫化、5) 非ブロック化 (脱トリチル化)、および6) 洗浄。典型的には、酸化又は硫化のいずれが、工程として使用されるが、両方ではない。図11は、カップリング、キャッピング、酸化及び非ブロック化の工程を含む4工程のホスホラミダイト合成方法を例示している。 30

【0346】

成長しているオリゴデオキシヌクレオチドの伸長は、典型的には、リン酸トリエステルのヌクレオチド間の結合の形成を介して、ホスホラミダイト構築ブロックのその後の添加によって達成され得る。カップリング工程の間、典型的にはアセトニトリル中0.02-0.2M濃度のホスホラミダイト構築ブロック (例えばヌクレオシドホスホラミダイト) (またはいくつかのホスホラミダイトの混合物) の溶液は、例えば、典型的には0.2から0.7Mの濃度の、酸性アゾール触媒、1H-テトラゾール、2-エチルチオテトラゾール (Sproat et al., 1995, "An efficient method for the isolation and purification of oligoribonucleotides". Nucleosides & Nucleotides 14 (1&2): 255-273) 2-ベンジルチオテトラゾール (Stutz et al., 2000, "Novel fluoride-labile nucleobase-protecting groups for the synthesis of 3'-(2')-O-amino-acylated RNA sequences", Helv. Chim. Acta 83 (9): 2477-2503; Welz et al., 2002, "5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite buildi 40
50

ng blocks in RNA synthesis", Tetrahedron Lett., 43 (5): 795-797)、4,5-ジシアノイミダゾール (Vargeese et al., 1998, "Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis", Nucl. Acids Res., 26 (4): 1046-1050)、または多くの同様の化合物の溶液によって、活性化され得る。構成要素が、本明細書の他の部分でさらに詳細に記載される適切な基板の選択されたスポットに送達されている間、混合は、インクジェットの流体ラインで達成され得る。上記のように活性化されたものなどのホスホラミダイト構築ブロックは、典型的には、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倍超、またはそれより多く提供され、基板結合材料 (substrate-bound material) は、その後、出発固体担体 (starting solid support) (第一のカップリング) または支持体結合オリゴヌクレオチド前駆体 (support-bound oligonucleotide precursor) (その後のカップリング) に導かれる。3' から 5' への合成において、前駆体の 5'-ヒドロキシ基は、亜リン酸トリエステル結合を形成するように入ってくるヌクレオシドホスホラミダイトの、活性化されたホスホラミダイト部分と反応するように設定され得る。反応は、特にホスホラミダイトの希釈溶液が使用される場合に、水の存在にも非常に敏感であり、典型的には無水アセトニトリル中で行われる。カップリングが完了した後、未結合の試薬および副産物は洗浄工程によって除去され得る。

【0347】

カップリング反応の生成物は、キャッピング剤で処理され得、それは、例えば不全の配列をエステル化でき、および／または複素環式塩基上でリン酸反応生成物を切断できる。キャッピング工程は、無水酢酸と、触媒としての1-メチルイミダゾールまたはDMA Pとの混合物により、固体担体結合材料を処置することにより行われ得、2つの目的に役立ち得る。共役反応の完成の後、固体担体に結合した5'-OH基 (例えば0.1~1%) の画分は、反応しないままであってもよい。これらの未反応基は、(n-1) ショートマーと一般に呼ばれる内部の塩基の欠失を有するオリゴヌクレオチドの形成を防止するために、恒久的にさらなる鎖の伸長を阻止され得る。未反応の5'-ヒドロキシル基をキャッピング混合物によりアセチル化することができる。さらに、1Hテトラゾールにより活性化されたホスホラミダイトはグアノシンのO6位で、小さな程度まで、反応することが理解される。理論に束縛されることなく、I2/水による酸化に際して、この副生成物は、おそらくO6-N7の移行を介して、脱プリンを受け得る。脱プリン塩基の部位はこのように、完全長生成物の収率を低下させるオリゴヌクレオチドの最終的な脱保護の過程で、切断され得る。O6修飾は、I2/水による酸化の前にキャッピング試薬での処理によって除去され得る。

【0348】

オリゴヌクレオチドホスホロチオエートの合成 (OPS; さらなるに詳しく本明細書に別記された) は、一般的にI2/水による酸化を含まず、その分、上記の副反応を受けない。一方、キャッピング混合物は、硫黄転移反応を妨げ得る。理論に束縛されることなく、キャッピング混合物は、所望のPSトリエステルの代わりに、リン酸トリエステルのヌクレオシド間結合の広範な形成を引き起こし得る。それ故、OPSの合成について、硫化工程は任意のキャッピング工程に先立って行われてもよい。

【0349】

支持体に結合した材料は、典型的には、弱い塩基 (例えばピリジン、ルチジン、またはコリジン) の存在下で、ヨウ素および水で処理され得、その結果、天然に存在するリン酸ジエステルのヌクレオシド間の結合の保護された前駆体である、亜リン酸トリエステルの四配位リン酸トリエステルへの酸化に影響を与える。酸化は、例えばtert-ブチルヒ

ドロペルオキシドまたは(1S) - (+) - (10-カンファースルホニル) - オキサジリジン(CSO)を用いて、無水条件下で行われ得る。酸化工程は、オリゴヌクレオチドホスホロチオエートを取得するための硫化工程で置換され得る。

【0350】

オリゴヌクレオチドホスホロチオエート(OPS)の合成は、様々な実施形態において、本発明の方法および組成物を用いて、天然オリゴヌクレオチドと同様に達成され得る。簡潔には、酸化工程は、硫黄転移反応(脱硫)により置換することができ、任意のキャッピング工程は、脱硫後に行うことができる。多くの試薬は効率的な硫黄除去が可能であり、それは限定されないが、3-(ジメチルアミノメチリデン)アミノ-3H-1, 2, 4-ジチアゾール-3-チオン、DDTT、3H-1, 2-ベンゾチアゾール-3-オン1, 1-ジオキシド(ボーケージ試薬としても知られている)、およびN、N'、N'-テトラエチルチウラムジスルフィド(TETD)を含む。

10

【0351】

非ブロック化(または脱トリチル化)の工程は、例えば、不活性溶媒(ジクロロメタンまたはトルエン)中の2%トリクロロ酢酸(TCA)または3%ジクロロ酢酸(DCA)などの酸の溶液で、DMT基等の保護基を除去するのに役立ち得る。洗浄工程が行なわれ得る。固体担体に結合されたオリゴヌクレオチド前駆体は、遊離した5'-末端の水酸基を持つように影響される。長時間の、または酸のより強い推奨された溶液での脱トリチル化を行うと、固体担体に結合したオリゴヌクレオチドの脱プリン増加につながり得、故に所望の完全長の生成物の収率を低下させる。本明細書に記載の本発明の方法および組成物は、望ましくない脱プリン反応を制限する制御された非ブロック化の条件を提供する。

20

【0352】

置換プロセスは、有用な範囲内でオリゴヌクレオチド合成場所の化学剤を十分に制御するように最適化することができる。投与量は、目的の反応(脱トリチル)および副反応(脱プリン化)の程度の両方の終了とでの時刻、濃度および温度の積算運動効果を総称し得る。

【0353】

さらに、脱トリチル化は、可逆的であることによって、一つ以上の適切なヌクレオチドを欠いているオリゴマーの一連の合成をもたらし得る。Sierzchalaらにより提案された(Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: A two-step cycle using peroxy anion deprotection, J. Am. Chem. Soc. 2003; 125: 13427-13441)二段階の合成サイクルは、アリルオキシカルボニル基を除去するために、例えばpH約9.6の穏やかな塩基性条件下で緩衝されるペルオキシアニオンを利用し、これは一般的に4段階のホスホラミダイト合成に使用されるDMT基を置換する。したがって、ペルオキシアニオン溶液、または強い求核性と穏やかな酸化性の性質を有する任意の適切な変形は、非ブロック化および酸化ステップを1つに統合することを可能にする。また、高循環収率は、キャッピング工程の排除を可能にする。

30

【0354】

基板からのDNAの脱保護および切断は、Clearyらにより記載されるように(Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis, Nature Methods, 2004; 1: 241-248)、例えばNH₄OHで処理することにより、光切断可能なリンカーに紫外光を照射することにより、例えば組み込まれたdU-残基のウラシルDNAグリコシラーゼ処理または当該技術分野で既知の任意の適切な切断方法によって生成されるものなどの、熱処理、脱プリン塩基部位の標的化によって、行われ得る。オリゴヌクレオチドは、凍結乾燥による切断後に回収され得る。

40

【0355】

50

ホスホラミダイト化学作用を保つために、基板のオリゴヌクレオチド合成の場所の表面は、成長しているヌクレオチド鎖の表面に対する結合のための適切な部位を提供するために、化学的に修飾され得る。様々な種類の表面修飾化学作用が存在し、これはヌクレオチドが基板表面に付着するのを可能にする。表面修飾は、オリゴヌクレオチド鎖が核酸塩基の脱保護と付随して表面から切断されるか、又はまたは脱保護後に表面に付着したままであるかによって、その実装が変化し得る。当該技術分野で既知である様々な型の適切な表面修飾化学作用は、www.glenresearch.comに記載されており、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。一つの表面修飾技術は、A、GおよびC塩基の環外のN原子が、オリゴヌクレオチド鎖を有しつつ基板に付着したままで、脱保護されるのを可能にする。

10

【0356】

別のスキームは、トリアルキルシリルアミン（例えば、 $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$ ）をガラスまたはシリカ表面のSiOH基と反応させ、その後アミンを備える無水コハク酸との反応により、アミド結合およびヌクレオチド鎖成長が始まる遊離OHが生成される。

【0357】

リンカー基の第三のタイプは、光切断可能なプライマーに基づいてもよい。このタイプのリンカーは、オリゴヌクレオチドが（例えば約350nmの光を照射することにより）各塩基上の窒素含有官能性の保護基を切断することなく、基板から除去されるのを可能にする。基板からのオリゴマーを切断するための試薬として使用される場合、典型的なアンモニアまたはNH₃処理はすべてを脱保護する。この種の光開裂リンカーの使用はwww.glenresearch.comに記載されている。種々の他の適切な切断可能なリンカー基は、当該技術分野で既知であり、代わりに使用され得る。

20

【0358】

酸化と脱トリチル化のための時間枠は、通常、それぞれ約30秒と60秒とすることができる。試薬は排出され得、その後アセトニトリル洗浄（ACN）される。脱プリン制御脱トリチル化工程では、脱トリチル化溶液は、間にドレイン工程なしで酸化溶液の連続的な流入を用いて駆動され得る。

【0359】

その場合成工程中の試薬の流れの正確な制御は、製品の収率、均一性および品質を向上させるのを可能にする。例えば、酸濃度及び脱トリチル化時間は正確に制御され得る。基板のための、特にインサイトの合成および／または周囲での領域のための水接触角は、合成の脱プリン化および／または速度を低減するために選択され得る。水接触角の適切な所望の値は、本明細書の他の箇所に記載されている。いくつかの実施形態では、脱プリンの低い量は、高い表面エネルギー、すなわち、低い接触角の表面上に達成することができる。

30

【0360】

本発明の方法および組成物は、オリゴヌクレオチド合成中に脱プリン率の減少、例えばサイクル当たり0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、0.0001%未満の率またはそれ以下を可能にする。さらに、本明細書に記載の本発明の方法および組成物は、オリゴヌクレオチドのインサイト合成を支持する基板の表面にわたって、脱プリン勾配の減少または排除を可能にする。したがって、均一性の高い、高品質、高収量のオリゴヌクレオチド合成は、分解されたオリゴヌクレオチドの場所の高密度を保持できる基板上で達成され得る。

40

【0361】

オリゴヌクレオチドのインサイトでの合成は、典型的には、比較的疎水性である固体担

50

体で始まり、その後、その表面エネルギーに影響を与えるオリゴヌクレオチドの特徴部の合成でますます疎水性となる。オリゴヌクレオチドの機能は、オリゴヌクレオチドの長さの増加に伴って実質的な表面エネルギーを得ることができる。一般に、保護されたオリゴヌクレオチドからなるこれらの部位または特徴部は、約10～20の合成サイクル後、アセトニトリルまたはプロピレンカーボネートなど、ホスホラミダイト合成に一般的に使用される高表面張力有機溶剤まで自発的に湿潤になるために、十分な表面エネルギーを獲得する。本発明の方法および組成物は、オリゴヌクレオチド合成の場所での変化する表面特性を考慮ための長さに応じて、成長しているオリゴヌクレオチドの合成の間に、流量、温度、体積、粘度、または試薬濃度などのパラメータが変動するのを可能にする。このような変化は、合成サイクルを繰り返すことで、一定または変化する増分で連続的に変化するパラメータによって適用され得る。また、パラメータは、合成の唯一の選択されたサイクルで変更することができ、すべての他のサイクル、すべての第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九、第十サイクルなどのように、パターンに随意に従い得る。

10

【0362】

様々な実施形態において、本発明の方法および組成物は、基板上に合成されたオリゴヌクレオチドのライブラリを企図しており、ここでライブラリは、本明細書の他の場所でさらに詳細に説明するように、様々な大きさのオリゴヌクレオチドを含む。さらに、本発明の方法および組成物は、場合によっては、基板上のサイズ、配列またはヌクレオチド組成を変化させることにより、オリゴヌクレオチドの実質的に類似の量の合成を可能にする。量の変化は、任意の二つの合成されたオリゴヌクレオチドの間で、または代替的にライブラリにわたる相対誤差またはパーセント偏差として、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%未満又はそれら未満に限定され得る。本明細書の他の場所でさらに詳細に記載されるように、本明細書に記載の本発明の方法および組成物は、所望の量での基板上のオリゴヌクレオチド合成を企図している。

20

【0363】

いくつかの実施形態において、本発明の方法および組成物は、基板上のオリゴヌクレオチドのライブラリの合成を可能にし、ここで、各オリゴヌクレオチドのストイキオメトリーは、合成された特徴部の相対数を変化させることにより厳密に制御および調整可能である。基板の分解された場所上の成長するオリゴヌクレオチドの密度を微調整するための適切な表面官能化およびコーティングは、本明細書の他の場所でさらに詳細に記載されており、基板のすべてのマイクロ構造に均一に適用され得、又は代替的には、マイクロ構造の選択された量および個々の割合で適用され得る。

30

【0364】

インサイツの合成方法は、ペプチドアレイの合成についての米国特許第5449754号、ならびに国際公開第98/41531号、ホスホラミダイトまたは他の化学作用を用いてポリヌクレオチド（具体的にはDNA）を合成するためにそこに引用されている文献に記載されている。インサイツの核酸アレイ合成プロトコルおよび装置を記載している付加的な特許には、米国特許出願公開第2013/0130321号および米国特許出願公開第2013/0017977号があり、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

40

【0365】

そのようなインサイツの合成法は、適切に活性化された基板表面の（または以前に付着した脱保護されたモノマーとの）いずれかに結合するための基板上の、あらかじめ決められた位置の保護されたモノマーの、付着する液滴の配列の反復として、基本的にみなされ得、付着モノマーを脱保護し、その結果、付着した保護モノマーと反応することができる、結合のための別の保護された単量体が付着する。異なるモノマーは、任意の1サイクルの間、基板上の異なる領域に付着させることができ、その結果、完成したアレイの異なる領域は、完成したアレイにおいて所望のように、異なるバイオポリマー配列を保有する。一つ以上の中間のさらなる工程は、酸化、硫化、および／または洗浄ステップとして、各

50

反復で必要とされ得る。

【0366】

単一の基板上のオリゴヌクレオチドの配列を生成するために使用できる様々な方法が、米国特許第5677195号、第5384261号、および、国際公開第93/09668号に記載されている。これらの出願に開示された方法では、試薬は、(1) 予め定められた領域に定義されたチャンネル内を流れる、または(2) 事前に定義された領域に「スポットティングする (spotting)」、または(3) フォトリジストを使用することによって、のいずれかによって、基板に送達される。しかし、他の手法、並びにスポットティング及び流れの組み合わせを用いることができる。各例において、基板の特定の活性化領域は、モノマー溶液が種々の反応部位に送達されたとき、機械的に、他の領域から分離される。したがって、オリゴヌクレオチドのインサイツ合成は、本明細書に記載される方法および組成物に、当該分野で公知の合成の種々の適切な方法を適用することによって達成することができる。そのような方法の一つは、光不安定な保護基を使用して、固体またはポリマー表面上の分解され予め定められた部位でのオリゴヌクレオチドのインサイツ合成に直接関与するフォトリソグラフィ技術 (Kumarら、2003) に基づいている。ヒドロキシル基は、表面上に生成することができ、光不安定保護基により遮断されている。表面は、例えばフォトリソグラフィ・マスクを介して、UV光に曝されるとき、表面上の遊離ヒドロキシル基のパターンが生成され得る。これらのヒドロキシル基は、ホスホラミダイト化学作用にしたがって光保護ヌクレオシドホスホラミダイト (nucleoside phosphoramidites) と反応し得る。第二のフォトリソグラフィ・マスクが適用され得、表面はヒドロキシル基の第二のパターンを生成するためにUV光に露光され得、続いて5' - 光保護ヌクレオシドホスホラミダイトとカップリングする。同様に、パターンは生成され得、オリゴマー鎖を延ばすことができる。いくつかの光解離性保護基は、当該技術分野で知られている5' - ヒドロキシル官能基から、クリーンかつ迅速に除去され得る。理論に束縛されることなく、光開裂性基の不安定性は、使用する溶媒の波長および極性に依存し、光切断の速度は、暴露の持続時間と光の強さによって影響され得る。この方法は、例えばマスクのアライメント精度、光保護基の除去の効率、ホスホラミダイトカップリング工程の収率といった多数の要素を利用することができる。さらに、隣接する部位への光の意図しない漏れを最小限に抑えることができる。スポット当たりの合成オリゴマーの濃度は、合成の表面上のリーダヌクレオシド (leader nucleoside) の負荷を調整することによってモニターすることができる。

【0367】

本発明の方法および組成物は、当該技術分野で知られている数々の構造の適切な技術、例えば、マスクレスアレイ合成装置、マスクを利用した光指向性の方法、フローチャンネル法、スポットティング法などを利用し得る、ということは理解されよう。いくつかの実施形態では、構造及び／又は選択のオリゴヌクレオチドは、マスクレスアレイ合成装置 (MAS) を使用して固体担体上で合成され得る。マスクレスアレイ合成装置は、国際公開第99/42813号および対応する米国特許第6375903号に記載されている。他の例は、配列内の特徴部の各々が所望の配列の一本鎖DNA分子を有する、カスタムDNAマイクロアレイを製造し得るマスクレスの機器として既知である。構造及び／又は選択のオリゴヌクレオチドを合成するための他の方法は、例えば、マスクを利用した光指向性の方法、フローチャンネル法、スポットティング法、ピンに基づく方法、およびの支持体を利用する方法を含む。オリゴヌクレオチドの合成のためのマスクを利用した光指向性の方法 (例えばVLSIPS (商標) 法) は、例えば米国特許第5,143,854号、第5,510,270号および第5,527,681号に記載されている。これらの方法は、固体担体の事前定義された領域を活性化し、その後、事前選択されたモノマー溶液を支持体と接触させる工程に関する。選択された領域は、集積回路の製造に使用されるフォトリソグラフィ技術のようにマスクを介した光源の照射によって活性化され得る。照明がマスクによって遮断され、それらが化学的に保護されたままにされているため、支持体の他の領域は不活性のままである。このように、光パターンは、どの支持体の領域が与えられたモノ

マーと反応するかを定義する。事前に定義された領域の異なるセットを繰り返し活性化し、支持体と異なるモノマー溶液を接触させることによって、ポリマーの多様なアレイが支持体上に作製される。支持体からの未反応のモノマー溶液の洗浄のような他の工程が、随意に使用され得る。他の適用可能な方法は、米国特許第5384261号に記載されているような機械的技術を含む。単一の支持体上の構造及び／又は選択のオリゴヌクレオチドの合成に適用可能なさらなる方法は、米国特許第5384261号に記載されている。例えば、試薬は、事前に定義された領域または事前に定義された領域上の「スポッティング」で定義されたチャンネル内を流れることによって、支持体に送達され得る。他のアプローチ、ならびにスポッティング及び流れの組み合わせは、同様に使用され得る。各例において、支持体の特定の活性化領域は、モノマー溶液が種々の反応部位に送達されたとき、機械的に、他の領域から分離される。フローチャンネル法は、例えば、固体担体上のオリゴヌクレオチドの合成を制御するマイクロ流体システムを含む。例えば、多様なポリマー配列は、適切な試薬が流れる又は適切な試薬が設置される支持体の表面にフローチャンネルを形成することによって、固体担体の選択された領域で合成され得る。固体担体上のオリゴヌクレオチドを調製するためのスポッティング法は、同じように流体的に接続された選択領域または構造に、それらを直接付着させることによって、比較的少量で反応体を送達する工程を含む。いくつかの工程では、全体の支持体表面は、噴霧され得、そうでなければ溶液でコーティングされ得る。モノマー溶液の正確に測定されたアリコートは、領域から領域に移動するディスペンサーによって滴下で付着させることができる。固体担体上のオリゴヌクレオチドの合成のためのピンに基づく方法は、例えば米国特許第5288514号に記載されている。ピンベースの方法は、ピンまたは他の複数の延長部を有する支持体を利用する。ピンは、各トレイ内の個々の試薬容器に同時に挿入されている。

【0368】

別のアプローチでは、高密度マイクロアレイの光指向合成は、5' - 3' 方向 (Albertら、2003) で達成することができる。3' 末端が配列特異的プライマー伸長およびライゲーション反応などの酵素反応のために利用可能であるため、このアプローチは、このような合成表面上で行われるべき並列ジェノタイピングまたは配列決定などの下流の反応を可能にする。光保護された5' - OH基、NPPOC (2 - (2 - ニトロフェニル) プロポキシカルボニル) の延期 - 補助光脱保護の完全なまたは実質的に完全な脱保護は、使用され得る。(Beierら、2002)。

【0369】

本明細書に記載される方法および組成物は、平坦なまたは不規則な表面を含む、様々な形状の基板上での、インサイツ合成を使用する合成の核酸の産生を促進することができる。本明細書中に記載されているこれらの基板に適した種々の材料 (例えばシリコン) は、当該技術分野において既知である。基板は、合成中に異なる配列の多様性を伴ってロードされ得る。インサイツでの基質の合成方法は、共通の支持体上の対処可能な位置で、異なって定義された配列のオリゴマーの多数の調製を可能にする。本明細書に記載の方法および組成物は、本明細書にさらに別の箇所に記載のような長く高い品質のオリゴヌクレオチドのインサイツの合成を可能にする。合成工程は、供給材料の様々なセットを組み込まれ得、オリゴヌクレオチド合成の場合には、4塩基A、G、T及びCのルール、ならびに本明細書に記載されているいくつかの技術分野で公知の適切な修飾塩基が、支持体または基板上での分解された方法における核酸ポリマーの所望の配列を構築するのに使用され得る。

【0370】

固体担体 (例えばアレイ) 上の高密度オリゴヌクレオチドの製造および適用は、以前にさらに以下に開示されている。例えば国際公開第97/10365号、国際公開第92/10588号、1996年12月23日に出願された米国特許第6309822号、1995年9月15日に出願された第6040138号、1993年12月15日に出願された第08/168904号、1990年12月6日に出願された第07/624114号、1990年6月7日に出願された第07/362,901号、および米国特許第5,6

77, 195号であり、これらすべてが引用により全ての目的のために本明細書に組み込まれる。高密度アレイを使用するいくつかの実施形態では、高密度オリゴヌクレオチドアレイは、米国特許第5445934号および第6566495号に開示された超大規模固定化ポリマー合成(VLSIPS)などの方法を用いて合成され、両方が引用により全ての目的のために本明細書に組み込まれる。各オリゴヌクレオチドは、基板上の既知の位置を占めている。

【0371】

合成工程の最小数を有するオリゴヌクレオチド、ペプチドおよび他のポリマーの配列の高密度アレイを形成する種々の他の適切な方法は、当該技術分野で既知である。オリゴヌクレオチドアナログの配列は、限定されないが、光指向性化学カップリングおよび機械的に方向付けされたカップリングを含む種々の方法によって、固体基板上で合成され得る。例えば、光指向合成技術のための使用、ペプチド、オリゴヌクレオチドおよび他の分子の膨大なアレイを形成する方法が開示されている、Pirrungらの米国特許第5,143,854号、(国際公開第90/15070号を参照)、およびFodorらの国際公開第92/10092号および国際公開第93/09668号および米国特許出願公開第07/980,523号を参照されたい。ポリマーアレイの合成のためのこれらの手順は、現在VLSIPS工程と呼ばれる。VLSIPSアプローチを用いて、ポリマーの不均一なアレイは、数々の反応部位への同時カップリングを介して、異なる不均一なアレイに変換される。米国特許出願公開第07/796243号および第07/980523号を参照されたい。

【0372】

ポリアミド骨格を有するオリゴヌクレオチドアナログがVLSIPS手順において使用される場合には、モノマーは、リン酸結合を介して相互に付着しないので、合成ステップを実行するホスホラミダイト化学作用を使用することはしばしば不適切である。代わりに、ペプチド合成方法は、Pirrungらによって米国特許第5,143,854号に記載されるように、電子を置換することができ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0373】

個々の分子種は、例えば、インサイツのスポッティング法や圧電技術においてそうであるように、インクジェット印刷技術に基づいて、合成供給材料の添加のために別々の流体区画によって画定することができる(A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996)。オリゴヌクレオチドの分解されたインサイツ合成法は、合成部位の空間的な分解活性化によって達成され得、それは活性化試薬(脱保護試薬)の選択的または空間的な分解生成を介して、または活性化試薬(脱保護試薬)の選択的な追加を介して、選択的な照明によって可能である。

【0374】

アレイのインサイツ合成のためにこれまでに知られている方法としては、例えば、フォトリソグラフィ、光ベースの合成(McGall, G. et al.; J. Amer. Chem. Soc. 119; 5081-5090; 1997)、プロジェクター系光ベースの合成(PCT/EP99/06317)、反応空間の物理的分離による流体合成(Prof. E. Southern, Oxford, UK, およびOxford Gene Technologies, Oxford, UKの仕事により当業者に吉である)、反応のサポートにおける光活性化フォト酸と適当な反応チャンバーまたは物理的に分離された反応空間による、プロジェクターベースの光制御合成、電極によって誘導されるプロトンの生産を使用して、支持体上の個別電極上の空間

分解脱保護による、電子的に誘導された合成、および活性化合成モノマーの空間分解付着による流体合成 (A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996により既知) がある。

【0375】

一般的な固体担体上の特定の核酸二本鎖における合成核酸の調製方法は、国際公開第00/49142号および国際公開第2005/051970号からも既知である。それらの両方の全体が本明細書中に引用として組み込まれる。

【0376】

核酸配列のインサイツでの調製は、3'から5'方向、ならびにより従来型の5'から3'方向で達成され得る。試薬の添加は、パルスジェット付着、例えば、コーティングされたシリコンウェーハ表面基などの板表面上または表面における分解された場所への、適切なヌクレオチドホスホラミダイトおよび活性剤の付着によって達成することができる。基板の分解された場所はさらに、他のホスホロアミダイトサイクル工程 (5'-ヒドロキシル基の脱保護、酸化、硫化および／または硫化) のさらなる試薬に向けられ得、これは、並列に実行されてもよい。付着及び一般的なホスホラミダイトサイクルの工程は、オリゴヌクレオチド合成のウェーハを移動させずに実行することができる。例えば、試薬は、基板の反対側の面に一方の面から基板を介してそれらを流すことにより、基板内の分解された場所を通過することができる。代替的に、基板は、例えばホスホラミダイトサイクル工程のいくつかのために、例えばフローセルに移動することができる、基板は、その後、モノマーの次の層をプリントする前に、再配置、再登録、及び／又は再整列させることができる。

【0377】

オリゴヌクレオチドを用いた基板は、インサイツで製造されるか場合における (モノマーなどの) ポリヌクレオチド前駆体ユニットの、又は以前に合成されたポリヌクレオチドのいずれかの、パルスジェットからの液滴の付着を用いて製造され得る。このような方法は、例えば米国特許出願公開第2013/0130321号および米国特許出願公開第2013/0017977号、そこに引用された参考文献に記載されており、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。これらの文献は引用により本明細書に組み込まれる。本明細書の他の箇所に記載されるように、他の液滴付着法は、製造のために使用することができる。また、ドロップ付着方法の代わりに、当該技術分野で知られているように、光指向性の製造方法が用いられ得る。フィーチャー間の領域は、アレイが光指向性合成プロトコルによって行われた場合、特に存在する必要はない。

【0378】

既知の種々のインサイツ製造装置が適合れ得、代表的なパルスジェット装置は、現地されないが、米国特許第2010/0256017号、米国特許第20120050411号、および米国特許第6446682号に開示されており、これらの開示は、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0379】

様々な実施形態では、基板上または内部の生体高分子アレイは、以前に得られた生体高分子の付着又はインサイツ合成法を用いて製造され得る。付着法は、典型的には、生体高分子がリンクできるように適切に活性化された基板上またはその内部の予め決められた位置でバイオポリマーを付着させる工程を含む。異なる配列の生体高分子は、基板上または内の異なる領域に付着され得る。全オリゴマーまたはcDNAなどの、以前に得られたポリヌクレオチド、特にDNAの付着のための、当該技術分野で既知の標準的な手順は、限定されないが、パルスジェットヘッドの形体で液滴ディスペンサーへポリヌクレオチドを

ロードし、基板上に発射される工程を含む。このような技術は、国際公開第95/25116号および国際公開第98/41531号に記載されており、その両方は、その全体が引用により本明細書中に組み込まれる。基板の分解された部位への液滴付着のためのインクジェットの種類々の適切な形体は、当該技術分野で既知である。

【0380】

いくつかの実施形態において、本発明は、全オリゴヌクレオチドライブラリーまたはその一部、例えば表面上に固定化されたオリゴヌクレオチドライブラリー内の、予め合成されたオリゴヌクレオチドの使用に依存し得る。核酸アレイの高密度を支援する基板は、基板上、基板中、または基板を介して、予め決められた定位置に予め合成された又は天然の核酸を付着させることによって、製造され得る。合成または天然の核酸は、光指向性ターゲティング、オリゴヌクレオチド指向性ターゲティング、または当該技術分野で既知の任意の他の適切な方法により、基板の特定の位置に付着され得る。核酸はまた、特定の位置に向けることができる。特定のスポット中の核酸を付着するための、領域から領域へと移動するディスペンサーを使用することができる。ディスペンサーは、選択された領域につながるマイクロウェルを介して核酸を付着させることができる。代表的なディスペンサーは、基板と、基板に対するマイクロピペットの位置を制御するロボットシステムに核酸を送達するために、マイクロピペットまたは毛細管のピンを含む。種々の試薬を同時に反応領域に送達することができるように、他の実施形態では、ディスペンサーは、一連のチューブ、マニフォールド、ピペットまたは毛細管ピン等のアレイを含む。

【0381】

事前合成されたオリゴヌクレオチドおよび／または支持体およびポリヌクレオチド配列の支持体への付着、および、光指向性の方法、フローチャネル及びスポットティング法、インクジェット法、ピンベースの方法、およびビーズベースの方法を用いた、同じもののインサイツでの合成は、以下の文献にさらに記載されており；McGall et al.

(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 : 13555; Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering, Vol. 20: 111, Plenum Press (1998); Duggan et al. (1999) Nat. Genet. 21 : 10 ; Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, 2003; U. S. Patent Application Publication Nos. 2003/0068633 and 2002/0081582; 米国特許第6,833,450, 第6,830,890号, 第6,824,866号, 第6,800,439号, 第6,375,903号および第5,700,637号; および、国際公開第04/031399号, 国際公開第04/031351号, 国際公開第04/029586号, 国際公開第03/100012号, 国際公開第03/066212号, 国際公開第03/065038号, 国際公開第03/064699号, 国際公開第03/064027号, 国際公開第03/064026号, 国際公開第03/046223号, 国際公開第03/040410号および国際公開第02/24597号; これらの開示は全ての目的のためにその全体が引用により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、予め合成されたオリゴヌクレオチドは、支持体に付着されるか、または、モノマー溶液が領域から領域に移動するディスペンサー（例えばインクジェット）によって滴下で付着される、スポットティング法を用いて合成される。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、例えば機械波作動式ディスペンサー（a mechanical wave actuated dispenser.）を使用して、支持体上にスポットされる。

【0382】

本明細書に記載のシステムはさらに、支持体に結合した複数のオリゴヌクレオチドを有する第1のスポット（または特徴部）に液滴を提供するための部材を含むことができる。いくつかの実施形態では、液滴は、ヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む1つ以

上の組成物（本明細書でヌクレオチド付加構築物とも呼ばれる）を含み得、特定のまたは予め決められた加えられるヌクレオチド、および／または、ハイブリダイゼーション、変性、鎖延長反応、ライゲーション、および消化の一つ以上を可能にする試薬を有する。いくつかの実施形態では、異なる組成又は異なるヌクレオチド付加構築物は、任意の反復の間に支持体上の異なるアドレスに付着することができ、その結果、予め決められたオリゴヌクレオチド配列のアレイ（支持体の異なる特徴部は異なる予め定められたオリゴヌクレオチド配列を有する）が生成される。組成物を堆積させる1つの特に有用な方法は、一つ以上の液滴を付着させることであり、各液滴は、支持体表面または支持体表面に構築される特徴部の上で、支持体表面から離されているパルスジェット装置からの所望の試薬（例えば、ヌクレオチド付加構築物）を含む。

10

【0383】

サブユニットのポリマー合成の化学的方法を自動化することを可能にするために、固相がしばしば使用され、そこでは成長する分子鎖が固定されている。合成の完了時には、それは分離され得、それは実際の重合体と固相との間の適切なリンカーを破壊することによって達成され得る。自動化のために、方法は、直接基板面を用いることができるか、あるいは本方法は、活性化された粒子の形態で固相の基板面を使用することができ、それは例えば孔制御ガラス（CPG）などの基板において列またはマイクロチャネル内に充填されている。各時点における基板表面は、予め決められたシーケンスで、一つの除去可能な型のオリゴを特異的に運ぶことができる。個々の合成試薬は、その後、制御可能な方法で添加することができる。合成された分子の量は、限定されないが、専用の基板表面のサイズ、支持体材料の量、反応バッチの大きさ、合成のための利用可能な官能基領域、官能化の程度、または合成反応の継続時間を含む、様々な要因によって制御され得る。

20

【0384】

従って、本発明の様々な実施形態は、組成物（典型的にはオリゴヌクレオチド）のライブラリを保持する基板の製造および使用に関する。異なる部分の複数の領域（例えば異なるポリヌクレオチド配列）を有する場合、分解された特徴部を備えた基板は、「対処可能」であり、その結果、基板上の特定の所定位置（すなわち、「アドレス」）での領域（すなわち、基板の「特徴部」または「スポット」）は、ターゲットの特定のターゲットまたはクラスを検出する（特徴部が偶然その場所の非標的を検出し得るが）。基板の特徴部は、典型的には介在空間によって分離されるが、その必要はない。いくつかの場合では、特徴部は、基板内に内蔵されていてもよいし、一寸法、二寸法、または三寸法のマイクロ流体ジオメトリを作成することができる。「基板レイアウト（substrate layout）」は、基板上の特徴部の位置、一つ以上の特徴部の寸法、及び所与の位置における部分の表示など、特徴部の1つ以上の特性を指す。

30

【0385】

他の分子の合成

本発明の方法および組成物は、目的の分子の他の種類を合成することができる。選択されたグリッド領域でのペプチドの合成は、そのような場合である。アレイ表面上のペプチドの段階的成長に使用される種々の適切な化学物質は、当該技術分野で既知である。米国特許第5449754号に記載のペプチド合成技術は、その全体が引用により本明細書に組み込まれ、本発明と共に使用され得る。本明細書に記載の本発明の方法および組成物は、薬剤、タンパク質阻害剤、または複数の化合物の迅速な合成が所望される任意の化学合成における使用を見出す。

40

【0386】

遺伝子アセンブリ

様々な実施形態において、本発明は、基板表面または代替的に基板ハウジングの適切な表面上に合成またはスポットされた、重複する短いオリゴヌクレオチドのアセンブリ、又はビーズなどのオリゴヌクレオチドのスポットを使用する、ポリヌクレオチド配列（「遺伝子」とも呼ばれる）の調製に関する。より短いオリゴヌクレオチドは、連続した組み立てられたオリゴヌクレオチドに対する相補的な領域でのオリゴヌクレオチドとのアニーリ

50

ングを使用して、例えば鎖の置換活性を欠いたポリメラーゼ、リガーゼ、C l i c kケミストリー、又は 当該技術分野で既知の任意の他の適切な組み立て方法を用いて、同じ鎖上で一緒にパッチワークされ得る (p a t c h w o r k e d)。このように、アニーリングするヌクレオチドの配列は、反対鎖の連続したオリゴヌクレオチドとの間で複製され得る。いくつかの場合では、同じ鎖の連続したオリゴヌクレオチドは、アニーリングするオリゴヌクレオチドからの配列要素を導入せずに、例えばリガーゼ、C l i c kケミストリー、又は 当該技術分野で既知の任意の他の適切なアセンブリ化学を使用して、縫合され得る。いくつかの場合では、より長いポリヌクレオチドは、短いポリヌクレオチド／オリゴヌクレオチドを含むアセンブリのラウンドを通じて階層的に合成され得る。

【0387】

遺伝子またはゲノムは、大きなポリヌクレオチドを組み立てることによって、ウイルスゲノム (7.5 kb; C e l l o e t a l, S c i e n c e, 2002, 297, 1016)、バクテリオファージゲノム (5.4 kb; S m i t h e t a l, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 2003, 100, 15440)、および32 kbの遺伝子クラスター (K o d u m a l e t a l, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, 2004, 101, 15573)の合成として記載されているように、オリゴヌクレオチドをデノボ合成することができ、これらの全ては、その全体が引用によって本明細書中に組み込まれる。長い合成DNA配列のライブラリは、ベンターと共同研究者 (ギブソンら、S c i e n c e、2008、319、1215)によって、細菌 (M y c o p l a s m a g e n i t a l i u m)の582kbのゲノムアセンブリにおいて記載されている方法に従って製造され得、その全体が引用によって本明細書中に組み込まれる。15 kbの核酸の場合について記載されるように (T i a n e t a l, N a t u r e, 2004, 432, 1050; その全体が引用によって本明細書中に組み込まれる)、さらに大きなDNA生体分子は、オリゴヌクレオチドを用いて構築され得る。本発明の方法および組成物は、当該技術分野において、本明細書に記載のまたは既知の遺伝子アセンブリ法を用いてデノボ合成されたポリヌクレオチド配列の大きなライブラリを企図する。そのような配列の合成は、典型的には、本明細書の他の場所でさらに詳細に記載されている基板の適切な領域にて高濃度で並行して行われる。さらに、これらの大規模なライブラリは、本明細書の他の場所でさらに詳細に説明されるように、非常に低いエラー率で合成することができる。

【0388】

遺伝子は、プールされ合成されたオリゴヌクレオチドの多数から組み立てることができる。T i a nらによって記載されているように、(T i a n e t a l, N a t u r e, 432:1050, 2004)、例えば、600の別個のオリゴヌクレオチドのプールを使用して、遺伝子合成を適用することができる。組み立てられた遺伝子の長さは、さらに長いオリゴヌクレオチドを使用することによって拡張することができる。さらに大きな遺伝子およびDNA断片のために、より大きい、例えば約0.5、1、1.5、2、3、4、5 kb、またはそれ以上の、合成の複数のラウンドを適用することができ、典型的には、階層的な遺伝子の組立工程内である。以下に記載するように、本明細書に開示されるようなオリゴヌクレオチドのPCRアセンブリ及び合成は、直列で使用するために適用され得る。

【0389】

遺伝子アセンブリの種々の方法は、リガーゼ連鎖反応 (L C R) のような方法 (C h a l m e r s a n d C u r n o w, B i o t e c h n i q u e s, 30(2), 249-52, 2001; W o s n i c k e t a l, G e n e, 60(1), 115-27, 1987 からPCR戦略のスイートまで (S t e m m e r e t a l, 164, G e n e, 49-53, 1995; P r o d r o m o u a n d L. H. P e a r l, 5(8), P r o t e i n E n g i n e e r i n g, 827-9, 1992; S a n d h u e t a l, 12(1), B i

o Techniques, 14-6, 1992; Young and Dong, Nucleic Acids Research, 32 (7), e59, 2004; Gao et al, Nucleic Acids Res., 31, e143, 2003; Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32 (12), e98, 2004) の範囲で、本発明の方法及び組成物に従って使用され得る (図11)。ほとんどのアセンブリプロトコルは、合成されたオリゴの重複のプールで開始し、組み立てられた遺伝子のPCR増幅で終わるが、その2点間の経路は全く異なるものとするができる。LCRの場合には、初期オリゴ集団は、PFU DNAリガーゼなどのリガーゼが「構築ブロック」を共有結合させて、初期テンプレートを形成するのを可能にするリン酸化された5'末端を有する。PCRアセンブリは、しかしながら、典型的には非リン酸化オリゴを利用し、それは、拡張して完全長テンプレートを作成するための反復PCRサイクリングを受ける。さらに、LCRプロセスはμM範囲のオリゴ濃度を必要としてもよいが、一方、一本鎖および二本鎖PCRのオプションの両方ははるかに低い (例えばnM範囲の) 濃度要件を有する。

【0390】

公開されている合成の試みは、20-70bpのサイズの範囲のオリゴを使用して、重複 (6-40bp) のハイブリダイゼーションを介して組み立てている。多くの要因が長さおよびオリゴの組成によって決定される (Tm、二次構造など) ので、この集団の大きさと不均一性は、アセンブリの効率及び組み立て遺伝子の品質に大きな影響を与え得る。正しい最終DNA生成物の割合は、「構築ブロック」オリゴの質と数に依存している。短いオリゴは、より長いオリゴのそれと比較して低い変異率を有するが、より多くのオリゴDNA産物を構築するために必要とされる。また、短いオリゴの重複の減少は、アニーリング反応の低いTmを結果として生じ、これは、非特異的アニーリングを促進し、組立工程の効率を低下させる。本発明の方法および組成物は、低いエラー率で長いオリゴヌクレオチドを送達することによってこの問題に対処する。

【0391】

熱電界 (thermal field) の時間変化は、PCR増幅又はPCA反応を起こさせるための、マイクロ流体デバイスの時間調節された加熱を指す。熱電界を変化させる時間は、例えばナノリアクターなどの反応器を用いて、デバイス基板を熱加熱ブロックの上に配置することによって、外部から適用されてもよく、または例えばPCAおよびPCRチャンバーのすぐ下に位置する薄膜ヒータとして、マイクロ流体デバイスで統合されてもよい。温度コントローラは、ヒータ素子に連結された温度センサーと組み合わせて加熱素子の温度を変化させることができ、または反応チャンバーに統合されてもよい。タイマーは、反応チャンバーに加えられる熱の持続時間を変化させることができる。

【0392】

熱電界の温度は、PCRまたはPCA反応の変性、アニーリングおよび伸長の工程に応じて異なってもよい。一般的に、核酸は、約95℃2分間で変性され、続いて約95℃30秒での変性、40から60℃30秒のアニーリング、約72℃30秒の伸長を30サイクル以上、および、最後に72℃10分間伸長される。使用される持続時間及び温度は、オリゴヌクレオチド、PCRプライマー、増幅産物のサイズ、テンプレート、及び、例えばポリメラーゼなどの使用される試薬に依存して変化し得る。

【0393】

ポリメラーゼは、PCRプライマー、オリゴヌクレオチドまたはDNA断片の3'ヒドロキシル末端を拡張するために、ヌクレオシド三リン酸またはデオキシヌクレオシド三リン酸を取り込む酵素である。ポリメラーゼに関する一般的な議論については、Watson, J. D. et al, (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. を参照されたい。適切なポリメラーゼとしては、限定されないが、KODポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI、「Klenow」フラグメント、T7ポリメ

ーゼ、T4ポリメラーゼ、T5ポリメラーゼおよび逆転写酵素があり、これらの全ては当該技術分野で既知である。PfuおよびPyrobest等の、ブルーフリーディング能力を有するポリメラーゼは、高い忠実度でDNAを複製するために使用され得る。Pfu DNAポリメラーゼは3'から5'のエキソヌクレアーゼブルーフリーディング活性を有しており、ゆえにそれはヌクレオチドの取り込みエラーを訂正し得る。本発明の様々な実施形態において、核酸断片は、核酸断片の相互に相補的なセグメントの重複領域の間での特異的なハイブリダイゼーション反応によって、好ましくは、互いに接合されており、それによってより長い合成二本鎖核酸を得る。より長い核酸を構築するために使用される個々の配列セグメントは、例えば20-200、50-300、75-350または100-400ヌクレオチドの構築ブロックの長さを有し得る。当業者は、配列セグメントの長さが、これらの値（例えば、20~350または200~350）の任意の値によって束縛される任意の範囲内に入り得ることを理解している。

10

【0394】

配列セグメントは、好ましくは、合成される相補的な核酸のアンチセンス鎖の配列セグメントに少なくとも部分的に重なるように選択され、その結果、そのように合成される核酸鎖は、個々の配列セグメントのハイブリダイゼーションによって構築され得る。代替的な実施形態では、配列セグメントは、好ましくは、合成される核酸の両方の鎖上の配列セグメントが完全に重なるように選択され、多かれ少なかれ完全な二本鎖の調製はホスホジエステル骨格の共有結合のみを必要とする。個々のフラグメント間での相補的領域や重複の長さは、例えば、10-50、10-100、12-25、20-80、15-20、または15-25ヌクレオチドの構築ブロックであり得る。当業者は、配列セグメントの長さは、任意のこれらの値（例えば、25~100又は10~25）によって束縛される任意の範囲内に入り得る、ことを理解している。二つの核酸断片間の重複または相補性の領域が高いAT含有量、例えば50%、60%、65%を超えるAT含有量を有する場合、結合定数はGC-リッチな配列と比較して低い。従って、熱力学的理由のために、これらの断片間のハイブリダイゼーションは、比較的低効率であり得る。これは、2以上の断片のアセンブリに影響を与えることができる。配列依存性のあり得る結果は、正確な標的配列を有する核酸二本鎖の収量減少である。したがって、遺伝子を組み立てるための配列セグメントは、重複領域内のGC含有量を所望のレベルで、例えば30、40、45、50、55、60、65%、またはそれ以上のGC含有量で、設計することができる。典型的な遺伝子の組み立て方法のより詳細な議論は、米国特許第8367335号に記載されており、引用によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

30

【0395】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）ベースの、および非ポリメラーゼサイクリングアセンブリ（PCA）ベースの戦略は、化学的遺伝子合成のために使用され得る。様々な実施形態では、酵素遺伝子合成、アニーリングおよびライゲーション反応、2つの遺伝子の同時合成、ショットガンライゲーション、共ライゲーション、挿入遺伝子合成、DNAの一方の鎖を介した遺伝子合成、テンプレート指向性ライゲーション、ライゲースチェーン反応、マイクロアレイ媒介遺伝子合成、Blue Heron 固体技術、Sloning 構築ブロック技術、RNA媒介遺伝子アセンブリ、PCRベースの熱力学的にバランスのとれたインサイドアウト（TBIO）（Gao et al., 2003）、デュアル非対称PCR（DA-PCR）を組み合わせた二段全遺伝子合成法（Sandhu et al., 1992）、オーバーラップ伸長PCR（Young and Dong, 2004）、PCRベースの2段階のDNA合成（PTDS）（Xiong et al., 2004b）連続したPCR法（Xiong et al., 2005, 2006a）または当該技術分野で既知の他の適切な方法を含む、異なる方法および戦略が用いる、非PCRベースの化学的遺伝子合成は、より短いオリゴヌクレオチドからのより長いポリヌクレオチドのアセンブリのために、本明細書に記載される方法および組成物に関連して用いることができる。

40

【0396】

50

本発明の方法および組成物を化学的に使用して合成されたDNA配列は、例えば、ポリヌクレオチドの500、750、1000、1250、1500、1750、2000、2500、3000、4000、5000、6000、7500、10000、20000、30000、40000、50000、75000、100000塩基対またはそれ以上の長いポリヌクレオチド配列を伸長させることができる。本明細書の他の箇所にさらに記載されるように、本発明の方法および組成物はまた、非常に低いエラー率で化学的に合成されたポリヌクレオチド配列を可能にする。

【0397】

様々な実施形態において、ポリメラーゼの構築および増幅と総称される、ポリメラーゼ媒介のアセンブリ技術の変形は、ポリヌクレオチドの化学合成のために使用されている。カスタム遺伝子合成のために 当該技術分野で既知の一般的に使用される技術のいくつかは、ポリメラーゼ・サイクリング・アセンブリーに基づいており、オリゴヌクレオチドのプールのアセンブリを介してより長いポリヌクレオチドのデノボ合成を達成することができる。オリゴヌクレオチドのプールは、種々の遺伝子合成技術で使用するための構築ブロックとして合成することができる。配列、長さおよびオリゴヌクレオチドの正確な分布、ならびにプール内での任意の配列重複は、所望のポリヌクレオチド配列および使用されるアセンブリ方法に従って設計され得る。所望の完全長DNAは、例えば重複オリゴヌクレオチドの変性、アニーリング、および伸長に必要な温度条件でのPCRのいくつかの工程によって、取得され得る。

【0398】

PCRアセンブリ (PCA)

PCRアセンブリは、アニールすることができる相補的末端を有する少なくとも二つのオリゴヌクレオチドと組み合わせた、ポリメラーゼ媒介の鎖伸長を用い、その結果、ポリヌクレオチドの少なくとも一つは、ポリメラーゼ (例えば、Taqポリメラーゼなどの熱安定性ポリメラーゼ、VENT (商標) ポリメラーゼ (New England Biolabs社)、KOD (Novagen社) など) によって、ポリヌクレオチド鎖の伸長が可能となる遊離3'-ヒドロキシルを有する。重複オリゴヌクレオチドは、dNTP、ポリメラーゼおよびバッファーを含有する標準的なPCR反応で混合されてもよい。オリゴヌクレオチドの重複する末端は、アニーリングの際、PCR反応でポリメラーゼによる伸長のためのプライマーとして機能する二本鎖核酸配列の領域を作成する。伸長反応の生成物は、より長い二本鎖核酸配列の形成のための基質として働き、最終的に完全長の標的配列の合成を結果としてもたらす。PCR条件は、標的の長いDNA配列の収率を増加させるために最適化することができる。

【0399】

種々のPCRに基づく方法は、オリゴヌクレオチドから遺伝子を合成することができる。これらの方法は、限定されないが、熱力学的にバランスのとれたインサイドアウト (T-BIO) 法 (Gao et al, Nucleic Acids Research, 31:e143, 2003)、連続したPCR (Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004)、重複伸長PCR (OE-PCR) (Young and Dong, Nucleic Acid Research, 32:e59, 2004; Prodromou and Pearl, Protein Eng., 5:827, 1992)、およびPCRベースの2段階のDNA合成 (PTDS) (Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004)を含み、これらの全ては、その全体が引用により本明細書に組み込まれており、マイクロ流体デバイス内のPCRのテンプレートを組み立てるように構成され得る。

【0400】

DA-PCRは、合成遺伝子を構築するための1工程のプロセスである。一例では、例えば17から100塩基のオリゴヌクレオチド重なりと長さが、例えば15-17塩基である、4つの隣接するオリゴヌクレオチドは、PCR反応におけるプライマーとして使用

され得る。他の好適なオリゴヌクレオチドおよび重複のサイズは、本明細書に記載される本発明の範囲内である。2つの内部プライマーの量は非常に限られており、得られた反応は、2つの隣接するプライマーの過剰に依存して、全配列の2つの半分の非対称な一本鎖の増幅を引き起こす。その後のPCRサイクルでは、互いに重複するこれらの二重の非対称増幅断片は、二本鎖の完全長の生成物を生成する。

【0401】

TBIO合成は、遺伝子配列の、アミノ末端の半分のためのセンス鎖プライマーのみを、およびカルボキシ末端半分のためのアンチセンス鎖プライマーのみを、必要とする。また、TBIOプライマーは、温度最適化されたプライマーの重複の同一の領域を含むことができる。TBIO法は、完全に合成された内部断片の末端と、外側のプライマーの次のペア間の相補性を伴う。TBIOの双方向の伸長は、双方向の伸長の次のラウンドが行われる前に与えられた、外のプライマー対のために完了する。

10

【0402】

連続のPCRは、センス・プライマーの半分が、組み立てられるテンプレートの2分の1に対応するシングル・ステップPCRアプローチであり、アンチセンスのプライマーは組み立てられるテンプレートの後半に対応する。このアプローチにより、内部のプライマー対を使用する増幅が完了するまで、外側のプライマー対の双方向の増幅は生じない。

【0403】

PDTSは典型的には2つの工程を包含している。対象のDNAの第一の個体フラグメントが合成される：本発明の幾つかの実施形態において、約20のbpの重複を備える、約60、80、100、125、150、175、200、250、300または350以上の長さのヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドが混合され、PCR反応はpfuDNAなどのポリメラーゼにより行なわれて、より長いDNAフラグメントを生成する。次に、対象のDNAの全体の配列が合成される：第一ステップからの5-10のPCR産物混合物は合わせられ、プライマーとして2つの最も外側のオリゴヌクレオチドを伴うpyrobest DNAポリメラーゼなど、ポリメラーゼによる第2のPCR反応のテンプレートとして使用された。

20

【0404】

短いオリゴヌクレオチドを用いたPCRアセンブリは、比較的短い核酸ではうまく機能するが、単一の反応内で組み立てることができるオリゴヌクレオチドの最大数に制限があってもよいです。これは二本鎖DNA生成物にサイズ制限を課し得る。この問題の解決策は、直列でDNAを生成することである。このスキームでは、複数より小さなDNAセグメントは、別のチャンバーで、複数チップで、または直列で平行して合成され、次に、組立てのためのPCA反応のための前駆物質として、後のPCR増幅のための「より大きな」DNAフラグメントへ、ともに導入される。言い換えれば、オリゴヌクレオチドを使用するPCRアセンブリは、PCR増幅のためにテンプレート（第一ランのテンプレート（a first-run template））を結果として生じる。多くの第一ランのテンプレートは、第一ランのテンプレートより大きなDNA断片のPCAアセンブリのための前駆体として働き、故に第二ランのテンプレートを生成する。次に、第二ランのテンプレートは、第三ランのテンプレートなどの組み立てのための前駆体として機能し得る。所望のDNAが得られるまで、手法は繰り返され得る。

30

40

【0405】

合成反応の中で使用されるオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド自体より長い核酸を組み立てるための、典型的には一本鎖の分子である。オリゴヌクレオチドは、例えば20-200、50-300、75-350または100-400のヌクレオチド構築用ブロックであり得る。当業者は、配列セグメントの長さ、これらの任意の値（例えば20-350または200-350）に制限される任意の範囲内であり得ることを認識している。複数のオリゴヌクレオチドを包含しているPCAチャンバーは、遺伝子、またはDNAフラグメントに対応するテンプレートを生成するのに必要なオリゴヌクレオチドのプールを指す。合成反応および装置が直列で使用される時、続く一連の反応中のPCAチャン

50

バーは、PCRのためのテンプレートへ、アセンブリのための開始オリゴヌクレオチドの代わりに、DNAフラグメントのプールを含みうる。図12は、重複するオリゴヌクレオチドのプールからの長い構築物の、反応の複数のサイクルを通じての、徐々に長い構築物への、ポリメラーゼサイクリングアセンブリを例証する。

【0406】

本明細書に記載されるように、より長いオリゴヌクレオチドは、アセンブリのエラーを回避し、合成遺伝子（図13）の品質を向上させるために、遺伝子アセンブリの様々な方法で有利に使用され得る、ということが理解される。組み立てられる配列の相同の繰り返しまたは高GC領域は、より小さなオリゴヌクレオチドの正確な順序およびハイブリダイゼーションに関連したエラーを導入し得る。より長いオリゴヌクレオチドは、順序付けされ整列されるオリゴヌクレオチドの数を減少させることによって、アラインメントの部位からの相同性の繰り返しや高GC領域などの問題のある配列を回避することによって、および／または所望の遺伝子を組み立てるために必要な組立サイクルの数を減らすことによって、これらの問題を回避することができる。

【0407】

より大きな遺伝子は図14に例証されるように遺伝子アセンブリ方法を階層的に組み合わせて合成され得る。したがって、中間の長さ（例えば約2 kb）の多くの遺伝子は、PCAなど第一の遺伝子アセンブリ方法を使用して組み立てることができる。第二の遺伝子アセンブリ方法、例えば、Gibsonアセンブリ（Gibson et al., Science, 2008, 319, 1215）は、より大きな遺伝子（例えば約5または10 kb）への中間の長さの遺伝子を組み合わせるために利用され得る。階層的アセンブリは段階的に適用することができる。インビトロ組換え技術は、例えば5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000 kb以上を超えるますます長い配列への、中間の長さの遺伝子のカセットを組み立てるために使用されてもよい。

【0408】

遺伝子のアセンブリに役立つオリゴヌクレオチドは、1つ以上の固体担体上で新たに合成され得る。典型的な固体担体は例えば、スライド、ビーズ、チップ、粒子状物質、鎖、ゲル剤、シート、チュービング、球体、包装容器、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、ポリマー、またはマイクロ流体装置を含む。さらに、固体担体は生物学的、非生物学的、有機、無機、あるいはその組み合わせであり得る。実質的に平面の支持体においては、支持体が、トレンチ、溝、ウェルまたは化学的障壁（例えば、疎水性のコーティングなど）を伴う領域へと、物理的に分離され得る。支持体は、表面の全体の幅に随意にわたって、表面に組み込まれ物理的に分離された領域を含み得る。改良されたオリゴヌクレオチド合成に適切な支持体がさらに本明細書に記載されている。

【0409】

一態様では、オリゴヌクレオチドは、例えばPCA反応チャンバーの部分として、マイクロ流体装置での使用のためのを固体担体上で提供され得る。あるいは、オリゴヌクレオチドは合成され、続いて、マイクロ流体装置へ導入され得る。

【0410】

一般に、完全な遺伝子配列は可変のまたは固定長の（N）オリゴヌクレオチドに適切に分解される。適切なオリゴヌクレオチドの長さは、例えば20–200、50–300、75–350または100–400のヌクレオチド構築用ブロックから選ばれ得る。当業者は、配列セグメントの長さ、これらの任意の値（例えば20–350または200–350）に制限される任意の範囲内であり得ることを認識している。サブ配列（subsequences）間の重複の長さは、約 $N/2$ またはそれ未満であるが、例えば6–40 bp、10–20 bpおよび重なる20–30 bpの重複から、アセンブリ反応の指示の必要性として選択され得る。当業者は、配列セグメントの長さ、これらの任意の値（例えば20–40または6–30）に制限される任意の範囲内であり得ることを認識

している。部分的な塩基相補性の量は使用されるアセンブリ方法に依存して変わり得る。重複遺伝子の組み立て方法については、なPCAオリゴヌクレオチドは、得られたPCRテンプレートの末端を形成するものを除いて、5'および3'の両方で重複してもよい。オリゴヌクレオチド間の塩基対ミスマッチは、ミスマッチの性質によってハイブリダイゼーションに影響を与え得る。オリゴヌクレオチドの3'末端付近のミスマッチは、伸長を阻害することができる。しかしながら、重複のG/Cリッチ領域は、エラーを含んでいるテンプレートにおけるミスマッチを克服し得る。したがって、重なり配列、融解温度、交差反応の可能性、およびオリゴヌクレオチド設計中の二次構造の検討は、考慮に入れることができる。

【0411】

PCRアセンブリ反応から結果として生じる核酸配列は、テンプレートと呼ばれ、PCRによって相補鎖の増殖のための標的核酸として役立ち得る。典型的には、アセンブリ反応に続いて、PCRアセンブリ生成物は、恐らく不完全なアセンブリおよび／またはコンカテマーによる可変サイズの二本鎖DNAであり得る。幾つかの実施形態において、第一ランのテンプレートはオリゴヌクレオチドから組み立てられる。他の具体化では、第二ランのテンプレートは、最初の2ランから得られ、随意に精製されかつ／またはエラーフィルターされた、少なくとも2つの第一ランのテンプレート、PCR反応生成物である2つのテンプレートを含むDNA断片から組み立てられる。第三ランのテンプレートは、同様にエラーフィルターされた、少なくとも2つの第二ランのテンプレートを含むDNA断片から組み立てられる。アニーリングおよびライゲーション反応 (Climie and Santi, 1990; Smith et al., 1990; Kalman et al., 1990)、挿入遺伝子合成 (IGS) (Ciccarello et al., 1990)、一方の鎖を介した遺伝子合成 (Chen et al., 1990)、テンプレート指向ライゲーション (TDL) (Strizhov et al., 1996)、リガーゼ連鎖反応、金 (Au et al., 1998)、または当該技術分野で既知の任意の適切な組み立て方法などの、非ポリメラーゼサイクリングアセンブリベースの戦略が、ポリヌクレオチドの化学合成のために使用され得る。他の非ポリメラーゼサイクリングアセンブリベースの遺伝子合成の戦略は、限定されないが、マイクロアレイベースの遺伝子合成技術 (Zhou et al., 2004)、ブルーヘロン固体支持技術、クロニング構築ブロック技術 (Ball, 2004; Schmidt, 2006; Bugl et al., 2007)、およびDNAアレイからのRNA媒介性遺伝子アセンブリ (Wu et al., 2012)を含む。

【0412】

酵素遺伝子合成

大腸菌およびT4バクテリオファージ感染大腸菌細胞中で1960年代に初めて発見された (Meselson, 1964; Weiss and Richardson, 1967; Zimmerman et al., 1967)、二本鎖DNA中の一本鎖切断を修復する酵素は、連続的ならせん構造を形成するために (Gupta et al., 1968a)、デオキシリボヌクレオチドなど化学合成されたオリゴヌクレオチドを結合するために、使用され得る。別の例において、DNAポリメラーゼI (Klenow) はより長いポリヌクレオチドにオリゴヌクレオチドを連結するために使用することができる。オリゴヌクレオチドは、T4ファージポリヌクレオチドリガーゼを使用するように、例えばリガーゼを使用して、ライゲーションによってさらにともに連結することができる。幾つかの場合において、オリゴヌクレオチドは各々の工程でますます長いポリヌクレオチドを形成するので、階層的にライゲーションすることができる。

【0413】

アニーリングおよびライゲーション反応

遺伝子の容易な合成のための別のアプローチは、多くのオリゴヌクレオチドからのアニーリングおよびライゲーション反応 (Climie and Santi, 1990; Smi

10

20

30

40

50

th et al., 1990; Kalman et al., 1990) を介するポリヌクレオチドのアセンブリを含む。相補的なオリゴヌクレオチドの隣接する対がアニールできるようにするために、最初に、所望の配列の両方の鎖が短い付着末端に分割することができる。合成されたオリゴヌクレオチドは、例えばキナーゼを使用し、二重鎖ヘライゲーションの前にアニーリングされてリン酸化され得る。

【0414】

ショットガンライゲーションおよび共ライゲーション

ショットガンライゲーションアプローチは、いくつかの合成されたブロックから完全な遺伝子のアセンブリを含む (Eren and Swenson, 1989)。従って、遺伝子は、いくつかのセクションでサブアセンブルされていてもよく、それぞれは、隣接するペアに相補的な短い一本鎖と化学的に合成されたオリゴヌクレオチドのいくつかの相補対の酵素的ライゲーションによって構築される。セクションの共ライゲーションは、最終的なポリヌクレオチドの合成を達成することができる。

10

【0415】

挿入遺伝子合成

挿入遺伝子合成 (IGS) (Ciccarelly et al., 1990) は一本鎖 DNA フェージの複製起点を含むプラスミド内の徐々のやり方で、DNA 塩基配列を組み立てるために使用され得る。IGS 法は、オリゴヌクレオチド定方向変異によってプラスミド内の長い DNA オリゴヌクレオチドの、連続する標的化された挿入に基づいている。

20

【0416】

1つの鎖による遺伝子合成

1つの鎖による遺伝子合成は、1つの位置 (Chen et al.; 1990) 経由で遺伝子を合成する方法を指す。標的遺伝子のプラス鎖 DNA は、複数 (例えば 2) の末端相補的なオリゴヌクレオチドおよび複数 (例えば 3) の短い断片間で相補的なオリゴヌクレオチドの存在下で、いくつか (例えば 2) のオリゴヌクレオチドを用いて段階的または単一ステップ T4 DNA リガーゼ反応により組み立てることができる。より少数の合成された塩基の用途は、二本鎖あるいは重複の方法に対する比較において、コストを下げることができる。

【0417】

テンプレート配向性ライゲーション

テンプレートに配向されたライゲーションは、野生型遺伝子 (Strizhovら; 1996) から由来した一本鎖 DNA テンプレートとの部分的なアニーリングによる、オリゴヌクレオチド・モジュールのライゲーションによって大きな合成遺伝子を構築する方法を指す。1つの鎖のみを含むオリゴヌクレオチドは、2つの鎖の合成を必要とする他の技術とは対照的に合成することができる。Pfu DNA 連結酵素などのリガーゼは、テンプレート配向性のライゲーション (TDL) 生成物の線形増幅と同様に、完全長オリゴヌクレオチドのアセンブリ、選択およびライゲーションのための熱サイクルを行うために、使用することができる。相同のテンプレートに対するその信頼により、この方法は、存在するポリヌクレオチド分子との類似性を備えた配列の制限のある数だけの合成に適している。

30

40

【0418】

リガーゼ連鎖反応

リガーゼ連鎖反応 (LCR) はポリヌクレオチド (Auら; 1998) の合成のための用いられている方法になりえる。フラグメントはリガーゼ (例えば Pfu DNA 連結酵素) を使用するので、ライゲーションによっていくつかのオリゴヌクレオチドから組み立てることができる。LCR の後、省略がない遺伝子は、外側の 2 つのオリゴヌクレオチドを使用する変性および伸長によって重なりを共有したフラグメントの混合物により増幅することができる。

【0419】

50

マイクロアレイを媒介とした遺伝子合成

マイクロアレイを媒介とした遺伝子合成は、一般的なコンセプトとして、小さな固体表面上に何万もの特異的プローブを固定する能力に基づく (Lockhart and Barlow, 2001)。アレイの生産については、DNAは固体担体上に直接合成され得 (Lipshutz et al., 1999; Hughes et al., 2001)、あるいは例えばピンまたはインクジェットプリンターで表面上にあらかじめ合成された形態で付着させることができる (Goldmann and Gonzalez, 2000)。得られたオリゴヌクレオチドは、数百の塩基対のDNA構築物を生成する熱サイクル条件下のライゲーションにおいて使用することができる。正確な多重の遺伝子合成のための別のマイクロチップベースの技術 (修正されたアレイ媒介の遺伝子合成技術 (Tian et al., 2004)) は、チップ溶出DNA AACEDの増幅およびアセンブリ (高スループット遺伝子合成 (Richmond et al., 2004) のために開発された方法) に類似している。何千もの「構築」オリゴヌクレオチドおよびタグを付けられた相補的な「選択」オリゴヌクレオチドのプールは、合成誤差を減少するために、フォトプログラマブルなマイクロ流体チップ上で合成され、リリースされ、ライゲーション増幅され、およびハイブリダイゼーションによって選択され得る (Tian et al., 2004)。

【0420】

ブルーヘロン技術

ブルーヘロンバイオテクノロジーによって開発されたブルーヘロン技術は、GeneMakerプラットフォームに基づいた固相支持体ストラテジーに基づき、自動化 (Parker and Mulligan, 2003; Mulligan and Tabone, 2003; Mulligan et al., 2007) を可能にする。GeneMakerプロトコルは一般に、ユーザ・シーケンスデータエントリ、入力されたシーケンスの組み立てに適したオリゴヌクレオチドを設計するアルゴリズム、二重鎖に合成し、ハイブリダイゼーションをオリゴヌクレオチド、固体支持マトリックス上でのカラム内部に自動化されたシーケンシャル付加を介して自動化されたライゲーションベースの固相アセンブリ、および/またはクローニングおよび配列検証を含み得る。ブルーヘロン技術は、PCR方法など構築ブロックの非連続プールに基づいた他の遺伝子アセンブリ方法により生じる、より低いエラーに対する構築ブロックの連続する付加に依存する。

【0421】

本発明の様々な実施形態は、Blue Heron技術の実施で例証されるような連続階層的アセンブリ方法を利用する。

【0422】

スローニング・構築ブロック技術

スローニング・構築ブロック技術 (Slonomics (tm); Sloning Biotechnology GmbH, Puchheim, Germany) は、化学的な遺伝子合成のためのライゲーションベースのストラテジーを使用する別の方法である (Adis International, 2006)。スローニング合成法は、一連の平行の反復し標準化された反応工程 (ピペット操作、混合、インキュベーション、洗浄) (Schatz and O'Connell, 2003; Schatz et al., 2004; Schatz, 2006) から成る。与えられた遺伝子構築物のために特に設計され合成されたオリゴヌクレオチドのライゲーションとは対照的に、スローニング技術は、一連の標準化され、完全に自動化され、コスト効率の良い反応工程と任意の所望配列を形成するために組み合わせられ得る、標準化された構築用ブロックのライブラリを使用する (Schatz and O'Connell, 2003; Schatz, 2006)。

【0423】

ゴールドデンゲートアセンブリ

ゴールデンゲート法（例えばEngler et al. (2008) PLoS ONE, 3(11): e3647; Engler et al. (2009) PLoS ONE 4(5): e5553を参照）は、標準化された多重部分DNAアセンブリを提供する。ゴールデンゲート法は、IIs型エンドヌクレアーゼ（その認識部位はそれらの切断部位から遠位である）を使用し得る。いくつかの異なるIIs型エンドヌクレアーゼが、例えばBsaIが、選択される。ゴールデンゲート法は単一のIIs型エンドヌクレアーゼの使用によって有利になりえる。ゴールデンゲート法は、米国特許出願公開第2012/0258487号にさらに記載されており、その全体が、引用によって本明細書に組み込まれる。

【0424】

幾つかの場合において、遺伝子アセンブリのための方法および組成物は、特に合成された構築ブロックと予め合成された構築ブロックの組み合わせを包含し得る。予め合成されたオリゴヌクレオチドのライブラリは貯蔵されてもよく、所望の標的核酸のためのアセンブリ工程は、新しい合成の必要性を最小限にするように、予め合成されたオリゴヌクレオチドの最大の使用のために最適化されてもよい。具体的には合成されたオリゴヌクレオチドは、標的核酸（予め合成されたオリゴヌクレオチドのライブラリにはカバーされていない）の部分を含み得る。

【0425】

RNAを媒介とした遺伝子組立て

様々な実施形態において、RNA媒介性の遺伝子組立ては、固定されたDNAアレイを形成する表面に随意に固定される、DNA要素からRNA転写物を組み立てるために使用される。DNA要素は、5'末端に向かって、T&RNAポリメラーゼプロモーター配列のようなRNAポリメラーゼ（RNAP）プロモーター配列を含むように設計されている。DNA要素のようなT7RNAPのプロモーター配列とプロモーター配列をコードするオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、二本鎖プロモーターを生成し得る。

RNAPの添加は、多くのRNAコピーをもたらす、これら随意に表面に結合したプロモーターからの転写に影響を与えることができる。これらの増幅されたRNA分子は、自己集合がより長いRNAをもたらすことを可能にするように設計され得る。簡単には、DNA構成要素は、「セグメント配列」（それらは所望の完全長RNA転写物の切片である）、および「辺材配列（splint sequences）」（それらはRNAセグメントの正確なアセンブリを導くためにテンプレートとして役立つ相補的RNAである）をコード化するように設計することができる。RNAセグメントまたは辺材配列をコード化するDNA構成要素は、組み立てられたポリヌクレオチドの合成の間に1つ以上の反応を最適化するために選択され得る。例えば、DNA要素は、各RNA転写物の5'末端がGGヌクレオチドに対応するように構築され得、それはT7RNAポリメラーゼ（T7RNAP）によって示される転写のより高い効率に影響を与えられている。5'末端のCGGトリヌクレオチド配列は、順番にポリG残基のラダーが生じるのを回避するために回避され得、ここでG残基の数は、GTPの結合時の酵素の「滑り」に起因する、1-3の範囲であり得る。アセンブリはRNAによって影響される場合がある：辺材配列へのセグメントのRNAハイブリダイゼーション。ニックは、当該技術分野で既知の適切な酵素を使用するして、化学的にまたは酵素学的にシールされ得る。一例では、完全長RNA転写物へのRNAセグメント配列のアセンブリは、T4RNAリガーゼ2とのライゲーションを含む。T7RNAポリメラーゼによって生成されたものなどトリリン酸化された転写物は、ライゲーションの前にそれらのモノリン酸化されたアナログにトリムする(trimmed)ことができる。トリミングは、各RNAの5'末端からピロリン酸基を除去してRNA 5'ピロホスホヒドラーゼで転写産物のプールを処理することによって達成され得る。以前合成された転写物は、対応する遺伝子を生成するために逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によってコピーすることができる。組み立てられたRNA配列またはそのDNA等量は、本明細書に別記されたものを含む適切な核酸増幅方法を使用するして増幅され得る。この方法は、Wuら(Cheng-Hsien W

10

20

30

40

50

u, Matthew R. Lockett, and Lloyd M. Smith, RNA-Mediated Gene Assembly from DNA Arrays, 2012, Angew. Chem. Int. Ed. 51, 4628-4632) にさらに記載されており、その全体が、引用によって本明細書に組み込まれる。

【0426】

DNAの非酵素の化学的なライゲーション

他のアプローチは、183bpの生物学的に活性なミニ遺伝子の合成について記載されるように (Shabarova et al., 1991)、DNAの非酵素的化学ライゲーション (例えば縮合剤とし臭化シアンで) を含む。

10

【0427】

幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドのアッセンブリは、CLICK化学作用の使用を含む。CLICK化学作用を使用して、様々な分子を連結する適切な方法は、当該技術分野において既知である (for CLICK chemistry linkage of oligonucleotides, see, e.g. El-Sagheer et al. (PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011)。クリック化学作用はCuIがある状態で行われ得る。

【0428】

エラー率と校正

現在の遺伝子合成技術の重大な制限は、プロセスの低い配列忠実度である：化学的に合成されたDNAから作り出された遺伝子クローンは大抵の場合配列エラーを包含している。これらのエラーは、二重らせん構造のオリゴヌクレオチドの組立ての間に、およびDNAの操作および単離、またはクローニング法中に生じる化学的な損傷によって、成分のオリゴヌクレオチドの化学合成中に、プロセスの多くの段階に導入され得る。

20

【0429】

化学的に合成されたDNAフラグメントを生成する既知の方法は、平均で非常に高い配列エラー率 (例えば200~500bpごと) を有している。本明細書に記載されている方法は、非常に低いエラー率での、オリゴヌクレオチドおよびより長いポリヌクレオチドの最初のデノボ合成を可能にする。オリゴヌクレオチド中の一般の変異は、キャッピング、酸化及び/又は非ブロック化の失敗に由来し得る欠失を含む。他の顕著な副反応は、アデノシン (A) をコードする2,6-ジアミノプリンを与えるようなアンモニアによるグアニン (G) の修飾を含む。脱アミノ化は、ウリジン (U) を形成するシチジン (C)、およびイノシン (I) を形成するアデノシンを有することも可能である。

30

【0430】

理論に束縛されることなく、ホスホラミダイト法を用いて、典型的には、オリゴヌクレオチドの合成の間に生成される塩基修飾の非限定的な例としては、2,6-ジアミノプリン残基を形成するデオキシグアノシンのO6酸素の転移 ウリジン残基を形成するデオキシシチジンのN4-アミンの脱アミノ化 (Eadie, J. S. and Davidson, D. S., Nucleic Acids Res. 15:8333, 1987)、脱プリン部位を生じるN6-ベンゾイルのデオキシアデノシンの脱プリン (Shaller, H. and Khorana, H. G., J. Am. Chem. Soc. 85:3828, 1963; Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981), およびN2イソブチルアミドの不完全な除去はデオキシグアノシンの保護基を含む。これらの副産物 (side products) (副産物 (byproducts)) の各々は、クローンを作られた合成ポリヌクレオチドにおける配列エラーの一因となり得る。

40

【0431】

さらに、オリゴヌクレオチド合成の共通の方法は、所望のオリゴヌクレオチドの完全長さ未満である、短縮された生成物を形成しやすい。オリゴヌクレオチド合成への固相アプ

50

ローチは、その3'-水酸基によって固体担体に典型的には付着され、その5'端部へ構築ブロックを連結されることにより伸ばされるオリゴマー・鎖を構築することを包含している。与えられた鎖伸長サイクルの各々のカップリング工程の収率は、一般に<100%になる。長さnのオリゴヌクレオチドについては、n-1の結合があり、最大の収率推定は[結合効率]ⁿ⁻¹によって典型的には決定される。25量体について、98%の結合効率を仮定すると、完全長生成物の計算された最大の収率は約61%になる。それ故、最終生成物は、n-1、n-2、n-3などの失敗の配列の量の減少を包含する。

【0432】

別の種類の合成の失敗は、所望のオリゴヌクレオチドの完全長より長い、「n+」生成物の形成である。理論に束縛されることなく、これらの生成物は、ホスホラミダイト・モノマーが塩基を介して反応する、成長するオリゴヌクレオチドの分枝、特にN-6アデノシンおよびO-6グアノシンに由来し得る。n+生成物の別の源は、望まれない反応部位強力発破支持体からの開始および生殖である。5'-トリチル保護基が結合工程の間に不注意に脱保護されるときもまた、n+生成物が生じ得る。5'-ヒドロキシルのこの早すぎる露出は、ホスホラミダイトの二重の追加を可能にする。オリゴヌクレオチド合成プロセスのこのタイプの合成の失敗は、合成遺伝子中の配列誤りの一因ともなり得る。様々な実施形態で、本発明の方法および組成物は、さらなるに詳しく本明細書に別記されるような反応パラメータの正確な対照を通じて、オリゴヌクレオチドのデノボ合成中にエラーを減少することを可能にする。

【0433】

他のタイプのエラーはPCRベースならびに非PCRベースのアセンブリ方法の間の、より長い構築物へのオリゴヌクレオチドの組み立て中に導入され得る。例えば、より大きな合成の二重らせん構造のオリゴヌクレオチドを形成する、他の合成の二重らせん構造のオリゴヌクレオチドに対する、合成の二重らせん構造のオリゴヌクレオチドのライゲーションは、エラーを生じやすい。例えば、T4DNAリガーゼは低い忠実度を示し、3'および5' A/AまたはT/T mismatches (Wu, D. Y., and Wallace, R. B., Gene 76:245-54, 1989)、5' GT mismatches (Harada, K. and Orgel, L. Nucleic Acids Res. 21:2287-91, 1993) または3' C/A、C/T、T/G、T/T、T/C、A/C、G/GまたはG/T mismatches (Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J., and Hood, L., Science 241:1077-80, 1988) でニックをシールする。

【0434】

エラー率は、遺伝子変異体のライブラリの産生のための遺伝子合成の価値も制限する。1/300のエラー率で、1500の塩基対遺伝子中のクロンの約0.7%は正確である。オリゴヌクレオチド合成からのほとんどのエラーは、フレームシフト変異を結果として生じるので、そのようなライブラリのクロンの99%以上は、完全長のタンパク質を生成しない。エラー率を75%減少することは、40の因子だけ正確なクロンの画分を増大する。本発明の方法および組成物は、合成の品質の向上および超並列かつ時間効率的な方法で有効であるエラー校正方法の適用の両方によって、一般的に観察される遺伝子合成法よりも低いエラー率で、大きなオリゴヌクレオチドおよび遺伝子ライブラリの迅速なデノボ合成を可能にする。したがって、ライブラリは、ライブラリにわたって1/300、1/400、1/500、1/600、1/700、1/800、1/900、1/1000、1/1250、1/1500、1/2000、1/2500、1/3000、1/4000、1/5000、1/6000、1/7000、1/8000、1/9000、1/10000、1/12000、1/15000、1/20000、1/25000、1/30000、1/40000、1/50000、1/60000、1/70000、1/80000、1/90000、1/100000、1/125000、1/150000、1/200000、1/300000、1/400000、1/500000

、1/600000、1/700000、1/800000、1/900000、1/1000000、あるいはそれら未満より低い合計エラー率で、あるいはライブラリの80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%、99.98%、99.99%またはそれら以上にわたって、塩基挿入、欠失、置換をともなって合成され得る。本発明の方法および組成物は、予め決められた／予め選択された配列と比較してエラーフリーの配列に関連するライブラリのサブセット中のオリゴヌクレオチドまたは遺伝子の、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%、99.98%あるいは99.99%以上の関連する低いエラー率を備える、大きな合成オリゴヌクレオチドおよび遺伝子ライブラリに関連する。幾つかの実施形態において、ライブラリ内の単離された容積中のオリゴヌクレオチドまたは遺伝子の、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%、99.98%、99.99%またはそれ以上は、同じ配列を有している。幾つかの実施形態において、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%あるいはそれ以上の類似性または同一性に関連している任意のオリゴヌクレオチドまたは遺伝子の少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%、99.98%、99.99%あるいはそれ以上は、同じ配列を有している。幾つかの実施形態において、オリゴヌクレオチドまたは遺伝子上の規定された遺伝子座と関係するエラー率が最適化される。従って、所定の遺伝子座、または大きなライブラリの一部として、一つ以上のオリゴヌクレオチドまたは遺伝子の選択された遺伝子座の複数の各々は、1/300、1/400、1/500、1/600、1/700、1/800、1/900、1/1000、1/1250、1/1500、1/2000、1/2500、1/3000、1/4000、1/5000、1/6000、1/7000、1/8000、1/9000、1/10000、1/12000、1/15000、1/20000、1/25000、1/30000、1/40000、1/50000、1/60000、1/70000、1/80000、1/90000、1/100000、1/125000、1/150000、1/200000、1/300000、1/400000、1/500000、1/600000、1/700000、1/800000、1/900000、1/1000000、あるいはそれら未満のエラー率を有する様々な実施形態において、そのような誤差を最適化した遺伝子座は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、6000、5000、4000、7000、8000、9000、10000、100000、500000、1000000、2000000、3000000またはそれ以上の遺伝子座を含みうる。実施形態において、誤差を最適化した遺伝子座は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、6000、5000、4000、7000、8000、9000、10000、100000、500000、1000000、2000000、3000000またはそれ以上のオリゴヌクレオチドまたは遺伝子に分布し得る。

【0435】

エラー率は、エラー校正で、またはエラー校正なしで達成することができる。エラー率はライブラリにわたって、またはライブラリの80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95

10

20

30

40

50

％、99.98％、99.99％またはそれ以上にわたって達成することができる。

【0436】

ライブラリは、100、200、300、400、500、600、750、1000、15000、20000、30000、40000、50000、60000、75000、100000、200000、300000、400000、500000、600000、750000、1000000、2000000の、3000000、4000000または5000000以上異なるオリゴヌクレオチドまたは遺伝子を含みうる。異なるオリゴヌクレオチドまたは遺伝子は予め決められた／予め選択された配列と関連され得る。ライブラリは500、bp、600bp、700bp、800bp、900p、1000bp、1250bp、1500bp、1750bp、2000bp、2500bp、3000bp、4000bp、5000bp、6000bp、7000bp、8000bp、9000bp、10kb、20kb、30kb、40kb、50kb、60kb、80kb、90kb、100kb長またはそれより長いオリゴヌクレオチドまたは遺伝子を含みうる。ライブラリは、異なるエラー率及び／又は構築物サイズによって支配される、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のサブセクションなどの、複数の異なるサブセクションから構成され得る、ということが理解される。本発明の組成物および方法は、例えば3ヶ月、2ヶ月、1ヶ月、3週間、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2日未満またはそれ未満の短い時間枠内で、上述の低いエラー率で、オリゴヌクレオチドの上記大規模合成ライブラリまたは遺伝子の構築を可能にする。上述言及されたライブラリの遺伝子は、本明細書の他の場所で詳細に記載されるか、または当該技術分野で既知の、適切な遺伝子アセンブリ方法によって新たに合成されたオリゴヌクレオチドを組み立てることにより合成され得る。

【0437】

いくつかの方法は、合成遺伝子中のエラーを含んでいる配列の除去のための技術分野において既知である。DNAミスマッチ結合タンパク質Mut S (Thermus aquaticusから)は、異なるストラテジー (Schofield and Hsieh, 2003; Carr et al., 2004; Binkowski et al., 2005) を使用して、合成遺伝子から失敗生成物を取り除くために利用することができる。他のいくつかのストラテジー (Pogulis et al., 1996; Ling and Robinson, 1997; An et al., 2005; Peng et al., 2006b) は、誤りを修正するために重複伸長PCRによる部位特異的変異誘発を使用し、オリゴヌクレオチドのさらなる合成と同様に、2以上回のクローニングおよび配列決定と結び付けられ得る。遺伝子合成後の機能的な選択および同定は別のアプローチ (Xiong et al., 2004b; Smith et al., 2003) である。エラー校正への別のアプローチは、ヘテロ二本鎖DNA中で、既知および未知の変異および多型性をスキャンするためのミスマッチ特異的DNAエンドヌクレアーゼであるSURVEYORエンドヌクレアーゼ (Trans genomic) を使用する。SURVEYOR技術は、植物DNAエンドヌクレアーゼ (Qiu et al., 2004) のCELヌクレアーゼ・ファミリーのメンバーである、セロリ (Surveyor nuclease) からのミスマッチ特異的DNAエンドヌクレアーゼに基づく。SURVEYORヌクレアーゼは、少なくとも12のヌクレオチドまでの塩基置換および挿入／欠失をすべて含む、両方のDNA鎖内での任意の塩基置換ミスマッチおよび他の変形部位の、3'側面への高特異性により、切断する。挿入／欠失ミスマッチおよびすべての塩基置換ミスマッチは、ミスマッチ配列に基づいた開裂の様々な効率により、認識され得る。一例では、Surveyorヌクレアーゼ技術は、次の4つの工程を含む方法の中でミスマッチ検出に使用することができる: (i) 変異体／変形および野生型の／所望配列の両方と所望ポリヌクレオチド標的の、随意のポリヌクレオチド増幅、例えばPCR; (ii) ミスマッチを含む、ハイブリダイゼーションを生じるヘテロ二本鎖; (iii) ミスマッチ部位で切断するSurveyorヌクレアーゼによるヘテロ二本鎖の処置; および (iv) 選択の検出／分離プラットフォームを使用する

10

20

30

40

50

、消化されたポリヌクレオチド生成物の随意の解析。(図15-16)切断部位のエラーが囓まれた後、ヘテロ二本鎖の処理に起因する分解産物は、例えば、エキソヌクレアーゼによって、エラーなしの生成物を生成するために、PCAにさらされ得る(図15)。ミスマッチ塩基は、エラーなしの鎖を生成するために、実質的にまたはいくつかの場合において完全に、除去され得る。幾つかの実施形態において切断された鎖は、ポリヌクレオチドのプール中のターゲットに再アニーリングし、伸長することができる。ポリヌクレオチドを包含しているエラーの頻度は、ミスマッチを除去するヘテロ二本鎖の最初のアニーリングおよび開裂の後に非常に低いので、最も切断された鎖は、最初ミスマッチの部位でのエラーがない配列により、標的にアニーリングされる。ターゲットに沿った伸長を通じて、ポリヌクレオチドは最初ミスマッチなしに再合成することができる。遺伝子アセンブリの様々な実施例はエラー校正を組込む。例えば、PCRに基づいた正確な合成(PAS)プロトコルが組み入れられ：それは、遺伝子およびオリゴヌクレオチドの設計、オリゴヌクレオチドの精製、セグメントを合成する第一のPCR、完全長遺伝子を組み立てる第二PCR、および配列決定およびエラー校正(Xiong et al., 2006)である。また、試料は、切断された生成物が参加できないPCRにかけられ、それにより試料中にエラーを豊富に希釈する(図16)。

10

【0438】

特定の実施形態において、本発明は、完全に一致した合成DNA断片を含む溶液からの、DNAの化学合成の過程に発生する、ミスマッチ、バルジおよび小ループを有するDNA分子、化学的に改変された塩基、および他のヘテロ二重鎖など、二本鎖オリゴヌクレオチドを選択的に除去する方法を提供する。方法は、ヘテロ二本鎖DNAに直接、またはヘテロ二重鎖含有DNAへの、取り込まれたヌクレオチドアナログを含む親和性システム(例えば、ビオチン分子またはビオチンアナログの導入に続いて形成されるアビジン-ビオチン-DNA複合体に基づいているもの)、およびその後のストレプトアビジンを含むタンパク質のアビジンファミリーの任意のメンバーによる結合を介して、形成された特定のタンパク質-DNA複合体を分離する。アビジンは、固体担体上に固定化することができる。

20

【0439】

この方法の中心は、二本鎖オリゴヌクレオチド(例えば、DNA)内のミスマッチまたは不對塩基分子を認識し特異的に結合し、ヘテロ二重鎖の部位またはその近くへ関連付けられたままの酵素であり、それは、一本鎖または二本鎖切断を作成し、またはヘテロ二重鎖部位またはその近くで鎖の移転転位事象(strand transfer transposition)を開始することができる。合成DNA分子溶液からの、誤対合、ミスマッチおよび化学的に改変されたヘテロ二本鎖DNA分子の除去は、予想される合成されたDNA配列とは異なるDNA分子の濃度低下をもたらす。

30

【0440】

ミスマッチ認識タンパク質は、典型的には、ミスマッチの上または近傍に結合する。ミスマッチ認識タンパク質ベースのエラー校正のための試薬は、エンドヌクレアーゼ、制限酵素、リボヌクレアーゼ、ミスマッチ修復酵素、リゾルベース、ヘリカーゼ、リガーゼ、ミスマッチに特異的な抗体、およびそれらの変異体であるタンパク質をみ得る。酵素は、例えば、T4エンドヌクレアーゼ7、T7エンドヌクレアーゼ1、S1、マングベーンヌクレアーゼ、MutY、MutS、MutH、MutL、切断酵素(cleavase)、およびHINF1から選択され得る。本発明の特定の実施形態では、ミスマッチ認識タンパク質は、ミスマッチ部位の近傍のミスマッチDNAの少なくとも一方の鎖を切断する。

40

【0441】

一本鎖ニックを形成するヘテロ二本鎖DNA(例えばCELIエンドヌクレアーゼ酵素)を認識し切断するタンパク質の場合、得られたニックは、親和性パートナーシップに適した修飾ヌクレオチド(例えばビオチン部分またはその類似体を含むもの)を組み込むための、DNAポリメラーゼの基質として使用され得る。ミスマッチDNAを認識し一本鎖

50

ニックを生成するタンパク質の例があるが、それはリゾルベースエンドヌクレアーゼ、グリコシラーゼおよびエンドヌクレアーゼ活性を有する特殊なMutS様タンパク質を含む。いくつかの場合には、ニックは、さらなる処理後のヘテロ二本鎖DNA分子で作成され、例えばチミンDNAグリコシラーゼは、ミスマッチDNAを認識しデオキシリボースとDNA中の塩基のうちの1つとの間の結合を加水分解するために使用することができ、必ずしもDNAの糖リン酸骨格を切断することなく、無塩基部位を生成する。脱塩基部位は、DNAポリメラーゼ伸長に適したニック酵素に、APエンドヌクレアーゼによって変換され得る。タンパク質ヘテロ二本鎖DNA複合体は、故に、MutSタンパク質の例において、直接的に、またはその後のヘテロ二重鎖含有鎖へのヌクレオチドアナログ（ビオチンまたはそのアナログ）の取り込み、およびその後のストレプトアビジンまたはアビジンタンパク質とビオチンまたはビオチンアナログとの結合で間接的に、形成され得る。

10

【0442】

その他のエラー校正方法は、鎖転移反応によるインビトロでのミスマッチDNAの部位に又はその近くに、トランスポザーゼDNA結合部位の予め切断されたバージョンを含む、標識DNA（例えばビオチンまたはビオチンアナログで標識されたDNA）を優先的に挿入する、MUAトランスポザーゼなどのトランスポザーゼ酵素に依存し得る。インビトロMUAトランスポザーゼ向かう鎖移転は、ミスマッチDNAに特異的であることが当業者およびトランスポザーゼ活性に精通した当業者に知られている。この方法では、予め切断されたMUA結合部位のDNAは、ストレプトアビジンまたはアビジンタンパク質で、タンパク質-ビオチン-DNA複合体の形成と、その後のDNAを含むヘテロ二重鎖転への鎖転移を可能にする分子の5'末端にて、ビオチン化され得る。

20

【0443】

インビトロでのタンパク質-DNA複合体の分離は、タンパク質の結合についての高い親和性および能力ならびにDNAの結合について低い親和性を有している固体マトリックスと、タンパク質-DNA複合体を含む溶液をインキュベートすることによって、達成され得る。いくつかの場合において、このようなマトリックスは、本明細書に記載される本発明の様々な実施形態に関連して、マイクロ流体デバイス内に埋め込むことができる。

【0444】

酵素のいくつかの大きなクラスは、ミスマッチ、欠失または損傷した塩基を含有するDNA基質などのヘテロ二重鎖ポリヌクレオチドを優先的に消化する。典型的には、これらの酵素は、その損傷を受けたまたは不一致の基質を、ニックまたは単一塩基対の隙間に変換するように作用する（いくつかの場合では、脱塩基部位をニックに変換するAPエンドヌクレアーゼの助けによって）。DNAグリコシラーゼ、ミスマッチエンドヌクレアーゼ、およびMutSLHミスマッチ修復タンパク質は、エラーを含む合成断片の修飾におけるそれらの有用性について、特に有用である。本発明の方法および組成物は、エラーを含むDNA分子を同定し、かつおよびクローニングプロセスからそれらを除去するために、これらのニックまたは小さなギャップに依存し得る。

30

【0445】

技術の組み合わせは、エラーを含む処理されたポリヌクレオチドを除去するために使用することができる。DNAグリコシラーゼは、ミスマッチ塩基を除去して、いくつかの場合において、得られた脱ピリミジン/脱プリン（AP）部位で切断する酵素のクラスである。チミンDNAグリコシラーゼ（TDGS）は、複合混合物からの、ミスマッチを含有するか完全に整合したDNA集団を、濃縮するために使用することができる（X. Pan and S. Weissman, "An approach for global scanning of single nucleotide variations" 2002 PNAS 99:9346-9351）。DNAグリコシラーゼはデオキシリボースおよびDNA中の塩基の間の結合を加水分解するために使用され得る、必ずしもDNAの糖リン酸骨格を切断することなく、無塩基部位を生成する。単一塩基ミスマッチの4つのすべてのグループと他のいくつかのミスマッチが、2つのTDGSの混合によって加水分解され得る。また、マグネシウムの非存在下における脱塩基部位のため

40

50

の酵素の高親和性は、ヘテロ二重鎖に富んだ又は枯渇した集団に、DNA分子を分離するために利用され得る。非常に多くのDNAグリコシラーゼが同定されており、非限定的な例は、米国特許出願公開第2006/0134638号に見られ、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。DNAグリコシラーゼは、典型的には不自然な、損傷またはミスマッチ塩基のサブセットに作用し、塩基を除去し、その後の修復のための酵素を残す。クラスとして、DNAグリコシラーゼは、それがDNAから除去される化学酵素のための幅広い、明瞭な、および重複する特異性を有している。グリコシラーゼ処理は低レベルまで塩基置換のエラー率を減らすのに特に有用であり得る。AP部位を残すグリコシラーゼは、DNAにニックを生成するために、大腸菌エンドヌクレアーゼI VまたはエキソI I IなどのAPエンドヌクレアーゼと組み合わせられる。

10

【0446】

ミスマッチまたは損傷したDNAの領域においてDNAをニッキングのためのミスマッチエンドヌクレアーゼ酵素の非限定的な例としては、T7エンドヌクレアーゼI、大腸菌エンドヌクレアーゼV、T4エンドヌクレアーゼV I I、マングベーンヌクレアーゼ、細胞、大腸菌エンドヌクレアーゼI V、およびUVDEを含む。

【0447】

PCR断片からエラーの大部分を除去するMutSLH複合体の使用は、Smithらによって記載されており(J. Smith and P. Modrich, "Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products." 1997, PNAS 94: 6847-6850)、その全体が引用により本明細書に組み込まれ得る。DAMメチル化の非存在下では、MutSLH複合体は、(GATC)部位で二本鎖切断を触媒するために使用され得る。PCR産物は、ATPの存在下でMutSLHにより処理され得る。

20

【0448】

合成ポリヌクレオチドにおけるエラー校正に関するより詳細な開示は、米国特許出願公開第2006/0134638号および米国特許第6664112号に見られ、これらは両方ともその全体が本明細書に組み込まれる。

【0449】

酵素は、結合パートナーと本発明の方法および組成物に従って合成されたポリヌクレオチドのエラー校正に使用される他の試薬は、本明細書中に記載の担体および基板上に、コーティングされた又は官能表面などの表面上に固定化され得る。反応は、固定された1つ以上の構成要素によりインサイツで行われる。適切な表面上の構成要素などを利用する、より少数のエラーまたはエラーなしで、ポリヌクレオチドを豊富にする精製スキームは、本発明の範囲内にあることが理解される。

30

【0450】

結局、低いエラー率のポリヌクレオチドのデノボ合成を達成するために、遺伝子アセンブリのためのストラテジーは、高品質のオリゴヌクレオチドに依存する。本明細書に記載されている方法および組成物は、様々な実施形態中のそのような高品質のオリゴヌクレオチドの合成を可能にする。

【0451】

核酸の増幅

幾つかの実施形態において、本明細書に記載される核酸は増幅され得る。増幅は当該技術分野で既知の任意の手段によって行うことができる。幾つかの場合において、核酸はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅される。様々なPCR法は、当該技術分野において既知であり、例えば、米国特許第5,928,907号、米国特許第6,015,674号に記載されており、それらは引用によって本明細書に組込まれる。核酸増幅の他の方法は例えば、リガーゼ連鎖反応、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイおよびハイブリダイゼーション・アッセイを含む。これらおよび他の方法は、米国特許第5928907号および第6015674号により詳細に記載されている。また例えば米国特許第5,928,907号および第6,015,674号により詳しく記載されているよう

40

50

に、リアルタイム光学的検知システムは、当該技術分野で既知である。本明細書で使用され得る他の増幅方法は、米国特許第5, 242, 794号；第5, 494, 810号；第4, 988, 617号；および第6, 582, 938号に記載されており、その全体が引用により本明細書に組み込まれる。

【0452】

本発明のいくつかの態様において、核酸またはポリヌクレオチドの指数関数的な増幅が使用される。これらの方法は、しばしば核酸またはポリヌクレオチド分子、またはその補体の複数のコピーの、生成物の触媒された形成に依存する。増幅産物は時々「アンプリコン (amplicons)」と呼ばれる。DNAの特異的な二重鎖配列の酵素の増幅のためのそのような1つの方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である。このインビトロ増幅法は、好熱性鋳型依存性ヌクレオチドポリメラーゼによる変性、オリゴヌクレオチド・プライマーのアニーリング、およびプライマー伸長の反復サイクルに基づいており、その結果、プライマーによって挟まれたポリヌクレオチド分析物の所望の配列の複製が指数関数的に増加する。DNAの反対の鎖にアニーリングする二つの異なるPCRプライマー

が配置され、その結果、一方のプライマーのポリメラーゼ触媒による伸長産物は、他のための鋳型鎖として働くことができ、オリゴヌクレオチド・プライマーの5'末端との間の距離によって長さが定められる、離散的な二本鎖フラグメントの蓄積につながる。提供される本発明の方法において使用することができる他の増幅技術は、AFLP (増幅された断片長の多型)、PCR (例えばVos et al. 1995. AFLP: a

new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-14を参照)、アレル特異的PCR (例えばSaiki R K, Bugawan T L, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes Nature 324: 163-166を参照されたい)、アレル特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いた酵素的に増幅されたβグロビンおよびHLA-DQのアルファDNAの分析 (Nature 324: 163-166)、Alu PCR、アセンブリPCR (例えばStemmer W P, Cramer A, Ha K D, Brennan T M, Heyneker H L (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides Gene 164: 49-53を参照)、非対称PCR (たとえばSaiki R K supraを参照)、コロニーPCR、ヘリカーゼ依存PCR (例えばOchman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetics. 1988 November; 120 (3): 621-3)を参照)、ホットスタートPCR、インバースPCR (例えばOchman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetics. 1988 November; 120 (3): 621-3を参照)、インサイツPCR、インター配列特異的PCRまたはでSR PCRは、デジタルPCRは、直線状のアフタ指数PCRまたは後期PCR (例えばPierce K E and Wang L T (2007) Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells Methods Mol. Med. 132: 65-85を参照)、長いPCR、ネスティッドPCR、real-time PCR、二重鎖PCR、多重PCR、定量PCR、定量蛍光PCR (QF-PCR)、多重蛍光PCR (MF-PCR)、制限断片長PCR (PCR-RFLP)、PCK-RFLP IRT-PCR-IRFLP、ポロノニ

10

20

30

40

50

ー (polonony) PCR, インサイツ・ローリングサークル増幅 (RCA), ブリッジPCR, ピコタイターPCR およびエマルジョンPCR, 又は単一細胞 PCR、を含む。他の適切な増幅方法、転写増幅、自立した配列複製、ターゲット・ポリヌクレオチド配列の選択的な増幅、コンセンサス配列で刺激されるポリメラーゼ連鎖反応 (CPCR)、恣意的に刺激されるポリメラーゼ連鎖反応 (APPCR) および分解したオリゴヌクレオチドで刺激されるPCR (DOP-PCR)を含む。増幅のための別の方法は、一本鎖オリゴヌクレオチド・プライマーを使用する、一本鎖ポリヌクレオチドの増幅を包含している。増幅される一本鎖ポリヌクレオチドは、他方と実質的にまたは完全に相補的な、2つの非コンティグ配列を包含しており、それによりステムループ構造を形成するように共にハイブリダイズすることができるこの一本鎖ポリヌクレオチドは既にポリヌクレオチド分析物の部分であってもよいし、またはポリヌクレオチド分析物の存在の結果作り出され得る。

10

【0453】

核酸の増幅の結果を達成する別の方法は、リガーゼ連鎖反応 (LCR) として知られている。この方法は、対の前もって形作られた核酸プローブを連結するためにリガーゼ酵素を使用する。存在する場合、プローブは核酸分析物の各々の相補鎖によりハイブリダイズし、リガーゼは特定の核酸配列を繰り返すために次のサイクルで働きうる2つのテンプレートにおいてともに結果として生じる、プローブ対の各々を結合するために利用される。

【0454】

核酸増幅を達成する別の方法は核酸配列に基づいた増幅 (NASBA) である。この方法は、核酸のRNAコピーを提供するために、特定の核酸のインビトロで、同一の、及び等温の増幅を誘導するプロモーター指向性の、酵素的なプロセスである。NASBAを行うための試薬は、プロモーターを含む5'末端の最初のDNAプライマー、第二のDNAプライマー、逆転写酵素、RNA分解酵素H、T7 RNAポリメラーゼ、NTPおよびdNTPを含む。

20

【0455】

核酸の特異的な基を増幅する別の方法はQベータ・レプリカーゼ方法であり、。それは、Qベータ・レプリカーゼがそのRNA基板を指数関数的に増幅する能力に依存する。そのような増幅を行なうための試薬は「ミディー変形-RNA」(増幅可能なハイブリダイゼーションプローブ)、NTPのもの、およびQベータ・レプリカーゼを含む。

30

【0456】

核酸を増幅する別の方法は、3SRとして知られており、RNA分解酵素H活性が逆転写酵素の中にあるという点を除いて、NASBAに類似している。3SRによる増幅は、プロモーター指向性RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、RNA分解酵素Hを標的RNAと組み合わせる、等温の増幅においてRNAが増幅される、RNA特異的標的方法である。FahyらのPCR Methods Appl. 1: 25-33 (1991)を参照されたい。

【0457】

核酸を増幅する別の方法はGen-Probeによって使用される、転写を媒介とした増幅 (Transcription Mediated Amplification) (TMA) である。該方法は自給の配列複製中の2つの酵素の利用において、NASBAに類似している。本明細書に引用により組み込まれる米国特許第5,096,699号を参照されたい。

40

【0458】

核酸の増幅のための別の方法は、鎖変位増幅 (Strand Displacement Amplification) (SDA) (Westin et al 2000, Nature Biotechnology, 18, 199-202; Walker et al 1992, Nucleic Acids Research, 20, 7, 1691-1696)、これは、ニックの3'末端を伸長し下流のDNA鎖を置換するための、HincIIまたはBsoBIなどの制限エンドヌクレアーゼが

50

認識部位の半ホスホロチオエート型の非修飾鎖にニックを入れるための能力、および、KlenowエキソマイナスポリメラーゼまたはBstポリメラーゼなどのエキソヌクレアーゼ欠損型DNAポリメラーゼの能力、に基づく等温増幅法である。指数関数的な増幅は、センスおよびアンチセンスの反応の連結を結果として生じ、ここで、センス反応から置き換えられ鎖は、アンチセンスの反応およびターゲットとして役立ち、逆もまた同様である。

【0459】

核酸の増幅のための別の方法は、ローリングサークル増幅(RCA)(Lizardi et al., 1998, Nature Genetics, 19:225-232)である。RCAは核酸の環の形態の一本鎖分子を増幅するために使用され得る。その最も簡単な形態では、RCAは、環状の核酸に対する一本鎖プライマーのハイブリダイゼーションを包含している。鎖転位活性によるDNAポリメラーゼによるプライマーの伸長は、一本鎖DNA鎖へ連結された環状の核酸の複数コピーの産生を結果として生じる。

【0460】

本発明のいくつかの実施例では、RCAはライゲーションと結び付けられる。例えば、一本鎖オリゴヌクレオチドはライゲーションに、およびRCAのための環状の鋳型として使用され得る。このタイプのポリヌクレオチドを、「パドロックプローブ」または「RCA・プローブ」と呼ぶことができる。パドロックプローブについては、オリゴヌクレオチドの両方の末端が、対象の核酸配列内のドメインへ相補的な配列を包含している。パドロックプローブの第一の端部は、興味のある核酸配列中の第一のドメインに実質的に相補的であり、パドロックプローブの第二の端部は、第二ドメイン(第一のドメインの近くの第一のドメインに隣接している)に実質的に相補的である。ターゲット核酸に対するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション複合体の形成を結果として生じる。パドロックプローブの末端のライゲーションは、環状のポリヌクレオチドを包含している、修飾されたハイブリダイゼーション複合体の形成を結果として生じる。幾つかの場合において、ライゲーション前に、ポリメラーゼはパドロックプローブの1つの末端の伸長によりギャップを充たし得る。したがって、形成された環状のポリヌクレオチドは、ポリメラーゼの付加により、増幅された生成物核酸の形成を結果として生じる、RCA用のテンプレートとして役立つことができる。本明細書に記載の本発明の方法は、5'末端および3'末端の両方の上の規定配列を有する増幅した生成物を、生成することができる。そのような増幅された生成物は、パドロックプローブとして使用され得る。

【0461】

本発明のいくつかの態様は、核酸またはポリヌクレオチドの線形増幅を利用する。線形増幅は、核酸またはポリヌクレオチド分子の、通常は核酸またはポリヌクレオチドの分析物の、たった1つの鎖の補体の1つ以上のコピーの形成を包含している方法を一般に指す。したがって、線形増幅と指数関数的な増幅の間の主要な違いは、後者のプロセスでは、生成物がより多くの生成物の形成用基板として役立つが、一方前者のプロセスでは、開始配列が生成物の形成用の基板であるが、反応(すなわち開始テンプレートの複製)の生成物は生成物の生成の基質でない、ということである。線形増幅では、形成される生成物の量が時間の指数関数である場合、生成物の量は、指数関数的な増幅に対立するものとしての時間の線形関数としての増大を形成した。

【0462】

幾つかの実施形態において、当該技術分野における技術のうちの1つとして認識されるように、増幅方法は、固相増幅、ポロニー増幅、コロニー増幅、エマルジョンPCR、ビーズRCA、表面RCA、表面のSDAなどであり得る。いくつかの実施形態では、DNA分子の一端のみによって適切なマトリックスに溶液または係留中の遊離DNA分子の増幅を生じる増幅方法を使用することができる。両方のPCRプライマーが表面に付着しているブリッジPCRに依存する方法が、使用され得る(例えば国際公開第2000/018957 および Adessi et al., Nucleic Acids Research (2000): 28(20): E87を参照されたい)。幾つかの

場合において、本発明の方法は、同一のアンプリコンの空間クラスターリングを維持する多重増幅を引用して (Harvard Molecular Technology Group and Lipper Center for Computational Genetics のウェブページを参照されたい)。「ポリメラーゼ・コロニー技術」または「ポロニー」を作り出すことができる。これらは、例えば、インサイツのポロニー (Mitra and Church, Nucleic Acid Research 27, e34, Dec. 15, 1999)、インサイツのローリングサークル増幅 (RCA) (Lizardi et al., Nature Genetics 19, 225, July 1998)、ブリッジPCR (米国特許第5,641,658号)、ピコタイターPCR (Leamon et al., Electrophoresis 24, 3769, November 2003), and emulsion PCR (Dressman et al., PNAS 100, 8817, Jul. 22, 2003)を含む。発明の方法は、ポロニーを生成しおよび使用する新しい方法を提供する。

【0463】

増幅は、標的配列のコピー数が増大される任意のプロセス、例えばPCRを通じて達成され得る。当該技術分野で既知であるPCRによる標的配列の増幅に好ましい条件は、プロセスの様々なステップで最適化され、反応中の要素の特性 (ターゲット・タイプ、ターゲット濃度、増幅される配列長等、標的および／または1つ以上のプライマーの配列、プライマーの長さ、プライマー濃度は、使用されるポリメラーゼ、反応容量、1つ以上の要素の、一つ以上の他の要素に対する割合、その他など、それらのうちいくつかまたはすべてが変更され得る) に依存し得る。一般に、PCRは、(二本鎖場合) 増幅されるべき標的の変性の、標的への1つ以上のプライマーのハイブリダイゼーションの、およびDNAポリメラーゼによるプライマー伸長の工程を含んでおり、標的配列を増幅するために繰り返される (をまたは「循環される」)。このプロセスの工程は、産出を増強するか、偽性の生成物の形成および／または増加を減少させるか、あるいはプライマー・アニーリングの特異性を減少させるように、様々な結果について最適化され得る。最適化の方法は当該技術分野において周知であり、増幅反応での要素のタイプまたは量に対する、および／または、ある工程の温度、ある工程の持続、および／またはサイクル数等の、プロセス中の与えられた工程の条件への調節を含んでいる。幾つかの実施形態において、増幅反応は、5、10、15、20、25、30、35、50、またはそれ以上のサイクルであり得る。幾つかの実施形態において、増幅反応は、5、10、15、20、25、35、50、またはそれ以上よりも少ないサイクルであり得る。幾つかの実施形態において、サイクルは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上段階の工程任意のような、任意の工程数を含む。工程は、与えられた工程の目的を達成するのに適切な、任意の温度または温度の勾配を含み得、該工程は、限定されないが、3'末端伸長 (例えばアダプター挿入)、プライマー・アニーリング、プライマー伸長および鎖変性を含む。工程は、限定されないが、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、70、80、90、100、120、180、240、300、360、420、480、540、600秒またはそれより多い秒 (手動で阻止されるまで無限を含む) の、それら未満またはそれら以上の任意の持続時間になり得る。異なる工程を含む任意の数字のサイクルは任意の順序に組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、別の工程を含む別のサイクルは、総サイクル数が、約5、10、15、20、25、30、35、50、またはより多くサイクル、またはそれら未満またはそれらより多いように、組み合わせられる。増幅は、本発明の方法および組成物を用いたマルチ反応手順中の任意の時点 (例えば独立反応体積からの配列決定ライブラリのプールの前または後) で行われ得、本明細書に記載の任意の適切な標的分子を増幅するために使用され得る。

【0464】

ライゲーション反応

幾つかの実施形態においてオリゴヌクレオチドはライゲーションされるか、またはアダ

10

20

30

40

50

プターまたはバーコードに連結され得る。連結剤は、リガーゼであり得る。幾つかの実施形態においてリガーゼは、周知の手順 (Maniatis, T. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982)) を使用する、T4 DNAリガーゼである。他のDNAリガーゼも使用され得る。ライゲーションに関しては、好熱性生物に由来するものなどの他のリガーゼは故に、(増加した特異性を有する) より長いオリゴヌクレオチドの使用を可能にし、それは、こうしたオリゴヌクレオチドをアニールするための通常の許容可能な高温下で同時にアニーリングまたは連結され得る。

【0465】

用語「接着点」および「ライゲーション」は、本明細書に使用されるように、2つのポリヌクレオチドに関して、隣接するバックボーンで一本鎖の大きなポリヌクレオチドを生成するための、2つの別々のポリヌクレオチドの共有結合の取付けを指す。2つのポリヌクレオチドを連結する方法は、当該技術分野では既知であり、制限、酵素および非酵素(例えば化学物質)を制限なしで含む。非酵素の結合反応の実施例は、米国特許第5,780,613号および第5,476,930号に記載されている非酵素のライゲーション技術を含む。幾つかの実施形態において、アダプターオリゴヌクレオチドは、リガーゼ(例えばDNAリガーゼまたはRNAリガーゼ)による標的ポリヌクレオチドに連結される。各々が特徴づけられた反応条件を有する複数のリガーゼは、技術分野では既知であり、制限なしで、tRNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼ、Thermus filiformis DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼ、Tth DNAリガーゼ、Thermus scotoductus DNAリガーゼ(IおよびII)、耐熱性のリガーゼ、Ampligase thermostable DNAリガーゼ、Vancタイプ・リガーゼ、9°N DNAリガーゼ、Tsp DNAリガーゼ、およびバイオプロスペクティングによって発見された新しいリガーゼを包含するNAD⁺依存のリガーゼ; T4 RNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼ、T3 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、Pfu DNAリガーゼ、DNAリガーゼI、DNAリガーゼIII、DNAリガーゼIV、およびバイオプロスペクティングによって発見された新しいリガーゼを包含するATP依存性のリガーゼ; および野生型、突然変異体アイソフォーム、および、それらの遺伝的に改変された変形、を含む。ライゲーションは、相補的なオーバーハングなど、ハイブリダイズすることができる配列を有するポリヌクレオチド間であり得る。ライゲーションは、また2つの平滑末端間にある場合がある。一般に、5'リン酸塩は結合反応の中で利用される。5'リン酸塩は標的・ポリヌクレオチド、アダプターオリゴヌクレオチドまたは両方によって提供され得る。5'リン酸塩は、必要に応じて加えられるか、または連結されるポリヌクレオチドから取り除かれ得る。5'リン酸塩の付加または除去のための方法は、当該技術分野では知られており、制限なしで酵素および化学プロセスを含む。5'リン酸塩の付加及び/又は除去に役立つ酵素は、キナーゼ、フォスファターゼおよびポリメラーゼを含む。幾つかの実施形態において、ライゲーション反応(例えばアダプター末端、および標的ポリヌクレオチド末端)における連結された2つの末端の両方とも、5'リン酸塩を提供し、その結果2つの末端を連結する際に、2つの共有結合が作られる。幾つかの実施形態において、ライゲーション反応(例えばアダプター末端、および標的ポリヌクレオチド末端)における連結された2つの末端の1つのみが、5'リン酸塩を提供し、その結果2つの末端を連結する際に、一つの共有結合のみが作られる。幾つかの実施形態において、ターゲット・ポリヌクレオチドの一本鎖または両鎖での一鎖のみが、アダプターオリゴヌクレオチドに連結される。幾つかの実施形態において、ターゲット・ポリヌクレオチドの一本鎖または両鎖での両鎖が、アダプターオリゴヌクレオチドに連結される。幾つかの実施形態において、3'リン酸塩はライゲーションに先立って除去される。いくつかの実施形態では、アダプターオリゴヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの両端に付加され、一方、各末端に1つまたは両方の鎖が、一つ以上のアダプターオリゴヌクレオチドに結合されている。両端の両方の鎖がアダプターオリゴヌクレオチドに結合されている場合、接合に続いて開裂反応が起き、それは対応する3'末端の延長のためのテンプレート

10

20

30

40

50

としての役割を果たすことができる5´末端オーバーハングを残し、その3´末端はアダプターオリゴヌクレオチドに由来する1つまたは複数のヌクレオチドを含見得る。幾つかの実施形態において、ターゲット・ポリヌクレオチドは、1つの端部の第一のアダプターオリゴヌクレオチドおよびもう1つの端部の第二アダプターオリゴヌクレオチドに連結される。幾つかの実施形態において、ターゲット・ポリヌクレオチド、およびそれが連結されるアダプターは平滑末端を含む。幾つかの実施形態において、別の結合反応は、各々のサンプルにつき少なくとも1つのバーコード配列を含む異なる第一アダプターオリゴヌクレオチドを使用して、各々のサンプルのために実行され、その結果、1より多いサンプルの標的ポリヌクレオチドにバーコード配列は連結されない。アダプター／プライマー・オリゴヌクレオチドを連結するターゲット・ポリヌクレオチドは、連結されたアダプターによって「タグ付けされる」ことを考慮される。

10

【0466】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される核酸は、CLIC化学作用の使用にリンクされている。CLIC化学作用を用いた種々の分子をリンクするための適切な方法は、当該技術分野で既知である (for CLICK chemistry linkage of oligonucleotides, see, e.g. El-Sagheer et al. (PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011)。CLIC化学作用はCuIの存在において行われる。Barcodes

【0467】

バーコード

20

バーコードは、典型的には、バーコードが識別されるように関連するポリヌクレオチドのいくつかの機能を可能にする既知の核酸配列である。いくつかの実施形態において、バーコードは、標的ポリヌクレオチドに結合するとき、標的ポリヌクレオチドが由来する試料の識別子として機能する核酸配列を含む。

【0468】

バーコードは、十分な程度の識別の可能にするために適切な長さ（例えば、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、またはそれ以上のヌクレオチド長）に設計され得る。2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のバーコードなどの複数のバーコードは、非バーコード配列によって随意に分離され、同一分子上で使用されてもよい。いくつかの実施形態において、バーコードは、長さが10、9、8、7、6、5、又は4ヌクレオチドより短い。いくつかの実施形態では、いくつかのポリヌクレオチドに関連したバーコードは、他のポリヌクレオチドに関連したバーコードとは異なる長さである。一般に、バーコードは、十分な長さであり、それらが関連付けられているバーコードに基づく試料の同定を可能にするのに十分な異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコード、及びそれが関連付けられている試料ソースでは、バーコード配列中の1またはそれ以上のヌクレオチドの変異、挿入、または欠失（例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のヌクレオチドの変異、挿入、または欠失）の後に、正確に識別され得る。いくつかの実施形態では、複数のバーコードの各バーコードは、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の位置など、少なくとも三つのヌクレオチド位置での複数のバーコードの他の全てのバーコードとは異なっている。

30

40

【0469】

配列決定

本明細書に記載のデノボ合成されたオリゴヌクレオチドより長いポリヌクレオチド産物は、多反応手順などの、その後の工程を進める前の、品質管理の対象となり得る。本明細書に記載されるような基板の分解された特徴部のような別々のボリューム内の個々の製品を維持しつつ、品質制御が適用されてもよい。画分は品質管理のために小分けされ得るが

50

、各生成物を区画化する体積の残りの部分は、アクセス可能なままである。

【0470】

図17は、次世代配列決定を含む例示的な品質管理手順を示す。特定の産物を標的化する遺伝子特異的パドロックプローブは、試験される製品の重複配列のセグメントをカバーするように設計されている。遺伝子産物に特異的な個々のパドロックプローブの末端は、配列決定の間に適切なカバレッジのための遺伝子産物に沿って散乱領域にハイブリダイズできるように設計得る。同一の遺伝子産物に特異的な全てのプローブは、その遺伝子産物に関連したバーコード配列を含み得る。適切なポリメラーゼおよび／もしくはリガーゼは、遺伝子産物の目標に沿ったパドロックプローブの末端の間を充填するために使用され得る。いくつかの場合において、パドロックプローブが環状一本鎖DNAを形成し得る。典型的には、線形遺伝子産物は、例えば、遺伝子産物の断片の一部を分取した後、消化され得る。代替的に、遺伝子産物の量の割合は、パドロックプローブの添加の前に分取され得る。遺伝子産物のセグメントを有するパドロックプローブは、例えばPCRを使用して増幅され得る。パドロックプローブのユニバーサルまたは特異的プライマー結合領域は、増幅の間に標的化され得る。配列決定のプライマー結合領域は、例えば、パドロックプローブに元々存在してもよく、またはその後の工程の間に（例えば、増幅の前に、間に、または後にシ配列決定アダプターを利用することによって）添加されてもよい。

10

【0471】

様々な実施形態では、遺伝子産物特異的パドロックプローブは、最初の配列決定ライブラリ工程の後にプールされる。これらの場合において、遺伝子産物特異的バーコードは、個々の遺伝子産物に対する配列情報を追跡するために利用され得る。当該技術分野において、本明細書または他の方法で記載されている既知の任意の適切な手段によって得られた配列決定情報を、例えばバーコード情報に基づいて個々の配列プールにビンニングすることによって、デコンボリューションすることができる。当該技術分野で既知の適切な整列および配列確認アルゴリズムは、品質管理を完了するために利用され得る。エラー率と場所は、配列の場所によって、遺伝子産物によって、ライブラリによって、またはライブラリサブセグメントによって、分析され得る。エラー解析は、後の工程のために、または要求者への配信のために、受諾または製品の拒絶を通知し得る。

20

【0472】

任意の態様において、オリゴヌクレオチドの検知および定量分析は、配列決定することによって達成され得る。サブユニットまたは全体の合成されたオリゴヌクレオチドは、当該技術分野で既知の任意の適切な方法によって、本明細書中に記載の配列決定法を含む、例えばイルミナHiSeq2500など、全てのオリゴヌクレオチドの完全な配列決定を介して検知され得る。

30

【0473】

配列決定法は、技術分野において周知の古典的なサンガー配列決定法を用いて達成され得る。配列決定はまた、そのうちのいくつかは成長する鎖に組み込まれる直後またはその際に配列決定されたヌクレオチドの検出（すなわち、読まれた時間または実質的にリアルタイムでの配列の検出）を可能にする、高スループットシステムを使用して、達成され得る。幾つかの場合において、高スループット配列決定は、毎時少なくとも1,000、少なくとも5,000、少なくとも10,000、少なくとも20,000、少なくとも30,000、少なくとも40,000、少なくとも50,000、少なくとも100,000または少なくとも500,000の配列読み取りを生成し；それは、読み取り当たり、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも120または少なくとも150塩基対のである各々の読み取りによって行われる。

40

【0474】

幾つかの実施形態において、高スループット配列決定は、IlluminaのGenome Analyzer IIX、MiSeq personal sequencer、or HiSeq systems、such as those using H

50

iSeq 2500、HiSeq 1500、HiSeq 2000、またはHiSeq 1000. によって利用可能な技術の用途を包含している。これらの機械は、合成化学作用によって可逆的なターミネーターベースの配列を使用する。これらの機械は、8日で2000億のDNAのまたはより多くの読み取りを行うことができる。より小さなシステムは、3、2および1日またはより少ない時間内で、ランのために利用され得る。短い合成サイクルは、配列決定の結果を得るためにかかる時間を最小限にするために使用され得る。

【0475】

幾つかの実施形態において、高スループット配列決定は、ABIの固体のシステムによって利用可能な技術の使用を包含している。クローン増幅DNA断片 (clonally amplified DNA fragments) の重く平行な配列決定を可能にするこの遺伝子分析プラットフォームは、ビーズに連結した。配列決定の方法論は、色素標識化オリゴヌクレオチドで配列決定するライゲーションに基づいている。

10

【0476】

次世代配列決定は、イオン半導体配列決定 (例えば、Life Technologies (Ion Torrent) からの技術を使用する) を含み得る。イオン半導体配列決定は、ヌクレオチドがDNA鎖に組み入れられるときイオンを放出することができるという事実を利用することができる。イオン半導体配列決定を行うために、マイクロマシン化されたウェルの高密度アレイが形成され得る。各ウェルは、単一のDNAテンプレートを保持することができる。ウェルの下に、イオン感受性層であり得、イオンの下に、感受性層はイオンセンサーであり得る。ヌクレオチドがDNAに加えられるとき、H⁺は放出され得、それはpHの変化として測定され得る。H⁺イオンは電圧に変えて、半導体センサーによって記録され得る。アレイチップは、ヌクレオチドで連続して次々に氾濫させられる場合がある。スキャン、光またはカメラは必要とされ得る。幾つかの場合において、IONPROTON (商標) シークエンサーが核酸を配列するために使用される。幾つかの場合において、IONPGM (商標) シークエンサーが使用される。Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) は、2時間で1000万読み取りを行いうる。

20

【0477】

幾つかの実施形態において、高スループット配列決定は、Single Molecule Sequencing by Synthesis法 (SMSS) などのHelicos BioSciences Corporation (Cambridge, Massachusetts) によって利用可能な技術の使用を包含している。それは、24時間以内でヒトゲノム全体のを配列決定することを可能にするので、SMSSはユニークである。最終的に、MIP技術のように、それがハイブリダイゼーション前に前増幅工程を必要としないので、SMSSは強力である。実際、SMSSは任意の増幅を必要としない。SMSSは、米国特許出願公開第2006002471I号; 第20060024678; 第20060012793号; 第20060012784号; および第20050100932号に記載されている。

30

【0478】

幾つかの実施形態において、高スループット配列決定は、器具中のCCDカメラによって記録される、配列決定反応によって生成された化学発光シグナルを送信するファイバオプティックプレートを含む、Pico Titer Plate装置など454のライフサイエンス社 (Branford, Connecticut) によって利用可能な技術の使用を包含している。光ファイバーのこの用途は、4.5時間で最低2000万の塩基対の検出を可能にする。

40

【0479】

光ファイバー検出が後に続くビーズ増幅を使用する方法は、Marguiles, M., ら “Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors”, Natur

50

e, doi:第10.1038/nature03959;および、米国特許出願第20020012930号;第20030058629号;第20030100102号;20030148344号;第20040248161号;第20050079510号,20050124022号;および20060078909号に記載されている。
【0480】

幾つかの実施形態において、高スループット配列決定は、可逆的なターミネーター化学作用を使用するClonal Single Molecule Array (Sol
exa, Inc.)またはsequencing-by-synthesis (SB
S) によって行われる。これらの技術は米国特許第6,969,488号;第6,89
7,023号;第6,833,246号;第6,787,308号;および米国特許
出願第20040106130号;第20030064398号;第2003002
2207号;および Constans, A., The Scientist 2
003, 17(13):36に部分的に記載されている。オリゴヌクレオチドの高ス
ループット配列決定は、acific Biosciences、Complete Ge
nomics、Genia Technologies、Halcyon Molec
ular、Oxford Nanopore Technologiesなどによって市
販されている、当該技術分野で既知の任意の適切な配列方法を使用して、達成され得る。
他の高スループット配列決定システムVenter, J., et al. Scie
nce 16 February 2001; Adams, M. et al, S
cience 24 March 2000; およびM. J, Levene, e
t al. Science 299:682-686, January 2003;
並びに米国特許出願公開第20030044781号および第2006/007893
7号に開示されているものを含む。全体的に、全体として、このようなシステムは、オリ
ゴヌクレオチドの分子上で測定された重合反応を介して、塩基の時間的な添加によって塩
基を複数有する標的オリゴヌクレオチド分子を配列決定することを含み、例えば続いて、
リアルタイムで配列決定されるテンプレート・オリゴヌクレオチド分子上の核酸の重合酵
素の活性はリアルタイムで起きる。その後、配列は、塩基追加の配列の各工程に核酸を重
合する酵素の触媒活性によって、ターゲット・オリゴヌクレオチドの成長している相補鎖
にどの塩基が組み入れられているかを識別することにより、推定され得る。ターゲット・
オリゴヌクレオチド分子複合体上のポリメラーゼは、ターゲット・オリゴヌクレオチド分
子に沿って移動し、かつ活性部位にオリゴヌクレオチド・プライマーを拡張するのに適切
な位置で提供される。複数の標識化タイプのヌクレオチドアナログが、各々が、活性部位
に近似なので、識別して提供されている、ターゲット・オリゴヌクレオチド配列の異なる
ヌクレオチドに相補的なヌクレオチドアナログのタイプ。成長しているオリゴヌクレオチ
ド鎖は、加えられているヌクレオチドアナログが活性部位のターゲット・オリゴヌクレオ
チドのヌクレオチドに相補的なところで、活性部位にオリゴヌクレオチド鎖にヌクレオチ
ドアナログを加えるためにポリメラーゼを使用することにより拡張される。重合する工程
の結果オリゴヌクレオチド・プライマーに加えられたヌクレオチドアナログが識別される
。標識化ヌクレオチドアナログを提供する工程、成長しているオリゴヌクレオチド鎖を重
合する工程、および加えられたヌクレオチドアナログを識別する工程が繰り返され、その
結果、オリゴヌクレオチド鎖がさらに伸長され、ターゲット・オリゴヌクレオチドの配列
が測定される。

【0481】

次世代シーケンシング技術は、Pacific Biosciences. によってリ
アルタイム (SMRT (商標)) の技術を含む。SMRTでは、各々の4つのDNA塩基
は、4つの異なる蛍光色素のうちの1つに付けることができる。これらの色素はリン酸結
合でありえる。単一のDNAポリメラーゼは、ゼロ・モード導波管 (ZMW) の底のテン
プレート一本鎖DNAの単一の分子により固定され得る。ZMWは、ZMWの外で (マイ
クロ秒単位で) 速く拡散することができる蛍光のヌクレオチドのバックグラウンドに対す
る、DNAポリメラーゼに単一のヌクレオチドの取り込みについての観察を可能にする

10

20

30

40

50

制限構造であり得る。成長している鎖とヌクレオチドを取り込むのにいくつかの数ミリ秒かかり得る。この間に、蛍光のラベルは励起し蛍光シグナルを生成することができ、蛍光のタグを切断することができる。ZMWは下から照らすことができる。励起ビームからの減じられた光は、各々のZMWの、より低い20–30nmを貫通することができる。20zeptoリットル(10⁻²¹リットル)の検出限界と顕微鏡は作り出すことができる。小さな検出容積は、背景ノイズの低減における1000倍の向上を提供し得る。色素の対応する蛍光の検出は、どの塩基が組込まれたか示すことができる。その工程は繰り返され得る。

【0482】

幾つかの場合において、次世代シーケンシングがナノポア配列決定である{See e.g., Soni GV and Meller A. (2007) Clin Chem 53: 1996–2001}。ナノポアは、小さな孔(直径が約1ナノメートルのオーダー)であり得る。それを超える能力を持つ、伝達する流体および適用中のナノポアの浸漬は、ナノポアによってイオンの伝導によりわずかな電流を結果として生じ得る。流れる電流の量は、ナノポアのサイズに感受性であり得る。DNA分子がナノポアを通り抜けるとともに、DNA分子の上のヌクレオチドは、それぞれ異なる程度にナノポアを妨げることができる。したがって、DNA分子としてナノポアを通過する電流の変化はナノポアを通過し、DNA配列の読み取りを表すことができる。ナノポア配列決定技術はOxford Nanopore Technologiesから(例えばGridIONシステム)であり得る。単一のナノポアはマイクロウェルの上部をわたって高分子膜中に挿入され得る。マイクロウェルはそれぞれの感知のために電極を有し得る。マイクロウェルは、1つのチップ当たり100,000以上のマイクロウェル(例えば200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000または1,000,000以上)でアレイチップへ生成され得る。器機(あるいは結節)はチップを分析するために使用され得る。データはリアルタイムで分析され得る。1個以上の器機は一度に操作され得る。ナノポアは、タンパク質ナノポア(例えばタンパク質 α 溶血素、七量体のタンパク質細孔)であり得る。ナノポアは、作られた固態ナノポア(例えば合成膜(例えばSiNx、またはSiO₂)で形成されたナノメートルサイズの孔)であり得る。ナノポアは、ハイブリッド孔(例えば固体膜へのタンパク質孔の統合)であり得る。ナノポアは、統合されたセンサー(例えばトンネリング電極検出器、容量性検出器またはグラフェンベースのナノギャップまたは、エッジ状態検出器(edge state detectors)(たとえばGaraj et al. (2010) Nature vol. 67, doi: 10.1038/nature09379を参照されたい))を備えたナノポアであり得る。ナノポアは分子(例えばDNA、RNAまたはタンパク質)の特定種類の分析のために機能的であり得る。ナノポア配列は、DNAが孔を移動させるとともに、リアルタイムでの配列決定を伴うタンパク質ナノポアを通して、無傷のDNAポリマーが渡され得る、「鎖配列決定(strand sequencing)」を含み得る。酵素は、二本鎖DNAの繊維を分離し、ナノポアによって鎖を供給することができる。DNAは1つの末端でヘアピンを有することができ、システムは両方の鎖を読むことができる。幾つかの場合において、ナノポア配列は、各ヌクレオチドは前進型エキソヌクレアーゼによってDNA鎖から切断され得る「エキソヌクレアーゼ配列決定」でありヌクレオチドはタンパク質ナノポアを通して渡され得る。ヌクレオチドは、一時的に孔(例えばシクロデキストラン)中の分子と結合することができる。電流中の特徴部的な破壊は、塩基を識別するために使用され得る。

【0483】

GENIAからのナノポア配列決定技術は使用され得る。改変タンパク質の孔は脂質二重層膜に埋め込まれ得る。「能動的制御(Active Control)」技術は、効率的なナノポア膜アセンブリを可能にし、かつチャネルによってDNAに移動を制御するために使用され得る。幾つかの場合において、ナノポア配列技術はNABsysからである。ゲノムDNAは約100kbの平均長の鎖へフラグメント化され得る。100kbフ

10

20

30

40

50

ラグメントは単一鎖になることができ、続いて6量体のプローブとハイブリダイズし得る。プローブとゲノムのフラグメントはナノポアを通り抜けることができ、それは電流対時間のトレーシングを作成することができる。現在のトレーシングは、各ゲノムのフラグメント上のプローブの位置を提供することができる。ゲノムのフラグメントはゲノム用のプローブ・マップを作り出すために並べられ得る。そのプロセスはプローブのライブラリ用に平行で行うことができる。各々のプローブのゲノム長さのプローブ・マップが生成され得る。エラーは「moving window Sequencing By Hybridization (mwsBH)」と名付けられたプロセスにより修正され得る。幾つの場合において、ナノポア配列技術はIBM/ロッシュからである。電子ビームは、マイクロチップのナノポアサイズの開口部を生成するために使用され得る。電場は、ナノポアを介してDNAを引くか通すために使用され得る。ナノポア中のDNAトランジスタ装置は、金属および誘電体のナノメートルサイズの層を交互にすることを含み得る。DNA骨格内での個別の電荷は、DNAナノポアの内部の電場によって閉じ込められ得る。ゲート電圧を断続的につけることは、DNA配列が読まれることを可能にし得る。

【0484】

次世代シーケンシングは、DNAナノボール配列決定（例えば、Complete Genomicsによって行われるように；例えばDrmanac et al. (2010) Science 327: 78-81を参照されたい）を含み得る。DNAは単離され、断片化され、サイズ選択され得る。例えば、DNAは、（例えば超音波処理によって）約500bpの平均の長さまで断片化され得る。アダプター（Ad1）は、フラグメントの末端へ付けることができる。アダプターは、配列決定反応のためのアンカーにハイブリダイズするために使用され得る。各々の末端に結合されたアダプターを備えるDNAは、増幅されたPCRになり得る。相補的な一本鎖末端を互いに形成環状DNAに結合するようにアダプター配列を改変することができる。DNAは、後の工程で使用されるIIS型制限酵素による開裂からそれを保護するためにメチル化され得る。アダプター（例えば正しいアダプター）は、制限認識部位を有することができ、制限認識部位は非メチル化されたままであり得る。アダプター中のメチル化されていない制限認識部位は、制限酵素（例えばAclI）によって認識することができ、DNAは、直鎖状の二本鎖DNAを形成する正しいアダプターの右に対するAclI 13bpによってされ得る。右および左のアダプターの第2ラウンド（Ad2）は、線形のDNAのどちらの末端上にもライゲーションすることができ、両方のアダプター境界を備えた全てのDNAは、（例えばPCRにより）PCRで増幅され得る。Ad2配列は、それらが互いに結合しかつ環状DNAを形成することを可能にするように、変更され得る。DNAはメチル化され得るが、しかし、制限酵素認識部位は、左のAd1アダプター上で非メチル化されたままである。制限酵素（例えばAclI）が適用され得、DNAは、直鎖状DNA断片を形成するAd1の左側の切断された13bpであり得る。右・左のアダプター（Ad3）の第3ラウンドは、直鎖状のDNAの右および左のフラंक（right and left flank）にライゲーションされ得、生じるフラグメントはPCRで増幅され得る。アダプターを変更することができ、その結果、それらは互いに結合することができ、および環状DNAを形成することができる。III型制限酵素（例えばEcoPI5）が加えられ得；EcoPI5は、Ad3の左側のDNA 26bp、およびAd2の右の26bpを開裂することができる。この開裂は、多数のDNAのセグメントを除去し、DNAをもう一度直鎖状にすることができる。右・左のアダプター（Ad4）の第4ラウンドは、DNAにライゲーションすることができ、DNAは増幅し（例えばPCRにより）、それらが互いに結合し、完結した環状DNAテンプレートを形成するように、修飾され得る。

【0485】

ローリングサークル複製（例えば、Phi29 DNAポリメラーゼを使用して）は、DNAのフラグメントを増幅するために使用され得る。4つのアダプター配列は、ハイブリダイズすることができるパンドローム配列を包含することができ、平均の直径でおよそ200-300ナノメートルでありうるDNAナノボール（DNB（商標））を形成す

10

20

30

40

50

るように、一本鎖がそれ自体の上に折りたたまれ得る。DNAナノボールは、マイクロアレイ（配列決定しているフローセル）に（例えば吸着によって）付けられ得る。フローセルは、二酸化ケイ素、チタンおよびヘキサメチルジシラザン（HMDS）でコーティングされたシリコンウェハ、およびフォトレジスト物質であり得る。配列は、DNAに対する蛍光プローブのライゲーションによって、非連鎖シーケンシングによって行われ得る。質問された位置の蛍光の色は、高解像度カメラによって視覚化され得る。アダプター配列間のヌクレオチド配列の同一性は、測定され得る。

【0486】

インクジェット付着物

本発明の方法および組成物は、幾つかの実施形態において、支持体の表面上または表面において、特定位置で、組成物を付着させ、位置決めし、または置くことを利用する。付着させる工程は、1つの組成物を別のものと接触させる工程を含み得る。付着させる工程は手動または自動であってもよく、例えば、付着させる工程は自動化ロボット装置によって達成され得る。パルスジェットまたはインクジェットは、支持体上に流体組成物の滴剤を分配するために使用されてもよい。パルスジェットは、滴剤をそこから分配することができるように、出口か開口部に隣接している液体に圧力のパルスを送達することにより（圧電気か熱電素子によってなど）、典型的には作動する。

【0487】

試薬の液体は、さらに詳しく本明細書に別記される当該技術分野で既知の様々な方法またはシステムを使用して、基板の分解された場所に堆積し得る。流体の微小滴は、ミクロン以下の精度で現在の本発明に記載されている基板上またはその内部での、表面または分解される位置に送達され得る。以下の流体ボリュームのマイクロディスペンス法などのインクジェット技術を使用して、市販の分配装置を用いることができる。インクジェットの技術を使用して生み出された液滴は、高度に複製可能であり、液滴が特定の時間に特定の位置に置かれるように、デジタル保存された画像データによって、コントロールされ得る。ダイヤモンド・モード・インクジェット装置のための典型的な液滴径は30–100 μmであり得、それは14–520 p lの液滴容量に変換される。ダイヤモンド・モード・インクジェット装置の液滴生成速度は毎秒2000–5000の液滴であり得る。ダイヤモンド・モードのインクジェットの微小分配は、本明細書でさらに詳細に別記される、分解された場所の高密度の基板をサービスするための、適切な分解能および処理量で利用され得る。試薬を堆積させるかまたは送達する方法およびシステムは、米国特許第5,843,767号および第6,893,816号にさらなるに詳しく記載され、それら両方は全体が引用によって組み入れられる。

【0488】

分解された場所に対して試薬を堆積させるか送達するためのシステムは、限定されないが、以下の1つ以上のサブシステムを含み得る：マイクロジェット分配ヘッド、流体送達システムまたはインクジェットポンプ、X-Y位置決めシステム、ビジョンシステム、またはシステムのコントローラ。マイクロジェット分配ヘッドは、複数のマイクロジェット装置（例えば、8マイクロジェット装置）および必要な駆動電子回路の組立てであり得る。システムの複雑さは、8または10の分配装置を多重化するドライブエレクトロニクスの単一チャネルを使用することによって最小化することができる。各デバイスのための駆動波形（Drive waveform）の要件は、システムコントローラからダウンロードされ得る。駆動電子回路は、当該技術分野で知られている従来の方法を用いて構築され得る。流体送達システム、またはインクジェットポンプは、複数の試薬入力システムとして作用するように修飾されるベックマン・バイオメック（Beckman Biomec）であり得る。それとマイクロジェットとの間で、分配ヘッドは、システムコントローラにより制御される、ソレノイドバルブのシステムであり得る。それらは、システムに試薬をロードするためのシステム、および真空から試薬をパージするために加圧されたフラッシング液と空気を提供する。X-Y測位システムは、制御装置を備える精密なX-Y測位システム、任意に市販で入手可能であり得る。測位システムの大きさは、複数のセ

ンサーを収容するために大きさを合わせることができる。視覚装置は、測位システムに関する各々のMicroJet装置の「着陸地帯 (landing zone)」を校正するために使用され得る。校正は、各々の試薬を充填サイクルの後に生じ得る。また、センサー・トレーが基準マークによってセンサーに最初に充填されるとき、視覚装置は、各々のセンサーに各々の調剤部位を位置付けることができる。ソフトウェアに基づいたシステム、またはハードウェアに基づいた視覚装置は、使用され得る。システム制御装置は、総合システムの制御装置として使用される標準のコンピュータシステムとなり得る。視覚装置画像キャプチャーおよび処理は、またシステム制御装置上に存在する。分解された場所に対する試薬を堆積させるかまたは送達するためのシステムは、国際出願番号WO 2000 039344にさらなるに詳しく記載されており、その全体が、引用によって本明細書に組み込まれる。

10

【0489】

図18は、インクジェットの組立ての実施例を例証する。幾つかの実施形態において、インクジェットのアセンブリは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、32、34、36、38、40、45、48、50、56、60、64、72、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のインクジェットヘッドを含み得る。インクジェットヘッドは、それぞれ異なるコドン (トリヌクレオチド) 構築ブロックを堆積させることができる。典型的な実施形態では、インクジェットヘッドは、254 μm の中心に256ノズルと100 μm の浮上高さを備えるシリコンオリフィス板を有する。各ヘッドが横断する各ウェルにアクセスし得る。インクジェットのアセンブリは、約2 μm である移動する (x、y) 平面において、正確に、約100 mm/sのスキャン速度を有し得る。いくつかの場合において、インクジェットアセンブリのウェーハ上のスキャンの高さは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20 μm の振れを伴う約100 μm であり得る。幾つかの場合において、インクジェットのアセンブリは、基板 (例えば、シリコンウェーハ、真空チャック上で軽く打たれた基板、いくつかの場合にはフローセル・アセンブリの部分として) でインクジェットを並べるための視覚システムを含み得る。

20

【0490】

幾つかの場合において、本明細書に記載される複数の分解された場所に対する試薬を堆積させる方法およびシステムは、インクジェットポンプを介して第1の試薬の少なくとも一つのマイクロ液滴を、複数の場所の第一の場所へと適用する工程、インクジェットポンプを介して第2の試薬の少なくとも一つのマイクロ液滴を、複数の場所の第二の場所へと適用する工程を含む。幾つかの実施形態において、第二の場所は第一の場所に隣接し得、第一および第二の試薬は異なり得る。第一および第二位置は支持体表面へ生成されたマイクロ構造上に存在し得、マイクロ構造は少なくとも1つのチャンネルを含み得る。幾つかの場合において、少なくとも1つのチャンネルが100 μm を超える深さである。幾つかの実施形態において、第一および第二の試薬は同様であり得る。幾つかの場合において、微小構造は大きな、および第一のマイクロチャンネルにfluidicallyに接続される1本以上のマイクロチャンネルを含む。大きな初期マイクロウェルは、最初に、一般的に、堆された液体を受け、隣接する微細構造への、ならびに該微細構造からの、試薬の任意の交差汚染を低減する。小滴の内容物は、その後、1つ以上のより小さなマイクロウェルの中に流れることができ、オリゴヌクレオチド合成など、本明細書に記載の反応のための適切な表面を保持し得る。

30

40

【0491】

少なくとも1つのチャンネルは、約あるいは少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、13

50

0、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900または1000 μm であり得る深さを有し得る。ある実施形態において、少なくとも1つのチャンネルは、約50-100、50-150、50-200、100-200、100-300または20-100 μm の間にありうる深さを有し得る。幾つかの実施形態において、少なくとも1つのチャンネルは、100 μm 以上の深さであり得る。

【0492】

試薬の液滴の各々は、勢いを失わずに、マイクロウェルの深さによって横断することができる適切な容積を有し得る。適切な容積は、オリゴヌクレオチド合成用試薬の所望量を含み得る。例えば、制限なしで、試薬を含む液滴の各々は、約、又は少なくとも約4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、400、500 p l、1、1.5、2、2.54、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、75、100、200、500 n l またはそれ以上の容積を有し得る。種々の実施形態では、システムは、任意のサテライト液滴が堆積される液滴の後端が、交差汚染を最小化するのに十分小さくなるように調整される。インクジェットの場合、プリントヘッドは、例えば100 μm の範囲内で、基板に十分に近づけることができ、その結果、堆積した液滴とそのサテライト滴がエアロゾルの移動の前の基板のチャンネル内で実質的なものである。サテライトの液滴は、0.5、1、1.5または2 μm 未満の直径を有し得る。様々な実施形態で、体積で、エアロゾル移動に従事するサテライト液滴の画分は、堆積された液滴の5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01%未満またはそれら未満である。

【0493】

本明細書に別記されるように、微小構造は互いの流体連通において、複数チャンネルを含み得る。いくつかの場合において、微小構造は、流体連通に少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9または10個のチャンネルを含み得る。さらなるに詳しく本明細書に別記されるように、チャンネルは異なる寸法（例えば幅、長さ）を有し得る。いくつかの実施形態では、微小構造の流体連通チャンネルは、同じ幅、長さ、および／または他の寸法を有する2つ以上のチャンネルを含み得る。

【0494】

流体の微小滴は、最小限の交差汚染と高精度の、本明細書に別記されるような基板内の、表面または分解された場所に送達され得る。幾つかの場合において、第一の場所は、第二の場所に堆積させるように意図される第二の試薬の0.1%未満を受け取ることができ、同様に、第二の場所は、第一の試薬の0.1%未満を受け取ることができる。幾つかの場合において、第一の場所は、第二の試薬の約0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.25%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%または0.01%未満を受け取ることができる。第二の場所は、第一の試薬の約0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.25%、0.2%、0.15%、0.1%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%または0.01%未満を受け取ることができる。いくつかの場合において、試薬は、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190又は200 μm の直径を有する液滴で送達され得る。試薬の液滴は、少なくとも約2 μm である直径を有し得る。試薬は、約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190または200 μm 未満の直径を有する液滴で送達され得る。試薬は、約2-10、2-5、10-200、10-150、10-100、10-500、20-200、20-150、20-100、30-100、30-200、30-150、40-100、40-80ま

たは50-60 μm の間の直径を有する液滴で送達され得る。

【0495】

試薬の液滴は、毎秒約または少なくとも約1000、約1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500または5000の液滴で堆積し得る。

【0496】

軟着陸

また、複数のマイクロウェルに対する液滴を堆積させるためのシステムおよび方法は本明細書に記載されている。1つの態様では、液滴は、複数のマイクロウェルと表面を含むmicrofluidicなシステムのマイクロウェルへ堆積させることができる。2-500、1-100、2-100、5-100で液滴には1-1000に関してのように適切なレイノルズ数がありえる、1-50、2-50、5-50または10-50、マイクロウェルの下部に達することで、液体の弾むことが最小限にされるそのようなもの。当業者は、レイノルズ数が、これらの任意の値（例えば約0.5から約500）に制限される任意の範囲内であり得ることを認識している。流体システムにおけるレイノルズ数の正確な推定のための適切な方法は、Cliftら（Clift, Roland, John R. Grace, and Martin E. Weber, Bubbles, Drops and Particles, 2005. Dover Publications）およびHappelら（Happel, John and Howard Brenner, 1965. Prentice-Hall）に記載されており、それらの両方は、その全体が引用により本明細書中に組み込まれる。

【0497】

複数のマイクロウェルの密度は、 mm^2 あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、1000またはそれ以上とすることができる。本明細書に記載の方法に続いて、液体の滴は、マイクロウェルを介して滑らかに流れ、およびマイクロウェルの底にそっと着地し得る。

【0498】

液体の滴は、液滴は任意の方法、および技術分野で既知のシステムを使用して、堆積され得る。いくつかの実施形態では、マイクロ流体システムは、さらに、インクジェットポンプを含み得る。インクジェットのポンプは複数個のマイクロウェルのうちの1つへ、液体の小滴を堆積させるために使用され得る。液体堆積システムの様々な実施形態は、明細書に別記されている。

【0499】

幾つかの場合において、マイクロウェルが、基板のサブ領域内の異なる幅、同じ幅、または同じあるいは異なる幅の組み合わせ、である場合がある。マイクロウェルは任意の異なる幅を有し得る。例えば、制限なしで、マイクロウェルの幅は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、28.4、100 μm より広いか、または狭いものであり得る。

【0500】

マイクロウェルは、任意の異なる長さを有し得る。例えば、制限なしで、マイクロウェルの長さは、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900または1000 μm より長い、または短いものであり得る。

【0501】

マイクロウェルは、少なくとも1つのマイクロチャネルに流体的に接続することができる。マイクロウェルは、約または少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100 μm またはそれら未満の、長さに対する、または周に対する表面積の比を含み得る。

【0502】

液体の液滴は、本明細書に記載されている方法に適している容積を有し得る。いくつかの実施形態では、液滴は、約0.5マイクロリットル(μL)未満、約1 μL 未満、約1.5 μL 未満、約2 μL 未満、約2.5 μL 未満、約3 μL 未満、約3.5 μL 未満、約4 μL 未満、約4.5 μL 未満、約5 μL 未満、約5.5 μL 未満、約6 μL 未満、less than about 6.5 μL 未満、約7 μL 未満、約7.5 μL 未満、約8 μL 未満、約8.5 μL 未満、約9 μL 未満、約9.5 μL 未満、約10 μL 未満、約11 μL 未満、約12 μL 未満、約13 μL 未満、約14 μL 未満、約15 μL 未満、約16 μL 未満、約17 μL 未満、約18 μL 未満、約19 μL 未満、約20 μL 未満、約25 μL 未満、約30 μL 未満、約35 μL 未満、約40 μL 未満、約45 μL 未満、約50 μL 未満、約55 μL 未満、約60 μL 未満、約65 μL 未満、約70 μL 未満、約75 μL 未満、約80 μL 未満、約85 μL 未満、約90 μL 未満、約95 μL 未満または約100 μL 未満の堆積を有しうる。いくつかの実施形態では、液滴は、約0.5マイクロリットル(μL)、about 1 μL 、約1.5 μL 、約2 μL 、約2.5 μL 、約3 μL 、約3.5 μL 、約4 μL 、約4.5 μL 、約5 μL 、約5.5 μL 、約6 μL 、約6.5 μL 、約7 μL 、約7.5 μL 、約8 μL 、約8.5 μL 、約9 μL 、約9.5 μL 、約10 μL 、約11 μL 、約12 μL 、約13 μL 、約14 μL 、約15 μL 、約16 μL 、約17 μL 、約18 μL 、約19 μL 、約20 μL 、約25 μL 、約30 μL 、約35 μL 、約40 μL 、約45 μL 、約50 μL 、約55 μL 、約60 μL 、約65 μL 、約70 μL 、約75 μL 、約80 μL 、約85 μL 、約90 μL 、約95 μL 又は約100 μL の体積を有しうる。

【0503】

幾つかの場合において、マイクロウェルは、化学的に不活性の部分（それは表面エネルギーを増大する）など、部分でコーティングされ得る。適切な化学的に不活性か反応的な部分のタイプは現在の規格に別記されている。

【0504】

液滴のレイノルズ数は、本明細書に記載されるような液体がマイクロウェル及び／又はマイクロウェルを滑らかに流れることを可能にする、さまざまなレイノルズ数の範囲であり得る。幾つかの実施形態において、液滴のレイノルズ数は、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000未満であり得る。幾つかの実施形態において、液滴のレイノルズ数は、約0.1、0.5、1、2、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000より多いものであり得る。いくつかの場合において、液滴は、層流またはほぼ層流でマイクロウェルを通して流れることができる。

【0505】

液滴は、少なくとも0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100 m/秒、あるいはより高い速度で適用するかまたは堆積され得る。

【0506】

プログラマブルなスプリット

本明細書に記載されるように、システムは、複数の分解された場所、および複数の分解

された反応器を形成するためにともにシールすることができる複数の分解されたリアクターキャップを含み得る。複数の分解されたリアクターは試薬を包含し得る。シーリングは可逆的あるいは緩くてもよく、複数の分解されたリアクターキャップは、複数の分解された位置から解放され得る。複数の分解された場所を含む表面から放出に際して、リアクターキャップは、少なくとも試薬の一部分を保持することができる。複数の分解された場所からリアクターキャップの放出を制御することによって、液体または試薬の分配は制御され得る。本発明の1つの態様では、分配の方法は本明細書に記載されている。この方法は、リアクターキャップなどの第二の複数の分解された場所を含む第二の表面と、第一の複数の分解された場所の液体を含む第一の表面とを接触させる工程を含み、ここで第一の表面は、液体との第一の表面張力を含み得、第二の表面は液体との第二の表面張力を含み得、前記方法はさらに、液体の所望の画分が、第一の複数の分解された場所から第二の複数の分解された場所まで移されるように、放出の速度を決定する工程、を含む。この算出された速度で第一の表面から第二の表面を取り外す際に、リアクターの内容物の目的のフラクションが反応器内に保持され得る。第一の複数の分解された場所を含む表面は、オリゴヌクレオチドでコーティングされる複数の分解された場所を含み得る。第一の複数の分解された場所を含む第1の表面は、オリゴヌクレオチドでコーティングされている複数の分解された場所を含み得る。第二の複数の分解された場所を含む第二の表面は、複数のリアクターキャップを含むキャッピング要素であってもよい。幾つかの場合において、方法は、第3の表面を第3の複数の分解された場所と接触させる工程をさらに含み得る。実施形態の様々な態様が、本明細書に記載されている。

【0507】

裏面で保持される液体は技術分野で既知の任意の方法によって保持され得る。幾つかの実施形態では、第1または第2の表面は、液体の少なくとも一部分を保持するマイクロウェルを含む。幾つかの実施形態では、第1または第2の表面は、液体の少なくとも一部分を保持するナノリアクターを含む。ある場合には、液体は、1番目と第2の表面の間の表面張力差により保持され得る。水に基づいた液体については、理論によって拘束されずに、液体のより多くの部分は、より高い表面エネルギー又は低い疎水性を備える表面上に保持され得る。

【0508】

第一または第二の表面の上に試薬の所望画分を保持することができるように、液体は分割され得る。例えば、制限なしで、所望の分画は、少なくとも約1%以上、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%および99%、またはそれらより多くいものであり得る。

【0509】

並列マイクロ流体混合方法

現在の発明の別の様相では、液体を混合する方法が本明細書中に記述される。作られた複数のマイクロ構造を含む第1基板を提供する工程、複数の分解されたリアクターキャップを含む第2基板を提供する工程、複数の第1リアクターキャップを第1基板中のnマイクロ構造から液体を受け取るように構成することができるように第1基板と第2基板を並べる工程、および液体をnマイクロ構造から第1リアクターキャップへと送達し、それによって、混合物を形成するnマイクロ構造から液体を混合する工程を含む。様々な実施形態および変形が本明細書に記載されている。

【0510】

分解されたリアクターキャップの密度は、第一の基板の微小構造および第二基板のリアクターキャップの所望のアラインメントを可能にする任意の適切な密度であり得る。幾つかの場合において、分解されたリアクターキャップの密度は少なくとも1/mm²であり得る。幾つかの実施形態では、密度のリアクターの密度は、1mm²あたり、約、1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約25、約

30、約35、約40、約50、約75、約100、約200、約300、約600、約700、約800、約900、約1000、約1500または約2000部位であり得る。幾つかの実施形態では、分解されたリアクターの密度は、 1 mm^2 あたり、少なくとも約1、少なくとも約2、少なくとも約3、少なくとも約4、少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約20、少なくとも約30、少なくとも約40、少なくとも約50、少なくとも約75、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1000、少なくとも約1500、少なくとも約2000又は少なくとも約3000部位であり得る。

10

【0511】

ミクロ構造は、本発明の方法および組成物に従って実行可能な任意の密度であり得る。複数の分解された場所は、 1 mm^2 あたり、約、少なくとも約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約50、約75、約100、約200、約300、約300、約400、約500、約600、約700、約800、約900、約1000、約1500または約3000部位であり得る。幾つかの実施形態では、微小構造は、 $1/\text{mm}^2$ に少なくとも100の密度であり得る。幾つかの場合において、微小構造は、分解されたリアクターの密度とほぼ同じである表面密度を有し得る。

【0512】

20

幾つかの場合において、複数の第1リアクターキャップを第1基板中のnミクロ構造から液体を受けるように構成することができるように第1基板と第2基板を並べた後、第1と第2の基板に、ギャップ（例えば約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、または200 μm 未満のギャップ）があり得る。

【0513】

幾つかの場合において、混合物または液体は、複数の第一のリアクターキャップが第一の基板中のnミクロ構造から液体を受け取るように構成されるように、第一および第二の基板を合わせた後に、第一および第二の基板の間のギャップへ部分的に広がり得る。ギャップへ部分的に広がる液体または混合物は、キャピラリーバーストバルブを形成し得る。混合の方法は、第1および第2の基板を互いに接近させることにより、ギャップをシールする工程を含む。幾つかの実施形態において、第一および第二の基板は直接の物理的な接触であり得る。

30

【0514】

複数のミクロ構造およびリアクターキャップは、任意の適切な設計またはさらに詳しく本明細書に別記されるような寸法があり得る。少なくとも一つのチャネルは、円形状である断面積を有することができ、約、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、55、50、45、60、65、70、75、80、85、90、95、120、5、100 μm またはそれら未満の断面の半径を含み得る。

40

【0515】

幾つかの実施形態では、2つのチャネルの1つは、90度未満の水接触角に対応する表面エネルギーを増大させる部分でコーティングされる。表面エネルギー、または表面の疎水性は水接触角の測定により評価するか測定することができる。90°未満の水接触角は、比較的親水性の様式で固体表面を官能化し得る。低い表面エネルギーを備える高度に疎水性の表面は、120°より大きな水接触角を有する。幾つかの場合において、本発明において本明細書に記載されているような基板の表面、または基板の表面の一部は、本明細書に記載されているように、曲がっていない表面上で測定されるように、疎水性か、低

50

い表面エネルギーを有するように、または、約 90° 、 95° 、 100° 、 105° 、 110° 、 115° 、 120° 、 125° 、 130° 、 135° 、 140° 、 145° または 150° よりも大きいと測定される水接触角を有するように官能化または修飾され得る。幾つかの場合において、本発明において本明細書に記載されているような基板の表面、または基板の表面の一部分は、本明細書に記載されているように、曲がっていない、滑らか又は平面の、基板の関連する官能化された表面の等価物上で、疎水性か、低い表面エネルギーを有するように、または、約 90° 、 95° 、 100° 、 105° 、 110° 、 115° 、 120° 、 125° 、 130° 、 135° 、 140° 、 145° または 150° よりも大きいと測定される水接触角を有するように官能化または修飾され得る。チャンネルまたは2つのチャンネルのうちの1つの表面は、より親水性か疎水性に変更され得る。第一の表面および第二の基板が、水など与えられた液体と異なる表面エネルギーを含むことができる。幾つかの場合において、第一の表面および第二の基板は、 10° 、 20° 、 30° 、 40° 、 50° 、 60° 、 70° 、 80° 、 90° の異なる水接触角を含み得る。表面を官能化する他の方法は、米国特許第6029189号に記載され、これは引用によってその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0516】

幾つかの実施形態では、送達は、圧力によって実行される。液体をnミクロ構造から第1リアクターキャップへと送達し、それによって、混合物を形成するnミクロ構造から液体を混合する工程を含む。幾つかの実施形態では、混合物の容積は、リアクターキャップの容積より大きい。縁面などのリアクターキャップ表面のすべて又は一部分は、本明細書でさらに詳しく別記される、そうでなければ当該技術分野で既知の適切な表面改質方法を使用して改質され得る。

20

【0517】

幾つかの場合において、表面不整が操作される。化学的な表面改質および不整は、リムの水接触角を調節する役目をするかもしれない。類似した表面処理も、シール、例えば両面シールを形成するリアクターキャップの近位にもたらされる基板の表面上に適用され得る。毛細血管のバースト弁はさらなる詳しく本明細書に別記されるような金型とプレフォームの接触両面のことの間で利用されるかもしれない。前処理は毛細血管のバースト弁を含むそのようなシールの正確な対照に役立つことができる。

30

【0518】

いくつかの場合において、第一の表面からのキャップ要素の解放、および第二の表面からのキャップ要素の解放は、異なる速度で行われ得る。対応面からキャップする要素を解放することで保持される、試薬の部分の量は、速度またはキャップする要素および対応面の表面エネルギーによって制御することができる。キャッピング要素および対応する表面の、表面エネルギー、又は疎水性の差は、解放時に保持される試薬の部分を制御するためのパラメータであり得る。第1の容積および第2の反応は異なり得る。

【0519】

下流適用

発明の方法および構成は、遺伝子発現解析、遺伝子型決定、ヘテロデュプレックス分析、ハイブリダイゼーションに基づいた決定を順番に並べる核酸、DNAの合成、RNA、ペプチド、タンパク質または他のオリゴマーか、非オリゴマーの分子（候補薬の評価用の組み合わせのライブラリ）のような核酸ハイブリッド形成研究に使用されてもよい。

40

【0520】

本発明に従って合成されるDNAおよびRNAは、遺伝子発現解析、ハイブリダイゼーション（競合ハイブリダイゼーションおよびヘテロ分析）による遺伝子型決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、サザンためのプローブとしてハイブリダイゼーションのためのプローブプロット分析（標識プライマー）、配列のためのプローブ（マイクロアレイまたはフィルタアレイのいずれか）、ハイブリダイゼーション、遺伝子型決定または発現アッセイにおけるハイブリダイゼーションを検出するエネルギー移動色素で使用可能な「パッドロック」プローブ、およびプローブの他の種類を含む任意の適用において使用

50

され得る。本発明に従って調製されたDNAおよびRNAはまた、PCRのためのプライマー、PCRのためのテンプレート、対立遺伝子特異的PCR（遺伝子タイピング／ハプロタイプ）技術として、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような酵素ベースの反応に使用されうるリアルタイムPCR、定量的PCRは、転写PCR、および他のPCR技術に用いられる。DNAおよびRNAは、ライゲーションベースの遺伝子型決定、オリゴライゲーションアッセイ（OLA）、ライゲーションベースの増幅、アダプター配列のライゲーションクロニング実験のための、サンガーのジデオキシ配列決定（プライマー、標識プライマー）、高スループットを含む種々のライゲーション技術、配列決定、プライマー伸長、ミニシーケンシング、および単一塩基拡張（SBE）（電気泳動分離または他の分離法を用る）に使用され得る。本発明に従って製造されたDNA及びRNAは、（オリゴと既知配列に変異を導入する）、逆転写（RNA転写物のcDNAコピーを作成する）、遺伝子合成、制限酵素部位の導入（変異誘発の形態）、タンパク質、DNA結合研究などの変異誘発研究で使用されてもよい。方法によって生成されたDNA及びRNAの種々の他の用途が当業者に示唆され得、そのような使用はまた、本開示の範囲内であると考えられる。

10

【0521】

計算機装置

様々な実施形態において、本発明の方法およびシステムは、さらに計算機装置上のソフトウェアプログラムを含み、それについて使用され得る。したがって、分配／真空／詰め替えの同期のためのコンピューター制御は、印字ヘッドの移動を組み合わせる同調させるように機能する。計算機装置は、ユーザーに規定された塩基配列順序および基板の規定された領域に正確な試薬を送達する、ディスペンサーヘッドの位置の間に接続するようにプログラムされ得る。

20

【0522】

図19に示されるコンピューターシステム1900は、媒体1911および／またはネットワークポート1905からの指示を読み取ることができる論理装置として理解され得、それは、必要に応じてメディア1912に固定されたサーバ1909に接続され得る。図19に示すようなシステムは、CPU 1901 ディスクドライブ1903、キーボード1915および／またはマウス1916年オプションのモニター1907年オプションの入力装置を含み得る。データ通信は、ローカルまたは遠隔地にサーバに指示された通信媒体を介して達成され得る。通信媒体は、データを送信および／または受信する任意の手段を含み得る。例えば、通信媒体は、ネットワーク接続、ワイヤレス接続またはインターネット接続であってもよい。このような接続は、World Wide Webを介した通信を提供し得る。図19に示すように、本開示に関連するデータは、1922によって受信および／または検討のためこのようなネットワークまたは接続経路で送信し得るが想定される。

30

【0523】

図20は、本発明の例示的な実施形態に関連して使用することができるコンピューターシステム2000の第1の例示的なアーキテクチャーを示すブロック図である。図20に示されているように、例示的なコンピューターシステムは、処理命令するためのプロセッサ2002を含み得る。プロセッサの非限定的な例は、インテルXeon™プロセッサ、AMDのOpteron（商標）プロセッサ、サムスン32ビットRISC ARM1176JZ（F）はv1.0™プロセッサ、ARMのCortex-A8三星S5PC100（商標）プロセッサ、ARMのCortex-A8アップルA4（商標）プロセッサ、マーベルPXA930（商標）プロセッサ、または機能的に同等のプロセッサを含む。複数の実行のスレッドが並列処理のために使用され得る。いくつかの実施形態では、複数のコアを有する複数のプロセッサまたはプロセッサは、クラスター内の単一のコンピューターシステム内か、または複数のコンピューター、携帯電話および／またはパーソナルデータアシスタント装置を含むネットワークを介してシステムに分散されるかにかかわらず、使用され得る。

40

50

【0524】

図20に示すように、高速なキャッシュ2004は、プロセッサ2002によって最近、または頻繁に使用された命令またはデータのための高速メモリを提供するために、プロセッサ2002に接続される。プロセッサ2002は、プロセッサバス2008によってノースブリッジ2006に接続されている。ノースブリッジ2006は、メモリバス2012によってランダムアクセスメモリ(RAM)2010に接続され、プロセッサ2002によってRAM2010へのアクセスを管理される。ノースブリッジ2006は、また、チップセット・バス2016によってサウスブリッジ2014に接続されている。サウスブリッジ2014は、周辺バス2018に順番に接続される。周辺バスは、例えば、PCI、PCI-X、PCI Express、または他の周辺バスであり得る。ノースブリッジとサウスブリッジは、多くの場合、プロセッサ・チップセットと呼ばれ、周辺バス2018上のデータプロセッサ、RAM間の転送、および周辺部品を管理している。いくつかの代替的なアーキテクチャでは、ノースブリッジの機能は、別個のノースブリッジチップを使用するプロセッサに組み込まれ得る。

10

【0525】

いくつかの実施形態において、システム2000は、周辺バス2018に取り付けられるアクセラレーターカード2022を含み得る。アクセラレータは、フィールドプログラマブルゲートアレイ(FPGA)または特定の処理を促進するための他のハードウェアを含み得る。例えば、促進剤は、適応データ再構築のために、または拡張集合処理に使用される代数式を評価するために使用され得る。

20

【0526】

ソフトウェアおよびデータは、外部記憶装置2024に格納され、プロセッサによる使用のためにRAM2010および／またはキャッシュ2004にロードされ得る。システム2000は、システム・リソースを管理するオペレーティングシステムを含む；オペレーティングシステムの非限定的な例は：リナックス(登録商標)、Windows(登録商標)、MACOS(商標)、ブラックベリーOS(商標)、iOS(商標)、および他の機能的に等価なオペレーティングシステム、並びに本発明の実施例に従って、データストレージと最適化を管理するためのオペレーティングシステム上で動作するアプリケーションソフトウェアを含む。

【0527】

本実施例において、システム2000はまた、さらにネットワーク接続ストレージ(NAS)などの、外部ストレージにネットワークインターフェースを提供するための周辺バスに接続されたネットワークインターフェースカード(NIC)2020および2021、および分散並列処理に使用され得る他のコンピューターシステムを含む。

30

【0528】

図21は、複数のコンピューターシステム2102a、および2102b、複数の携帯電話および個人用携帯情報端末2102c、並びにネットワーク接続ストレージ(NAS)2104a、および2104bを備えるネットワーク2100を示すダイアグラムである。例の実施形態では、システム2102a、2102b、および2102cは、データ保存を管理し、ネットワーク接続ストレージ(NAS)2104aおよび2104bに保存されたデータのためのデータアクセスを最適化することができる。数理モデルが、データに使用され、コンピューターシステム2102a、および2102b、並びに携帯電話および個人用携帯情報端末のシステム2102cにわたる分散並列処理を使用して評価され得る。コンピューターシステム2102a、および2102b、並びに携帯電話および個人用携帯情報端末のシステム2102cはまた、ネットワーク接続ストレージ(NAS)2104aおよび2104bに保存されたデータの適応的データ再構成に並列処理を提供することができる。図21は、例のみを例証し、種々様々な他のコンピューターのアーキテクチャおよびシステムが、本発明の様々な実施形態とともに使用され得る。例えば、ブレードサーバーは、並列処理を提供するために使用され得る。プロセッサ・ブレードは、並列処理を提供するためにバックプレーンに通して接続され得る。ストレージも、

40

50

個別のネットワークインターフェースを介してバックプレーンに、またはネットワーク接続ストレージ（NAS）として接続され得る。

【0529】

幾つかの例の実施形態では、プロセッサは、個別のメモリ空間を維持し、ネットワークインターフェース、バックプレーン、または他のプロセッサによる並列処理用他のコネクタを介してデータを送信することができる。例の実施形態では、プロセッサの幾つか又はすべては、共有仮想アドレスメモリ空間を使用することができる。

【0530】

図22は、例の実施形態に従う共有仮想アドレスメモリ空間を使用するマルチプロセッサコンピュータシステム2200のブロック図である。システムは、共有メモリサブシステム2204にアクセスすることができる複数のプロセッサ2202a-fを含む。システムは、メモリサブシステム2204に複数のプログラム可能なハードウェアメモリアルゴリズムプロセッサ（MAP）2206a-fを組み込んでいる。MAP 2206a-fの各々は、メモリ2208a-fおよび1つ以上のフィールドプログラム可能なゲートアレイ（FPGA）2210a-fを含むことができます。MAPは、構成可能な機能ユニットを提供し、特定のアルゴリズムまたはアルゴリズムの部分が、それぞれのプロセッサと密に協働し処理するためのFPGA 2210a-fに提供され得る。例えば、MAPは、例の実施形態において、データモデルに関する代数式を評価するために、および適応的データ再構成を行うために使用され得る。この例において、各MAPは、これらの目的のためにプロセッサのすべてによって地球規模でアクセス可能である。一構成において、各MAPは、関連するメモリ2208a-fにアクセスするためにダイレクトメモリアccess（DMA）を使用することができ、それぞれのマイクロプロセッサ2202a-fから独立して、およびそれとは非同期的にタスクを実行することが可能となる。この構成において、MAPは、アルゴリズムのパイプライン処理および並列実行のために、別のMAPに直接、結果を供給することができる。

【0531】

上記のコンピュータのアーキテクチャおよびシステムは、例のみであり、種々様々な他のコンピュータ、携帯電話、個人用携帯情報端末のアーキテクチャおよびシステムが、一般的なプロセッサ、コプロセッサ、FPGA、および他のプログラム可能論理デバイス、システムオンチップ（SOC）、特定用途向け集積回路（ASIC）、並びに他の処理素子および論理素子の任意の組み合わせを使用するシステムを含む、例の実施形態とともに使用され得る。幾つかの実施形態では、コンピュータシステムのすべて又は一部分は、ソフトウェアまたはハードウェアに実装され得る。あらゆる種類のデータ記憶媒体が、ランダムアクセスメモリ、ハードドライブ、フラッシュメモリ、テープドライブ、ディスクアレイ、ネットワーク接続ストレージ（NAS）、および他のローカルの及び分散したデータ記憶デバイスおよびシステムを含む、例の実施形態とともに使用され得る。

【0532】

例の実施形態では、コンピュータシステムは、上記または他のコンピュータのアーキテクチャおよびシステムのいずれかで実行するソフトウェアモジュールを使用して実行され得る。他の実施形態では、システムの機能は、ファームウェア、図22に言及されるようなフィールドプログラム可能なゲートアレイ（FPGA）などのプログラム可能論理デバイス、システムオンチップ（SOC）、特定用途向け集積回路（ASIC）、または他の処理素子および論理素子に部分的または完全に実装され得る。例えば、セットプロセッサ（Set Processor）およびオプティマイザ（Optimizer）が、図20に例証されたアクセラレーターカード122などの、ハードウェアアクセラレーターカードの使用によってハードウェアアクセラレーションで実行され得る。

【0533】

実施例1：マイクロウェルを作り出すためのシリコンウェーハのフロントエンド処理

シリコンウェーハは、図23に例証されるようなフロントエンド処理方法を使用して、

10

20

30

40

50

複数のマイクロウェルを含む典型的な基板を作り出すためにエッチングされる。基板の両方の表面上に酸化物の層を有するSOI基板から始めて、フォトレジストの層は、好ましい位置で基板のハンドル側にフォトリソグラフィ方法を使用してコーティングされる。フォトレジストのコーティング後に、DRIEが、ウェーハの真中の酸化物の層に達するまでハンドル側で実行される。その後、フォトレジストのコーティングは、はぎ取られて、真下の酸化物の層をさらす。同様に、フォトレジストの第2層が、適切な直径を有して、好ましい位置で基板のデバイス側にフォトリソグラフィ方法を使用してコーティングされる。フォトレジストの第2層のコーティング後に、DRIEは、シリコンウェーハの真中の酸化物の層に達するまでシリコンウェーハのデバイス側で再び実行される。その後、フォトレジストおよびウェーハの真中の酸化物の層は、はぎ取られる。最後に、酸化物は、ウェーハのすべての表面上でコーティングされ、シリコンウェーハを複数のマイクロ構造とともに作り出し、その各々は、より大きなマイクロウェルおよびマイクロウェルに流体接続された1つ以上のマイクロチャンネルを含む。

10

【0534】

実施例2：選択されたマイクロウェルの表面を官能化するためのシリコンウェーハのバックエンド処理

エッチングされたマイクロウェルを有するシリコンウェーハは、図24に例証されるように、バックエンド処理方法を使用して、選択されたマイクロウェルの部分を官能化するためにさらに処理される。表面エネルギーを増加させる能動型の官能化剤でマイクロウェル内のより小さなマイクロウェルの表面だけをコーティングするために、実施例1からの生成物は、出発物質として使用される。フォトレジストの液滴は、本明細書に記載されるようなインクジェットプリンターを使用して、マイクロチャンネルへと付着される。フォトレジストの液滴は、マイクロウェルと流体接続したマイクロチャンネルへと広げられる。フォトレジスト付着後に、酸素プラズマエッチングが、過剰なフォトレジストをエッチバックする(etch back)ために実行され、図24に例証されるようにフォトレジストのより滑らかな表面を残す。低表面エネルギーで受動型の官能化層を作り出すために、化学的に不活性な部分の層が、シリコンウェーハのすべてのさらされた表面上にコーティングされる。その後、フォトレジストは、はぎ取られ、マイクロウェルと流体連通したより小さなマイクロチャンネルの表面をさらす。フォトレジストの除去後に、マイクロウェルの表面の表面エネルギーを増加させる及び／又はオリゴヌクレオチド成長に表面化学作用を提供するために、能動型の官能化剤の層は、より小さなマイクロチャンネルの表面上にコーティングされる。前に官能化された表面は、官能化の第2の適用による影響を本質的に受けないままである。その結果、第2の表面官能化を有する1つ以上のマイクロチャンネルとの各々が流体連通した第1の表面官能化を有する複数のマイクロウェルは、固体基板上で製造される。

20

30

【0535】

実施例3：流体デバイス

実質的に平面の基板部分を含む流体デバイスを、図25Dで示されるように、本発明の方法および組成物に従って製造した。基板の断面は、図25Eに示される。基板は、108のクラスターを含、ここで、各クラスターは、流体接続した109のグルーピングを含む。各グルーピング、第1チャンネルから伸長する5つの第2チャンネルを含む。図25Aは、109のグルーピングを含む各クラスターのデバイス図である。図25Cは、図25Aのクラスターのハンドル図である。図25Bは、11のグルーピングの列を示す図25Aの断面図である。図25Fは、図25Dで示される基板についての別の図であり、ここで、ラベルの位置は視覚化される。図25Gは、図25Aに拡大図であり、クラスターの109のグルーピングを示す。

40

【0536】

図25Aおよび25Cで示されるように、109のグルーピングが、円状のパターンでクラスターを形成するためにオフセット列に配され、ここで、個々の領域は互いに重複していない。個々のグルーピングは、円を形成する。2503によって表わされるように、

50

これらのグルーピングの3列の間の距離は、0.254 mmである。2506によって示されるように、グルーピングの1列における2つのグルーピング間の距離は、0.0978 mmである。グルーピングにおける第1チャンネルの断面は、2504によって示されるように、0.075 mmである。グルーピングにおける第2チャンネルの各々の断面は、2505によって示されるように、0.020 mmである。グルーピングにおける第1チャンネルの長さは、2502によって示されるように、0.400 mmである。グルーピングにおける第2チャンネルの各々の長さは、2501によって示されるように、0.030 mmである。

【0537】

図25Aおよび25Cで示される109のグルーピングのクラスターは、図25Aおよび25Cにおいてクラスターに隣接して置かれ得る単一の反応ウェルにおける配置に適した構成で配されている。図25Dにおけるクラスターの残りは、図26および実施例4に記載されるナノリアクタープレートなどの、多くの反応ウェルへの送達を促進する方法で同様に配される。基板は、108の反応ウェルを含み、11,772のグルーピングを提供する。一寸法(one dimension)に沿った基板の幅は、2508によって示されるように、32.000 mmである。別寸法に沿った基板の幅は、2519までに示されたとともに、32.000 mmである。

【0538】

実質的に平面の基板部分は、図25Dで示されるように、グルーピングの108のクラスターを含む。クラスターは、正方形を形成に配される。一寸法でのクラスターの中心から起点までの最も遠い距離は、2518によって示されるように、24.467 mmである。別寸法でのクラスターの中心から起点までの最も遠い距離は、2509によって示されるように、23.620 mmである。一寸法でのクラスターの中心から起点までの最も近い距離は、2517によって示されるように、7.533である。別寸法でのクラスターの中心から起点までの最も近い距離は、2512によって示されるように、8.380である。同じ列での2つのクラスターの中心間の距離は、2507と2522によって示されるように、1.69334 mmである。

【0539】

基板は、システムの他のコンポーネントとの流体デバイスのアライメントを促進するために3つの基準マークを含む。第1基準マークは、起点の近くに位置付けられ、ここで、基準マークは、どのクラスターよりも起点に接近している。第1基準マークは、一寸法における起点から5.840 mm(2516)に位置付けられ、別寸法における起点から6.687 mm(2513)に位置付けられる。最初の基準マークは、一寸法におけるクラスターから1.69334 mm(2515)に位置付けられ、別寸法におけるクラスターから1.69344 mm(2514)に位置付けられる。2つの他の基準マークは、それぞれ、基板の縁から0.500 mm(2510および2520)に、および起点から16.000 mm(2511および2521)に位置付けられる。

【0540】

基板の断面は、図25Eに示され、ここで、グルーピング全長は、2523に示されるように、0.430 mmである。

【0541】

基板についての別の図が、図25Fに示され、これは、108のクラスターの配置およびラベルの位置を示している。ラベルは、基板の縁から1.5 mm(2603)に位置付けられる。起点から測定されるように、ラベルは、4.0 mm(2602)から9.0 mm(2601)の間の距離に位置付けられる。

【0542】

実施例4：ナノリアクター。

ナノリアクターを、図26Bおよび26Cに示されるような本発明の方法および組成物に従って製造した。ナノリアクターの断面は、図26Aに示される。ナノリアクターは、108のウェルを含む。図26Dは、ナノリアクターのハンドル図である。図26Eは、

10

20

30

40

50

図26Bに示されるナノリアクターの別の図であり、ここで、ラベルの位置は、視覚化される。

【0543】

図26Bに示されるように、108のウェルは、正方形のパターンを形成するための列に配され、ここで個々のウェルは、ナノリアクターベース上で持ち上げられる。2711によって示されるように、ウェルの列における2つのウェルの中心間の距離は、1.69334mmである。ウェルの内部の断面は、2721によって示されるように、1.15mmである。ウェルの縁を含むウェルの断面は、2720によって示されるように、1.450mmである。ナノリアクター中のウェルの高さは、2702によって示されるように、0.450mmである。ナノリアクターの全高は、2701によって示されるように、0.725mmである。

10

【0544】

図26Bにおけるウェルは、ナノリアクターの108の反応ウェルへの、図26によって例示されるような、108のウェルを有する流体デバイスからの送達を促進する方法で配される。

【0545】

一寸法に沿ったナノリアクターの幅は、2703によって示されるように、24.000mmである。別寸法に沿ったナノリアクターの幅は、2704によって示されるように、24.000mmである。

【0546】

20

ナノリアクターは、図26Bに示されたように、108のウェルを含む。ウェルは、正方形を形成する列に配される。一寸法におけるウェルの中心から起点までの最も遠い距離は、2706によって示されるように、20.467mmである。別寸法におけるウェルの中心から起点までの最も遠い距離は、2705によって示されるように、19.620mmである。一寸法におけるウェルの中心から起点までの最も近い距離は、2710によって示されるように、3.533mmである。別寸法におけるウェルの中心から起点までの最も近い距離は、2709によって示されるように、4.380mmである。同じ列における2つのウェルの中心間の距離は、2711および2712によって示されるように、1.69334mmである。一寸法におけるウェルの中心からナノリアクターの縁までの距離は、2707によって示されるように、3.387mmである。別寸法におけるウェルの中心からナノリアクターの縁までの距離は、2708によって示されるように、2.540mmである。

30

【0547】

ナノリアクターは、システムの他のコンポーネントとの、例えば、実施例3に記載されるような流体デバイスとのナノリアクターのアライメントを促進するために、装置面上に3つの基準マークを含む。第1基準マークは、起点の近くに位置付けられ、ここで基準マークは、どのウェルよりも起源に接近している。第1基準マークは、一寸法において起点から1.840mm(2717)に位置付けられ、別寸法において起点から2.687mm(2716)に位置付けられる。第1基準マークは、一寸法においてウェルから1.6933mm(2719)に位置付けられ、別寸法において同じウェルから1.6934mm(2718)に位置付けられる。2つの他の基準マークは、それぞれ、ナノリアクターの縁から0.500mm(2714および2715)に、および起点から12.000mm(2713)に位置付けられる。

40

【0548】

ナノリアクターは、図26Dで示されるように、ハンドル面上に4つの基準マークを含む。一寸法におけるナノリアクターの中心または基準マークおよび最も近い角からの距離は、1.000mm(2722および2723)である。一寸法における基準マークの長さは、1.000mm(2724および2725)である。基準マークの幅は、2726によって示されるように、0.050mmである。

【0549】

50

ナノリアクターの別の図が、図26Eで示され、これは、108のウェルの配置とラベルの位置を示している。ラベルは、ナノリアクターの縁から1.5mmの(2728)に位置付けられる。ラベルは、ナノリアクターの角から1.0mmの(2727)に位置付けられる。ラベルは、長さが9.0mm(2726)である。

【0550】

実施例5：オリゴヌクレオチド合成デバイスの製造

二酸化ケイ素の電氣的絶縁体層を挟む約30μm厚さのデバイス層および約400μm厚さのハンドル層を有するシリコン・オン・インシュレーター(SOI)のウェーハを、図28に例証されるようなフロントエンド処理方法を使用して、エッチングし、三次元の流体接続部を有している多くの特徴部を含む実施例3に記載される典型的な基板を作成した。図27は、デバイスの設計特徴を詳細に例証する。SOIウェーハを、両面上で熱酸化物で覆うために酸化した(図28のA)。図28のBで示されるように、フォトリソグラフィを、フォトレジストのマスク(赤)を作成するためにデバイス側に適用した。SOI酸化層(図28のC)がフォトレジストを欠く位置まで約30μmの深さまで垂直側壁をエッチングするために、深掘り反応性イオンエッチング(DRIE)工程を使用した。フォトレジストを、当該技術分野で既知の標準的なレジスト剥離プロセスを使用して剥離した。

【0551】

実施例3に記載されるデバイスに従って、フォトリソグラフィ、DRIE、およびフォトレジストの剥離をハンドル側繰り返し(図28のE-G)、所望のパターンを生成した。埋め込み酸化物(BOX)を、ウェットエッチングプロセスを使用して除去した(図28のG)。流体特徴部の側壁に付着されたかもしれない混入するフルオロポリマーを、熱酸化によって除去した。熱酸化を、ウェットエッチングプロセスを使用して剥離した。

【0552】

エッチングしたSOIウェーハを、図29に記載されるような処理工程にさらした。

【0553】

最初に、ウェーハを、ピラニア溶液を使用して湿式洗浄工程によって洗浄し、その後、乾燥したO₂プラズマ曝露が続いた。チップのデバイス層(図29のBにおける上部)を、約20μm幅であるデバイス層チャンネルへのウィッキングによって管理されたプロセスにおいてフォトレジストで覆った。フォトレジストを、フォトリソグラフィを使用してパターン化し、受動となることが望まれる領域をさらした(さらなるオリゴヌクレオチド合成はない)。このプロセスは、レジストを対象パターンを有する2値マスクに通して露出することによって機能する。露出後、露出領域におけるはレジストを、現像液中で除去した(図29のC)。

【0554】

フォトレジストのない表面を、化学蒸着(CVD)によってフルオロシランガスにさらした。これは、結果として、フォトレジストのない表面上のフルオロカーボンの付着をもたらす。代替的な適用において、炭化水素シランは、この工程に使用される。シラン化した表面は、表面上に単層を生成するシランのさらなる層に反応がない。その後、フォトレジストを、有機溶媒中に溶解し、表面上にフッ素化を残し、フォトレジストの真下にあったシリコン/二酸化ケイ素をさらした。オリゴヌクレオチド成長のための表面を調製するために、能動型の官能化の最終工程を行った(図29のF)。

【0555】

4時間のエタノールおよび酢酸中でN-(3-トリエトキシシリルプロピル-4-ヒドロキシブチルアミド)の1%の溶液を使用して、湿式プロセスにより水酸基の制御された面密度(図30)を表面上で達成し、その後、14時間150℃でホットプレートにチップを置いた。代替的な適用において、CVDプロセスは、気体状態で表面にシランを送達し、約200mTorrの制御された堆積圧および約150℃の制御された温度を適用することによって行われる。CVDプロセスは、インサイツでのプラズマ洗浄を可能にし、高秩序の自己集合単分子層(SAM)の生成によく適している。

【0556】

図31は、上記の方法に従って製造されたデバイスの画像を示す。

【0557】

実施例6：ナノリアクターデバイスの製造。

図32に記載されるようなナノウェルを備えるナノリアクターチップを製造した。適切なサイズを合わせたシリコンウェーハを、両面上で熱酸化物で覆うために酸化した（図33のA）。

【0558】

フォトリソグラフィーを裏面側に適用して、図33のBに示されるようなフォトレジストのマスク（赤）を作成した。裏面を、熱酸化層を越えて、フォトレジストを欠いている位置でエッチングし、浅いウェルを作り出した（図33のC）。フォトレジストを、当該技術分野で既知の標準的なレジスト剥離プロセスを使用して剥離した（図33のD）。

【0559】

フォトリソグラフィー工程を、図33のEにおけるパターンに従って正面側で繰り返した。時限エッチングを使用して約450umの深さまで垂直側壁をエッチングするために、深掘り反応性イオンエッチング（DRIE）工程を使用した。他の場合では、SOIウェーハを使用し、ハンドル層は、BOXまでエッチングされ、ここでBOXは、エッチング停止として機能することができる（図33のF）。正面側のフォトレジストを剥離し（図33のG）、図32に記載される装置に従って所望のパターンを生成した。流体特徴部の側壁に付着されたかもしれない混入するフルオロポリマーを、熱酸化によって除去し、熱酸化を、ウェットエッチングプロセスを使用して剥離した（図33のH）。

【0560】

次に、ウェーハを、ピラニア溶液を使用して湿式洗浄工程によって洗浄し、その後、乾燥したO₂プラズマ曝露が続いた。（図34のA）。レジストを、その後、微小滴付着システムを使用して、個々のウェルへと付着させた（図34のBの上部）。レジストなしの表面を、化学蒸着（CVD；図34のC）によってフルオロシランガスにさらした。これは、結果として、レジストのない表面上のフルオロカーボンの付着をもたらした。代替的な適用において、炭化水素シランまたは他のタイプのシランは、この工程に使用される。シラン化した表面は、表面上に単層を生成するシランのさらなる層に反応がない。その後、レジストを、有機溶媒中に溶解し、表面上にフッ素化を残し、レジストの真下にあったシリコン表面をさらした。

【0561】

図35のA-Bは、記載されるように製造されたナノリアクターデバイス中のナノウェルを例証する。

【0562】

実施例7 — 2Dオリゴヌクレオチド合成デバイス上の50量体の配列の合成

二次元のオリゴヌクレオチド合成デバイスを、フローセルへと組み込み、これを、フローセルに接続した（Applied Biosystems（ABI394 DNA Synthesizer"）。二次元のオリゴヌクレオチド合成デバイスを、N-（3-トリエトキシシリルプロピル）-4ヒドロキシブチルアミド（Gelast, shop.gelast.com/Product.aspx?catnum=SI8189.5&Index=0&TotalCount=1）で均一に官能化し、これを、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド合成方法を使用して、50bp（「50量体のオリゴヌクレオチド」）の典型的なオリゴヌクレオチドを合成するために用いた。

【0563】

50量体の配列を、SEQ ID NO. : 1に記載される通りであった。

【0564】

5' AGACAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTTCGGCAT##TTTTTTTTTTT3」（SEQ ID NO. : 1）であり、ここで#がチミジン-スクシニルヘキサミド CED ホスホラミダイト（Che

mGeneSからのCLP-2244)を示し、これは、脱保護中の表面からのオリゴの放出を可能にする切断可能なリンカーである。

【0565】

合成を、表3におけるプロトコルおよびABIシンセサイザーに従って、標準のDNA合成化学作用（連結、キャッピング、酸化、および非ブロック化）を使用して行った。

【0566】

【表 3 - 1】

一般的な DNA 合成プロセス名	表 3	
	プロセス工程	時間 (秒)
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	23
	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
DNA 塩基付加 (ホスホラミダイト+活性化因子の流れ)	活性化因子でのマニフォールドのフラッシュ	2
	フローセルへの活性化因子	6
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	6
	フローセルへの活性化因子	0.5
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	5
	フローセルへの活性化因子	0.5
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	5
	フローセルへの活性化因子	0.5
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	5
	25 秒間のインキュベーション	25
洗浄 (アセトニトリルの洗浄流)	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15
	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
DNA 塩基付加 (ホスホラミダイト+活性化因子の流れ)	活性化因子でのマニフォールドのフラッシュ	2
	フローセルへの活性化因子	5

【 0 5 6 7 】

【表 3 - 2】

表 3		
一般的な DNA 合成プロセス名	プロセス工程	時間 (秒)
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	18
	25 秒間のインキュベーション	25
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15
	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
キャッピング (CapA+B, 1:1, 流れ)	フローセルへの CapA+B	15
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
酸化 (酸化剤の流れ)	フローセルへの酸化剤	18
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15
	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4

【表 3 - 3】

一般的な DNA 合成プロセス名	表 3	
	プロセス工程	時間 (秒)
	フローセルへのアセトニトリル	23
	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
非ブロック化 (デブロックの流れ)	フローセルへのデブロック	36
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	18
	N2 系のフラッシュ	4.13
	アセトニトリル系のフラッシュ	4.13
	フローセルへのアセトニトリル	15

【0569】

ホスホラミダイト／活性化因子の組み合わせを、フローセルに通す大量の試薬の送達と同様に送達した。環境が試薬により「湿った」状態にずっととどまるために、乾燥工程を行わなかった。

【0570】

流量制限器を、より速いフローを可能にするために、ABI 394 シンセサイザーから取り外した。流量制限器なしで、（流量制限器を用いるすべての試薬に対する～50 uL／秒と比較して）アミダイト（ACN中に0.1 M）、活性化因子（ACN中の0.25 Mのベンゾイルチオテトラゾール（「BT T」；Glen Researchから30-3070-xx））、およびOx（20％のピリジン、10％の水、および70％のTHF中に、0.02 MのI2）に対する流量は、およそ～100 uL／秒であり、アセトニトリル（「ACN」）およびキャッピング試薬（Cap AとCap Bの1：1の混合、ここで、Cap AはTHF／ピリジン中で無水酢酸であり、Cap BはTHF中で16％の1-メチルイミダゾール（methylimidazole）である）に対する流量は、およそ～200 uL／秒であり、およびデブロック（Deblock）（トルエン中の3％のジクロロ酢酸）に対する流量は、およそ～300 uL／秒であった。

【0571】

酸化剤を完全に押し出す時間を観察し、化学的な滞留時間のタイミングを適切に調節して、異なる化学物質間に追加のACN洗浄を導入した。

【0572】

オリゴヌクレオチド合成の後、75 psiで一晩、チップをガス状のアンモニア中で脱保護した。5つの水滴を表面に塗布し、オリゴ (oligos) を回収した (図45のA)。その後、回収したオリゴを、BioAnalyzer小型RNAチップ上で分析した (図45のB)。

【0573】

＜実施例8：2Dオリゴヌクレオチド合成デバイス上での100量体の配列の合成＞

50量体の配列の合成について実施例7に記載されるものと同じプロセスを、異なる2つのシリコンチップ (1つはN-(3-トリエトキシシリルプロピル)-4-ヒドロキシブチルアミドで一様に官能化したものであり、もう1つは11-アセトキシウンデシルトリエトキシシランとn-デシルトリエトキシシランの5/95の混合により官能化したものである) 上での100量体のオリゴヌクレオチド (「100量体のオリゴヌクレオチド」; 5' CGGGATCCTTATCGTCAATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTTGCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAACCCTCGCAT#TTTTTTTTTTTTTT3'、ここで、#は、チミジンスクシニルヘキサミド (hexamide) CEDホスホラミダイト (ChemGenesのCLP-2244) を示す; SEQ ID NO. : 2) の合成に使用し、表面から抽出したオリゴを、BioAnalyzer装置上で分析した (図46)。

【0574】

2つのチップから10のサンプルを全て、以下の熱サイクルプログラムを使用して、50 µLのPCR混合物 (25 µLのNEB Q5 mastermix、2.5 µL 10 µMのフォワードプライマー、2.5 µL 10 µMのリバースプライマー、表面から抽出した1 µLのオリゴ、及び50 µLまでの水) 中のフォワード (5' ATGCGGGGTTCTCATCATC3'; SEQ ID NO. : 3) 及びリバース (5' CGGGATCCTTATCGTCAATCG3'; SEQ ID NO. : 4) のプライマーを使用して更にPCR増幅した：

98 C、30秒

98 C、10秒 ; 63 C、10秒 ; 72 C、10秒 ; 12のサイクルの繰り返し

72 C、2分

【0575】

PCR生成物もBioAnalyzer上で実行され、100量体の位置にて鋭いピークを実証した (図47)。

【0576】

次に、PCR増幅したサンプルをクローン化し、サンガー配列決定を行った (Sanger sequence)。表4は、チップ1のスポット1-5から採取したサンプル、及びチップ2のスポット6-10から採取したサンプルのためにサンガー配列決定を行った結果を要約する。

【0577】

【表 4】

表 4:

スポット	エラー率	サイクル効率
1	1/763 bp	99.87%
2	1/824 bp	99.88%
3	1/780 bp	99.87%
4	1/429 bp	99.77%
5	1/1525 bp	99.93%
6	1/1615 bp	99.94%
7	1/531 bp	99.81%
8	1/1769 bp	99.94%
9	1/854 bp	99.88%
10	1/1451 bp	99.93%

【0578】

故に、合成したオリゴヌクレオチドの高品質と均一性を、異なる表面化学作用により2つのチップ上で繰り返した。全体的に、配列決定した100量体の262のうち233に対応する、全体的に89%が、エラーのない完全な配列であった。

【0579】

図48と49は、それぞれ、スポット8と7から採取したサンプルに関する位置合せマップを示し、「x」は単独の塩基欠失を示し、「星印」は単独の塩基変異を示し、「+」はサンガー配列における低い質のスポットを示す。図48において位置合わせした配列は共に、約97%のエラー率を表し、29の読み取りの内28の読み取りが完全な配列に相当する。図49において位置合わせした配列は共に、約81%のエラー率を表し、27の読み取りの内22の読み取りが完全な配列に相当する。

【0580】

最終的に、表5は、スポット1-10のオリゴヌクレオチドサンプルから得た配列に関する、重要なエラー特性を要約する。

【0581】

【表 5】

表 5:

サンプル ID/ スポット no.	OSA_0046 /1	OSA_0047 /2	OSA_0048 /3	OSA_0049 /4	OSA_0050 /5	OSA_0051 /6	OSA_0052 /7	OSA_0053 /8	OSA_0054 /9	OSA_0055/ 10
合計の配列	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
配列決定の質	28 の内 25	27 の内 27	30 の内 26	23 の内 21	26 の内 25	30 の内 29	31 の内 27	31 の内 29	29 の内 28	28 の内 25
オリゴの質	25 の内 23	27 の内 25	26 の内 22	21 の内 18	25 の内 24	29 の内 25	27 の内 22	29 の内 28	28 の内 26	25 の内 20
ROI 一致の数	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
ROI 変異	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
ROI 複数の塩 基の欠失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 小さな挿 入	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 1 つの塩 基の欠失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大きな欠失の 数	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
変異: G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
変異: T>C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ROI エラーの 数	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1
ROI エラー率	834 にお いて Err: ~1	1350 にお いて Err: ~1	1282 にお いて Err: ~1	708 にお いて Err: ~1	2500 にお いて Err: ~1	2667 にお いて Err: ~1	876 にお いて Err: ~1	2900 にお いて Err: ~1	1400 にお いて Err: ~1	2349 にお いて Err: ~1
ROI マイナス プライマー エラー率	763 にお いて MP Err: ~1	824 にお いて MP Err: ~1	780 にお いて MP Err: ~1	429 にお いて MP Err: ~1	1525 にお いて MP Err: ~1	1615 にお いて MP Err: ~1	531 にお いて MP Err: ~1	1769 にお いて MP Err: ~1	854 にお いて MP Err: ~1	1451 にお いて MP Err: ~1

【0582】

<実施例 9：3D オリゴヌクレオチド合成デバイス上での 100 量体の配列の合成>

合成用の活性領域上で 11-アセトキシウンデシルトリエトキシシランと n-デシルトリエトキシシランの 5/95 の混合により差次的に官能化された、実施例 3 に記載されるような 3 次元のオリゴヌクレオチド合成デバイスを、本明細書に記載されるオリゴヌクレオチド合成方法を使用して、実施例 8 の 100 量体のオリゴヌクレオチドを合成するためにフローセルへ組み込んだ。表 3 のプロトコルに従い、実施例 7 に記載されるような標準の DNA 合成化学（連結、キャッピング、酸化、及びデブロッキング）を使用して、合成を行った。チップを一晩、75 psi で、ガス状のアンモニア中で脱保護し、オリゴを 500 μL の水の中に溶出した。蒸発後、オリゴを全て、下流の解析のために 20 μL の水の中で再懸濁した。再懸濁したサンプルを、BioAnalyzer 装置上で分析した（図 50 の A）。

【0583】

再懸濁したサンプルも、以下の熱サイクルプログラムに従って、25 μL の NEB Q

10

20

30

40

50

5 マスターミックス (master mix)、2. 5 μ L 10 μ M のフォワードプライマー、2. 5 μ L 10 μ M のリバースプライマー、表面から抽出した 1 μ L のオリゴ、及び 50 μ L までの水を含む 50 μ L の PCR 混合物中のフォワード (5' ATGCGGGGTTCATCATC 3' ; SEQ ID NO. : 5) 及びリバース (5' CGGGATCCCTTATCGTCATCG 3' ; SEQ ID NO. : 6) のプライマーを使用して PCR 増幅した：

1 つのサイクル：98 C、30 秒

12 のサイクル：98 C、10 秒；63 C、10 秒；72 C、10 秒

1 つのサイクル：72 C、2 分

【0584】

PCR 生成物も BioAnalyzer 上で実行し (図 50 の B)、100 量体の位置にて鋭いピークを示した。

【0585】

PCR 生成物の配列決定の結果は、29 の配列の内の 23 の配列が完全であり、エラー率が図 51 の位置合わせマップにより示されるように 600 bp において ~1 であり、ここで、「x」は単独の塩基欠失を示し、「星印」は単独の塩基変異を示し、「+」はサンガー配列における低品質スポットを示す。

【0586】

<実施例 10：3 次元のマイクロ流体オリゴヌクレオチド合成デバイス上での並列のオリゴヌクレオチド合成>

実施例 9 の 3 次元のマイクロ流体デバイス上で並列のオリゴヌクレオチド合成を実行するために、ハウス設定 (house set-up) を使用して、実施例 7 の合成プロトコルを修正した。

【0587】

表 6 は、2 つのプロトコルを並べた比較を示す。

【0588】

10

20

【表 6 - 1】

表 6:

一般的な DNA 合成 プロセス名	実施例 7 のプロトコル		屋内型ツイストシンセサイザー プロトコル	
	実施例 7 のプロセス工程	時間 (秒)	ツイストプロセス工程	時間 (秒)
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4	NA	
	フローセルへのアセトニトリル	23		
	N2 系のフラッシュ	4		
	アセトニトリル系のフラッシュ	4		
DNA 塩基付加 (ホスホラミダイト + 活性化因子の流れ)	活性化因子でのマニフォールドのフラッシュ	2	印刷ヘッドは、チップ活性部位に直接、1:1 の活性化因子 + ホスホラミダイトを印刷する	120
	フローセルへの活性化因子	6		
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	6		
	フローセルへの活性化因子	0.5		
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	5		
	フローセルへの活性化因子	0.5		
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	5		
	フローセルへの活性化因子	0.5		
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	5		
	25 秒間のインキュベーション	25		
	アセトニトリル系のフラッシュ	4		
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	フローセルへのアセトニ	15		

10

20

30

40

【表 6 - 2】

一般的な DNA 合成 プロセス名	実施例 7 のプロトコル		屋内型ツイストシンセサイザー プロトコル	
	実施例 7 のプロセス工程	時間 (秒)	ツイストプロセス工程	時間 (秒)
	トリル			
	N2 系のフラッシュ	4		
	アセトニトリル系のフラッシュ	4		
	活性化因子でのマニフォールドのフラッシュ	2		
DNA 塩基付加 (ホスホラミダイト + 活性化因子の流れ)	フローセルへの活性化因子	5		
	フローセルへの活性化因子 + ホスホラミダイト	18		
	25 秒間のインキュベーション	25		
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15	フローセルへのアセトニトリル	15
	N2 系のフラッシュ	4	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
キャッピング (CapA+B, 1:1, 流れ)	フローセルへの CapA+B	15	フローセルへの CapA+B	15
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15	フローセルへのアセトニトリル	15
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
酸化 (酸化剤の流れ)	フローセルへの酸化剤	18	フローセルへの酸化剤	18
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4

【 0 5 9 0 】

【表 6 - 3】

一般的な DNA 合成 プロセス名	実施例 7 のプロトコル		屋内型ツイストシンセサイザー プロトコル	
	実施例 7 のプロセス工程	時間 (秒)	ツイストプロセス工程	時間 (秒)
	N2 系のフラッシュ	4	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15	フローセルへのアセトニトリル	15
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15	フローセルへのアセトニトリル	15
	N2 系のフラッシュ	4	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	23	フローセルへのアセトニトリル	23
	N2 系のフラッシュ	4	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
非ブロック化 (デブロックの流れ)	フローセルへのデブロック	36	フローセルへのデブロック	36
洗浄 (アセトニトリルの洗浄の流れ)	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	N2 系のフラッシュ	4	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	18	フローセルへのアセトニトリル	18
	N2 系のフラッシュ	4	N2 系のフラッシュ	4
	アセトニトリル系のフラッシュ	4	アセトニトリル系のフラッシュ	4
	フローセルへのアセトニトリル	15	フローセルへのアセトニトリル	15

【表 6－4】

一般的な DNA 合成 プロセス名	実施例 7 のプロトコル		屋内型ツイストシンセサ イザー プロトコル	
	実施例 7 のプロセス工程	時間 (秒)	ツイストプロセス工 程	時間 (秒)
フローセル乾燥 (ツイストシンセサ イザーに特異的)	NA		N2 系のフラッシュ	4
			フローセルへの N2	19.5
			N2 系のフラッシュ	4
			フローセル上の真空 乾燥の引き抜き	10
			N2 系のフラッシュ	4
			フローセルへの N2	19.5

10

【0592】

アセトニトリル (ACN) は、直列形の脱ガス装置 (Model No. 403-0202-1; Random Technologies) を通過し、非常に疎水性の膜の側に沿って液体を通過させ、それは、50-400 μ L/秒の範囲の流速で官能化し、且つ、理論に縛られることなく、恐らく不飽和溶媒に気泡を溶解することにより、フローセル上に形成される気泡を取り除くことが以前に示されている。

20

【0593】

以下のように、試薬をフローセル中で異なる試薬と交換する：

- 1) フローセルへの試薬流動を開始する。
- 2) 新たな試薬で送達ラインから以前の試薬を「押し出す」ようにバルブを設定することにより準備する。このバルブ状態を 3.75 秒間保つ。
- 3) 2D バルブ状態：フローセルの表面上にある以前の試薬を新しい試薬と交換するようにバルブを設定する。これは、工程 2 が 3.75 秒間活性である間に生じる。工程 2 と 3 は同時に 0.25 秒間活性であり、その後、始動バルブ状態が止められる。
- 4) 3D バルブ状態：バルブは、フローセル中のシリコンの 3 次元のマイクロ流体機能を通して試薬が流れることを可能にするように切り替わり、それは、工程 3 における 0.75 秒の 2D バルブ状態が流れた後に開始する。

30

5) 試薬の流動：2D バルブ状態と 3D バルブ状態は、チップにおけるシリコン表面への試薬の適切な投与を可能にするために、指定した時間の間、開いたままである。

従って、試薬交換の 5 秒のサイクルの間、流体送達は、0-4 秒に及ぶ最初の期間中に準備し、3.75-5 秒に及ぶ期間に 2D バルブ状態をオンにすることにより、及び 4.5-5 秒に及ぶ期間中に 3D バルブ状態をオンにすることにより、実行される。

【0594】

40

ホスホラミダイト/活性化物質の組み合わせを、インクジェット印刷工程を使用して送達する。送達は、1:1 の、シリコン表面上への 1 滴ずつの (drop-on-drop) 付着であり得る。液滴サイズは約 10 pL でもよい。幾つかの実施形態において、液滴サイズは、少なくとも約 0.1、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500 ピコリットル以上である。幾つかの実施形態において、液滴サイズは、最大で約 500、400、300、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、5、4、3、2、1、0.1 ピコリットル以下である。液滴サイズは、0.1-50、1-150、又は 5-75 ピコリットルであってもよい。液滴サイズは、これらの値、例えば 2-50 ピコリットルの何れかにより結合される範囲内であってもよい。液滴は、1-100 m/秒の初

50

速度で付着されてもよい。幾つかの場合において、液滴は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、35、40の、45、50、75、100m/秒以上の初速度で付着されてもよい。幾つかの場合において、液滴は、最大で約100、75、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1m/秒以下の初速度で付着されてもよい。1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、35、40、45、50、75、100以上。液滴は、約1-50m/秒、5-15m/秒、5-30m/秒、又は1-30m/秒にある初速度で付着されてもよい。当業者は、これらの値の何れかによっても結合された範囲下にある初速度で液滴を付着してもよいことを理解する。

【0595】

乾燥工程は、大量の試薬配列の後の印刷工程のためにシリコン表面を調製する。印刷した試薬が反応するのを容易にする乾燥状態を達成するために、フローセルを約19.5秒間、約5PSIでN₂ガスによりフラッシュし、小さな真空を10秒間、フローセルのチャンバー上に引き抜き、フローセルを19.5秒間、N₂ガスにより再びフラッシュする。試薬を全て約200-400μL/秒で流す。

【0596】

異なる圧力を使用する屋内型 (i n - h o u s e) システムにおいて流速を制御することができる。流速は、市販で入手可能な合成装置の限定的な態様の1つである。屋内型の機械配列において、流速は、実施例7の値に、又は、合成プロセスを改善するのに適切なものとしての増加又は減少した流速に一致し得る。一般的に、より速い流れは、より遅い流速と比較して、非常に効果的に気泡を移動させ、且つ、与えられた時間間隔中で表面への新鮮な試薬のより多くの交換を可能にするといった、利点を提供する。

【0597】

<実施例11：オリゴヌクレオチド合成デバイスからナノリアクターデバイスへのオリゴヌクレオチド転移に基づくプロット解析>

50量体のオリゴヌクレオチドは、実施例9に記載されるような3Dオリゴヌクレオチド合成デバイス上で合成された。活性な官能化は適用されなかった。図53のA-Bは、オリゴヌクレオチド合成デバイスのデバイス側のクラスターにおけるオリゴヌクレオチド合成チャンネル分布を示し、図53のCは表面官能化を示す。14時間、75psiでのガス状アンモニアのチャンバーにおける処置により、オリゴヌクレオチドを表面から放出した。

【0598】

親水性の内壁と疎水性の上部リップを備えて実施例4に従って製造された、ナノリアクターデバイスのウェル (図54) を、負の対照としてPCAに適したバッファー (5X Q5バッファー; New England Biolabs) で最初に満たした。200-300nLのアリコートを手動でピペットを用いてBioAnalyzerに注ぎ、個別のナノリアクター中に任意の汚染する核酸が存在しないことを示した (図55)。

【0599】

次に、ナノリアクターを、わずかに突き出たメニスカスを形成する約650nLのPCAバッファーで満たした (図53)。ナノリアクターデバイスは、オリゴヌクレオチドデバイスと対になり、約5mm/秒の速度でPCAバッファーによりオリゴヌクレオチド合成チャンネル (「リボルバー」) を浸した。他の場合、とりわけ、デバイスが液体の所望量の制御された分取を引き起こす間に、多かれ少なかれ効果的な液体の転移を達成するため、又は蒸発を制御するために、2つのデバイスを対にする被覆速度 (m a n t l i n g v e l o c i t y) は、本明細書に記載されるように変えられてもよい。オリゴヌクレオチドデバイスとナノリアクターは、約10分間、2つのデバイス間で約50μmの間隙と対になったままであり、オリゴヌクレオチドが溶液に拡散することを可能にする (図57)。幾つかの場合、アセンブリ又はオリゴヌクレオチド合成デバイスは、より速い拡散を促進するように単独で振動するか又は揺れる場合がある。少なくとも11、12、13、14、15、20、25分以上といった、10分より長い拡散時間も、高収率を容易にす

10

20

30

40

50

るために使用してもよい。約5 mm/秒の速度でナノリアクターデバイスをオリゴヌクレオチドデバイスから解放し、個別のナノリアクターにおいて解放したオリゴヌクレオチドを捕捉する。他の場合、とりわけ、デバイスが液体の所望量の制御された分取を引き起こす間に、多かれ少なかれ効果的な液体の転移を達成するために、2つのデバイスを対にする被覆速度は、本明細書に記載されるように変えられてもよい。微量の液体が、オリゴヌクレオチドデバイス上に残ることを観察した。

【0600】

約300 nLのサンプルを、ナノリアクターデバイスにおける様々な個別のナノリアクターからピペットで移し、1 µLの量に希釈し、4.3倍の稀釈度を確立した。希釈したサンプルをBioAnalyzerにおいて個々に実行し、ナノリアクターへのオリゴヌクレオチドの放出を確立した(図55)。

10

【0601】

手動のシリンジを使用して、追加のサンプルを正の対照として採取した。Tygonチュービングを使用して、オリゴヌクレオチド合成デバイスと共に端面シールを作成した。500 µlの水で満たしたシリンジを使用して、1つの全体のクラスター、同様に、ハンドル側から近隣のクラスターの一部に通して液体をフラッシュした。フラッシュした液体を、デバイス側の1.5 mlのEppendorfチューブに集めた。サンプルを真空中で乾燥し、次に10 µLの水の中で再懸濁した。その後、BioAnalyzerにおいてサンプルを同様に分析した。希釈率を占める場合、比較可能な濃度のオリゴヌクレオチドを、正の制御方法とナノリアクターブロット方法を使用して放出した。

20

【0602】

＜実施例12：オリゴヌクレオチド合成デバイスからナノリアクターへのオリゴヌクレオチド転移に基づく注入＞

50量体のオリゴヌクレオチドを、実施例9に記載されるような3Dオリゴヌクレオチド合成デバイス上で合成する。約14時間、約75 psiでのアンモニアのチャンパーにおける処置により、オリゴヌクレオチドを表面から放出する。代替的に、20-120 psiの圧力を、オリゴヌクレオチドの放出のために1-48時間以上の間、使用することができる。温度は室温である。幾つかの場合、脱保護率を、少なくとも約25°C-30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C以上に温度を増加することにより、増加させてもよい。ガス状のメチルアミンも、室温、又は、少なくとも約25°C-30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C以上の高温での脱保護に使用してもよい。メチルアミンにおける脱保護は典型的に、ガス状のアンモニアにおけるよりも速く進行する。

30

【0603】

オリゴヌクレオチド合成デバイスを、1つの入口と1つの出口を持つHele-Shawのフローセルへ組み込む。Tygonチュービングを介してフローセルに繋がれ、手動で制御されるシリンジを使用して、流動が生じる(図57)。図56は、フローセルにおける流体力学の模式図を示す。流体回路を使用してハンドル側から第1のチャンネル(又はビア)へと流体を流し、及び、2のチャンネル、例えばオリゴヌクレオチド合成部位を含むのでリボルバーパターンを形成するものへと流体を更に引き抜く。流体を単点の入口から送達し、単点の出口から採取する(図56のB)。他の場合、線源とラインシンクを使用して流体を通過させることができる(図56のA)。理論に縛られることなく、点源/シンクの組み合わせは、Hele-Shawのフローセルから液体を全て押し出すのにより効果的であり得る、均一な空気フロントを形成すると予想される。フローセルから液体を取り除いた後、液体は、ハンドル側にあるビア、及び第2のチャンネル又はオリゴヌクレオチド合成チャンネルの中、例えば、デバイス側のリボルバーパターンの中にのみ、含まれる。この容量は、バイアス(又は第1のチャンネル)の1つのクラスターにつき300 nLであると推測される。そのような流体の包含は、オリゴヌクレオチド合成デバイスのデバイス層表面上での均一な付着性の液滴の形成を容易にすることができる。

40

【0604】

50

この工程のために、PCA適合性のバッファーなどの、適切な放出バッファーを選択し、放出されたオリゴヌクレオチドを溶液に溶解する。バイアスと第2のチャンネルを満たした後、液体は、約500–1000Paを使用してオリゴヌクレオチド合成のハンドル表面上でHellschawのフローセルからフラッシュされ、デバイスの停滞部（ハンドル及びリボルバー）にのみ液体を残し、それは、アセンブリのクラスター当たり300nLであると推測される（図56のC）。単点の出口を遮断し、加圧空気を約3000–5000Paでハンドル層の表面に流して、デバイス層表面上に液滴を排出する（図56のD）。フローセルを通して十分な放出バッファーを押し出して、第2のチャンネル（又はオリゴヌクレオチド合成チャンネル）からオリゴヌクレオチド合成デバイスのデバイス側面上に現れる、付着性の滴を形成する。付着性の滴径は約300–400nLであり得るが、オリゴヌクレオチド合成クラスター及びナノリアクターの特定の寸法に従い、同様に、所望の濃度のオリゴヌクレオチドに従って、適切な大きさに変えられ得る。例えば、約500nLの付着性滴径を形成することができる。付着性の液滴の形成を顕微鏡で随意にモニタリングして、液滴の形成がオリゴヌクレオチド合成デバイスにわたって完全であることを確かめる。幾つかの場合、付着性の液滴を形成する液体を、所望の接触角度がデバイス層の上で達成されるように、構成要素の混合物から調製してもよい。従って、洗浄剤、例えばポリソルベート20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウリン酸塩、aka Tween-20）などの構成要素で、溶液を補ってもよい。

【0605】

代替的に、適切な量の放出バッファーを、ハンドル側から個々のウェル／第1のチャンネルに付着し、及び、例えばハンドル側にHellschawのフローセルを形成することでハンドル側から圧力を加えることにより、オリゴヌクレオチド合成チャンネルを通して押し出す。ナノリアクターデバイスを、適切な速度（例えば約1–10mm/s）及び距離（例えば約50µm）で、オリゴヌクレオチド合成デバイスのデバイス側に対して被覆する（mantled）。被覆は、蒸発を回避するために、液滴の形成後、迅速に行われ得る。一旦2つのデバイス（ナノリアクターとオリゴ合成リアクター）が覆われると、蒸発も最小となる。

【0606】

<実施例13：オリゴヌクレオチド合成のデバイス側から転写された反応混合物からPCAを使用する、ナノリアクターにおける遺伝子アセンブリ>

表8のSEQ ID NO.：7–66を使用して、表7に記載されるようにPCA反応混合物を調製し、3075bp LacZ遺伝子（SEQ ID No.：67；表8）を組み立てた。

【0607】

【表7】

表 7:

PCA	1 (x100ul)	最終濃度
H2O	62.00	
5x Q5 バッファー	20.00	1x
10mM dNTP	1.00	100uM
BSA 20mg/ml	5.00	1mg/ml
オリゴ混合 各々50nM	10.00	5nM
Q5 pol 2U/ul	2.00	2u/50ul

【0608】

【表 8 - 1】

表 8:

配列名	配列	
オリゴ_1, SEQ ID NO.: 7	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTA CAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGG3'	
オリゴ_2, SEQ ID NO.: 8	5'GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGA TTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA C3'	10
オリゴ_3, SEQ ID NO.: 9	5'CCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGC CCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC3'	
オリゴ_4, SEQ ID NO.: 10	5'CGGCACCGCTTCTGGTGCCGGAAACCAGGCAAAGC GCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3'	
オリゴ_5, SEQ ID NO.: 11	5'CACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTG CGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCTCC3'	20
オリゴ_6, SEQ ID NO.: 12	5'GATAGGTCACGTTGGTG TAGATGGGCGCATCGTAAC CGTG CATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTAT CGG3'	
オリゴ_7, SEQ ID NO.: 13	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTC AATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTT G3'	
オリゴ_8, SEQ ID NO.: 14	5'GTCTGGCCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAACATTA AATGTGAGCGAGTAACAACCCGTCGGATTCTCCGTG3 ,	30
オリゴ_9, SEQ ID NO.: 15	5'GCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTG ATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG 3'	
オリゴ_10, SEQ ID NO.: 16	5'CAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACTGTCCTGGC CGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAA ACG3'	40
オリゴ_11, SEQ ID NO.: 17	5'CGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTA CGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTG 3'	

【0609】

【表 8 - 2】

配列名	配列	
オリゴ_12, SEQ ID NO.: 18	5'GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAA CTGCCGTCCTCCAGCGCAGCACCATCACCGCGAG3'	
オリゴ_13, SEQ ID NO.: 19	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACG TCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGA TTTC3'	10
オリゴ_14, SEQ ID NO.: 20	5'CTCCAGTACAGCGCGGCTGAAATCATCATTAAGCG AGTGGCAACATGGAAATCGCTGATTTGTGTAGTCGGT TTATG3'	
オリゴ_15, SEQ ID NO.: 21	5'ATTTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAG ATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACA GTTT3'	
オリゴ_16, SEQ ID NO.: 22	5'AAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTTTCACC CTGCCATAAAGAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACG3'	20
オリゴ_17, SEQ ID NO.: 23	5'GCGGCACCGCGCCTTTTCGGCGGTGAAATTATCGATG AGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACG3'	
オリゴ_18, SEQ ID NO.: 24	5'GATAGAGATTTCGGGATTTTCGGCGCTCCACAGTTTCG GGTTTTTCGACGTTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGG CA3'	
オリゴ_19, SEQ ID NO.: 25	5'GAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGT TGAAGTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGC AG3'	30
オリゴ_20, SEQ ID NO.: 26	5'CAGCAGCAGACCATTTTCAATCCGCACCTCGCGGA AACCGACATCGCAGGCTTCTGCTTCAATCAGCGTGCC G3'	
オリゴ_21, SEQ ID NO.: 27	5'CGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAA GCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCAT CA3'	40
オリゴ_22, SEQ ID NO.: 28	5'GCAGGATATCCTGCACCATCGTCTGCTCATCCATGA CCTGACCATGCAGAGGATGATGCTCGTGACGGTTAAC GC3'	
オリゴ_23, SEQ ID NO.: 29	5'CAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCA	

【 0 6 1 0 】

【表 8 - 3】

配列名	配列	
29	GAACAACCTTTAACGCCGTGCGCTGTTTCGCATTATCCG AAC3'	
オリゴ_24, SEQ ID NO.:	5'TCCACCACATACAGGCCGTAGCGGTGCGACAGCGT GTACCACAGCGGATGGTTCGGATAATGCGAACAGCG CAC3'	10
30		
オリゴ_25, SEQ ID NO.:	5'GCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTG AAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCG ATG3'	
31		
オリゴ_26, SEQ ID NO.:	5'GCACCATTCGCGTTACGCGTTCGCTCATCGCCGGTA GCCAGCGCGGATCATCGGTCAGACGATTCAATGGCAC 3'	
32		
オリゴ_27, SEQ ID NO.:	5'CGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCA CCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCA G3'	20
33		
オリゴ_28, SEQ ID NO.:	5'GGATCGACAGATTTGATCCAGCGATACAGCGCGTCG TGATTAGCGCCGTGGCCTGATTCATTCCCCAGCGACC AGATG3'	
34		
オリゴ_29, SEQ ID NO.:	5'GTATCGCTGGATCAAATCTGTGATCCTTCCCGCCC GGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGC 3'	30
35		
オリゴ_30, SEQ ID NO.:	5'CGGGAAGGGCTGGTCTTCATCCACGCGCGCGTACA TCGGGCAAATAATATCGGTGGCCGTGGTGTGCGGCTC3'	
36		
オリゴ_31, SEQ ID NO.:	5'TGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAA TGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAG AC3'	
37		
オリゴ_32, SEQ ID NO.:	5'CCAAGACTGTTACCCATCGCGTGGGCGTATTCGCAA AGGATCAGCGGGCGCGTCTCTCCAGGTAGCGAAAGC C3'	40
38		
オリゴ_33, SEQ ID NO.:	5'CGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATA CTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGC 3'	
39		

【表 8 - 4】

配列名	配列	
オリゴ_34, SEQ ID NO.: 40	5'GCCGTTTTTCATCATATTTAATCAGCGACTGATCCACC CAGTCCCAGACGAAGCCGCCCTGTAAACGGGGATAC TGACG3'	
オリゴ_35, SEQ ID NO.: 41	5'CAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCG TGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGA ACG3'	10
オリゴ_36, SEQ ID NO.: 42	5'GCGGCGTGCGGTCGGCAAAGACCAGACCGTTCATA CAGAACTGGCGATCGTTCGGCGTATCGCCAAA3'	
オリゴ_37, SEQ ID NO.: 43	5'CGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAA AACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCG3'	
オリゴ_38, SEQ ID NO.: 44	5'CTCGTTATCGCTATGACGGAACAGGTATTCGCTGGT CACTTCGATGGTTTGCCCGGATAAACGGAACTGGAA AAACTGC3'	20
オリゴ_39, SEQ ID NO.: 45	5'AATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGC ACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAA GCG3'	
オリゴ_40, SEQ ID NO.: 46	5'GTTTCAGGCAGTTCAATCAACTGTTTACCTTGTGGAG CGACATCCAGAGGCACTTCACCGCTTGCCAGCGGCT TACC3'	
オリゴ_41, SEQ ID NO.: 47	5'CAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACC GCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGT ACGCGTA3'	30
オリゴ_42, SEQ ID NO.: 48	5'GCGCTGATGTGCCCCGGCTTCTGACCATGCGGTCGCG TTCGGTTGCACTACGCGTACTGTGAGCCAGAGTTG3'	
オリゴ_43, SEQ ID NO.: 49	5'CCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTG GCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGC3'	
オリゴ_44, SEQ ID NO.: 50	5'CCAGCTCGATGCAAAAATCCATTTTCGCTGGTGGTCA GATGCGGGATGGCGTGGGACGCGGCGGGGAGCGTC3'	40
オリゴ_45, SEQ ID NO.: 51	5'CGAAATGGATTTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCG TTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAG ATGTG3'	

【表 8 - 5】

配列名	配列	
オリゴ_46, SEQ ID NO.: 52	5'TGAACTGATCGCGCAGCGGCGTCAGCAGTTGTTTTT TATCGCCAATCCACATCTGTGAAAGAAAGCCTGACTG G3'	
オリゴ_47, SEQ ID NO.: 53	5'GCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGG ATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTG AC3'	10
オリゴ_48, SEQ ID NO.: 54	5'GGCCTGGTAATGGCCCGCCGCCTTCCAGCGTTCGA CCCAGGCGTTAGGGTCAATGCGGGTCGCTTCACTTA3'	
オリゴ_49, SEQ ID NO.: 55	5'CGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAG TGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGAT3'	
オリゴ_50, SEQ ID NO.: 56	5'TCCGGCTGATAAATAAGGTTTTCCCTGATGCTGCC ACGCGTGAGCGGTCGTAATCAGCACCGCATCAGCAA GTG3'	20
オリゴ_51, SEQ ID NO.: 57	5'GGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACC GGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGA TGTTGA3'	
オリゴ_52, SEQ ID NO.: 58	5'GGCAGTTCAGGCCAATCCGCGCCGGATGCGGTGTA TCGCTCGCCACTTCAACATCAACGGTAATCGCCATTT GAC3'	
オリゴ_53, SEQ ID NO.: 59	5'GCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAG CAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAG 3'	30
オリゴ_54, SEQ ID NO.: 60	5'GGCAGATCCCAGCGGTCAAAACAGGCGGCAGTAA GGCGGTCGGGATAGTTTTCTTGCGGCCCTAATCCGAG C3'	
オリゴ_55, SEQ ID NO.: 61	5'GTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGT ATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGC3'	
オリゴ_56, SEQ ID NO.: 62	5'GTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTCAATTC GCGCGTCCCGCAGCGCAGACCGTTTTCTGCTCGG3'	40
オリゴ_57, SEQ ID NO.: 63	5'ACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGC CGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCAT	

【表 8 - 6】

配列名	配列	
	C3'	
オリゴ_58, SEQ ID NO.: 64	5'GAAACCGTCGATATTCAGCCATGTGCCTTCTTCCGC GTGCAGCAGATGGCGATGGCTGGTTTCCATCAGTTGC TG3'	
オリゴ_59, SEQ ID NO.: 65	5'CATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTG GTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCG3'	10
オリゴ_60, SEQ ID NO.: 66	5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCG ACCGGCGCTCAGCTGGAATTCCGCCGATACTGACGG GC3'	
LacZ 遺伝子 - SEQ ID NO: 67	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTA CAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAA CTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCT GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCT TTGCCTGGTTTCCGGCACCAAGCGGTGCCGGAAA GCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTG TCGTCGTCCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACG ATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTA CGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGA CGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAA GCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTG ATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACG GGCGCTGGGTTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGC CGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCG GAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGA GTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGC GGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGC ATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTG CCACTCGCTTTAATGATGATTTTCAGCCGCGCTGTACT GGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGA CTACCTACGGGTAAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGA AACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGG TGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCG	20 30 40

【表 8 - 7】

配列名

配列

CGTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACT
 GTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGT
 GGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGA
 AGCAGAAGCCTGCGATGTCGGTTTCCGCGAGGTGCG
 GATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCC
 GTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCA
 TCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGAT
 GGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACCT
 TAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAACCATCC
 GCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTA
 TGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCAT
 GGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTG
 GCTACCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGG
 TGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGATCATCT
 GGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATC
 ACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATC
 CTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCG
 ACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTACG
 CGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGC
 CGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTG
 GAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCC
 ACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAAT
 ACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGG
 GCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGA
 TTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTT
 ACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCC
 AGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCA
 CGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAG
 CAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAACCA
 TCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCG
 ATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATG
 GTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATG
 TCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTG
 AACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGG
 CTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCA

10

20

30

40

【表 8－8】

配列名

配列

TGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCA
 GTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCC
 CGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAG
 CGAAATGGATTTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCG
 TTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTACAG
 ATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACCTGCTGACGCCG
 CTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAAC
 GACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCT
 AACGCCTGGGTCTGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCA
 TTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGC
 AGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGC
 TCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTAT
 CAGCCGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCA
 AATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGA
 TACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCA
 GCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCG
 GATTAGGGCCGCAAGAAAACCTATCCCGACCGCCTTA
 CTGCCGCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTC
 AGACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAA
 CGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGG
 CCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACAT
 CAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCA
 GCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACAT
 GGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTG
 GCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAAT
 TCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGG
 TCTGGTGTCAAAAATAA3'

10

20

30

【0616】

オリゴヌクレオチド合成デバイスのデバイス側でリボルバー（オリゴヌクレオチド合成
 チャンネル）の上にMantisディスペンサー（Formulatrix, MA）を使用
 して、約400nLの液滴を分配した。ナノリアクターチップを、手動でオリゴヌクレオ
 チドデバイスと対にし、PCA反応混合物を有する液滴を拾い上げる。拾い上げた直後に
 、オリゴヌクレオチド合成デバイスからナノリアクターを解放することにより、液滴をナ
 ノリアクターチップ中の個々のナノリアクターに拾い上げた（図59）。

40

【0617】

ナノリアクターを熱密封フィルム／テープのカバー（Eppendorf, eshop.
 eppendorfna.com/products/Eppendorf_Heat_Sealing_PCR_Film_and_Foil）で密封し、サーモサイク
 ラーキット（OpenPCR）を使用して構築された、適切に構成されたサーモサイクラー
 に配した。

50

【0618】

以下の温度プロトコルをサーモサイクラー上で使用した：

1つのサイクル：98℃、45秒

40のサイクル：98℃、15秒；63℃、45秒；72℃、60秒；

1つのサイクル：72℃、5分

1つのサイクル：4℃、停止（hold）

【0619】

0.50μlの部分標本を、図60に示されるような個々のウェル1-10から採取し、及び、フォワード（F-プライマー；5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3'；SEQ ID NO.：68）及びリバース（R-プライマー；5'TTATTTTGTGACACCAGACCAACTGGTAATGG3'；SEQ ID NO.：69）のプライマーを使用して、アリコートをし、プラスチックチューブにおいて、PCR反応混合物（表9）において、及び以下のサーモサイクラープログラムに従って、増幅した：

サーモサイクラー：

1つのサイクル：98℃、30秒

30のサイクル：98℃、7秒；63℃、30秒；72℃、90秒

1つのサイクル：72℃、5分

1つのサイクル：4℃、停止

【0620】

【表9】

表 9:

PCR	1 (x25ul)	最終濃度
H ₂ O	17.50	
5x Q5 バッファー	5.00	1x
10mM dNTP	0.50	200uM
F-プライマー 20uM	0.63	0.5uM
R-プライマー 20uM	0.63	0.5uM
BSA 20mg/ml	0.00	
Q5 pol 2U/ul	0.25	1u/50ul
テンプレート (PCA アセンブリ)	0.50	1ul/50ul rxn

【0621】

結果として生じる増幅生成物を、BioAnalyzer装置（図60B、パネル1-10）上で、同様にゲル（図60C）上でも実行して、3000bpよりもわずかに大きな生成物を示す。11番目のPCR反応を、正の対照としてプラスチックチューブにおいて実行されたPCA反応を使用して、実行した（図60B、パネル11、及び図60C）。12番目のPCR反応を、生成物が無いことを示す負の対照として、PCAテンプレート無しで実行した（図60B、パネル12、及び図60C）。

【0622】

<実施例14：集めた核酸のエラー補正>

【0623】

【表 10 - 1】

表 10

核酸	配列
組み立てた 遺伝子, SEQ ID NO.: 70	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACG TCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCT TGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAA TGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGT GCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATA CTGTCGTCGTCCCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATG CGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATC CGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGC TCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAG ACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTG TGGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCG TTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGG AGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACG GCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGC ATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAA ATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTC AGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGA GTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGG TGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTG AAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACAC TACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAA ATCCCGAATCTCTATC3'
アセンブリ オリゴヌク レオチド 1, SEQ ID NO.: 71	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACG TCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCT TGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGA GGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC 3'
アセンブリ オリゴヌク レオチド 2, SEQ ID NO.:	5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTG CATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGGCCTCAG GAAGATCGCACTCCAGCCAGCTTTCCGGCACCGCTTCTGGTG CCGGAAACCAGGCAAAGCGCCATTCCGCATTCAGGCTGCGC

【表 10-2】

核酸	配列
72	AACTGTTGGGA3'
アセンブリ オリゴヌク レオチド 3, SEQ ID NO.: 73	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCC GCCGTTTGTTCACGAGAAATCCGACGGGTTGTTACTCGCT CACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGA CGCGAATTATTTTGTATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGT GGTGCAACGG3'
アセンブリ オリゴヌク レオチド 4, SEQ ID NO.: 74	5' GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCC GTCACTCCAGCGCAGCACCATCACC GCGAGGCGGTTTCTCC GGCGCGTAAAAATGCGCTCAGGTCAAATTCAGACGGCAAAC GACTGTCCTGGCCGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACA GATGAAACG 3'
アセンブリ オリゴヌク レオチド 5, SEQ ID NO.: 75	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCG TTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTT GCCACTCGCTTTAATGATGATTTTACGCCGCGCTGTACTGGAG GCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACG GGTAACAGTTT 3'
アセンブリ オリゴヌク レオチド 6, SEQ ID NO.: 76	5'GATAGAGATTCGGGATTTTCGGCGCTCCACAGTTTCGGGTTT TCGACGTTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCATAACCACC ACGCTCATCGATAATTTACCGCCGAAAGGCGCGGTGCCGCT GGCGACCTGCGTTTACCCCTGCCATAAAGAACTGTTACCCG TAGGTAGTCACG 3'

10

20

30

【0625】

約 1 kb の遺伝子 (SEQ ID NO. : 70 ; 表 10) を、6 つの購入されたオリゴヌクレオチド (PCA の間で各々 5 nM) (Ultramer ; SEQ ID NO. : 71-76 ; 表 10) を使用して組み立て、及び、以下のように 0.02 U/μL の Q5 ホットスタート (hot-start) の高忠実度のポリメラーゼ及び 100 μM の dNTP を含む 1×NEB Q5 バッファーを使用する PCA 反応において組み立てた：

1 つのサイクル：98℃、30 秒

15 のサイクル：98℃、7 秒；62℃、30 秒；72℃、30 秒

1 つのサイクル：72℃、5 分

40

【0626】

Ultramer のオリゴヌクレオチドは、500 のヌクレオチドにおいて 1 のエラー率、更には 200 以上のヌクレオチドにおいて少なくとも 1 のエラー率を有すると予想される。

【0627】

集めた遺伝子を、以下のように、0.02 U/μL Q5 のホットスタートの高忠実度のポリメラーゼ、200 μM の dNTP、及び 0.5 μM のプライマーを備えた 1×NEB Q5 バッファーを使用して、フォワードプライマー (5' ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC 3' SEQ ID NO. : 77) とリバースプライマ

50

ー (5' GATAGAGATTTCGGGATTTTCGGCGCTCC3' SEQ ID NO. : 78) を使用するPCR反応において増幅させた:

1つのサイクル: 98°C、30秒

30のサイクル: 98°C、7秒; 65°C、30秒; 72°C、45秒

1つのサイクル: 72°C、5分

【0628】

増幅して組み立てた遺伝子を、BioAnalyzerにおいて分析して、クローン化した(図52のA)。~24のコロニーからのミニプレップを、サンガー配列決定した。BioAnalyzer分析は、未訂正の遺伝子に広範囲のピークとテール(tail)を提供し、高いエラー率を示した。配列は、1/789のエラー率(示されないデータ)を示した。メーカーの指示に従いCorrectASE(Life Technologies, www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A14972)を使用して、2ラウンドのエラー補正を行った。結果として生じる遺伝子サンプルを、ラウンド1(図60B)とラウンド2(図60C)の後にBioAnalyzerにおいて同様に分析して、クローン化した。24のコロニーを配列決定のために拾い上げた。配列決定の結果は、ラウンド1とラウンド2のエラー補正の後にそれぞれ、1/5190bpと1/6315bpのエラー率を示した。

10

【0629】

<実施例15: プライマーの無い単鎖のオリゴヌクレオチドの大量の生成>

試薬。他に明示されない限り、phi29 DNAポリメラーゼを除く酵素とバッファーを全て、NEBから購入した。Phi29 DNAポリメラーゼをEnzymaticsから購入した。

20

【0630】

オリゴヌクレオチドの生成。所望のオリゴヌクレオチドに対して逆の相補配列を有するパドロック・オリゴヌクレオチド(OS_1518)を、IDTによって合成した(表1)。追加のパドロック・オリゴヌクレオチドOS_1515、OS_1516、OS_1517、OS_1519も、異なる制限酵素の集合により機能するアダプター/補助オリゴヌクレオチドの組み合わせにより機能するように、合成した。5µLのパドロック(200nM)を5µLのT4 PNKバッファー、0.5µLのATP(100mM)、2µLのT4 PNK(10U/µL)、1µLのBSA(100µg/µL)、2µLのDTT(100mM)、及び32.5µLの水と混合し、37°Cで60分間混合物をインキュベートし、その後65°Cで20分間インキュベートすることにより、パドロック・オリゴヌクレオチドをリン酸化した。パドロック・オリゴヌクレオチドに相補的な配列を有するアダプターオリゴヌクレオチドを、IDTによって合成した(表11)。アダプターオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有する補助のオリゴヌクレオチドを、IDTによって合成し、ビオチン化した。

30

【0631】

【表 11】

表 11. オリゴヌクレオチド配列.

パドロック, SEQ ID NO.: 79	5'ATCTTTGAGTCTTCTGCTTGGTCAGACGAGTGCATGTGCGT GACAAATTGGCGCGAGGAGCTCGTGTTCATTCACAACCTGCTCT TAGGCTACTCAGGCATGGTGAGATGCTACGGTGGTTGATGGA TACCTAGAT3'
アダプター, SEQ ID NO.: 80	5'CAGAAGACTCAAAGATATCTAGGTATCCATCAAC3'
補助, SEQ ID NO.: 81	/5Biosg/GTTGATGGATACCTAGATATCTTTGAGTCTTCTG3'
下線 = アダプターオリゴヌクレオチドに対する相補性 波線状の下線 = 制限部位 /5Biosg/ = ビオチン化部位	

【0632】

ハイブリダイゼーション及びライゲーション。48 μ L のパドロック・リン酸化反応混合物を、1.5 μ L のアダプターオリゴヌクレオチド (2 μ M) 及び0.5 μ L の T4 リガーゼと組み合わせた。反応物を 37℃で60分間、その後、65℃で20分間インキュベートした。反応物の5 μ L のサンプルを5 μ L の 2X ローディングバッファーと混合し、15%の TBE 尿素ゲル (180 V、75分) 上で分析した。

【0633】

随意のエキソヌクレアーゼ処理を以下のように行った。10 μ L のライゲーション生成物を、60分間37℃で、その後、20分間95℃で、0.15 μ L の Exo I 及び Exo II (NEB 又は Enzymatics) により処理した。インキュベーション後、0.3 μ L のアダプター・オリゴヌクレオチド (2 μ M) を、各々10 μ L の溶液に加え、5分間95℃に加熱し、ゆっくり冷却した。反応物の5 μ L のサンプルを5 μ L の 2X ローディングバッファーと混合し、15%の TBE 尿素ゲル (180 V、75分) 上で分析した。

【0634】

ローリングサークル増幅。氷の上で、0.6 μ L の phi29 DNA ポリメラーゼ (低濃度、Enzymatics)、0.5 μ L の 10mM dNTP、1 μ L の T4 PNK バッファー、0.2 μ L の 100 $\times$ BSA、0.5 μ L の 100mM DTT、及び7.2 μ L の水を組み合わせることにより、10 μ L の 2X RCA マスターミックス (master mix) を調製した。幾つかの例において、ベタイン (例えば 5M ベタイン) などの PCR 添加剤を使用して、増幅ピアを減らしてもよい。10 μ L の RCA マスターミックスを、10 μ L のライゲーション生成物 (エキソヌクレアーゼ処理の有無に関わらず) と組み合わせ、90分間又は4時間、40℃でインキュベートした。その後、反応物を10分間70℃でインキュベートし、phi29 DNA ポリメラーゼを非活性化した。反応物の0.1 μ L のサンプルを4.9 μ L の水と5 μ L の 2X ローディングバッファーと混合し、混合物を15%の TBE 尿素ゲル (180 V、75分) 上で分析した。

【0635】

制限エンドヌクレアーゼによる消化。RCA生成物の2 μ Lのサンプルを、2 μ Lの10 $\times$ Cut Smart、2 μ Lのビオチン化した補助オリゴヌクレオチド(20 μ M)、及び12 μ Lの水と混合した。混合物を98 $^{\circ}$ Cに加熱し、室温にまでゆっくりと冷却した。1 μ LのBci VI及びMly I各々を混合物に加え、その後、37 $^{\circ}$ Cで1時間、次に80 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベーションを行った。反応物の1 μ Lのサンプルを4 μ Lの水と5 μ Lの2Xローディングバッファーと混合し、混合物を15%のTBE尿素ゲル(180 V、75分)上で分析した。

【0636】

随意の精製工程を以下のように行った。1 μ Lの制限エンドヌクレアーゼによる消化のサンプルを、事前精製サンプルとして保持する。NanoLinkビーズ(Soluli 10
nk)を、力強く攪拌することにより再懸濁する。ビーズの5 μ Lのアリコート(1.5 mLのチューブに加えた。核酸結合とウォッシュバッファー、又はNABWB(50 mM
トリス=HCl、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、pH 8.0)を
チューブに加えて250 μ Lの最終容量とし、チューブを混合して再懸濁した。チューブ
を2分間、磁気スタンドに配し、その後、上清を取り除いた。チューブを磁石から取り外
し、ビーズを180 μ LのNABWBで再懸濁した。180 μ Lの再懸濁したビーズを、
20 μ Lの制限エンドヌクレアーゼによる消化の反応物に加え、混合物を攪拌した。ビー
ズが定着しないように、混合物を、プラットフォーム・シェーカー上で、40 $^{\circ}$ Cで60分
間インキュベートした。その後、チューブを2分間磁石の上に配し、精製した生成物を含
む上清を新たなチューブに移した。精製した生成物の10 μ Lのサンプルを5 μ Lの2X 20
ローディングバッファーと混合し、15%のTBE尿素ゲル(180 V、75分)上で分
析した。精製したRCA生成物の濃度を、Qubit ssDNAキットを使用して測定
した。

【0637】

代替的な精製。幾つかのワークフローにおいて、消化したオリゴヌクレオチドを、(高
速液体クロマトグラフィー) HPLCを使用して精製することができる。

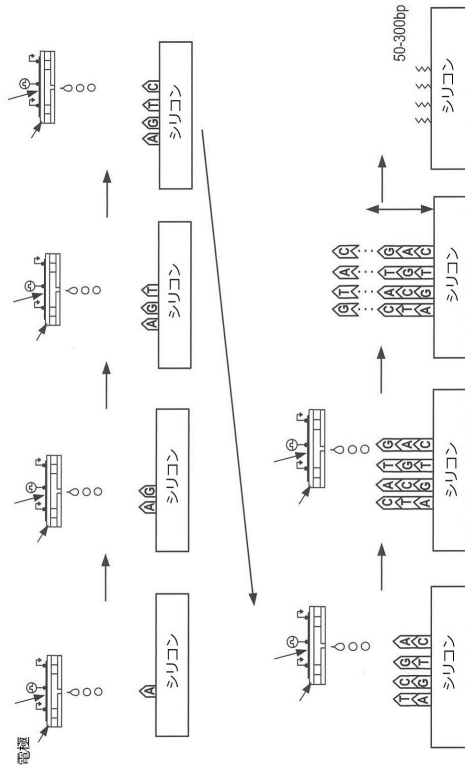
【0638】

図63は、制限酵素により開裂された増幅生成物の分離を表し、各一本鎖の増幅生成物
は、開裂前に、アダプター・コピー部位において増幅生成物に相補的な補助オリゴヌクレ
オチドでハイブリダイズされた。異なる群の制限酵素を伴う、パドロックプローブOS__ 30
1515、OS__1516、OS__1517、OS__1518、OS__1519を使用す
る、一本鎖核酸の増幅に関するデータも、示される。

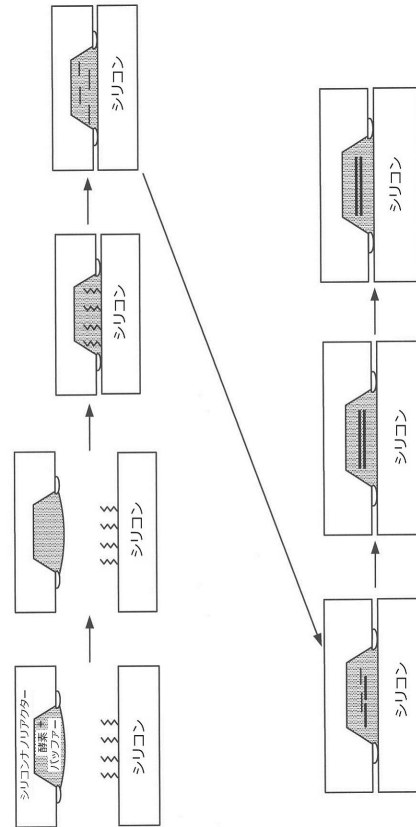
【0639】

本発明の好ましい実施形態が、本明細書に示され記載されている一方で、このような実
施形態が、ほんの一例として提供されることは当業者に明白であろう。多数の変形、変化
、及び置換は、本発明から逸脱することなく、当業者によって現在想到される。本明細書
に記載される本発明の実施形態の様々な代案が、本発明の実施において利用され得るこ
とを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義するものであり、この特
許請求の範囲及びそれらの同等物の範囲内の方法及び構成がそれによって包含されることが
、意図される。 40

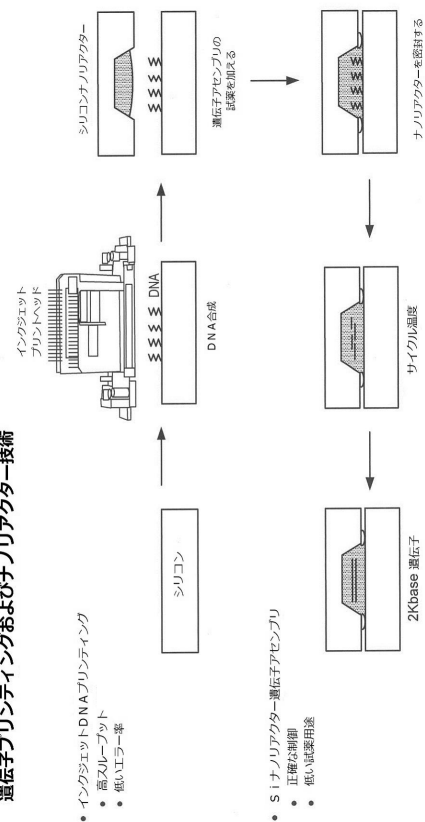
【図 1 A】



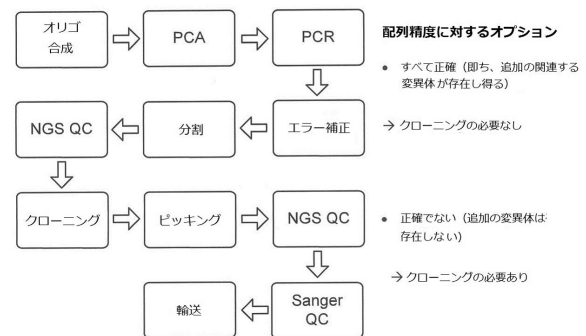
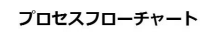
【図 1 B】



【図 1 C】



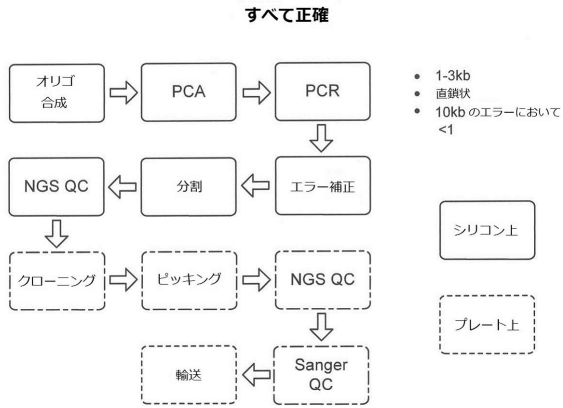
【図 2 A】



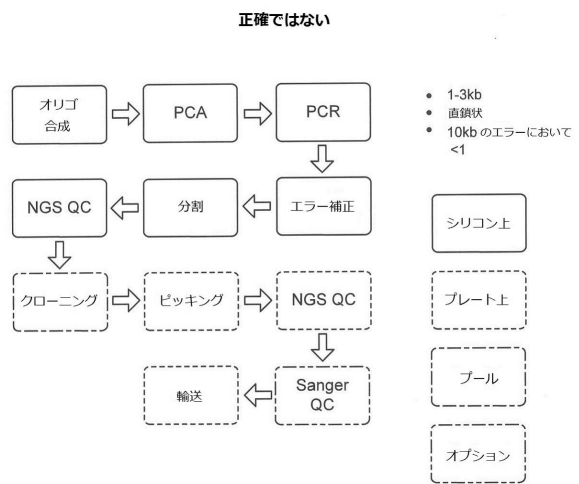
遺伝子プリンティングおよびナノリアクター技術

- インクジェットDNAプリンティング
 - 高スループット
 - 低いエラー率
-
- S i n a r i a クター遺伝子アセンブリ
 - 正確な制御
 - 低い試薬用途

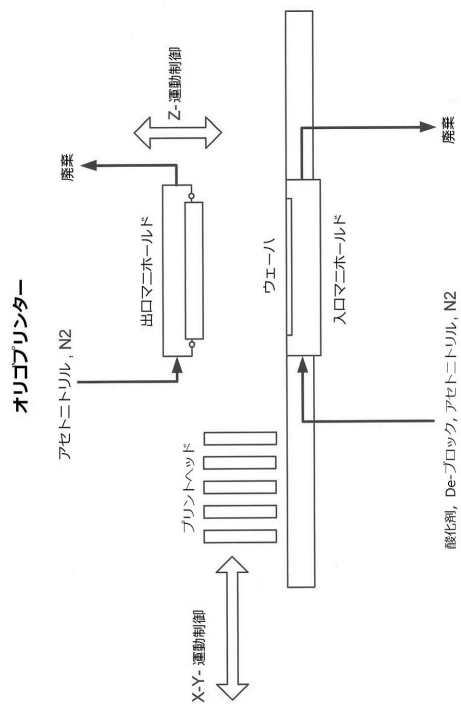
【図 2 B】



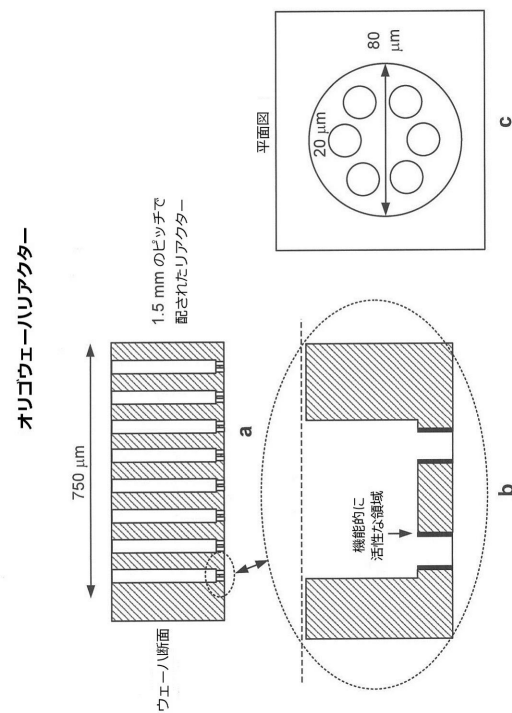
【図 2 C】



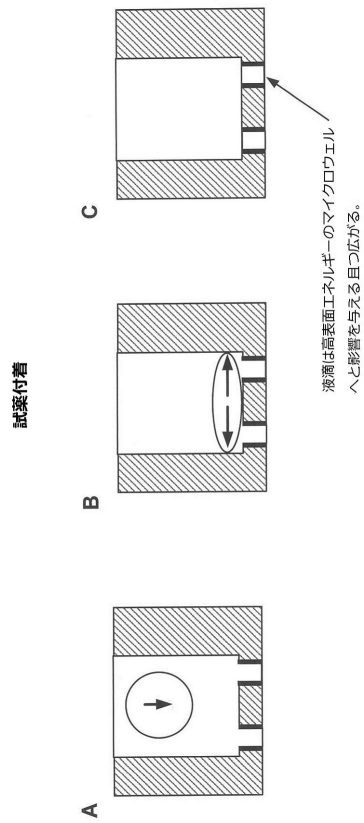
【図 3】



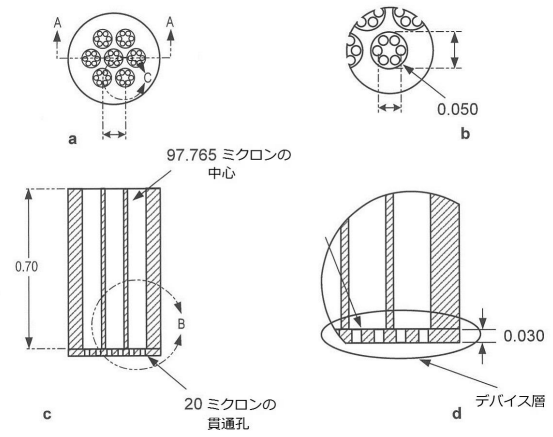
【図 4】



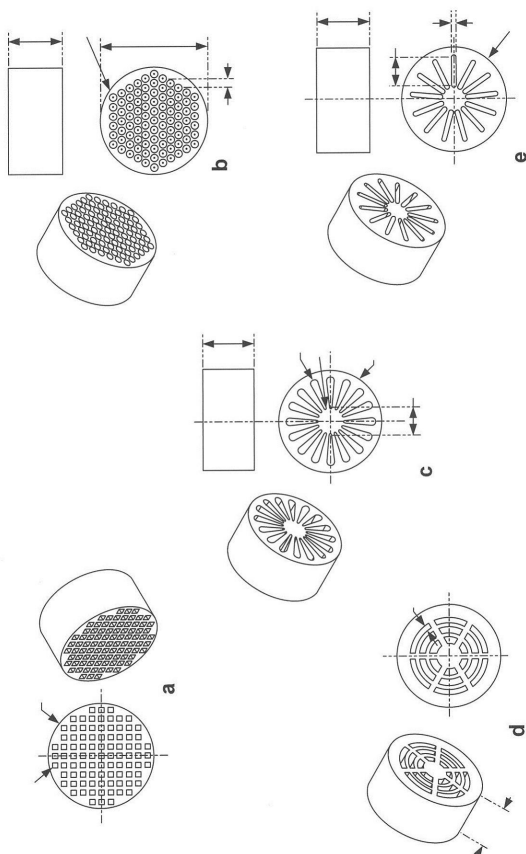
【図 5】



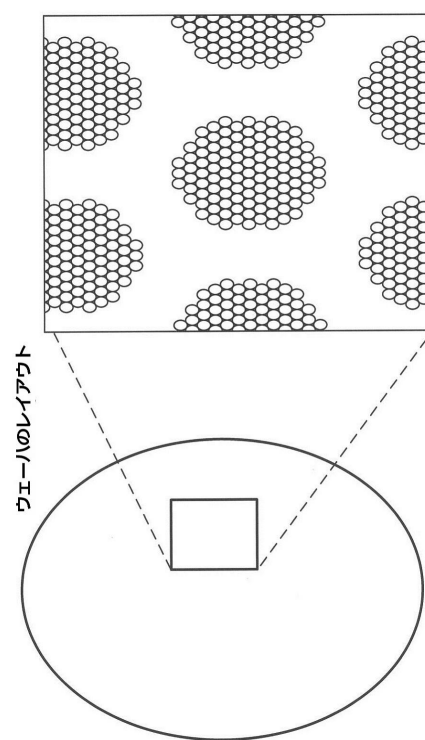
【図 6 A】



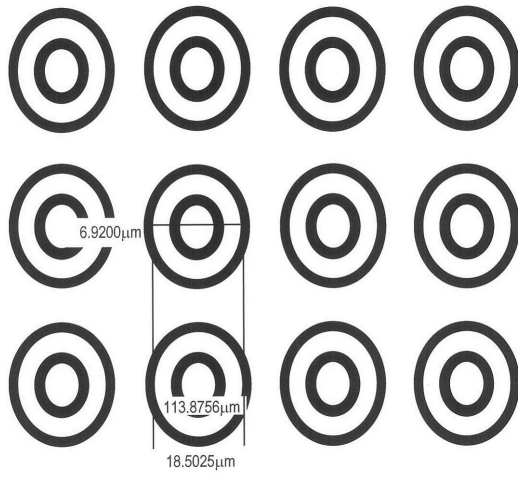
【図 6 B】



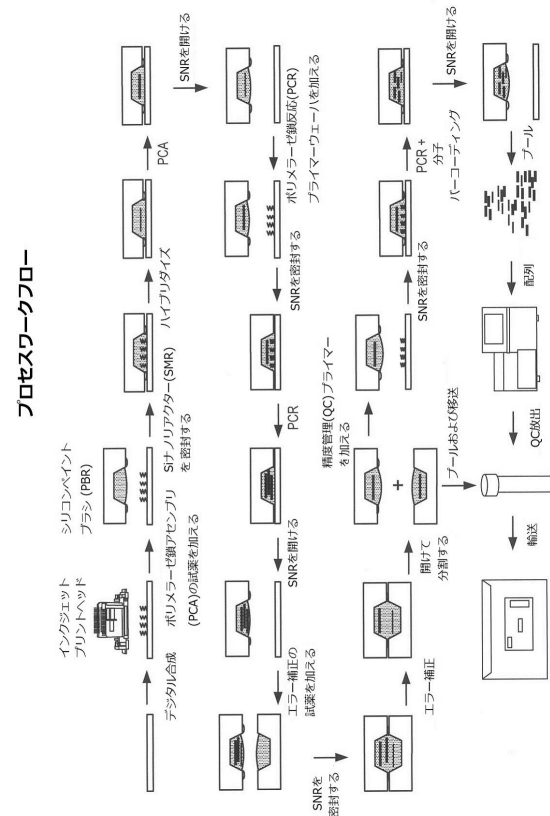
【図 6 C】



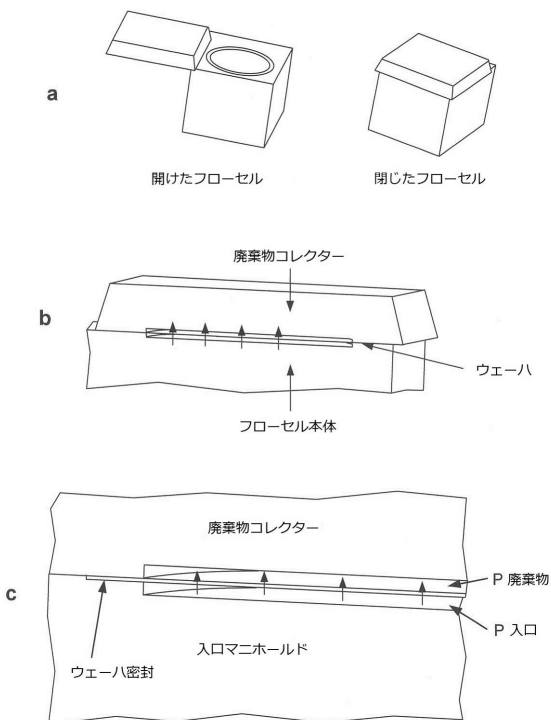
【図 7】



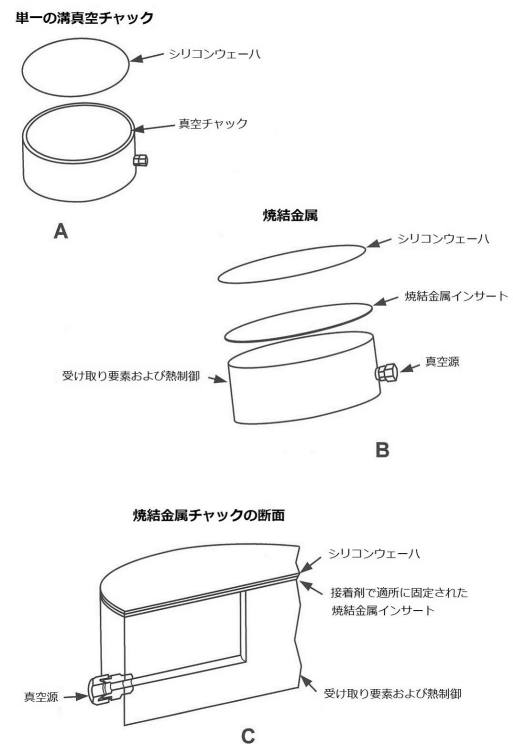
【图 8】



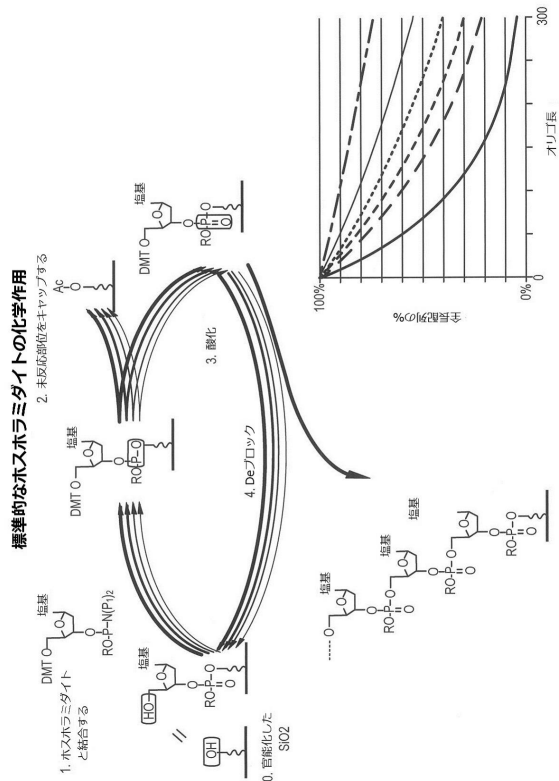
【图 9】



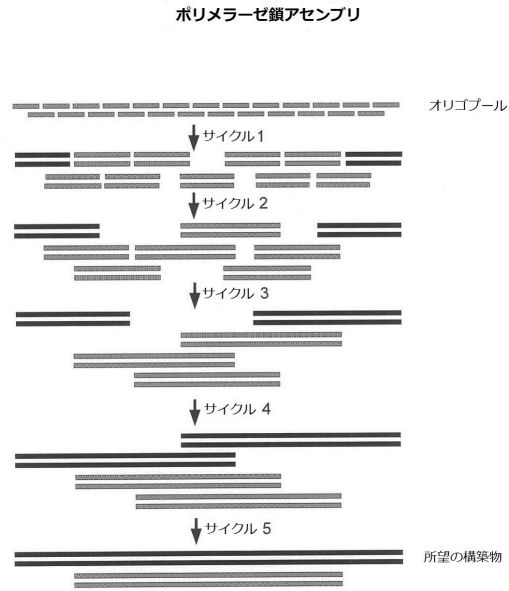
【図 10】



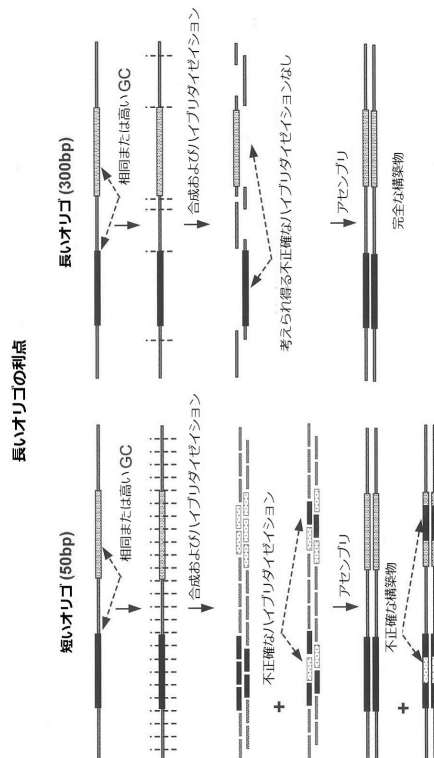
【図 1 1】



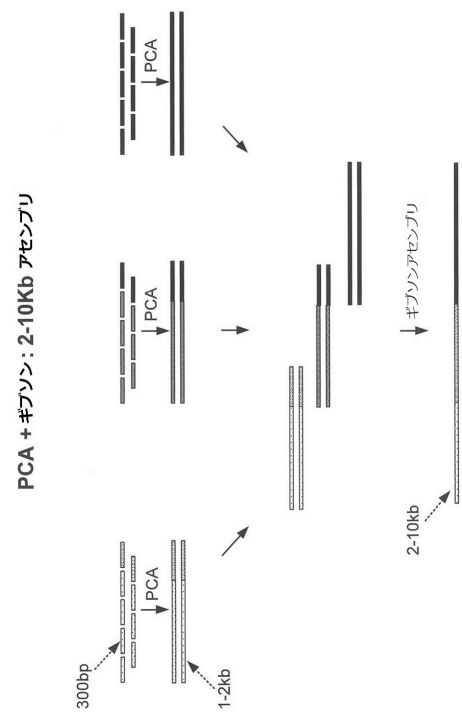
【図 1 2】



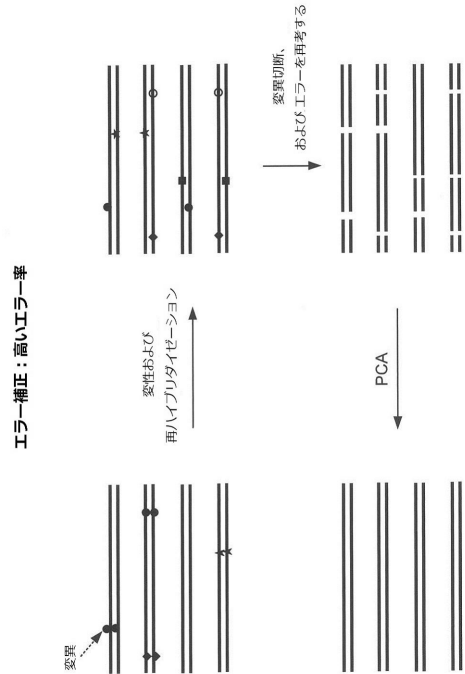
【図 1 3】



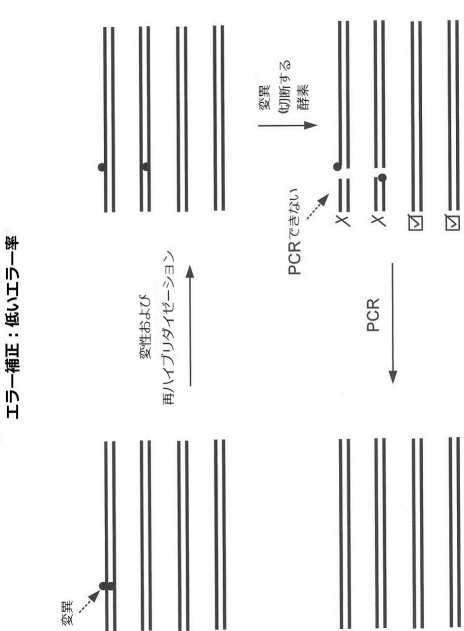
【図 1 4】



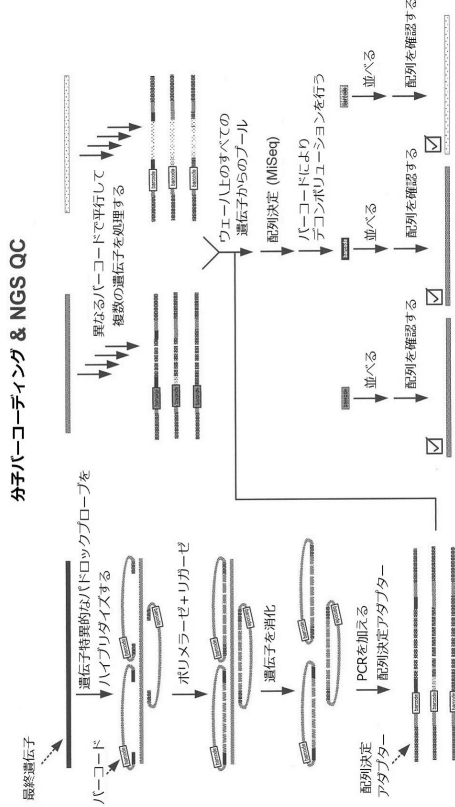
【図 15】



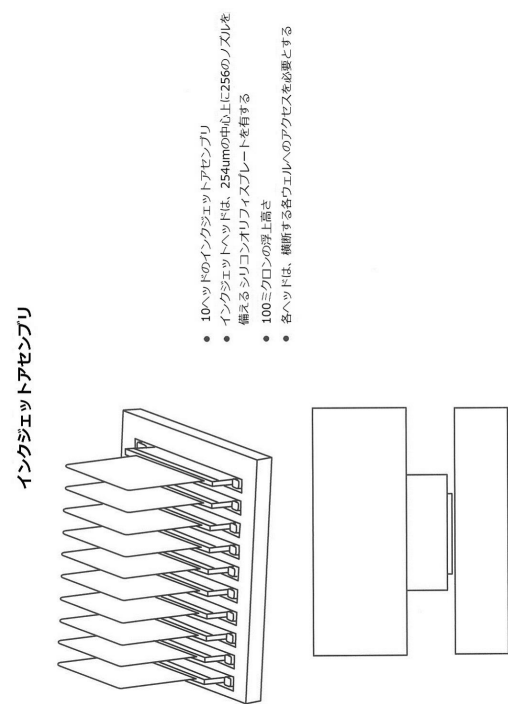
【図 16】



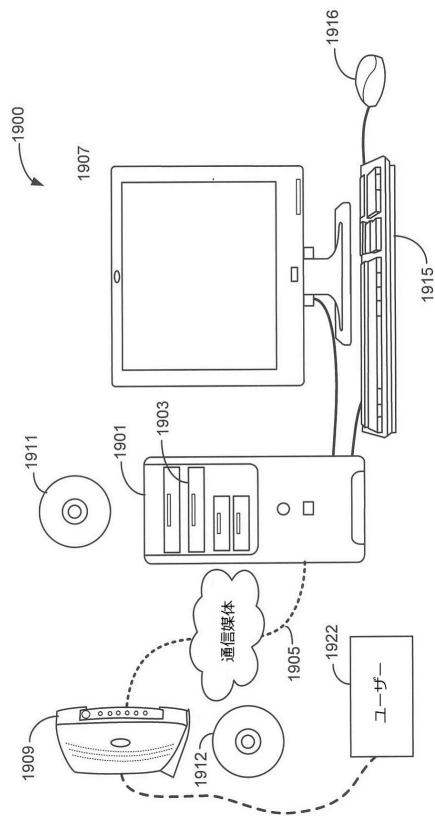
【図 17】



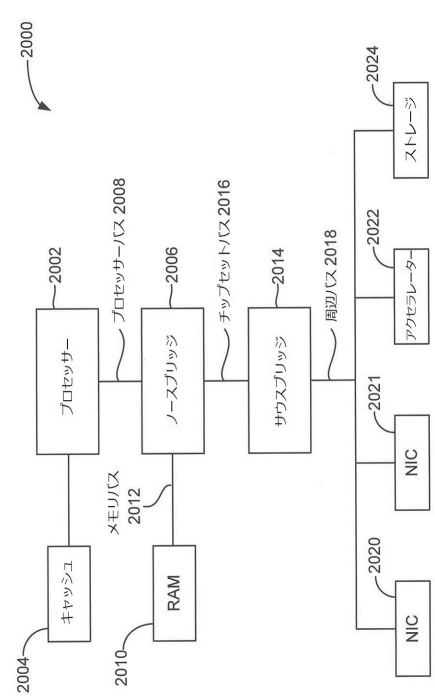
【図 18】



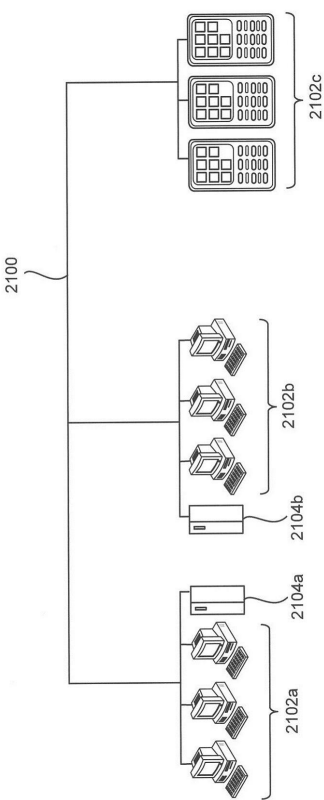
【図 19】



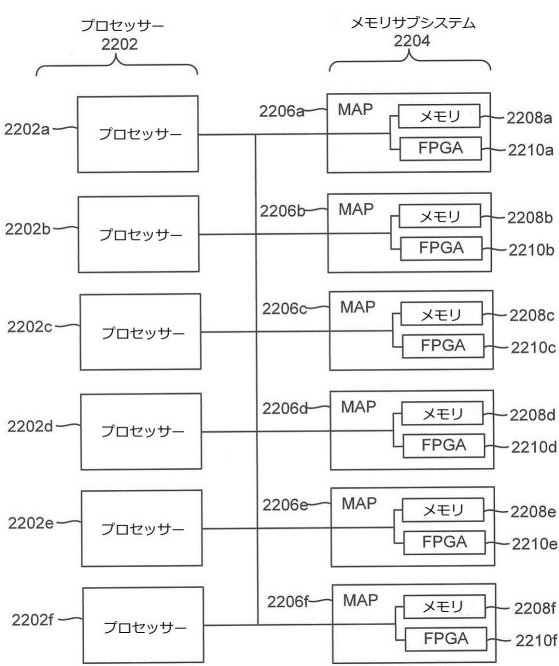
【図 20】



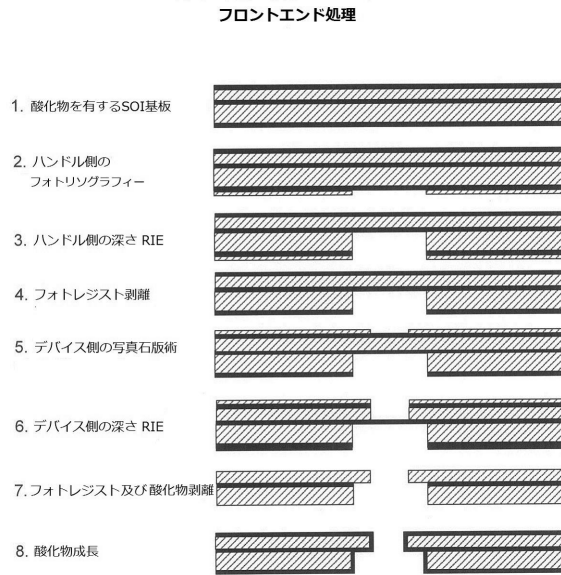
【図 21】



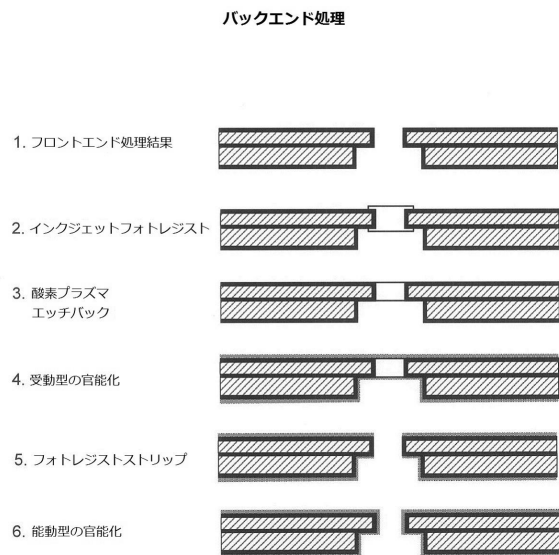
【図 22】



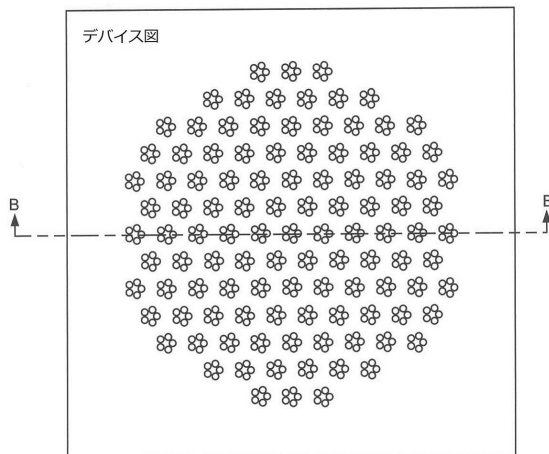
【図 2 3】



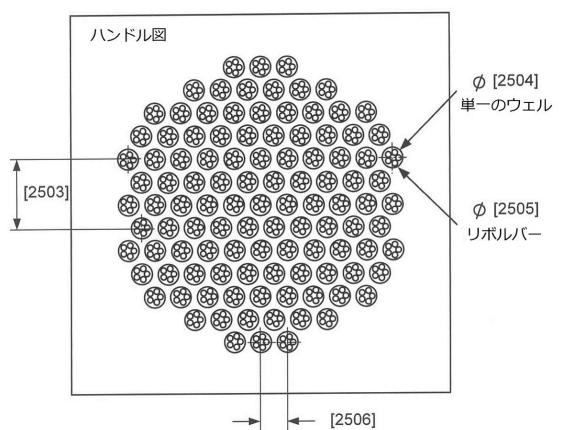
【図 2 4】



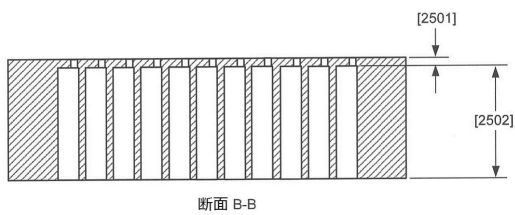
【図 2 5 A】



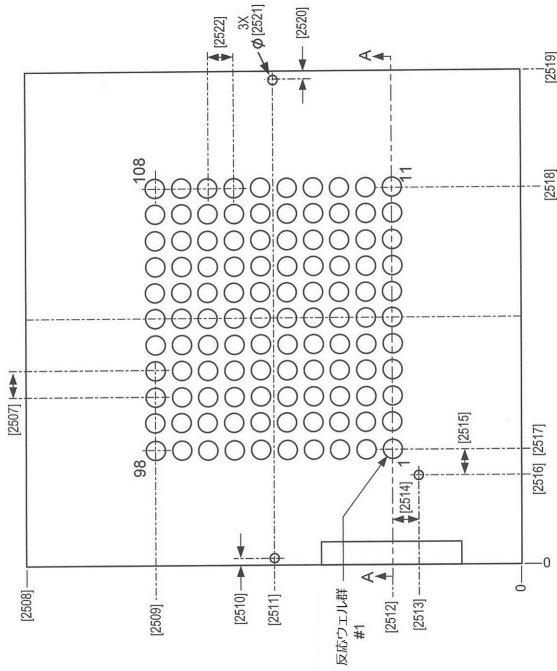
【図 2 5 C】



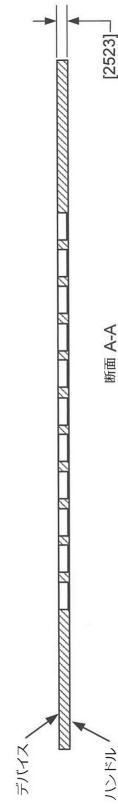
【図 2 5 B】



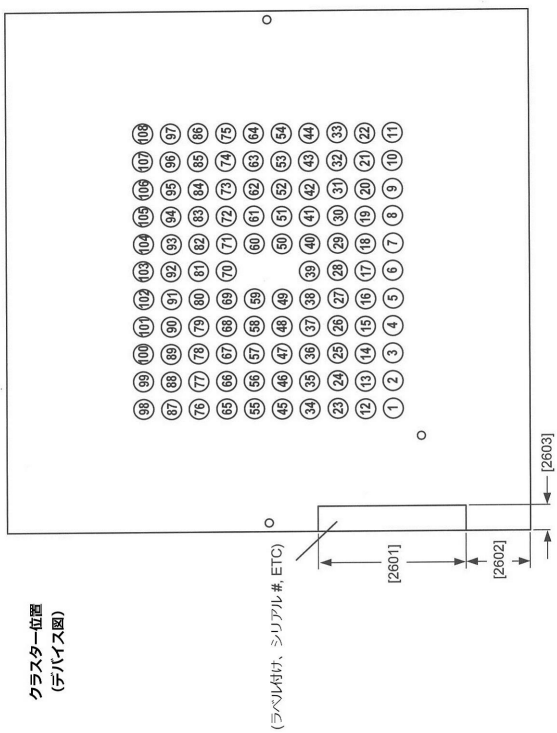
【図 2 5 D】



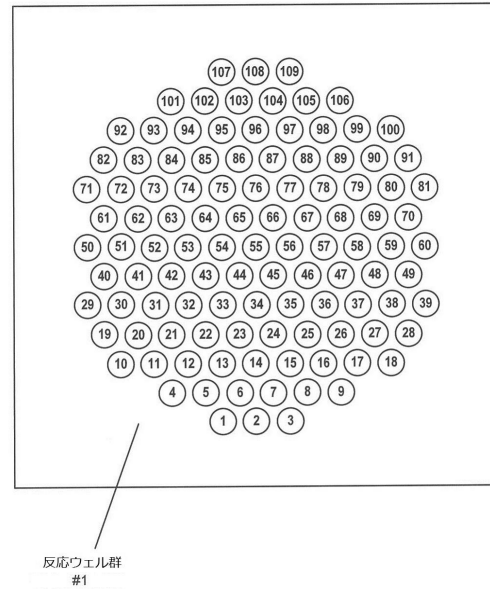
【図 2 5 E】



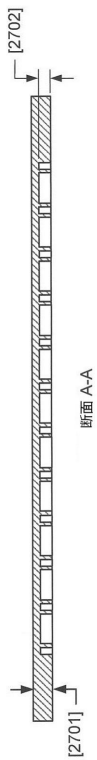
【図 2 5 F】



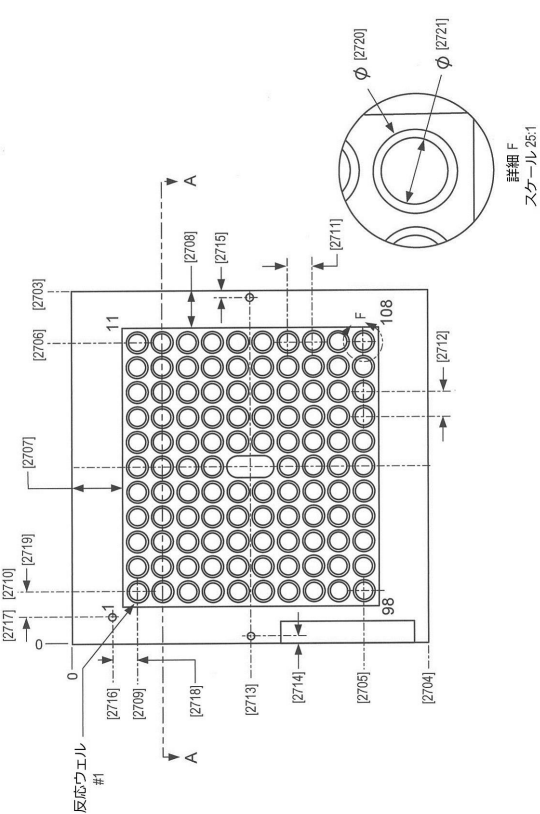
【図 2 5 G】

個々のクラスター内のウェル位置
(デバイス図)

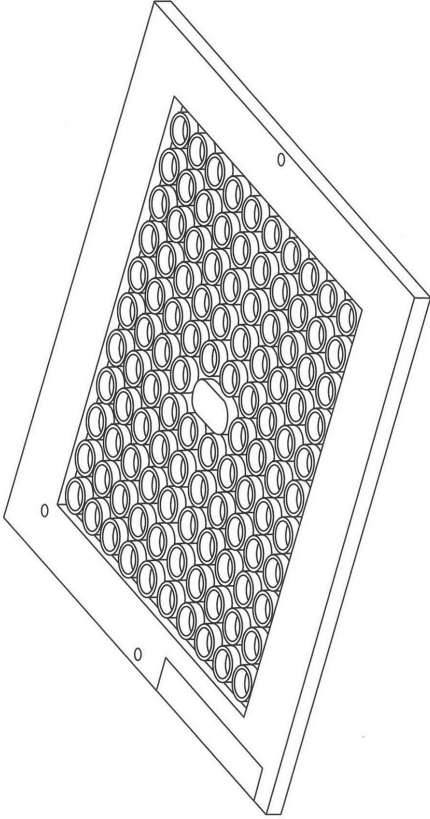
【図 2 6 A】



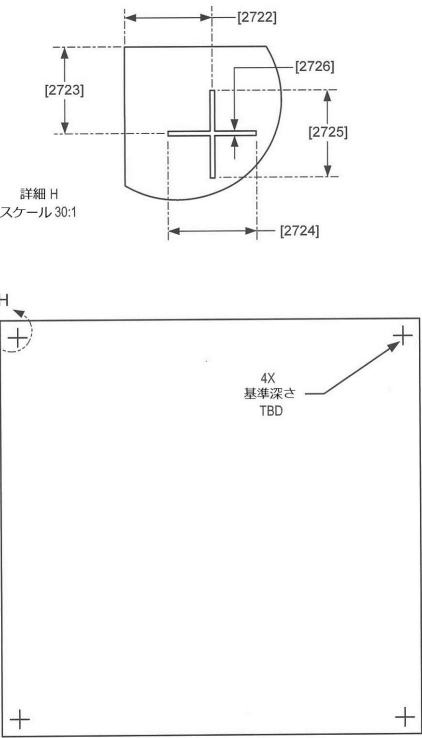
【図 2 6 B】



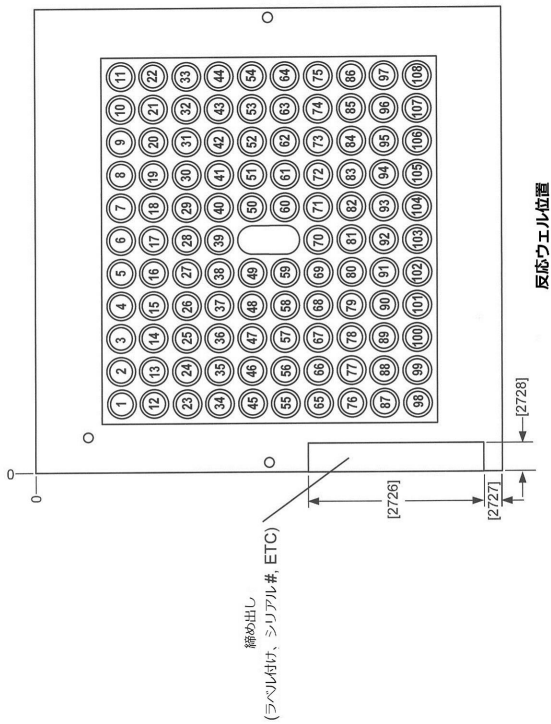
【図 2 6 C】



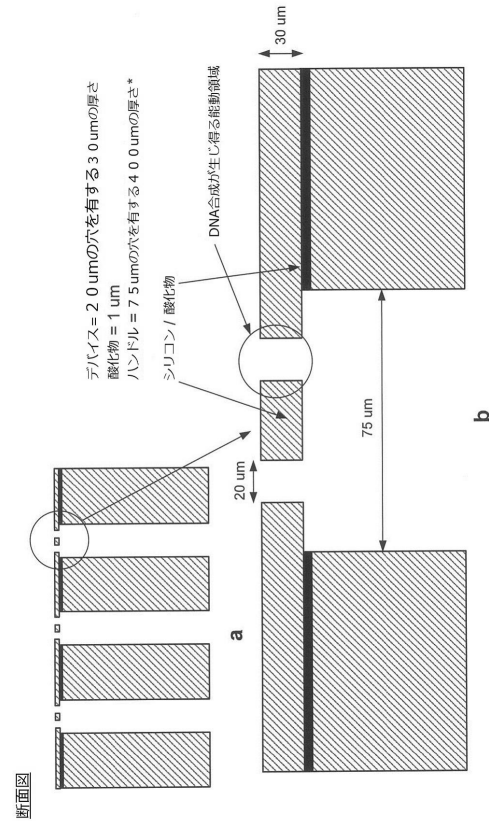
【図 2 6 D】



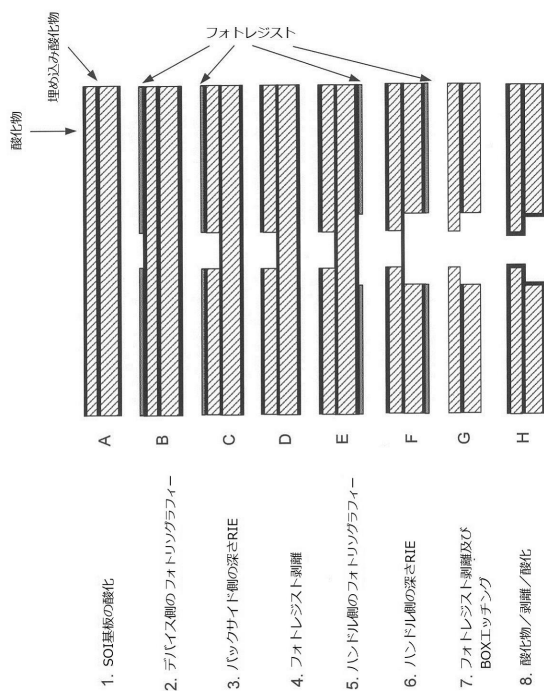
【図 26 E】



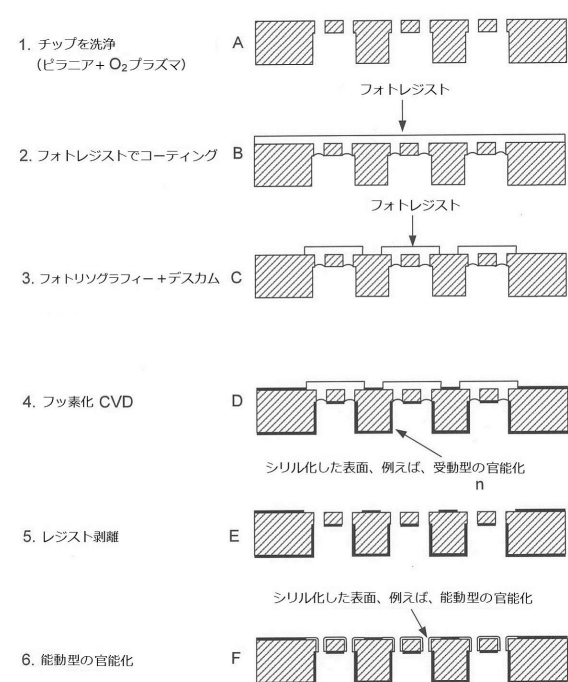
【図 27】



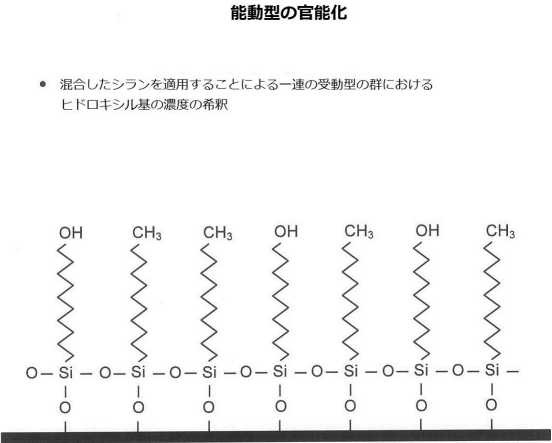
【図 28】



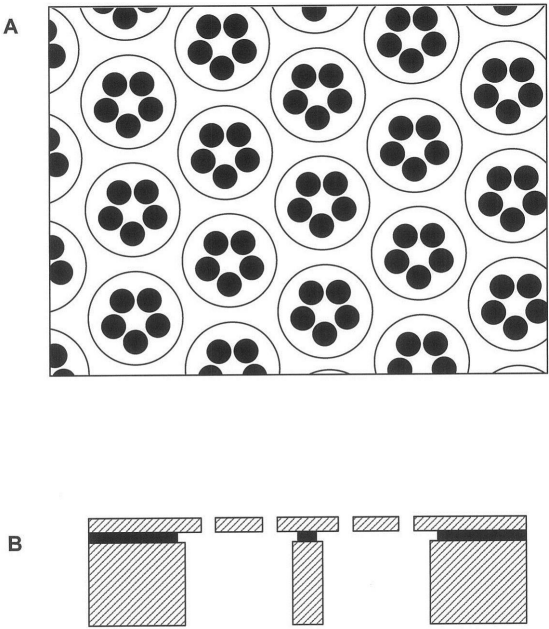
【図 29】



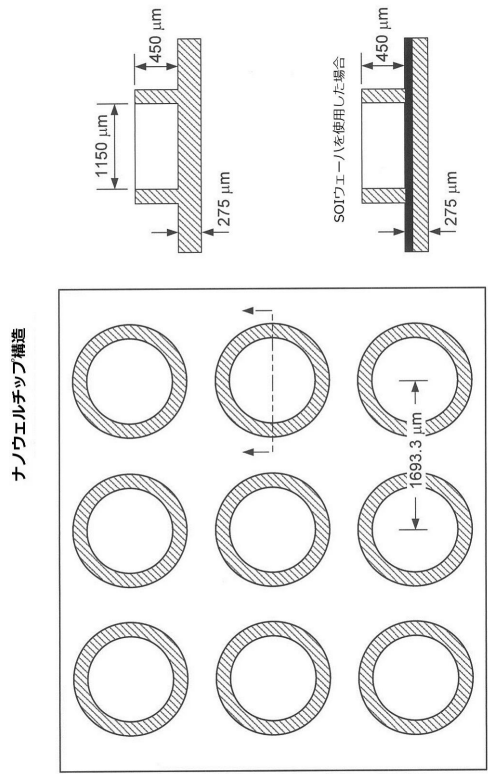
【図 3 0】



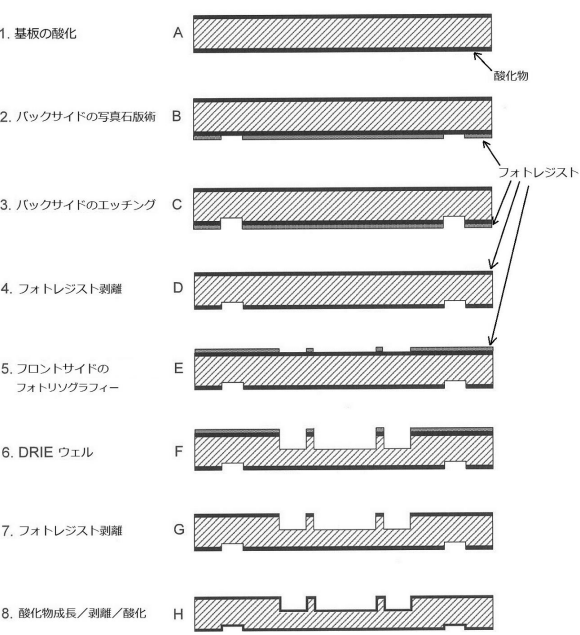
【図 3 1】



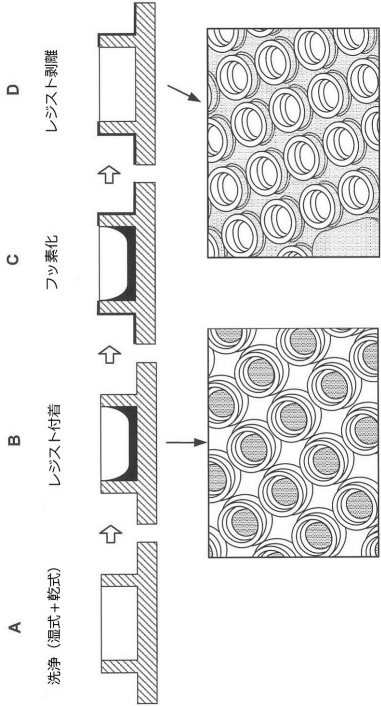
【図 3 2】



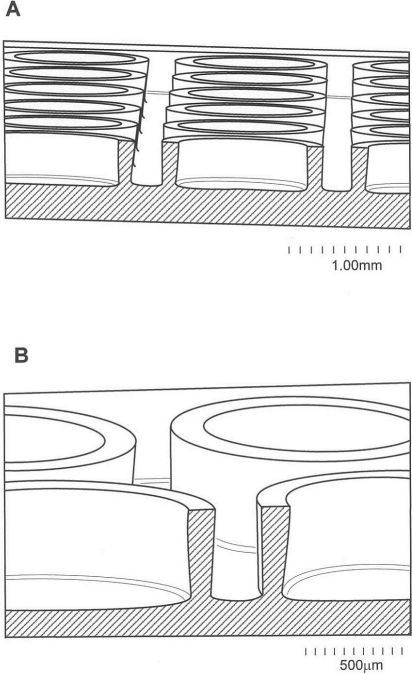
【図 3 3】



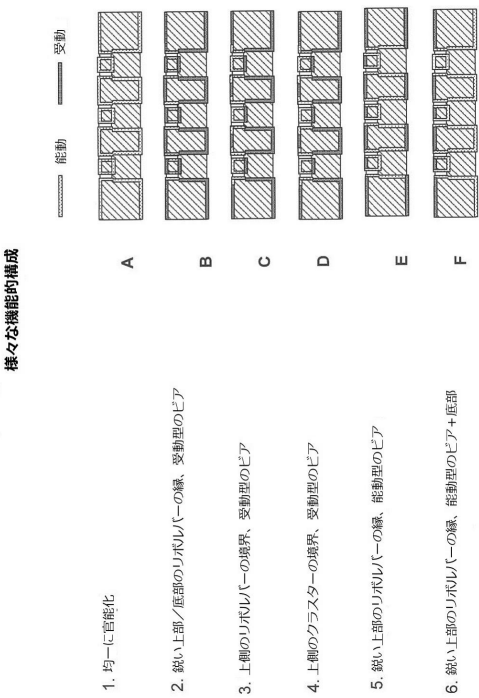
【図 3 4】



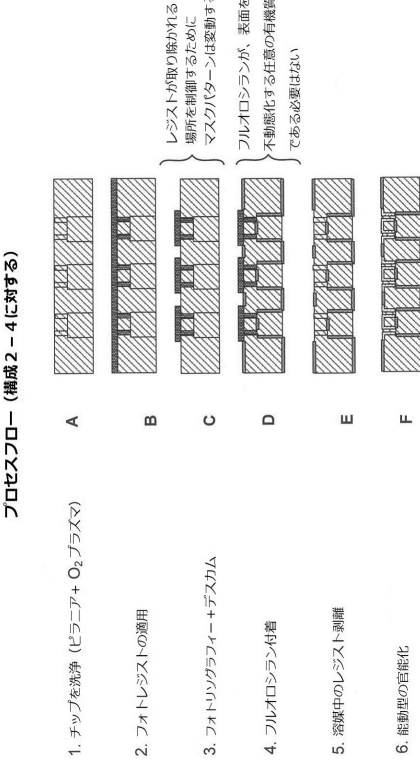
【図 3 5】



【図 3 6】

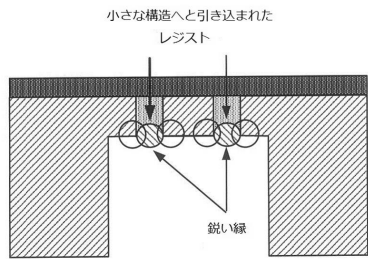


【図 3 7】



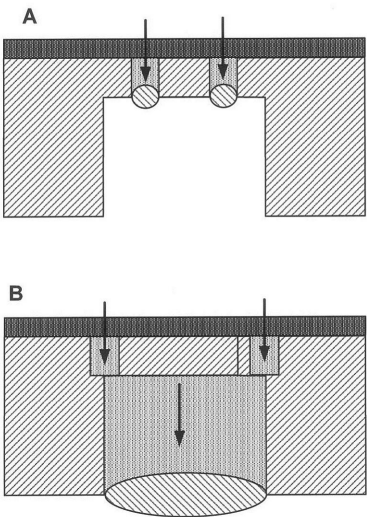
【図 3 8】

レジストウィッキングの制御プロセス



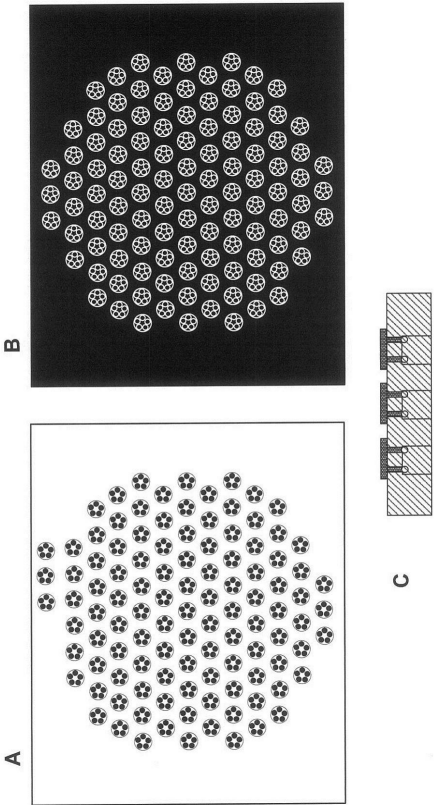
【図 3 9】

レジストウィッキングの制御構造



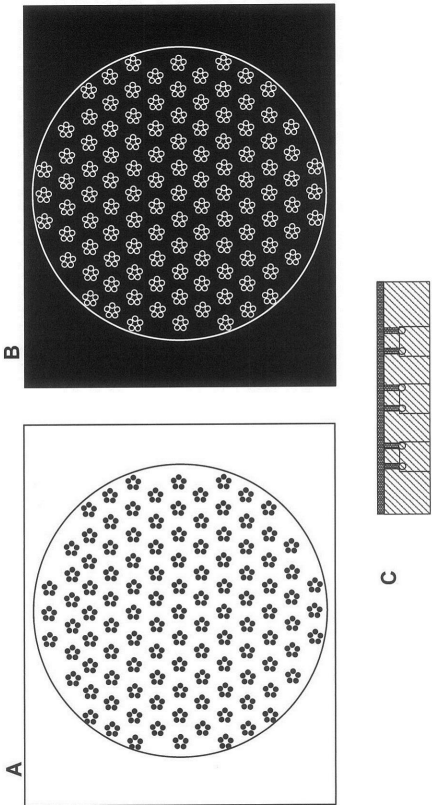
【図 4 0】

リングラファイアー後のレジストパターン

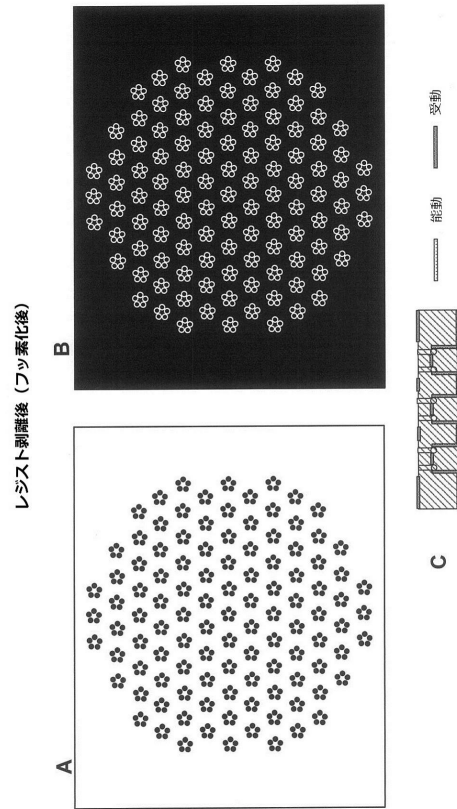


【図 4 1】

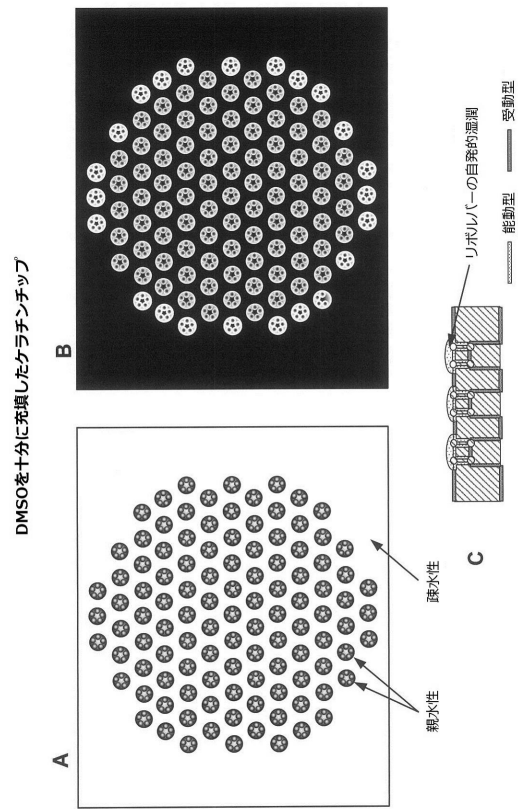
リングラファイアー後のレジストパターン



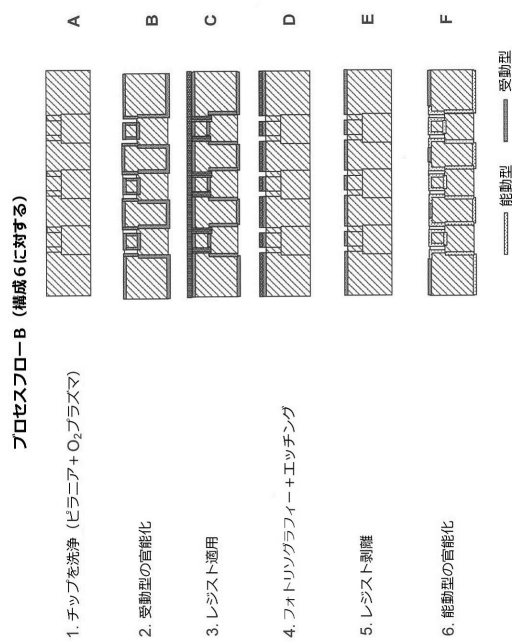
【図 4 2】



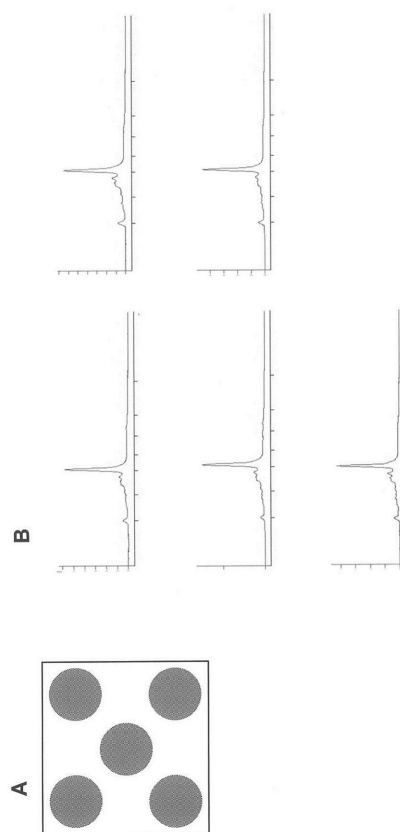
【図 4 3】



【図 4 4】

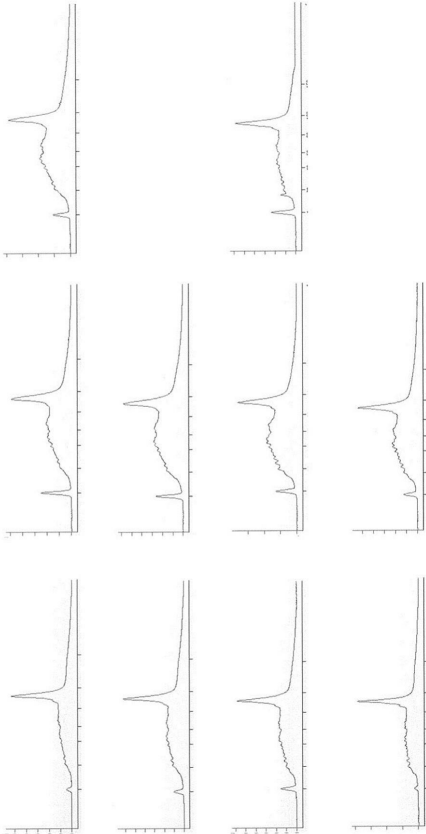


【図 4 5】

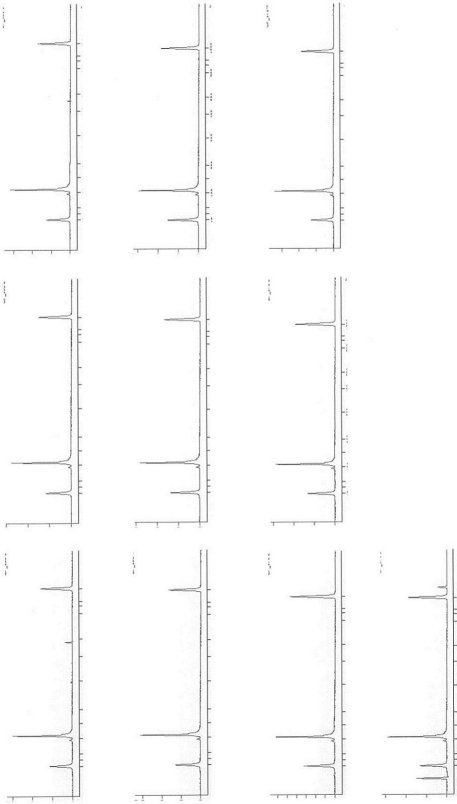


【図 4 6】

2Dオリゴヌクレオチド合成デバイス上の100番体の配列の合成

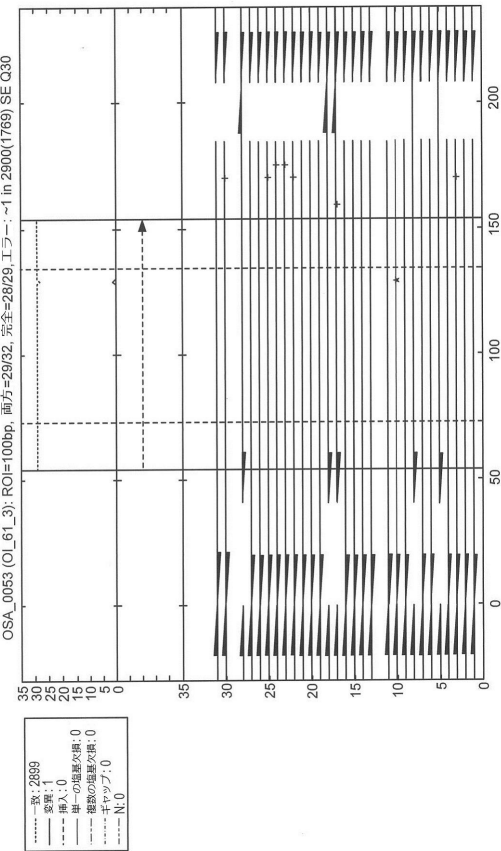


【図 4 7】



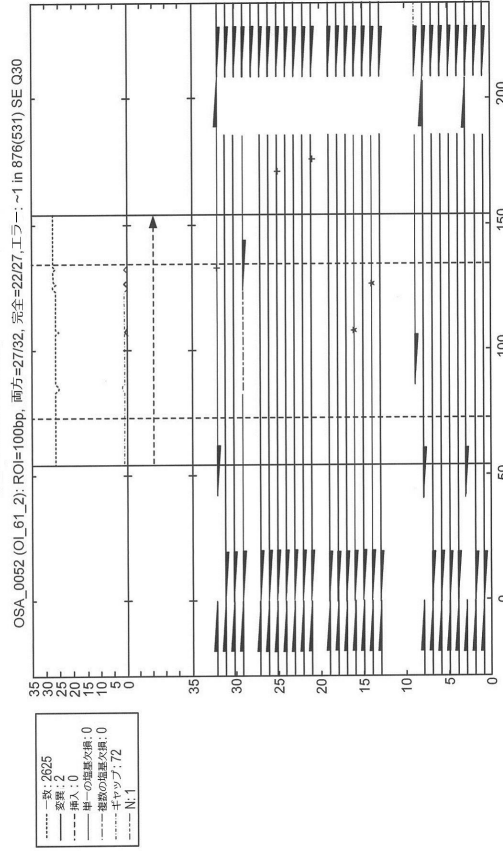
【図 4 8】

アラインメントマップ

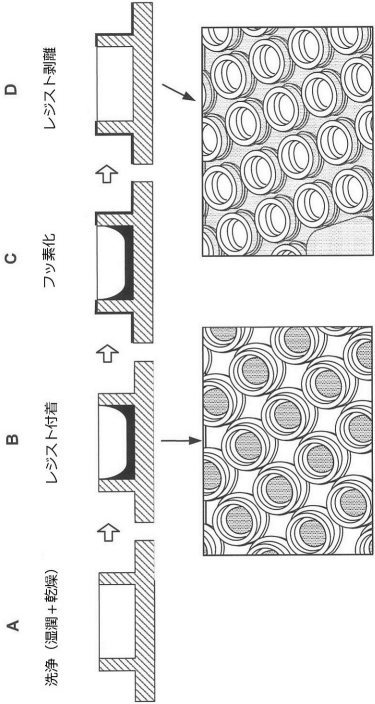


【図 4 9】

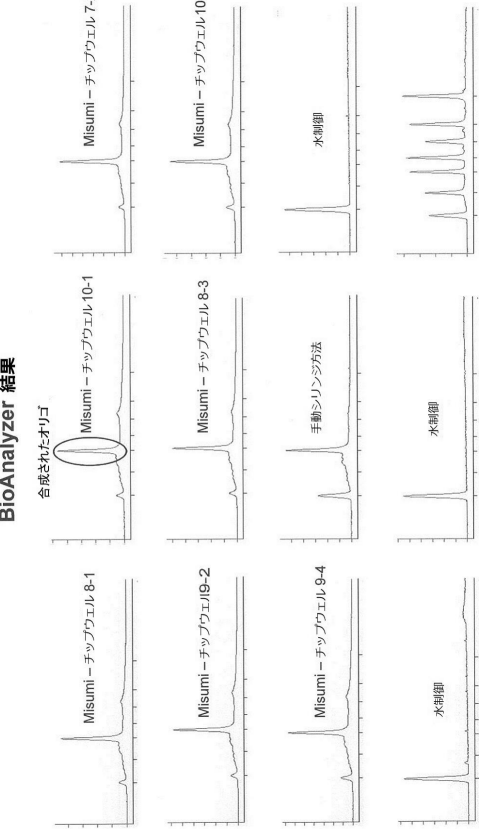
アラインメントマップ



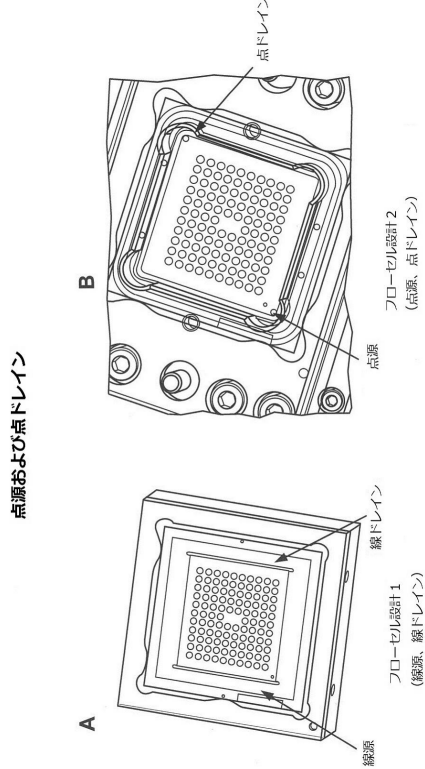
【図 5 4】



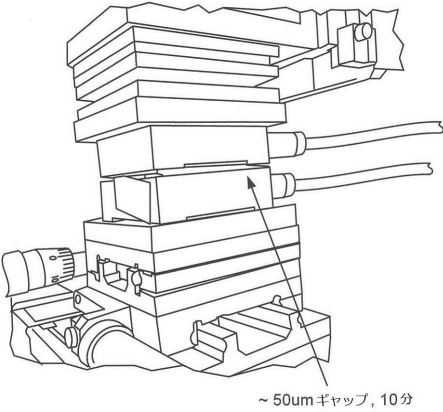
【図 5 5】



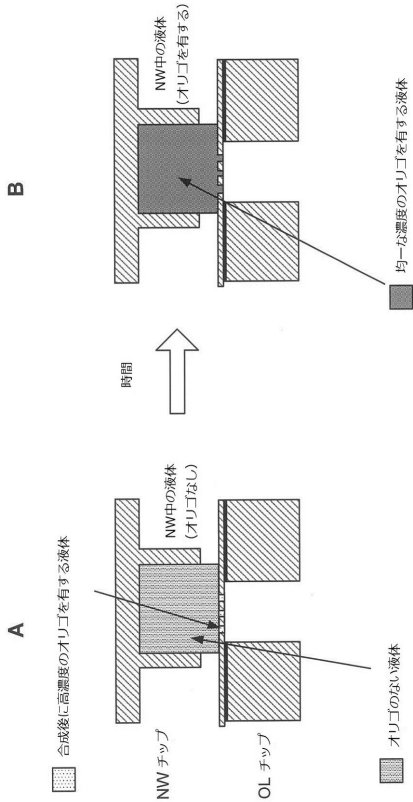
【図 5 6】



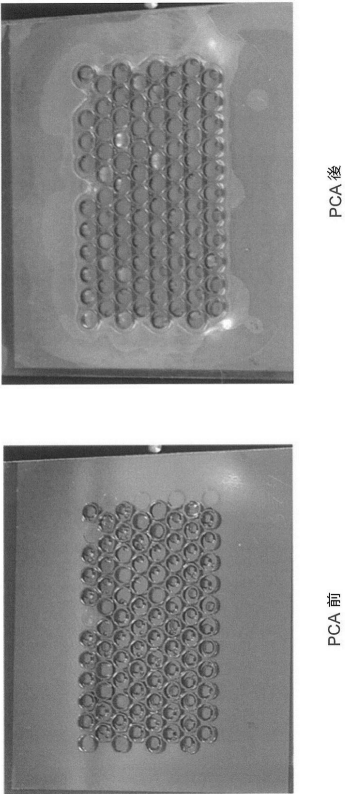
【図 5 7】



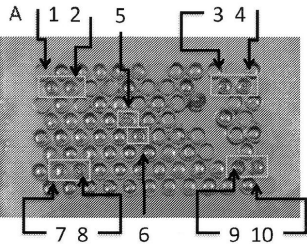
【図 58】



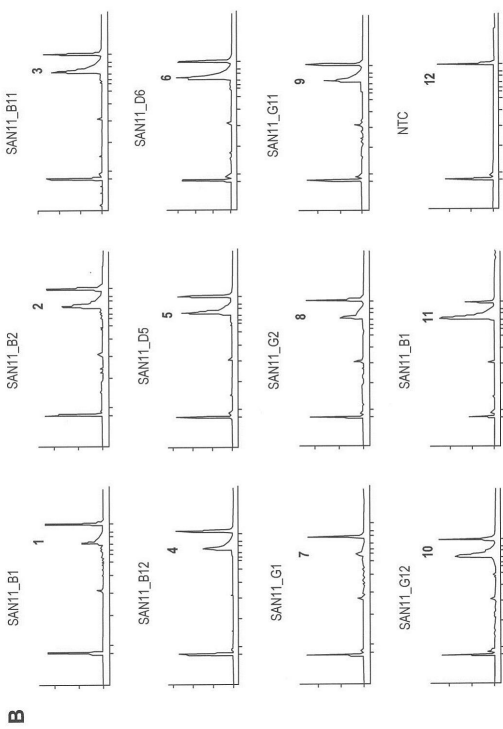
【図 59】



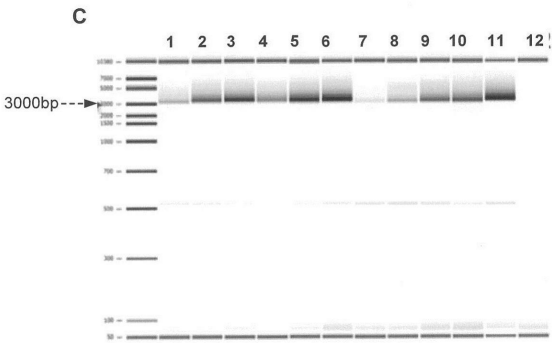
【図 60 A】



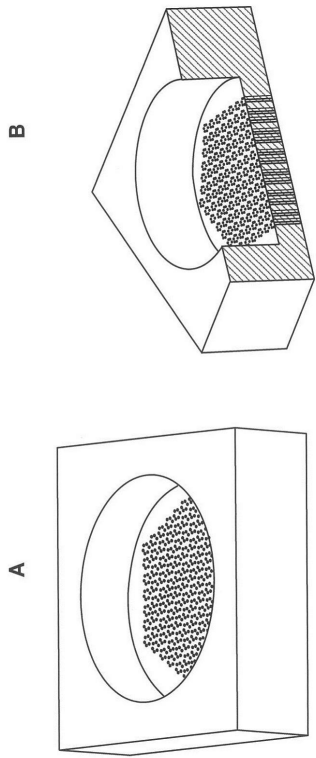
【図 60 B】



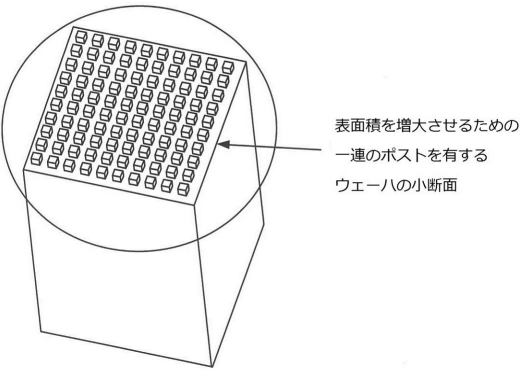
【図 6 0 C】



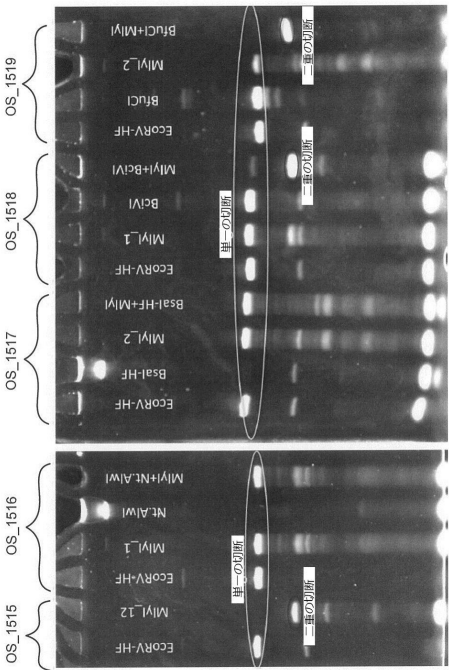
【図 6 1】



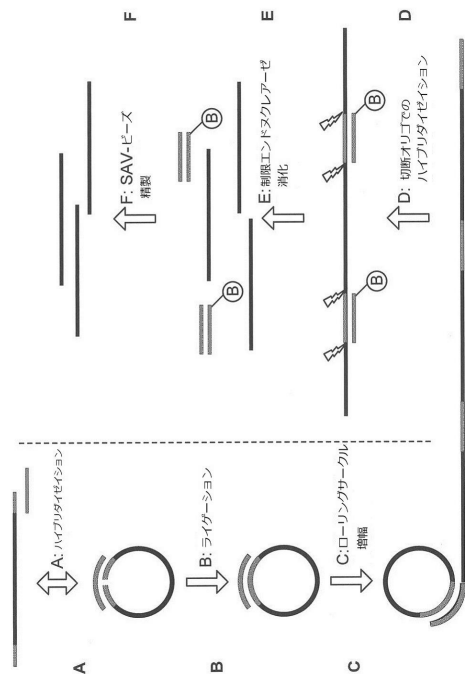
【図 6 2】



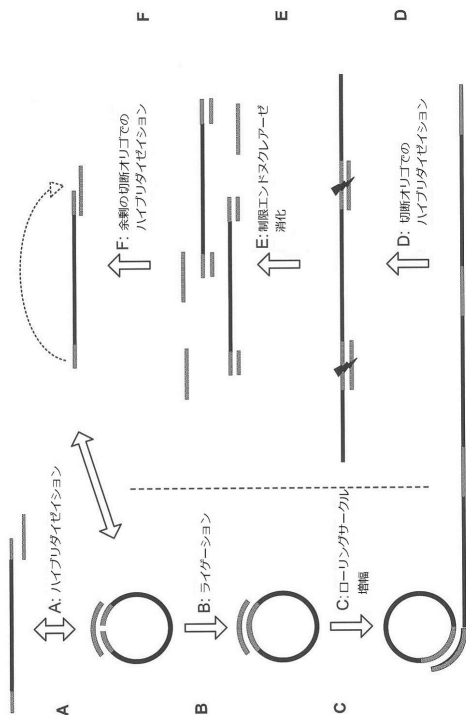
【図 6 3】



【図 6 4】



【図 6 5】



【配列表】

0006656733000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 9/00 (2006.01) C 1 2 N 9/00

前置審査

- (72)発明者 ペック, ビル, ジェイムス
アメリカ合衆国 9 5 0 5 1 カリフォルニア州 サンタクララ カールトン・プレイス 3 0 8
6
- (72)発明者 フェルナンデス, アンドレス
アメリカ合衆国 9 4 1 0 5 カリフォルニア州 サンフランシスコ ビール・ストリート 4 0
0 ナンバー1 4 0 6
- (72)発明者 チェン, シュアン
アメリカ合衆国 9 4 4 0 3 カリフォルニア州 サン・マテオ トヨン・コート 1 6 4 5
- (72)発明者 インデアミューレ, ピエール
アメリカ合衆国 9 4 7 0 3 カリフォルニア州 バークレー オレゴン・ストリート 1 8 1 7
ーエー

審査官 山本 匡子

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 2 / 1 5 4 2 0 1 (WO, A 1)
特表2 0 0 2 - 5 3 8 7 9 0 (JP, A)
特表2 0 0 6 - 5 0 3 5 8 6 (JP, A)
国際公開第2 0 0 2 / 0 7 2 7 9 1 (WO, A 1)
特開2 0 0 9 - 2 9 4 1 9 5 (JP, A)
米国特許出願公開第2 0 1 2 / 0 1 2 9 7 0 4 (US, A 1)
国際公開第2 0 0 5 / 0 5 9 0 9 6 (WO, A 1)
Morin, RD, et al., Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and
massively parallel short-read sequencing, BioTechniques, 2 0 0 8 年, 45 (1), 81-94
Tian, J., et al., Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips,
Nature, 2 0 0 4 年, 432, 1050-1054

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 4 0 B 1 0 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0
G 0 1 N 3 7 / 0 0
C 1 2 Q
C 1 2 M
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (STN)