I707038

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I707038 B**

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 10 月 11 日

(21)申請案號：109114224　(22)申請日： 中華民國 103 (2014) 年 08 月 05 日

(51)Int. Cl.：　*C12N15/11　(2006.01)*

(30)優先權：2013/08/05　美國　61/862,445

2013/08/05　美國　61/862,457

(71)申請人：美商扭轉生物科技有限公司 (美國) TWIST BIOSCIENCE CORPORATION　(US)
美國

(72)發明人：班艾　威廉 BANYAI, WILLIAM (US)；佩克　比爾　詹姆斯 PECK, BILL JAMES (CA)；費南德茲　安卓西 FERNANDEZ, ANDRES (US)；陳思遠 CHEN, SIYUAN (CN)；英德穆里　皮爾瑞 INDERMUHLE, PIERRE (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

Cleary, Michele A., et al. "Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis." Nature methods 1.3 (2004): 241-248.

Mitra, Robi D., and George M. Church. "In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules." Nucleic Acids Research 27.24 (1999): e34-e39.

Cheng, Ji-Yen, et al. "High throughput parallel synthesis of oligonucleotides with 1536 channel synthesizer." Nucleic acids research 30.18 (2002): e93-e93.

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：21 項　圖式數：81　共 402 頁

(54)名稱

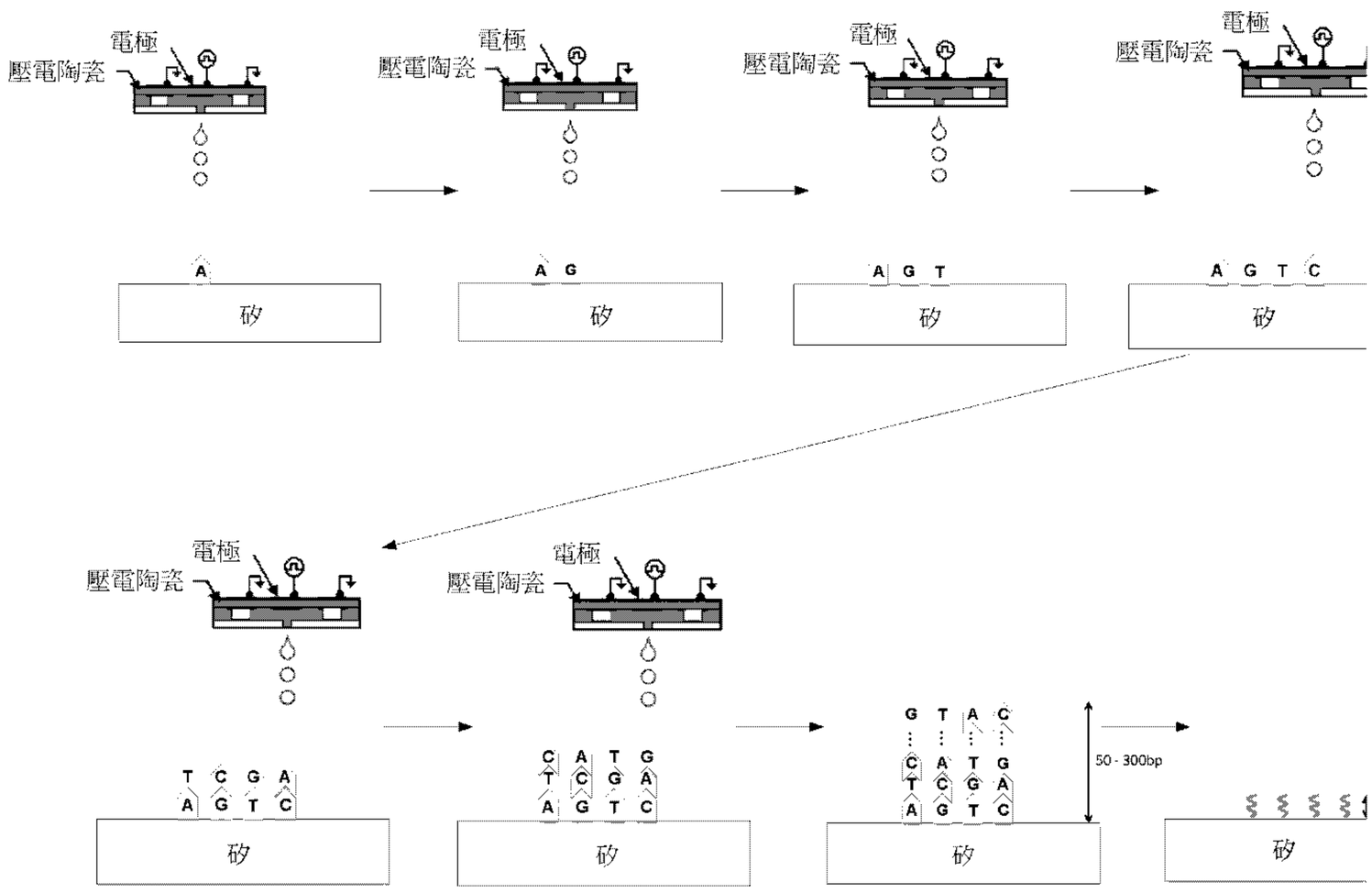
重新合成之基因庫

(57)摘要

本文提供具有低錯誤率之重新合成之大核酸庫。另外，本文描述用於製造高品質建構嵌段(諸如寡核苷酸)之裝置。較長核酸可使用微流體總成並行合成。另外，本文之方法允許快速構築大的高品質長基因庫。本文另外描述用於製造大的長且高品質核酸庫的裝置。

De novo synthesized large libraries of nucleic acids are provided herein with low error rates. Further, devices for the manufacturing of high-quality building blocks, such as oligonucleotides, are described herein. Longer nucleic acids can be synthesized in parallel using microfluidic assemblies. Further, methods herein allow for the fast construction of large libraries of long, high-quality genes. Devices for the manufacturing of large libraries of long and high-quality nucleic acids are further described herein.

指定代表圖：


電極
壓電陶瓷
A
矽
A G
矽
A G T
矽
A G T C
矽
T C G A
A G T C
矽
C A T G
T C A G
A G T C
矽
G T A C
C A T G
T C A G
A G T C
50 - 300bp
矽

【圖1A】

符號簡單說明：

無

專利案號：109114224
原申請案號：107133114

公告本

I707038

【發明摘要】

【中文發明名稱】

重新合成之基因庫

【英文發明名稱】

DE NOVO SYNTHESIZED GENE LIBRARIES

【中文】

本文提供具有低錯誤率之重新合成之大核酸庫。另外，本文描述用於製造高品質建構嵌段(諸如寡核苷酸)之裝置。較長核酸可使用微流體總成並行合成。另外，本文之方法允許快速構築大的高品質長基因庫。本文另外描述用於製造大的長且高品質核酸庫的裝置。

【英文】

De novo synthesized large libraries of nucleic acids are provided herein with low error rates. Further, devices for the manufacturing of high-quality building blocks, such as oligonucleotides, are described herein. Longer nucleic acids can be synthesized in parallel using microfluidic assemblies. Further, methods herein allow for the fast construction of large libraries of long, high-quality genes. Devices for the manufacturing of large libraries of long and high-quality nucleic acids are further described herein.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

重新合成之基因庫

【英文發明名稱】

DE NOVO SYNTHESIZED GENE LIBRARIES

【技術領域】

本發明係關於聚核苷酸之合成方法。

【先前技術】

具有高保真度及低成本的高效化學基因合成在生物技術及醫學中及在基礎生物醫學研究中具有中心作用。

重新基因合成為基礎生物學研究及生物技術應用之有力工具。雖然已知用於小規模合成相對較短片段的各種方法，但此等技術受可擴展性、自動化、速度、精確性及成本影響。需求用於簡單、可再現、可擴展、較不易錯及有成本效益的方法的裝置，確保成功合成所需基因且能夠自動化。

【發明內容】

如上所述，存在對可快速有效合成大基因庫或相對較長寡核苷酸片段而錯誤較少之方法、裝置及系統的迫切需求。類似地，亦存在對可在微流體規模分隔及混合液體試劑以便較大數目可單獨處理之反應並行之方法的需求。本發明解決此等需求且亦提供相關優勢。

在一個態樣中，本發明提供如本文所述之基因庫。基因庫包含基因之集合。在一些實施例中，集合包含至少100種不同的預選合成基因，該等基因可具有至少0.5 kb長度及與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp的錯誤率。在另一態樣中，本發明亦提供包含基因集合之基因

庫。集合可包含至少100種不同的預選合成基因，該等基因可各具有至少0.5 kb長度。至少90%之預選合成基因可包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之錯誤率。所需預定序列可通常由使用者藉由任何方法，例如使用者使用電腦化系統輸入資料來供應。在各種實施例中，合成核酸相對於此等預定序列加以比較，在一些情況下，藉由例如使用下一代定序方法定序合成核酸的至少一部分。在與本文所述之基因庫中之任一者相關的一些實施例中，至少90%之預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/5000 bp之錯誤率。在一些實施例中，至少0.05%之預選合成基因無錯誤。在一些實施例中，至少0.5%之預選合成基因無錯誤。在一些實施例中，至少90%之預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之錯誤率。在一些實施例中，至少90%之預選合成基因無錯誤或實質上無錯誤。在一些實施例中，預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之缺失率。在一些實施例中，預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之插入率。在一些實施例中，預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之取代率。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少10個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少100個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少1000個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少1000000個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因集合包含至少500種基因。在一些實施例中，集合包含至少5000種基因。在一些實施例中，集合包含至少10000種基因。在一些實施例中，預選合成基因為至少1kb。在一些實施例中，預

選合成基因為至少2kb。在一些實施例中，預選合成基因為至少3kb。在一些實施例中，預定序列與預選合成基因相比包含另外不到20 bp。在一些實施例中，預定序列與預選合成基因相比包含另外不到15 bp。在一些實施例中，合成基因中之至少一者與任何其他合成基因至少0.1%不同。在一些實施例中，合成基因中之每一者與任何其他合成基因至少0.1%不同。在一些實施例中，合成基因中之至少一者與任何其他合成基因至少10%不同。在一些實施例中，合成基因中之每一者與任何其他合成基因至少10%不同。在一些實施例中，合成基因中之至少一者與任何其他合成基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，合成基因中之每一者與任何其他合成基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含不到2kb及與預選基因序列相比錯誤率小於1/20000 bp之合成基因。在一些實施例中，一子集之可傳遞基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因集合之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因集合。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因集合之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，基因庫處於小於100 m^3之空間中。在一些實施例中，基因庫處於小於1 m^3之空間中。在一些實施例中，基因庫處於小於1 m^3之空間中。

在另一態樣中，本發明亦提供一種構築基因庫之方法。該方法包含以下步驟：在第一時間點之前將至少第一基因列表及第二基因列表輸入電腦可讀非暫時性媒體中，其中該等基因為至少500 bp且當彙集成聯合列表時，該聯合列表包含至少100種基因；在第二時間點之前合成聯合列表中

超過90%之基因，由此構築具有可傳遞基因之基因庫。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到一個月。

在實踐如本文提供之構築基因庫之方法中之任一者時，如本文所述之方法另外包含在第二時間點傳遞至少一個基因。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因無錯誤。在一些實施例中，可傳遞基因包含小於1/3000之錯誤率，導致產生與基因聯合列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因包含小於1/3000 bp之錯誤率，導致產生與基因聯合列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，可傳遞基因之子集中之基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因聯合列表之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，如本文所述構築基因庫之方法中之任一者另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因之第一、第二或聯合列表。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因聯合列表之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，基因聯合列表包含至少500種基因。在一些實施例中，基因聯合列表包含至少5000種基因。在一些實施例中，基因聯合列表包含至少10000種基因。在一些實施例中，基因可為至少1kb。

在一些實施例中，基因為至少2kb。在一些實施例中，基因為至少3kb。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到25天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到5天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到2天。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在另一態樣中，本文提供構築基因庫之方法。該方法包含以下步驟：在第一時間點將基因列表輸入電腦可讀非暫時性媒體中；合成超過90%之該列表之基因，由此構築具有可傳遞基因之基因庫；及在第二時間點傳遞可傳遞基因。在一些實施例中，列表包含至少100種基因且該等基因可為至少500 bp。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到一個月。

在實踐如本文提供之構築基因庫之方法中之任一者時，在一些實施例中，如本文所述之方法另外包含在第二時間點傳遞至少一個基因。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因無錯誤。在一些實施例中，可傳遞基因包含小於1/3000之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因包含小於1/3000 bp之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序

列。在一些實施例中，可傳遞基因之子集中之基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因列表之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，構築基因庫之方法另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因列表。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因列表之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在實踐如本文提供之構築基因庫之方法中之任一者時，在一些實施例中，基因列表包含至少500種基因。在一些實施例中，列表包含至少5000種基因。在一些實施例中，列表包含至少10000種基因。在一些實施例中，基因為至少1kb。在一些實施例中，基因為至少2kb。在一些實施例中，基因為至少3kb。在一些實施例中，如構築基因庫之方法中所述之第二時間點距離第一時間點不到25天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到5天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到2天。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法。該方法包含a)提供具有經適用於核苷酸偶合之化學部分官能化之解析基因座的基板；及b)根據基因座特定預定序列，以每小時至少12個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈，由此合成複數個n個鹼基對長的寡核苷酸。本文描述與在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法相關的各種實施例。

在如本文提供之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法中之任一者中，

在一些實施例中，該等方法另外包含以每小時至少15個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少20個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少25個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/500 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/1000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/2000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/500 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/1000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/2000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。

在實踐如本文提供之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法中之任一者時，在一些實施例中，建構嵌段包含腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或尿苷。在一些實施例中，建構嵌段包含經修飾之核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含二核苷酸或三核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含胺基磷酸酯。在一些實施例中，n聚體寡核苷酸之n為至少100。在一些實施例中，n為至少200。在一些實施例中，n為至少300。在一些實施例中，n為至少400。在一些實施例中，表面包含至少100,000個解析基因座

且複數個生長寡核苷酸中之至少兩者可彼此不同。

在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含在偶合之前真空乾燥基板。在一些實施例中，建構嵌段包含阻斷基。在一些實施例中，阻斷基包含酸不穩定DMT。在一些實施例中，酸不穩定DMT包含4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含氧化或硫化。在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含化學封端非偶合寡核苷酸鏈。在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含移除阻斷基，由此使生長寡核苷酸鏈去阻斷。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處於在真空乾燥步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處於在氧化步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處於在封端步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處於在去阻斷步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，基板包含至少10,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少100,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少1,000,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在本發明之另一態樣中，本文提供用於進行一組並行反應之系統。該系統包含：具有複數個解析基因座之第一表面；具有複數個解析反應器蓋之覆蓋元件。在一些實施例中，系統使複數個解析反應器蓋與第一表面

上之複數個解析基因座對準，在第一表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件，由此將第一表面上之基因座以物理方式分成至少兩個基因座一組進入與各反應器蓋相關聯之反應器。在一些實施例中，各反應器容納第一組試劑。

在與如本文所述用於進行一組並行反應之系統中之任一者相關的一些實施例中，在自第一表面剝離後，反應器蓋保留第一組試劑之至少一部分。在一些實施例中，該部分為約30%。在一些實施例中，該部分為約90%。在一些實施例中，複數個解析基因座位於製造於支撐表面中之微結構上。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通之通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，系統另外包含具有複數個解析基因座之第二表面，該等基因座之密度為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，系統另外包含具有複數個解析基因座之第二表面，該等基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，系統另外包含具有複數個解析基因座之第二表面，該等基因座之密度為每平方毫米至少10個。

在與如本文所述用於進行一組並行反應之系統中之任一者相關的一些實施例中，第一表面之解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，第

二表面之解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一或第二表面。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，複數個解析基因座中之解析基因座包含密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$之周邊的標稱弧長。在一些實施例中，複數個解析基因座中之解析基因座包含密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$之周邊的標稱弧長。在一些實施例中，第一表面之複數個解析基因座中之解析基因座包含高能量表面。在一些實施例中，第一及第二表面包含在給定液體下之不同表面張力。在一些實施例中，高表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，複數個解析基因座位於包含選自由以下組成之群之材料的固體基板上：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，覆蓋元件包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供殼體陣列(an array of enclosures)。殼體陣列包含：複數個包含第一基板及包含反應器蓋之第二基板的解析反應器；各反應器中之至少2個解析基因座。在一些情況下，解析反應器用可剝離密封件分開。在一些情況下，在第二基板自第一基板剝離後，反應器蓋保留至少一部分反應器內含物。在一些實施例中，第二基板上之反應器蓋之密度為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，第二基板上之反應

器蓋之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，第二基板上之反應器蓋之密度為每平方毫米至少10個。

在與如本文提供之殼體陣列相關的一些實施例中，反應器蓋保留至少30%之反應器內含物。在一些實施例中，反應器蓋保留至少90%之反應器內含物。在一些實施例中，解析基因座之密度為每平方毫米至少2個。在一些實施例中，解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，殼體陣列另外包含各反應器中之至少5個解析基因座。在一些實施例中，如本文所述之殼體陣列另外包含各反應器中之至少20個解析基因座。在一些實施例中，如本文所述之殼體陣列另外包含各反應器中之至少50個解析基因座。在一些實施例中，如本文所述之殼體陣列另外包含各反應器中之至少100個解析基因座。

在與如本文所述之殼體陣列相關的一些實施例中，解析基因座位於製造於支撐表面中的微結構上。在一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通的通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，微結構包含至少兩個通道之周邊的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$的標稱弧長。在一些實施例中，解析反應器用可剝離密封件分開。在一些實施例中，密封件包含毛細管破裂閥。

在與如本文所述之殼體陣列相關的一些實施例中，第一基板之複數

個解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，第二基板之複數個解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一或第二表面。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，第一基板之複數個解析基因座包含高能量表面。在一些實施例中，第一及第二基板包含在給定液體下之不同表面張力。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，複數個解析基因座或反應器蓋位於包含選自由以下組成之群之材料的固體基板上：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種進行一組並行反應的方法。該方法包含：(a)提供具有複數個解析基因座之第一表面；(b)提供具有複數個解析反應器蓋之覆蓋元件；(c)使複數個解析反應器蓋與第一表面上之複數個解析基因座對準，且在第一表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件，由此將第一表面上之基因座以物理方式分成至少兩個基因座一組；(d)進行第一反應，由此形成第一組試劑；及(e)將覆蓋元件自第一表面剝離，其中各反應器蓋保留第一反應體積中之至少一部分第一組試劑。在一些實施例中，該部分為約30%。在一些實施例中，該部分為約90%。

在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含以下步驟：(f)提供具有複數個解析基因座之第二表面；(g)使複數個解析反

應器蓋與第二表面上之複數個解析基因座對準，且在第二表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件，由此以物理方式劃分第二表面上之基因座；(h)使用部分第一組試劑進行第二反應，由此形成第二組試劑；及(i)將覆蓋元件自第二表面剝離，其中各反應器蓋可保留第二反應體積中之至少一部分第二組試劑。在一些實施例中，該部分為約30%。在一些實施例中，該部分為約90%。

在實踐如本文所述進行一組並行反應之方法中之任一者時，在第一表面上之複數個解析基因座的密度可為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，在第一表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，在第一表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，在覆蓋元件上之複數個解析反應器蓋的密度為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，在覆蓋元件上之複數個解析反應器蓋的密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，在覆蓋元件上之複數個解析反應器蓋的密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，在第二表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米0.1個以上。在一些實施例中，在第二表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米1個以上。在一些實施例中，在第二表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米10個以上。

在實踐如本文所述進行一組並行反應之方法中之任一者時，覆蓋元件自表面剝離之步驟，諸如如本文所述之(e)及(i)中之剝離步驟可以不同速度進行。在一些實施例中，第一表面之解析基因座包含用於第一反應之試劑塗層。在一些實施例中，第二表面之解析基因座包含用於第二反應之試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一或第二表面。在一

些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，寡核苷酸為至少25 bp。在一些實施例中，寡核苷酸為至少200 bp。在一些實施例中，寡核苷酸為至少300 bp。在一些實施例中，第一表面之解析基因座包含高能量表面。在一些實施例中，第一及第二表面包含在給定液體下之不同表面張力。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。

在與如本文所述進行一組並行反應之方法相關的一些實施例中，複數個解析基因座或解析反應器蓋位於包含選自由以下組成之群之材料的固體基板上：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，第一及第二反應體積為不同的。在一些實施例中，第一或第二反應包含聚合酶循環組裝。在一些實施例中，第一或第二反應包含酶促基因合成、黏接及接合反應、經由雜交基因之兩個基因的同時合成、鳥槍法接合及共接合、插入基因合成、經由DNA之一股的基因合成、模板引導之接合、接合酶鏈反應、微陣列介導之基因合成、固相組裝、Sloning建構嵌段技術或RNA接合介導之基因合成。在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含冷卻覆蓋元件。在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含冷卻第一表面。在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含冷卻第二表面。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列或系統組合。

在另一態樣中，本發明提供一種具有官能化表面之基板。具有官能

化表面之基板可包含具有複數個解析基因座之固體支撐物。在一些實施例中，解析基因座經增加固體支撐物表面能之部分官能化。在一些實施例中，解析基因座位於微通道上。

在與如本文所述具有官能化表面之基板相關的一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，微通道包含小於1 nl之體積。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為0.036 μm/μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}基板之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}基板之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}基板之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，複數個解析基因座之解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於基板。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個微通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個微通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個微通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個微通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，固體支撐物包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法。該方法包含：(a)經由至少一個噴墨泵施用至少一滴第

一試劑至複數個基因座之第一基因座；(b)施加負壓至基板；及(c)經由至少一個噴墨泵施用至少一滴第二試劑至第一基因座。

在實踐如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法中之任一者時，第一及第二試劑可為不同的。在一些實施例中，第一基因座經增加其表面能之部分官能化。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，複數個基因座位於製造於基板表面中之微結構上。在一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通之通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，基板表面包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。

在與如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法相關的一些實施例中，該滴第一及/或第二試劑之體積為至少2 pl。在一些實施例中，該滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，該滴之體積為至多100 pl。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施

例中，基板周圍的壓力減少至小於1 mTorr。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含使來源於第一滴之至少第一建構嵌段偶合至第一基因座上之生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，建構嵌段包含阻斷基。在一些實施例中，阻斷基包含酸不穩定DMT。在一些實施例中，酸不穩定DMT包含4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含氧化或硫化。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含化學封端非偶合寡核苷酸鏈。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含移除阻斷基，由此使生長寡核苷酸鏈去阻斷。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在偶合步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在氧化步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在封端步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在去阻斷步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，第一基因座位於製造於基板表面中之微結構上。在一些實施例中，氧化步驟之至少一種試劑藉由用包含至少一種試劑之溶液淹沒微結構來提供。在一些實施例中，封端步驟之至少一種試劑藉由用包含至少一種試劑之溶液淹沒微結構來提供。在一些實施例中，第一基因座位於製造於基板表面中之微結構上且去阻斷步驟之至少一種試劑可藉由用包含至少一種試劑之溶液淹沒微結構來提供。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方

法另外包含將基板封閉在密封室內。在一些實施例中，密封室允許清除第一基因座之液體。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含經由可操作地連接於第一基因座之排放口排出液體。在一些實施例中，在施加負壓至基板後，基板上之含水量小於1 ppm。在一些實施例中，增加表面能以對應於小於20度之水接觸角。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明提供一種使試劑沈積於複數個解析基因座之方法。該方法包含經由噴墨泵施用至少一滴第一試劑至複數個基因座之第一基因座；經由噴墨泵施用至少一滴第二試劑至複數個解析基因座之第二基因座。在一些實施例中，第二基因座與第一基因座相鄰。在一些實施例中，第一及第二試劑為不同的。在一些實施例中，第一及第二基因座位於製造於支撐表面中之微結構上。在一些實施例中，微結構包含至少一個超過100 μm深的通道。

在實踐如本文所述使試劑沈積於複數個解析基因座之方法中之任一者時，在一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通之通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，第一基因座接受小於0.1%之第二試劑且第二基因座接受小於0.1%之第一試劑。在一些實施例中，基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，第一及第二基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於基板。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核

苷酸。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，支撐表面包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，該滴之體積為至少2 pl。在一些實施例中，該滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，該滴之體積為至多100 pl。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明提供一種微流體系統。微流體系統包含以每平方毫米至少10個的密度具有複數個微孔的第一表面；及該複數個微孔中之一者內的液滴。在一些實施例中，複數個微孔中之一者內的液滴具有在約1-1000範圍內的雷諾數(Reynolds number)。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少10個。

在與如本文提供之微流體系統相關的一些實施例中，微流體系統另外包含噴墨泵。在一些實施例中，液滴藉由噴墨泵沈積。在一些實施例中，液滴在第一微孔維度之下半部移動。在一些實施例中，液滴在第一微孔維度之中間三分之一移動。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，第一微孔維度大於液滴。在一些實施例中，微孔長於100 μm。在一些實施例中，微孔短於1000 μm。在一些實施例中，微孔直徑寬於50 μm。在一些實施例中，微孔直徑窄於100

μm。在一些實施例中，液滴之體積為至少2 pl。在一些實施例中，液滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，液滴之體積為至多100 pl。在一些實施例中，複數個微孔中之每一者流體連接於至少一個微通道。在一些實施例中，至少一個微通道用增加表面能之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，微孔在包含選自由以下組成之群之材料的固體支撐物上形成：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。在一些實施例中，液滴包含能夠實現寡核苷酸合成之試劑。在一些實施例中，試劑為核苷酸或核苷酸類似物。

在另一態樣中，本發明提供一種使液滴沈積於複數個微孔之方法。該方法包含經由噴墨泵施用至少一個液滴至複數個微孔之第一微孔。在一些情況下，複數個微孔中之一者內的液滴具有在約1-1000範圍內的雷諾數。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少1個。在一些情況下，複數個微孔之密度為每平方毫米至少10個。

在實踐如本文提供之使液滴沈積於複數個微孔之方法中之任一者

時，該複數個微孔之密度可為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，微孔長於100 μm。在一些實施例中，微孔短於1000 μm。在一些實施例中，微孔直徑寬於50 μm。在一些實施例中，微孔直徑窄於100 μm。在一些實施例中，液滴以至少2 m/sec之速度施用。在一些實施例中，液滴之體積為至少2 pl。在一些實施例中，液滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，液滴之體積為至多100 pl。在一些實施例中，複數個微孔中之每一者流體連接於至少一個微通道。在一些實施例中，至少一個微孔用增加表面能之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，微孔在包含選自由以下組成之群之材料的固體支撐物上形成：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m^2 m/\mu m^2$。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，微孔內之液滴在微孔之中間三分之一移動。在一些實施例中，微孔內之液滴在微孔之下半部移動。在一些實施例中，液滴包含能夠實現寡核苷酸合成之試劑。在一些實施例中，試劑為核苷酸或核苷酸類似物。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種分配方法。分配方法包含使在第

一複數個解析基因座包含液體之第一表面與包含第二複數個解析基因座之第二表面接觸；確定剝離速度以使得所需部分之液體可自第一複數個解析基因座轉移至第二複數個解析基因座；及以該速度使第二表面與第一表面分離。在一些實施例中，第一表面包含與液體之第一表面張力，且第二表面可包含與液體之第二表面張力。

在實踐如本文提供之分配方法中之任一者時，第一表面之一部分可用增加表面張力之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，第一表面之表面張力對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，第二表面之表面張力對應於大於90度之水接觸角。在一些實施例中，第一表面包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，複數個解析基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，複數個解析基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，第一複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，第一複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，第一或第二表面包含容納至少一部分液體之微通道。在一些實施例中，第一或第二表面包含容納至少一部分液體之奈米反應器。在一些實施例中，如本文所述之分配方法另外包含使第三表面與第三複數個解析基因座接觸。在一些實施例中，液體包含

核酸。在一些實施例中，所需部分大於30%。在一些實施例中，所需部分大於90%。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種如本文所述之混合方法。該方法包含：(a)提供包含在上面製造之複數個微結構的第一基板；(b)提供包含複數個解析反應器蓋之第二基板；(c)使第一及第二基板對準以使得複數個第一反應器蓋可經配置以接受來自第一基板之n個微結構之液體；及(d)將來自n個微結構之液體傳遞至第一反應器蓋中，由此混合來自n個微結構之液體形成混合物。

在實踐如本文所述之混合方法中之任一者時，複數個解析反應器蓋之密度可為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，複數個解析反應器蓋之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析反應器蓋之密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，複數個微結構中之每一者可包含具有不同寬度之至少兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道用增加表面能之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，微結構在包含選自由以下組成之群之材料的固體支撐物上形成：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面

表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，複數個微結構包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一表面。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，微結構之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，微結構之密度為每平方毫米至少100個。

在與如本文所述之混合方法相關的一些實施例中，在使第一及第二基板對準以使得複數個第一反應器蓋可經配置以接受來自第一基板之n個微結構之液體的步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於100 μm之間隙。在一些實施例中，在步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於50 μm之間隙。在一些實施例中，在步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於20 μm之間隙。在一些實施例中，在步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於10 μm之間隙。在一些實施例中，混合物部分展佈至間隙中。在一些實施例中，混合方法另外包含藉由使第一及第二基板更靠近在一起來密封間隙。在一些實施例中，兩個通道中之一者用增加對應於小於20度之水接觸角之表面能的部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，藉由壓力來進行傳遞。在一些實施例中，混合物之體積大於反應器蓋之體積。在一些實施例中，液體包含核酸。在一些實施例中，n為至少10。在一些實施例中，n為至少25。在一些實施例中，其中液體混合形成混合物之微結構之數目n可為至少50。在一些實施例中，n為至少75。在一些實施例中，n為至少100。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種如本文所述在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法。該方法包含：提供具有經適用於核苷酸偶合之化學部分官能化之解析基因座的基板；及根據基因座特定預定序列，將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈且不在至少兩個建構嵌段偶合之間傳送基板，由此合成複數個n個鹼基對長的寡核苷酸。

在實踐如本文所述在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法中之任一者時，該方法可另外包含以每小時至少12個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少15個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少20個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少25個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/500 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/1000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/2000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/500 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/1000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些

實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/2000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。

在與如本文所述在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法相關的一些實施例中，建構嵌段包含腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或尿苷。在一些實施例中，建構嵌段包含經修飾之核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含二核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含胺基磷酸酯。在一些實施例中，n為至少100。在一些實施例中，其中n為至少200。在一些實施例中，n為至少300。在一些實施例中，n為至少400。在一些實施例中，基板包含至少100,000個解析基因座且複數個生長寡核苷酸中之至少兩者彼此不同。在一些實施例中，該方法另外包含在偶合之前真空乾燥基板。在一些實施例中，建構嵌段包含阻斷基。在一些實施例中，阻斷基包含酸不穩定DMT。在一些實施例中，酸不穩定DMT包含4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些實施例中，該方法另外包含氧化或硫化。在一些實施例中，該方法另外包含化學封端非偶合寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含移除阻斷基，由此使生長寡核苷酸鏈去阻斷。在一些實施例中，基板包含至少10,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少100,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少1,000,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種如本文所述構築基因庫之方法。該方法包含：在第一時間點將基因列表輸入電腦可讀非暫時性媒體中，其

中該列表包含至少100種基因且其中該等基因為至少500 bp；合成該列表中超過90%之基因，由此構築具有可傳遞基因之基因庫；製備代表該基因庫之定序庫；獲得序列資訊；基於該序列資訊選擇至少一個子集之可傳遞基因；及在第二時間點傳遞經選擇之可傳遞基因，其中該第二時間點距離該第一時間點不到一個月。

在實踐如本文所述構築基因庫之方法中之任一者時，序列資訊可經由下一代定序獲得。序列資訊可藉由桑格定序(Sanger sequencing)獲得。在一些實施例中，該方法另外包含在第二時間點傳遞至少一個基因。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因無錯誤。在一些實施例中，可傳遞基因包含小於1/3000之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因包含小於1/3000 bp之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，一子集之可傳遞基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因列表之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，該方法另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因列表。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因列表之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一

或多種代謝最終產物。在一些實施例中，列表包含至少500種基因。在一些實施例中，列表包含至少5000種基因。在一些實施例中，列表包含至少10000種基因。在一些實施例中，基因為至少1kb。在一些實施例中，基因為至少2kb。在一些實施例中，基因為至少3kb。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到25天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到5天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到2天。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在一些實施例中，本文提供一種用於核酸合成之微流體裝置，其包含實質上平坦的基板部分，在相對表面之間包含n個分組之m個微流體連接，其中該等n×m個微流體連接中之每一者包含第一通道及第二通道，且其中該n個分組中之每一者內的第一通道為所有m個微流體連接共用的，其中該複數個微流體連接沿著該基板之最小維度跨越該實質上平坦的基板部分，且其中n及m為至少2。在一些實施例中，第二通道經能夠有助於寡核苷酸附接至裝置之塗層官能化。在一些實施例中，該裝置另外包含附接至n個分組中之k個之第二通道的第一寡核苷酸。在一些實施例中，k為1。在一些實施例中，該裝置另外包含附接至n個分組中之l個之第二寡核苷酸。在一些實施例中，l為1。在一些實施例中，l個分組中無一分組屬於k個分組。

在一些實施例中，寡核苷酸為至少10個核苷酸、25個核苷酸、50個核苷酸、75個核苷酸、100個核苷酸、125個核苷酸、150個核苷酸或200個核苷酸長。

在一些實施例中，第一及第二寡核苷酸相差至少2個核苷酸、3個核

苷酸、4個核苷酸、5個核苷酸或10個核苷酸。

在一些實施例中，n×m個微流體連接為至多5 mm、1.5 mm、1.0 mm或0.5 mm長。在一些實施例中，n個分組中之每一者內的第一通道為至多5 mm、1.5 mm、1.0 mm或0.5 mm長。在一些實施例中，n個分組中之每一者內的第一通道為至少0.05 mm、0.75 mm、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm或0.4 mm長。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者的第二通道為至多0.2 mm、0.1 mm、0.05 mm、0.04 mm或0.03 mm長。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者的第二通道為至少0.001 mm、0.005 mm、0.01 mm、0.02 mm或0.03 mm長。在一些實施例中，n個分組中之每一者內之第一通道的截面為至少0.01 mm、0.025 mm、0.05 mm或0.075 mm。在一些實施例中，n個分組中之每一者內之第一通道的截面為至多1 mm、0.5 mm、0.25 mm、0.1 mm或0.075 mm。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者之第二通道的截面為至少0.001 mm、0.05 mm、0.01 mm、0.015 mm或0.02 mm。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者之第二通道的截面為至多0.25 mm、0.125 mm、0.050 mm、0.025 mm、0.02 mm。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者之第二通道的截面的標準差小於截面平均值之25%、20%、15%、10%、5%或1%。在一些實施例中，n×m個微流體連接之至少90%第二通道內之截面的變化為至多25%、20%、15%、10%、5%或1%。

在一些實施例中，n為至少10、25、50、100、1000或10000。在一些實施例中，m為至少3、4或5。

在一些實施例中，基板包含至少5%、10%、25%、50%、80%、90%、95%或99%矽。

在一些實施例中，n×m個微流體連接之至少90%第二通道經增加表面能之部分官能化。在一些實施例中，表面能增加至對應於小於75、50、30或20度之水接觸角的水準。

在一些實施例中，n×m個微流體連接之至少90%第二通道的縱橫比小於1、0.5或0.3。在一些實施例中，n個分組之至少90%第一通道的縱橫比小於0.5、0.3或0.2。

在一些實施例中，n×m個流體連接之至少10%、25%、50%、75%、90%或95%的總長度在實質上平坦的基板的最小維度的10%、20%、30%、40%、50%、100%、200%、500%或1000%內。

在一些實施例中，裝置之實質上平坦部分由SOI晶圓製造。

在另一態樣中，本發明係關於一種核酸擴增之方法，其包含：(a)提供包含n個環化單股核酸之樣品，其中每一核酸包含不同目標序列；(b)提供可雜交至n個環化單股核酸之m個上的至少一個轉接子雜交序列的第一轉接子；(c)提供適合於使用m個環化單股核酸作為模板延伸第一轉接子的條件，由此產生m個單股擴增子核酸，其中該m個單股擴增子核酸中之每一者包含複數個來自其模板之目標序列的複製品；(d)提供可雜交至第一轉接子之第一輔助寡核苷酸；及(e)在適合於第一藥劑在複數個切割位點切割m個單股擴增子核酸的條件下提供第一藥劑，由此產生m個環化單股核酸之目標序列的複數個單股複製品。在一些實施例中，n或m為至少2。在一些實施例中，n或m為至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、300、400或500。在一些實施例中，m小於n。在一些實施例中，包含n個環化單股核酸之樣品藉由以下步驟來形成：提供至少n個直鏈單股核酸，每一核酸包含不同目標序列中之一者，

及使n個直鏈單股核酸環化，由此產生n個環化單股核酸。在一些實施例中，第一轉接子可同時雜交至n個直鏈單股核酸之兩端。在一些實施例中，n個直鏈單股核酸之不同目標序列藉由第一及第二轉接子雜交序列側接。在一些實施例中，至少n個直鏈單股核酸藉由重新寡核苷酸合成來產生。在一些實施例中，n個直鏈單股核酸中之每一者之第一轉接子雜交序列相差不超過兩個核苷酸鹼基。在一些實施例中，第一或第二轉接子雜交序列為至少5個核苷酸長。在一些實施例中，第一或第二轉接子雜交序列為至多75、50、45、40、35、30或25個核苷酸長。在一些實施例中，當第一轉接子同時雜交至直鏈單股核酸之兩端時，n個直鏈單股核酸之末端與第一轉接子上之相鄰鹼基配對。在一些實施例中，複數個切割位點之位置使得轉接子雜交序列自m個環化單股核酸複製品之至少5%之剩餘序列部分切斷。在一些實施例中，除至少一個轉接子雜交序列以外的m個環化單股核酸複製品之至少5%之序列仍未切割。在一些實施例中，複數個切割位點之位置在至少一個轉接子雜交序列外。在一些實施例中，複數個切割位點之位置獨立於目標序列。在一些實施例中，複數個切割位點之位置藉由第一轉接子或第一輔助寡核苷酸之序列內的至少一個序列元件來確定。在一些實施例中，序列元件包含限制性核酸內切酶之識別位點。在一些實施例中，第一輔助寡核苷酸或第一轉接子寡核苷酸包含IIS型限制性核酸內切酶之識別位點。在一些實施例中，識別位點距離切割位點至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個核苷酸。在一些實施例中，複數個切割位點處於單股及雙股核酸之接點。在一些實施例中，雙股核酸包含第一轉接子及第一輔助寡核苷酸。在一些實施例中，單股核酸基本上由m個不同目標序列組成。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多95%之配

對相似性。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多90%之配對相似性。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多80%之配對相似性。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多50%之配對相似性。在一些實施例中，產生m個單股擴增子核酸包含股置換擴增。在一些實施例中，第一輔助寡核苷酸包含親和標籤。在一些實施例中，親和標籤包含生物素或生物素衍生物。在一些實施例中，該方法另外包含自樣品分離雙股核酸。在一些實施例中，分離包含親和純化、層析或凝膠純化。在一些實施例中，第一藥劑包含限制性核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含至少兩種限制性核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含IIS型限制性核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含切口核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含至少兩種切口核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含至少一種選自由以下組成之群之酶：MlyI、SchI、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyD4I、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Psp6I、MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb.BsrDI、

Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I、UbaPI、Nt.AlwI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI及Nt.BspQI及其變異體。在一些實施例中，第一藥劑包含基本上相同的功能、識別相同或基本上相同的識別序列、或在相同或基本上相同的切割位點處切割，如所列舉之第一藥劑及變異體中之任一者。在一些實施例中，至少兩種限制酶包含MlyI及BciVI或BfuCI及MlyI。在一些實施例中，該方法另外包含(a)將樣品分成複數份；(b)向至少一份提供可雜交至n個不同環化單股核酸之k個上的至少一個轉接子雜交序列的第二轉接子；(c)提供適合於使用k個環化單股核酸作為模板延伸第二轉接子的條件，由此產生k個單股擴增子核酸，其中該第二單股擴增子核酸包含複數個來自其模板之目標序列的複製品；(d)提供可雜交至第二轉接子之第二輔助寡核苷酸；及(e)在適合於藥劑在第二複數個切割位點切割k個單股擴增子核酸的條件下提供第二藥劑，由此產生k個環化單股核酸之目標序列的複數個單股複製品。在一些實施例中，第一及第二轉接子為相同的。在一些實施例中，第一及第二輔助寡核苷酸為相同的。在一些實施例中，第一及第二藥劑為相同的。在一些實施例中，k + m小於n。在一些實施例中，k為至少2。在一些實施例中，包含n個環化單股核酸之樣品藉由單股核酸擴增形成。在一些實施例中，單股核酸擴增包含：(a)提供包含至少m個環化單股前驅體核酸之樣品；(b)提供可雜交至m個環化單股前驅體核酸的第一前驅體轉接子；(c)提供適合於使用m個環化單股前驅體核酸作為模板延伸第一前驅體轉接子的條件，由此產生m個單股前驅體擴增子核酸，其中該單股擴增子核酸包含m個環化單股前驅體核酸之複數個複製品；(d)提供可雜交至第一前驅體轉接子之第一前驅體輔助寡核苷

酸；及(e)在適合於第一前驅體藥劑在複數個切割位點切割第一單股前驅體擴增子核酸的條件下提供第一前驅體藥劑，由此產生m個直鏈前驅體核酸。在一些實施例中，該方法另外包含使m個直鏈前驅體核酸環化，由此形成m個環化單股前驅體核酸之複製品。在一些實施例中，m個環化單股前驅體核酸在單股複製品中擴增至少10、100、250、500、750、1000、1500、2000、3000、4000、5000、10000倍或10000倍以上。在一些實施例中，m個環化單股核酸中之至少一者的濃度為約或至多約100 nM、10 nM、1 nM、50 pM、1 pM、100 fM、10 fM、1 fM或1 fM以下。在一些實施例中，環化包含接合。在一些實施例中，接合包含使用選自由以下組成之群之接合酶：T4 DNA接合酶、T3 DNA接合酶、T7 DNA接合酶、大腸桿菌DNA接合酶、Taq DNA接合酶及9N DNA接合酶。

在另一態樣中，本發明在各種實施例中係關於一種套組，其包含：(a)第一轉接子；(b)可雜交至該轉接子之第一輔助寡核苷酸；(c)接合酶；及(d)第一裂解藥劑，包含至少一種選自由以下組成之群之酶：MlyI、SchI、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyD4I、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Psp6I、MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、

Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I、UbaPI、Nt.AlwI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI及Nt.BspQI及其變異體。在一些實施例中，第一藥劑包含基本上相同的功能、識別相同或基本上相同的識別序列、或在相同或基本上相同的切割位點處切割，如所列舉之第一藥劑及變異體中之任一者。在一些實施例中，該套組另外包含第二裂解藥劑。在一些實施例中，第二裂解藥劑包含選自由以下組成之群之酶：MlyI、SchI、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyD4I、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Psp6I、 MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I、UbaPI、Nt.AlwI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI及Nt.BspQI及其變異體。在一些實施例中，第二

藥劑包含基本上相同的功能、識別相同或基本上相同的識別序列、或在相同或基本上相同的切割位點處切割，如所列舉之第二藥劑及變異體中之任一者。在一些實施例中，第一裂解藥劑包含MlyI。在一些實施例中，第二裂解藥劑包含BciVI或BfuCI。

在另一態樣中，本發明係關於一種核酸擴增之方法，其包含：(a)提供包含n個環化單股核酸之樣品，其中每一核酸包含不同目標序列；(b)提供可雜交至n個環化單股核酸之m個上的至少一個轉接子雜交序列的第一轉接子；(c)提供適合於使用m個環化單股核酸作為模板延伸第一轉接子的條件，由此產生m個單股擴增子核酸，其中該m個單股擴增子核酸中之每一者包含複數個來自其模板之目標序列的複製品；(d)在m個單股擴增子核酸上產生第一藥劑之雙股識別位點；及(e)在適合於第一藥劑在複數個切割位點切割m個單股擴增子核酸的條件下提供第一藥劑，由此產生m個環化單股核酸之目標序列的複數個單股複製品。在一些實施例中，雙股識別位點包含在雙股識別位點之第一股上之第一轉接子的第一部分及在雙股識別位點之第二股上之第一轉接子的第二股。在一些實施例中，轉接子包含迴文序列。在一些實施例中，雙股識別位點藉由使第一轉接子之第一及第二部分彼此雜交來產生。在一些實施例中，m個單股擴增子核酸包含複數個雙股自雜交區。

在另一態樣中，本發明係關於一種產生長核酸分子之方法，該方法包含以下步驟：(a)提供複數個固定於表面上之核酸，其中該複數個核酸包含具有重疊互補序列的核酸；(b)將該複數個核酸釋放至溶液中；及(c)提供條件促進：i)該等重疊互補序列之雜交以形成複數個雜交核酸；及ii)該等雜交核酸之延伸或接合以合成長核酸分子。

在另一態樣中，本發明係關於一種能夠加工一或多個基板之自動系統，其包含：噴墨印刷頭，用於將包含化學物質之微滴噴霧於基板上；掃描傳送帶，用於掃描鄰近印刷頭的基板以在指定位點選擇性沈積微滴；流槽，用於藉由使基板暴露於一或多種經選擇之流體來處理上面沈積微滴之基板；對準單元，用於每當基板鄰近印刷頭安置以便沈積時，相對於印刷頭正確地對準基板；且不包含使基板在印刷頭與流槽之間移動以便在流槽中處理的處理傳送帶，其中該處理傳送帶及該掃描傳送帶為不同元件。

在另一態樣中，本發明係關於一種在基板上合成寡核苷酸之自動系統，該自動系統能夠加工一或多個基板，其包含：噴墨印刷頭，用於將包含核苷或活化核苷之溶液噴霧於基板上；掃描傳送帶，用於掃描鄰近印刷頭的基板以在指定位點選擇性沈積核苷；流槽，用於藉由使基板暴露於一或多種經選擇之流體來處理上面沈積單體之基板；對準單元，用於每當基板鄰近印刷頭安置以便沈積時，相對於印刷頭正確地對準基板；且不包含使基板在印刷頭與流槽之間移動以便在流槽中處理的處理傳送帶，其中該處理傳送帶及該掃描傳送帶為不同元件。

在另一態樣中，本發明係關於一種自動系統，其包含：噴墨印刷頭，用於將包含化學物質之微滴噴霧於基板上；掃描傳送帶，用於掃描鄰近印刷頭的基板以在指定位點選擇性沈積微滴；流槽，用於藉由使基板暴露於一或多種經選擇之流體來處理上面沈積微滴之基板；及對準單元，用於每當基板鄰近印刷頭安置以便沈積時，相對於印刷頭正確地對準基板；且其中該系統不包含使基板在印刷頭與流槽之間移動以便在流槽中處理的處理傳送帶。

以引用的方式併入

本說明書中提及之所有公開案、專利及專利申請案以引用的方式併入本文中，其引用的程度如每個單獨的公開案、專利或專利申請經特定及單獨地指示以引用的方式併入一般。

【圖式簡單說明】

本發明之新穎特徵在隨附申請專利範圍中細緻闡述。將參考闡述利用本發明原理的說明性實施例和其附圖的以下詳細描述來獲得對本發明之特徵及優勢的較佳理解：

圖1顯示概括基因合成及奈米反應器技術之實例方法。圖1A圖示使用噴墨印刷機在基板上合成寡核苷酸之實例方法；圖1B圖示在解析殼體或奈米反應器中擴增基因之實例方法。圖1C圖示使用複數個晶圓並行連接用於寡核苷酸合成及基因組裝之微流體反應的實例。

圖2 A-C為顯示例示性商業方法流程的方塊圖。可跳過合成基因之選殖(圖2B)。在圖2C中，合成基因在裝運之前選殖(圖2C)。

圖3顯示用於寡核苷酸合成之系統的例示性概述，包括印刷機(例如噴墨印刷機)用於試劑沈積、基板(晶圓)、概括系統元件沿多個方向對準之示意圖及試劑流動之例示性設置。

圖4圖示構築至基板中之設計微結構的實例(寡核苷酸晶圓反應器)。

圖5為顯示試劑沈積至圖4所圖示之微結構中之例示性方法的圖式。經選擇之表面官能化區域允許試劑在潤濕條件下展佈至較小的官能化孔中。

圖6A為進一步例示圖4所圖示之微結構的圖示。圖6B為微結構之各種替代設計的圖示。圖6C圖示微結構在基板(晶圓)上之佈局設計。

圖7圖示反應器蓋在覆蓋元件上之例示性佈局。

圖8為顯示基因合成至裝運之例示性方法工作流程的圖式。

圖9A展示蓋打開或關閉之例示性流槽的圖示。圖9B圖示例示性流槽及廢料收集器總成之截面視圖。圖9C圖示例示性流槽及廢料收集器總成之放大截面視圖。

圖10A圖示具有單個1-5 mm凹槽、198 mm直徑之單凹槽真空夾盤的實例。圖10B圖示基板(晶圓)與真空夾盤及視情況選用之併入接受元件中之熱控制元件之間的燒結金屬插入物。圖10C圖示圖10A中例示之單凹槽真空夾盤的截面視圖。

圖11圖示用於寡核苷酸合成之例示性應用標準胺基磷酸酯化學方法。

圖12圖示聚合酶鏈組裝(PCA)之例示性應用。

圖13為顯示使用較長寡核苷酸(例如約300bp)對比較短寡核苷酸(例如約50kb)之優勢的圖式。較長寡核苷酸可用於在錯誤減少的情況下組裝基因產物。

圖14為顯示用於寡核苷酸組裝成基因產物之PCA及吉布森法(Gibson method)之例示性組合應用的圖式。

圖15為顯示尤其適合應用於具有較高錯誤率之基因合成產物的錯誤校正方法的圖式。

圖16為顯示尤其適合應用於具有較低錯誤率之基因合成產物的錯誤校正方法的圖式。

圖17為顯示使用鎖式探針產生帶分子條碼之定序庫及包含下一代定序(NGS)之品質控制(QC)方法的圖式。

圖18圖示噴墨總成之實例，其具有10個噴墨頭及100 μm飛行高度，

該等噴墨頭具有矽孔板及在254 μm中心之256個噴嘴。

圖19圖示可結合本發明之例示性實施例使用之電腦系統的實例。

圖20為圖示可結合本發明之例示性實施例使用之電腦系統2000的第一實例架構的方塊圖。

圖21為顯示可結合本發明之例示性實施例使用之經組態以併入複數個電腦系統、複數個行動電話及個人資料助理、及網路附接儲存(NAS)之網路2100的圖式。

圖22為可結合本發明之例示性實施例使用之使用共享虛擬位址記憶體空間的多處理器電腦系統2200的方塊圖。

圖23為顯示構成在基板(例如矽晶圓)上製造微結構之前端處理的例示性步驟的圖式。

圖24為顯示構成在基板(例如矽晶圓)上使微結構表面官能化之後端處理的例示性步驟的圖式。

圖25 A-C描繪包含高密度分組之叢集的不同視圖。圖25 D-E描繪包含實質上平坦的基板部分之微流體裝置之圖式的不同視圖。圖25F描繪包含具有108個反應孔及標記命名區域之實質上平坦的基板部分的微流體裝置的圖式的裝置視圖。圖25G描繪包含109個分組之叢集的裝置視圖。

圖26A描繪奈米反應器之圖式的截面視圖，其中該視圖展示包含11個孔之奈米反應器之一列。圖26B描繪包含108個培養孔之奈米反應器之圖式的裝置視圖。詳圖F描繪奈米反應器之一個孔的詳細視圖。圖26C描繪圖26B所示之奈米反應器圖式的成角度的裝置視圖。圖26D描繪奈米反應器之圖式的操作視圖。詳圖H描繪在奈米反應器之操作側上的基準標誌的詳細視圖。圖26E描繪包含108個孔及標記之奈米反應器之圖式的裝置視

圖。

圖27詳細圖示經差異性官能化之例示性寡核苷酸合成裝置的設計特徵。

圖28圖示圖15之例示性裝置之前端製造方法的工作流程。

圖29圖示用於差異性官能化之圖15之例示性寡核苷酸合成裝置之後端製造的例示性基線方法流程。

圖30圖示用於核酸合成之具有控制密度之活性基團的官能化表面。

圖31展示根據本文所述之方法製造之裝置的圖像。

圖32圖示例示性奈米反應器裝置之設計細節。

圖33圖示圖20中所述之例示性裝置之前端製造的例示性基線方法流程。

圖34圖示用於官能化之圖20之例示性奈米反應器裝置之後端製造的例示性基線方法流程。

圖35圖示如本文所述製造之奈米反應器裝置的奈米孔。圖35B圖示圖35A所圖示之奈米孔的近視圖。

圖36A-F圖示用於差異性官能化之各種組態。在每一圖中，淺色線指示主動表面，而深色線指示被動表面。

圖36A圖示均一官能化之表面。圖36B-F圖示以各種組態差異性官能化之表面。

圖37A-F圖示裝置官能化之方法流程。

圖38描繪抗蝕劑施用之例示性圖示，其中抗蝕劑拉至小結構中且藉由銳緣停止。

圖39A-B圖示在例示性實施例中使用底層結構停止抗蝕劑施用或藉

由毛細作用施用抗蝕劑。

圖40A-C圖示例示性差異性官能化組態之後微影抗蝕劑圖案。圖40A圖示後微影抗蝕劑圖案之明視野視圖。圖40B圖示後微影抗蝕劑圖案之暗視野視圖。圖40C圖示後微影抗蝕劑圖案之截面示意圖。

圖41A-C圖示其他例示性差異性官能化組態之後微影抗蝕劑圖案。圖41A圖示後微影抗蝕劑圖案之明視野視圖。圖41B圖示後微影抗蝕劑圖案之暗視野視圖。圖41C圖示後微影抗蝕劑圖案之截面示意圖。

圖42A-C圖示在經氟矽烷官能化後之後抗蝕劑剝除。圖42A圖示明視野視圖。圖42B圖示暗視野視圖。圖42C圖示截面示意圖。

圖43A-C圖示充分負載有DMSO之例示性寡核苷酸合成裝置(「角蛋白晶片」)。圖43A圖示充分負載有DMSO之角蛋白晶片的明視野視圖。指出親水區及疏水區。圖43B圖示充分負載有DMSO之角蛋白晶片的暗視野視圖。圖43C圖示充分負載有DMSO之角蛋白芯片的截面示意圖，指示旋轉器之自發潤濕。

圖44A-F概述圖36所圖示之組態6的例示性方法流程。

圖45A-B指示寡核苷酸合成裝置之樣點取樣組態(A)及圖45A中5個樣點中之每一者的對應生物分析儀資料(B)。

圖46指示表面提取之在矽寡核苷酸合成裝置上合成之100聚體寡核苷酸的生物分析儀資料。

圖47指示在PCR擴增後表面提取之在矽寡核苷酸合成裝置上合成之100聚體寡核苷酸的生物分析儀資料。

圖48表示自樣點8獲取之樣品的序列比對，其中「×」表示單個鹼基缺失，「星號」表示單個鹼基突變且「+」表示桑格定序中之低品質樣點。

圖49表示自樣點7獲取之樣品的序列比對，其中「×」表示單個鹼基缺失，「星號」表示單個鹼基突變且「+」表示桑格定序中之低品質樣點。

圖50A-B提供在提取後(A)及在PCR擴增後(B)在三維寡核苷酸裝置上之100聚體寡核苷酸的生物分析儀結果。

圖51表示在3D寡核苷酸裝置上合成之100聚體寡核苷酸之PCR擴增樣品的序列比對圖譜。

圖52表示經由使用CorrectASE施加兩輪錯誤校正之校正結果。

圖53A-C圖示在官能化後例示性差異性官能化組態之表面官能化圖案。圖53A圖示明視野視圖。圖53B圖示暗視野視圖。圖53C圖示表面官能化圖案及避開疏水區凸出之水性流體的截面示意圖。

圖54描繪奈米反應器裝置官能化之例示性工作流程。清潔後為抗蝕劑沈積、官能化及最後抗蝕劑剝除。

圖55描繪轉移至寡核苷酸合成裝置之個別奈米反應器孔中之多種寡核苷酸按照墨點法的生物分析儀結果。圖56A-B描繪替代流槽設計。

圖56A描繪流槽之線源/線排口設計。

圖56B描繪流槽之點源/點排口設計。

圖57圖示以具有50 μm間隙之組態安置之寡核苷酸合成裝置及奈米反應器裝置。在例示性實施例中，裝置保持此組態10分鐘。

圖58A-B展示在不受理論束縛的情況下，寡核苷酸隨時間推移藉由擴散自寡核苷酸合成裝置至奈米反應器裝置之再分佈。

圖58A展示寡核苷酸濃縮在旋轉器通道之液體中，且很少或無寡核苷酸在奈米反應器腔室中。圖58B示意在相對於圖58A之稍後時間點寡核苷酸經由液體均勻分佈於旋轉器腔室及奈米反應器腔室中。

圖59展示在PCA反應前後用於基因組裝之奈米反應器孔陣列的視圖。

圖60A-C描繪在奈米反應器裝置之不同孔中基因組裝之結果。圖60A描繪合成寡核苷酸之裝置。標記孔1至10。圖60B描繪在圖60A之孔中組裝之基因的分析。對應於每一孔中之基因的峰用恰當數字標記。圖60C描繪圖60B中分析之寡核苷酸的電泳。

圖61A-B呈現與本文揭示內容相符之高容量寡核苷酸合成裝置的區塊視圖。圖61A呈現如本文所揭示之區塊的完整、成角度的視圖。圖61B呈現穿過如本文所揭示之區塊的截面截塊的成角度的視圖。

圖62描繪與本文揭示內容相符之在表面上具有柱陣列增加表面積之另一高容量寡核苷酸合成裝置的區塊視圖。

圖63描繪使用滾環擴增所擴增之單股核酸之電泳，其中該擴增產物使用裂解藥劑之各種組合加以切割。

圖64A-F表示單股核酸擴增之方法。

圖65A-F表示單股核酸擴增之方法，其可偶合至圖64所圖示之方法。

【實施方式】

交叉參考

本申請案主張2013年8月5日申請之美國臨時申請案第61/862445號及2013年8月5日申請之美國臨時申請案第61/862457號之權益，該等申請案以引用的方式併入本文中。

在本發明通篇，本發明之各種態樣可以範圍格式呈現。應理解，範圍格式中的描述僅為了方便及簡潔起見且不應解釋為對本發明範疇的固定限制。因此，除非上下文另外明確指示，否則範圍描述應視為已特定揭示

所有可能的子範圍以及至下限十分位之該範圍內之個別數值。舉例而言，諸如1至6之範圍描述應視為已特定揭示諸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等之子範圍以及該範圍內之個別值，例如1.1、2、2.3、5及5.9。不管範圍之寬度此均適用。此等中間範圍之上限及下限可獨立地包括於較小範圍內且亦涵蓋於本發明內，在規定範圍內受到任何特定排他性限制。除非上下文另外明確指示，否則當規定範圍包括一個或兩個限制時，不包括彼等所包括之限制中之任一者或兩者之範圍亦包括在本發明中。

在一個態樣中，本發明提供如本文所述之基因庫。基因庫包含基因之集合。在一些實施例中，集合包含至少100種不同的預選合成基因，該等基因可具有至少0.5 kb長度及與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp的錯誤率。在另一態樣中，本發明亦提供包含基因集合之基因庫。集合可包含至少100種不同的預選合成基因，該等基因可各具有至少0.5 kb長度。至少90%之預選合成基因可包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之錯誤率。所需預定序列可通常由使用者藉由任何方法，例如使用者使用電腦化系統輸入資料來供應。在各種實施例中，合成核酸相對於此等預定序列加以比較，在一些情況下，藉由例如使用下一代定序方法定序合成核酸的至少一部分。在與本文所述之基因庫中之任一者相關的一些實施例中，至少90%之預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/5000 bp之錯誤率。在一些實施例中，至少0.05%之預選合成基因無錯誤。在一些實施例中，至少0.5%之預選合成基因無錯誤。在一些實施例中，至少90%之預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之錯誤率。在一些實施例中，至少90%之預選合成

基因無錯誤或實質上無錯誤。在一些實施例中，預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之缺失率。在一些實施例中，預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之插入率。在一些實施例中，預選合成基因包含與包含該等基因之預定序列相比小於1/3000 bp之取代率。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少10個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少100個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少1000個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含每一合成基因之至少1000000個複本。在一些實施例中，如本文所述之基因集合包含至少500種基因。在一些實施例中，集合包含至少5000種基因。在一些實施例中，集合包含至少10000種基因。在一些實施例中，預選合成基因為至少1kb。在一些實施例中，預選合成基因為至少2kb。在一些實施例中，預選合成基因為至少3kb。在一些實施例中，預定序列與預選合成基因相比包含另外不到20 bp。在一些實施例中，預定序列與預選合成基因相比包含另外不到15 bp。在一些實施例中，合成基因中之至少一者與任何其他合成基因至少0.1%不同。在一些實施例中，合成基因中之每一者與任何其他合成基因至少0.1%不同。在一些實施例中，合成基因中之至少一者與任何其他合成基因至少10%不同。在一些實施例中，合成基因中之每一者與任何其他合成基因至少10%不同。在一些實施例中，合成基因中之至少一者與任何其他合成基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，合成基因中之每一者與任何其他合成基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含不到2kb及與預選基因序列相比錯誤率小於1/20000 bp之合成基

因。在一些實施例中，一子集之可傳遞基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因集合之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，如本文所述之基因庫另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因集合。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因集合之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，基因庫處於小於100 m^3之空間中。在一些實施例中，基因庫處於小於1 m^3之空間中。在一些實施例中，基因庫處於小於1 m^3之空間中。

在另一態樣中，本發明亦提供一種構築基因庫之方法。該方法包含以下步驟：在第一時間點之前將至少第一基因列表及第二基因列表輸入電腦可讀非暫時性媒體中，其中該等基因為至少500 bp且當彙集成聯合列表時，該聯合列表包含至少100種基因；在第二時間點之前合成聯合列表中超過90%之基因，由此構築具有可傳遞基因之基因庫。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到一個月。

在實踐如本文提供之構築基因庫之方法中之任一者時，如本文所述之方法另外包含在第二時間點傳遞至少一個基因。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因無錯誤。在一些實施例中，可傳

遞基因包含小於1/3000之錯誤率，導致產生與基因聯合列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因包含小於1/3000 bp之錯誤率，導致產生與基因聯合列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，可傳遞基因之子集中之基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因聯合列表之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，如本文所述構築基因庫之方法中之任一者另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因之第一、第二或聯合列表。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因聯合列表之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，基因聯合列表包含至少500種基因。在一些實施例中，基因聯合列表包含至少5000種基因。在一些實施例中，基因聯合列表包含至少10000種基因。在一些實施例中，基因可為至少1kb。在一些實施例中，基因為至少2kb。在一些實施例中，基因為至少3kb。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到25天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到5天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到2天。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在另一態樣中，本文提供構築基因庫之方法。該方法包含以下步驟：在第一時間點將基因列表輸入電腦可讀非暫時性媒體中；合成超過90%之該列表之基因，由此構築具有可傳遞基因之基因庫；及在第二時間點傳遞可傳遞基因。在一些實施例中，列表包含至少100種基因且該等基因可為至少500 bp。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到一個月。

在實踐如本文提供之構築基因庫之方法中之任一者時，在一些實施例中，如本文所述之方法另外包含在第二時間點傳遞至少一個基因。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因無錯誤。在一些實施例中，可傳遞基因包含小於1/3000之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因包含小於1/3000 bp之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，可傳遞基因之子集中之基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因列表之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，構築基因庫之方法另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因列表。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因列表之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在實踐如本文提供之構築基因庫之方法中之任一者時，在一些實施例中，基因列表包含至少500種基因。在一些實施例中，列表包含至少5000種基因。在一些實施例中，列表包含至少10000種基因。在一些實施例中，基因為至少1kb。在一些實施例中，基因為至少2kb。在一些實施

例中，基因為至少3kb。在一些實施例中，如構築基因庫之方法中所述之第二時間點距離第一時間點不到25天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到5天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到2天。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法。該方法包含a)提供具有經適用於核苷酸偶合之化學部分官能化之解析基因座的基板；及b)根據基因座特定預定序列，以每小時至少12個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈，由此合成複數個n個鹼基對長的寡核苷酸。本文描述與在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法相關的各種實施例。

在如本文提供之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法中之任一者中，在一些實施例中，該等方法另外包含以每小時至少15個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少20個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少25個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/500 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/1000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/2000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷

酸。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/500 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/1000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/2000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。

在實踐如本文提供之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法中之任一者時，在一些實施例中，建構嵌段包含腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或尿苷。在一些實施例中，建構嵌段包含經修飾之核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含二核苷酸或三核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含胺基磷酸酯。在一些實施例中，n聚體寡核苷酸之n為至少100。在一些實施例中，n為至少200。在一些實施例中，n為至少300。在一些實施例中，n為至少400。在一些實施例中，表面包含至少100,000個解析基因座且複數個生長寡核苷酸中之至少兩者可彼此不同。

在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含在偶合之前真空乾燥基板。在一些實施例中，建構嵌段包含阻斷基。在一些實施例中，阻斷基包含酸不穩定DMT。在一些實施例中，酸不穩定DMT包含4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含氧化或硫化。在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含化學封端非偶合寡核苷酸鏈。在一些實施例中，如本文所述之在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法另外包含移除阻斷基，由此使生長寡核苷酸鏈去阻斷。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處於在真空乾燥步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處

於在氧化步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處於在封端步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在偶合步驟期間基板之位置處於在去阻斷步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，基板包含至少10,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少100,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少1,000,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在本發明之另一態樣中，本文提供用於進行一組並行反應之系統。該系統包含：具有複數個解析基因座之第一表面；具有複數個解析反應器蓋之覆蓋元件。在一些實施例中，系統使複數個解析反應器蓋與第一表面上之複數個解析基因座對準，在第一表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件，由此將第一表面上之基因座以物理方式分成至少兩個基因座一組進入與各反應器蓋相關聯之反應器。在一些實施例中，各反應器容納第一組試劑。

在與如本文所述用於進行一組並行反應之系統中之任一者相關的一些實施例中，在自第一表面剝離後，反應器蓋保留第一組試劑之至少一部分。在一些實施例中，該部分為約30%。在一些實施例中，該部分為約90%。在一些實施例中，複數個解析基因座位於製造於支撐表面中之微結構上。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在

一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通之通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，系統另外包含具有複數個解析基因座之第二表面，該等基因座之密度為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，系統另外包含具有複數個解析基因座之第二表面，該等基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，系統另外包含具有複數個解析基因座之第二表面，該等基因座之密度為每平方毫米至少10個。

在與如本文所述用於進行一組並行反應之系統中之任一者相關的一些實施例中，第一表面之解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，第二表面之解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一或第二表面。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，複數個解析基因座中之解析基因座包含密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$之周邊的標稱弧長。在一些實施例中，複數個解析基因座中之解析基因座包含密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$之周邊的標稱弧長。在一些實施例中，第一表面之複數個解析基因座中之解析基因座包含高能量表面。在一些實施例中，第一及第二表面包含在給定液體下之不同表面張力。在一些實施例中，高表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施

例中，複數個解析基因座位於包含選自由以下組成之群之材料的固體基板上：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，覆蓋元件包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供殼體陣列。殼體陣列包含：複數個包含第一基板及包含反應器蓋之第二基板的解析反應器；各反應器中之至少2個解析基因座。在一些情況下，解析反應器用可剝離密封件分開。在一些情況下，在第二基板自第一基板剝離後，反應器蓋保留至少一部分反應器內含物。在一些實施例中，第二基板上之反應器蓋之密度為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，第二基板上之反應器蓋之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，第二基板上之反應器蓋之密度為每平方毫米至少10個。

在與如本文提供之殼體陣列相關的一些實施例中，反應器蓋保留至少30%之反應器內含物。在一些實施例中，反應器蓋保留至少90%之反應器內含物。在一些實施例中，解析基因座之密度為每平方毫米至少2個。在一些實施例中，解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，殼體陣列另外包含各反應器中之至少5個解析基因座。在一些實施例中，如本文所述之殼體陣列另外包含各反應器中之至少20個解析基因座。在一些實施例中，如本文所述之殼體陣列另外包含各反應器中之至少50個解析基因座。在一些實施例中，如本文所述之殼體陣列另外包含各反應器中之至少100個解析基因座。

在與如本文所述之殼體陣列相關的一些實施例中，解析基因座位於製造於支撐表面中之微結構上。在一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通的通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，微結構包含至少兩個通道之周邊的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$的標稱弧長。在一些實施例中，微結構包含至少兩個通道之周邊的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$的標稱弧長。在一些實施例中，解析反應器用可剝離密封件分開。在一些實施例中，密封件包含毛細管破裂閥。

在與如本文所述之殼體陣列相關的一些實施例中，第一基板之複數個解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，第二基板之複數個解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一或第二表面。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，第一基板之複數個解析基因座包含高能量表面。在一些實施例中，第一及第二基板包含在給定液體下之不同表面張力。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，複數個解析基因座或反應器蓋位於包含選自由以下組成之群之材料的固體基板上：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。應注

意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種進行一組並行反應的方法。該方法包含：(a)提供具有複數個解析基因座之第一表面；(b)提供具有複數個解析反應器蓋之覆蓋元件；(c)使複數個解析反應器蓋與第一表面上之複數個解析基因座對準，且在第一表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件，由此將第一表面上之基因座以物理方式分成至少兩個基因座一組；(d)進行第一反應，由此形成第一組試劑；及(e)將覆蓋元件自第一表面剝離，其中各反應器蓋保留第一反應體積中之至少一部分第一組試劑。在一些實施例中，該部分為約30%。在一些實施例中，該部分為約90%。

在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含以下步驟：(f)提供具有複數個解析基因座之第二表面；(g)使複數個解析反應器蓋與第二表面上之複數個解析基因座對準，且在第二表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件，由此以物理方式劃分第二表面上之基因座；(h)使用部分第一組試劑進行第二反應，由此形成第二組試劑；及(i)將覆蓋元件自第二表面剝離，其中各反應器蓋可保留第二反應體積中之至少一部分第二組試劑。在一些實施例中，該部分為約30%。在一些實施例中，該部分為約90%。

在實踐如本文所述進行一組並行反應之方法中之任一者時，在第一表面上之複數個解析基因座的密度可為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，在第一表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，在第一表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，在覆蓋元件上之複數個解析反應器蓋的密

度為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，在覆蓋元件上之複數個解析反應器蓋的密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，在覆蓋元件上之複數個解析反應器蓋的密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，在第二表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米0.1個以上。在一些實施例中，在第二表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米1個以上。在一些實施例中，在第二表面上之複數個解析基因座的密度為每平方毫米10個以上。

在實踐如本文所述進行一組並行反應之方法中之任一者時，覆蓋元件自表面剝離之步驟，諸如如本文所述之(e)及(i)中之剝離步驟可以不同速度進行。在一些實施例中，第一表面之解析基因座包含用於第一反應之試劑塗層。在一些實施例中，第二表面之解析基因座包含用於第二反應之試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一或第二表面。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，試劑塗層之表面積為每1.0 μm^2平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，寡核苷酸為至少25 bp。在一些實施例中，寡核苷酸為至少200 bp。在一些實施例中，寡核苷酸為至少300 bp。在一些實施例中，第一表面之解析基因座包含高能量表面。在一些實施例中，第一及第二表面包含在給定液體下之不同表面張力。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。

在與如本文所述進行一組並行反應之方法相關的一些實施例中，複數個解析基因座或解析反應器蓋位於包含選自由以下組成之群之材料的固體基板上：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯

胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，第一及第二反應體積為不同的。在一些實施例中，第一或第二反應包含聚合酶循環組裝。在一些實施例中，第一或第二反應包含酶促基因合成、黏接及接合反應、經由雜交基因之兩個基因的同時合成、鳥槍法接合及共接合、插入基因合成、經由DNA之一股的基因合成、模板引導之接合、接合酶鏈反應、微陣列介導之基因合成、固相組裝、Sloning建構嵌段技術或RNA接合介導之基因合成。在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含冷卻覆蓋元件。在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含冷卻第一表面。在一些實施例中，如本文所述進行一組並行反應之方法另外包含冷卻第二表面。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列或系統組合。

在另一態樣中，本發明提供一種具有官能化表面之基板。具有官能化表面之基板可包含具有複數個解析基因座之固體支撐物。在一些實施例中，解析基因座經增加固體支撐物表面能之部分官能化。在一些實施例中，解析基因座位於微通道上。

在與如本文所述具有官能化表面之基板相關的一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，微通道包含小於1 nl之體積。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為0.036 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，複數個解析基因座之解析基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接

於基板。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個微通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個微通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個微通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個微通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，固體支撐物包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法。該方法包含：(a)經由至少一個噴墨泵施用至少一滴第一試劑至複數個基因座之第一基因座；(b)施加負壓至基板；及(c)經由至少一個噴墨泵施用至少一滴第二試劑至第一基因座。

在實踐如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法中之任一者時，第一及第二試劑可為不同的。在一些實施例中，第一基因座經增加其表面能之部分官能化。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，複數個基因座位於製造於基板表面中之微結構上。在一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通之通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通

道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，基板表面包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。

在與如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法相關的一些實施例中，該滴第一及/或第二試劑之體積為至少2 pl。在一些實施例中，該滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，該滴之體積為至多100 pl。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，官能化表面之標稱表面積為每1.0 μm^2基板之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，基板周圍的壓力減少至小於1 mTorr。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含使來源於第一滴之至少第一建構嵌段偶合至第一基因座上之生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，建構嵌段包含阻斷基。在一些實施例中，阻斷基包含酸不穩定DMT。在一些實施例中，酸不穩定DMT包含4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含氧化或硫化。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含化學封端非偶合寡核苷酸鏈。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含移除阻斷基，由此使生長寡核

苷酸鏈去阻斷。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在偶合步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在氧化步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在封端步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，在負壓施加期間基板之位置處於在去阻斷步驟期間基板之位置的10 cm以內。在一些實施例中，第一基因座位於製造於基板表面中之微結構上。在一些實施例中，氧化步驟之至少一種試劑藉由用包含至少一種試劑之溶液淹沒微結構來提供。在一些實施例中，封端步驟之至少一種試劑藉由用包含至少一種試劑之溶液淹沒微結構來提供。在一些實施例中，第一基因座位於製造於基板表面中之微結構上且去阻斷步驟之至少一種試劑可藉由用包含至少一種試劑之溶液淹沒微結構來提供。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含將基板封閉在密封室內。在一些實施例中，密封室允許清除第一基因座之液體。在一些實施例中，如本文所述在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸之方法另外包含經由可操作地連接於第一基因座之排放口排出液體。在一些實施例中，在施加負壓至基板後，基板上之含水量小於1 ppm。在一些實施例中，增加表面能以對應於小於20度之水接觸角。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明提供一種使試劑沈積於複數個解析基因座之方法。該方法包含經由噴墨泵施用至少一滴第一試劑至複數個基因座之第一基因座；經由噴墨泵施用至少一滴第二試劑至複數個解析基因座之第二基因座。在一些實施例中，第二基因座與第一基因座相鄰。在一些實施例

中，第一及第二試劑為不同的。在一些實施例中，第一及第二基因座位於製造於支撐表面中之微結構上。在一些實施例中，微結構包含至少一個超過100 μm深的通道。

在實踐如本文所述使試劑沈積於複數個解析基因座之方法中之任一者時，在一些實施例中，微結構包含至少兩個彼此流體連通之通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同寬度之兩個通道。在一些實施例中，至少兩個通道包含具有不同長度之兩個通道。在一些實施例中，第一基因座接受小於0.1%之第二試劑且第二基因座接受小於0.1%之第一試劑。在一些實施例中，基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，第一及第二基因座包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於基板。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，支撐表面包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，該滴之體積為至少2 pl。在一些實施例中，該滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，該滴之體積為至多100 pl。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明提供一種微流體系統。微流體系統包含以每

平方毫米至少10個的密度具有複數個微孔的第一表面；及該複數個微孔中之一者內的液滴。在一些實施例中，複數個微孔中之一者內的液滴具有在約1-1000範圍內的雷諾數。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少10個。

在與如本文提供之微流體系統相關的一些實施例中，微流體系統另外包含噴墨泵。在一些實施例中，液滴藉由噴墨泵沈積。在一些實施例中，液滴在第一微孔維度之下半部移動。在一些實施例中，液滴在第一微孔維度之中間三分之一移動。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，第一微孔維度大於液滴。在一些實施例中，微孔長於100 μm。在一些實施例中，微孔短於1000 μm。在一些實施例中，微孔直徑寬於50 μm。在一些實施例中，微孔直徑窄於100 μm。在一些實施例中，液滴之體積為至少2 pl。在一些實施例中，液滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，液滴之體積為至多100 pl。在一些實施例中，複數個微孔中之每一者流體連接於至少一個微通道。在一些實施例中，至少一個微通道用增加表面能之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，微孔在包含選自由以下組成之群之材料的固體支撐物上形成：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面

之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。在一些實施例中，液滴包含能夠實現寡核苷酸合成之試劑。在一些實施例中，試劑為核苷酸或核苷酸類似物。

在另一態樣中，本發明提供一種使液滴沈積於複數個微孔之方法。該方法包含經由噴墨泵施用至少一個液滴至複數個微孔之第一微孔。在一些情況下，複數個微孔中之一者內的液滴具有在約1-1000範圍內的雷諾數。在一些實施例中，複數個微孔之密度為每平方毫米至少1個。在一些情況下，複數個微孔之密度為每平方毫米至少10個。

在實踐如本文提供之使液滴沈積於複數個微孔之方法中之任一者時，該複數個微孔之密度可為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，微孔長於100 μm。在一些實施例中，微孔短於1000 μm。在一些實施例中，微孔直徑寬於50 μm。在一些實施例中，微孔直徑窄於100 μm。在一些實施例中，液滴以至少2 m/sec之速度施用。在一些實施例中，液滴之體積為至少2 pl。在一些實施例中，液滴之體積為約40 pl。在一些實施例中，液滴之體積為至多100 pl。在一些實施例中，複數個微孔中之每一者流體連接於至少一個微通道。在一些實施例中，至少一個微孔用增加表面能之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，表面能對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，微孔在包含選自由以下組成之群之材料的固體支撐物上形成：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，

微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 μm/μm^2。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 μm^{2}m/μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，微孔內之液滴在微孔之中間三分之一移動。在一些實施例中，微孔內之液滴在微孔之下半部移動。在一些實施例中，液滴包含能夠實現寡核苷酸合成之試劑。在一些實施例中，試劑為核苷酸或核苷酸類似物。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種分配方法。分配方法包含使在第一複數個解析基因座包含液體之第一表面與包含第二複數個解析基因座之第二表面接觸；確定剝離速度以使得所需部分之液體可自第一複數個解析基因座轉移至第二複數個解析基因座；及以該速度使第二表面與第一表面分離。在一些實施例中，第一表面包含與液體之第一表面張力，且第二表面可包含與液體之第二表面張力。

在實踐如本文提供之分配方法中之任一者時，第一表面之一部分可用增加表面張力之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，第一表面之表面張力對應於小於20度之水接觸角。在一些實施例中，第二表面之表面張力對應於大於90度之水接觸角。在一些實施例中，第一表面包含選自由以下組成之群之材料：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例

中，複數個解析基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 μm/μm^2。在一些實施例中，複數個解析基因座之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 μm/μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^{2}第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，第一複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，第一複數個解析基因座之密度為每平方毫米至少100個。在一些實施例中，第一或第二表面包含容納至少一部分液體之微通道。在一些實施例中，第一或第二表面包含容納至少一部分液體之奈米反應器。在一些實施例中，如本文所述之分配方法另外包含使第三表面與第三複數個解析基因座接觸。在一些實施例中，液體包含核酸。在一些實施例中，所需部分大於30%。在一些實施例中，所需部分大於90%。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種如本文所述之混合方法。該方法包含：(a)提供包含在上面製造之複數個微結構的第一基板；(b)提供包含複數個解析反應器蓋之第二基板；(c)使第一及第二基板對準以使得複數個第一反應器蓋可經配置以接受來自第一基板之n個微結構之液體；及(d)將來自n個微結構之液體傳遞至第一反應器蓋中，由此混合來自n個微結構之液體形成混合物。

在實踐如本文所述之混合方法中之任一者時，複數個解析反應器蓋之密度可為每平方毫米至少0.1個。在一些實施例中，複數個解析反應器

蓋之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，複數個解析反應器蓋之密度為每平方毫米至少10個。在一些實施例中，複數個微結構中之每一者可包含具有不同寬度之至少兩個通道。在一些實施例中，至少一個通道長於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道短於1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑寬於50 μm。在一些實施例中，至少一個通道直徑窄於100 μm。在一些實施例中，至少一個通道用增加表面能之部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，微結構在包含選自由以下組成之群之材料的固體支撐物上形成：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、PDMS及玻璃。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道之周邊之標稱弧長的密度為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.25 μm^2。在一些實施例中，用部分塗佈之表面之標稱表面積為每1.0 μm^2第一表面之平面表面積至少1.45 μm^2。在一些實施例中，複數個微結構包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層共價連接於第一表面。在一些實施例中，試劑塗層包含寡核苷酸。在一些實施例中，微結構之密度為每平方毫米至少1個。在一些實施例中，微結構之密度為每平方毫米至少100個。

在與如本文所述之混合方法相關的一些實施例中，在使第一及第二基板對準以使得複數個第一反應器蓋可經配置以接受來自第一基板之n個微結構之液體的步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於100 μm之間隙。在一些實施例中，在步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於50

μm之間隙。在一些實施例中，在步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於20 μm之間隙。在一些實施例中，在步驟(c)後，在第一及第二基板之間存在小於10 μm之間隙。在一些實施例中，混合物部分展佈至間隙中。在一些實施例中，混合方法另外包含藉由使第一及第二基板更靠近在一起來密封間隙。在一些實施例中，兩個通道中之一者用增加對應於小於20度之水接觸角之表面能的部分塗佈。在一些實施例中，部分為化學惰性部分。在一些實施例中，藉由壓力來進行傳遞。在一些實施例中，混合物之體積大於反應器蓋之體積。在一些實施例中，液體包含核酸。在一些實施例中，n為至少10。在一些實施例中，n為至少25。在一些實施例中，其中液體混合形成混合物之微結構之數目n可為至少50。在一些實施例中，n為至少75。在一些實施例中，n為至少100。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種如本文所述在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法。該方法包含：提供具有經適用於核苷酸偶合之化學部分官能化之解析基因座的基板；及根據基因座特定預定序列，將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈且不在至少兩個建構嵌段偶合之間傳送基板，由此合成複數個n個鹼基對長的寡核苷酸。

在實踐如本文所述在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法中之任一者時，該方法可另外包含以每小時至少12個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少15個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸

鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少20個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含以每小時至少25個核苷酸之速率將至少兩個建構嵌段偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/500 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/1000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，至少一個解析基因座包含以小於1/2000 bp之錯誤率偏離基因座特定預定序列之n聚體寡核苷酸。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/500 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/1000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。在一些實施例中，基板上之複數個寡核苷酸以小於1/2000 bp之錯誤率偏離對應的基因座特定預定序列。

在與如本文所述在基板上合成n聚體寡核苷酸之方法相關的一些實施例中，建構嵌段包含腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或尿苷。在一些實施例中，建構嵌段包含經修飾之核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含二核苷酸。在一些實施例中，建構嵌段包含胺基磷酸酯。在一些實施例中，n為至少100。在一些實施例中，其中n為至少200。在一些實施例中，n為至少300。在一些實施例中，n為至少400。在一些實施例中，基板包含至少100,000個解析基因座且複數個生長寡核苷酸中之至少兩者彼此不同。在一些實施例中，該方法另外包含在偶合之前真空乾燥基板。在一些實施例中，建構嵌段包含阻斷基。在一些實施例中，阻斷基包含酸不

穩定DMT。在一些實施例中，酸不穩定DMT包含4,4'-二甲氧基三苯甲基。在一些實施例中，該方法另外包含氧化或硫化。在一些實施例中，該方法另外包含化學封端非偶合寡核苷酸鏈。在一些實施例中，該方法另外包含移除阻斷基，由此使生長寡核苷酸鏈去阻斷。在一些實施例中，基板包含至少10,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少100,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。在一些實施例中，基板包含至少1,000,000個通孔提供基板之第一表面與基板之第二表面之間的流體連通。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在另一態樣中，本發明亦提供一種如本文所述構築基因庫之方法。該方法包含：在第一時間點將基因列表輸入電腦可讀非暫時性媒體中，其中該列表包含至少100種基因且其中該等基因為至少500 bp；合成該列表中超過90%之基因，由此構築具有可傳遞基因之基因庫；製備代表該基因庫之定序庫；獲得序列資訊；基於該序列資訊選擇至少一個子集之可傳遞基因；及在第二時間點傳遞經選擇之可傳遞基因，其中該第二時間點距離該第一時間點不到一個月。

在實踐如本文所述構築基因庫之方法中之任一者時，序列資訊可經由下一代定序獲得。序列資訊可藉由桑格定序獲得。在一些實施例中，該方法另外包含在第二時間點傳遞至少一個基因。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少0.1%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，

基因庫中之每一基因與任何其他基因至少10%不同。在一些實施例中，基因庫中之至少一種基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，基因庫中之每一基因與任何其他基因至少2個鹼基對不同。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因無錯誤。在一些實施例中，可傳遞基因包含小於1/3000之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，至少90%之可傳遞基因包含小於1/3000 bp之錯誤率，導致產生與基因列表中之基因序列偏離的序列。在一些實施例中，一子集之可傳遞基因共價連接在一起。在一些實施例中，基因列表之第一子集編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，該方法另外包含選擇一或多種代謝最終產物，由此構築基因列表。在一些實施例中，一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一些實施例中，基因列表之第二子集編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。在一些實施例中，列表包含至少500種基因。在一些實施例中，列表包含至少5000種基因。在一些實施例中，列表包含至少10000種基因。在一些實施例中，基因為至少1kb。在一些實施例中，基因為至少2kb。在一些實施例中，基因為至少3kb。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到25天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到5天。在一些實施例中，第二時間點距離第一時間點不到2天。應注意，本文所述之任何實施例可與本發明中提供之任何方法、裝置、陣列、基板或系統組合。

在一些實施例中，本文提供一種用於核酸合成之微流體裝置，其包含實質上平坦的基板部分，在相對表面之間包含n個分組之m個微流體連接，其中該等n×m個微流體連接中之每一者包含第一通道及第二通道，且其中該n個分組中之每一者內的第一通道為所有m個微流體連接共用的，

其中該複數個微流體連接沿著該基板之最小維度跨越該實質上平坦的基板部分，且其中n及m為至少2。在一些實施例中，第二通道經能夠有助於寡核苷酸附接至裝置之塗層官能化。在一些實施例中，該裝置另外包含附接至n個分組中之k個之第二通道的第一寡核苷酸。在一些實施例中，k為1。在一些實施例中，該裝置另外包含附接至n個分組中之l個之第二寡核苷酸。在一些實施例中，l為1。在一些實施例中，l個分組中無一分組屬於k個分組。

在一些實施例中，寡核苷酸為至少10個核苷酸、25個核苷酸、50個核苷酸、75個核苷酸、100個核苷酸、125個核苷酸、150個核苷酸或200個核苷酸長。

在一些實施例中，第一及第二寡核苷酸相差至少2個核苷酸、3個核苷酸、4個核苷酸、5個核苷酸或10個核苷酸。

在一些實施例中，n×m個微流體連接為至多5 mm、1.5 mm、1.0 mm或0.5 mm長。在一些實施例中，n個分組中之每一者內的第一通道為至多5 mm、1.5 mm、1.0 mm或0.5 mm長。在一些實施例中，n個分組中之每一者內的第一通道為至少0.05 mm、0.75 mm、0.1 mm、0.2 mm、0.3 mm或0.4 mm長。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者的第二通道為至多0.2 mm、0.1 mm、0.05 mm、0.04 mm或0.03 mm長。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者的第二通道為至少0.001 mm、0.005 mm、0.01 mm、0.02 mm或0.03 mm長。在一些實施例中，n個分組中之每一者內之第一通道的截面為至少0.01 mm、0.025 mm、0.05 mm或0.075 mm。在一些實施例中，n個分組中之每一者內之第一通道的截面為至多1 mm、0.5 mm、0.25 mm、0.1 mm或0.075 mm。在一些實施例

中，n×m個微流體連接中之每一者之第二通道的截面為至少0.001 mm、0.05 mm、0.01 mm、0.015 mm或0.02 mm。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者之第二通道的截面為至多0.25 mm、0.125 mm、0.050 mm、0.025 mm、0.02 mm。在一些實施例中，n×m個微流體連接中之每一者之第二通道的截面的標準差小於截面平均值之25%、20%、15%、10%、5%或1%。在一些實施例中，n×m個微流體連接之至少90%第二通道內之截面的變化為至多25%、20%、15%、10%、5%或1%。

在一些實施例中，n為至少10、25、50、100、1000或10000。在一些實施例中，m為至少3、4或5。

在一些實施例中，基板包含至少5%、10%、25%、50%、80%、90%、95%或99%矽。

在一些實施例中，n×m個微流體連接之至少90%第二通道經增加表面能之部分官能化。在一些實施例中，表面能增加至對應於小於75、50、30或20度之水接觸角的水準。

在一些實施例中，n×m個微流體連接之至少90%第二通道的縱橫比小於1、0.5或0.3。在一些實施例中，n個分組之至少90%第一通道的縱橫比小於0.5、0.3或0.2。

在一些實施例中，n×m個流體連接之至少10%、25%、50%、75%、90%或95%的總長度在實質上平坦的基板的最小維度的10%、20%、30%、40%、50%、100%、200%、500%或1000%內。

在一些實施例中，裝置之實質上平坦部分由SOI晶圓製造。

在另一態樣中，本發明係關於一種核酸擴增之方法，其包含：(a)提供包含n個環化單股核酸之樣品，其中每一核酸包含不同目標序列；(b)提

供可雜交至n個環化單股核酸之m個上的至少一個轉接子雜交序列的第一轉接子；(c)提供適合於使用m個環化單股核酸作為模板延伸第一轉接子的條件，由此產生m個單股擴增子核酸，其中該m個單股擴增子核酸中之每一者包含複數個來自其模板之目標序列的複製品；(d)提供可雜交至第一轉接子之第一輔助寡核苷酸；及(e)在適合於第一藥劑在複數個切割位點切割m個單股擴增子核酸的條件下提供第一藥劑，由此產生m個環化單股核酸之目標序列的複數個單股複製品。在一些實施例中，n或m為至少2。在一些實施例中，n或m為至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、300、400或500。在一些實施例中，m小於n。在一些實施例中，包含n個環化單股核酸之樣品藉由以下步驟來形成：提供至少n個直鏈單股核酸，每一核酸包含不同目標序列中之一者，及使n個直鏈單股核酸環化，由此產生n個環化單股核酸。在一些實施例中，第一轉接子可同時雜交至n個直鏈單股核酸之兩端。在一些實施例中，n個直鏈單股核酸之不同目標序列藉由第一及第二轉接子雜交序列側接。在一些實施例中，至少n個直鏈單股核酸藉由重新寡核苷酸合成來產生。在一些實施例中，n個直鏈單股核酸中之每一者之第一轉接子雜交序列相差不超過兩個核苷酸鹼基。在一些實施例中，第一或第二轉接子雜交序列為至少5個核苷酸長。在一些實施例中，第一或第二轉接子雜交序列為至多75、50、45、40、35、30或25個核苷酸長。在一些實施例中，當第一轉接子同時雜交至直鏈單股核酸之兩端時，n個直鏈單股核酸之末端與第一轉接子上之相鄰鹼基配對。在一些實施例中，複數個切割位點之位置使得轉接子雜交序列自m個環化單股核酸複製品之至少5%之剩餘序列部分切斷。在一些實施例中，除至少一個轉接子雜交序列以外的m個環化

單股核酸複製品之至少5%之序列仍未切割。在一些實施例中，複數個切割位點之位置在至少一個轉接子雜交序列外。在一些實施例中，複數個切割位點之位置獨立於目標序列。在一些實施例中，複數個切割位點之位置藉由第一轉接子或第一輔助寡核苷酸之序列內的至少一個序列元件來確定。在一些實施例中，序列元件包含限制性核酸內切酶之識別位點。在一些實施例中，第一輔助寡核苷酸或第一轉接子寡核苷酸包含IIS型限制性核酸內切酶之識別位點。在一些實施例中，識別位點距離切割位點至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個核苷酸。在一些實施例中，複數個切割位點處於單股及雙股核酸之接點。在一些實施例中，雙股核酸包含第一轉接子及第一輔助寡核苷酸。在一些實施例中，單股核酸基本上由m個不同目標序列組成。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多95%之配對相似性。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多90%之配對相似性。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多80%之配對相似性。在一些實施例中，m個不同目標序列具有至多50%之配對相似性。在一些實施例中，產生m個單股擴增子核酸包含股置換擴增。在一些實施例中，第一輔助寡核苷酸包含親和標籤。在一些實施例中，親和標籤包含生物素或生物素衍生物。在一些實施例中，該方法另外包含自樣品分離雙股核酸。在一些實施例中，分離包含親和純化、層析或凝膠純化。在一些實施例中，第一藥劑包含限制性核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含至少兩種限制性核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含IIS型限制性核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含切口核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含至少兩種切口核酸內切酶。在一些實施例中，第一藥劑包含至少一種選自由以下組成之群之酶：MlyI、SchI、AlwI、

BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyD4I、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Psp6I、MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I、UbaPI、Nt.AlwI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI及Nt.BspQI及其變異體。在一些實施例中，第一藥劑包含基本上相同的功能、識別相同或基本上相同的識別序列、或在相同或基本上相同的切割位點處切割，如所列舉之第一藥劑及變異體中之任一者。在一些實施例中，至少兩種限制酶包含MlyI及BciVI或BfuCI及MlyI。在一些實施例中，該方法另外包含(a)將樣品分成複數份；(b)向至少一份提供可雜交至n個不同環化單股核酸之k個上的至少一個轉接子雜交序列的第二轉接子；(c)提供適合於使用k個環化單股核酸作為模板延伸第二轉接子的條件，由此產生k個單股擴增子核酸，其中該第二單股擴增子核酸包含複數個來自其模板之目標序列的複製品；(d)提供可雜交至第二轉接子之第二輔助寡核苷酸；及(e)在適合於藥劑在第二複數個切割位點

切割k個單股擴增子核酸的條件下提供第二藥劑，由此產生k個環化單股核酸之目標序列的複數個單股複製品。在一些實施例中，第一及第二轉接子為相同的。在一些實施例中，第一及第二輔助寡核苷酸為相同的。在一些實施例中，第一及第二藥劑為相同的。在一些實施例中，k + m小於n。在一些實施例中，k為至少2。在一些實施例中，包含n個環化單股核酸之樣品藉由單股核酸擴增形成。在一些實施例中，單股核酸擴增包含：(a)提供包含至少m個環化單股前驅體核酸之樣品；(b)提供可雜交至m個環化單股前驅體核酸的第一前驅體轉接子；(c)提供適合於使用m個環化單股前驅體核酸作為模板延伸第一前驅體轉接子的條件，由此產生m個單股前驅體擴增子核酸，其中該單股擴增子核酸包含m個環化單股前驅體核酸之複數個複製品；(d)提供可雜交至第一前驅體轉接子之第一前驅體輔助寡核苷酸；及(e)在適合於第一前驅體藥劑在複數個切割位點切割第一單股前驅體擴增子核酸的條件下提供第一前驅體藥劑，由此產生m個直鏈前驅體核酸。在一些實施例中，該方法另外包含使m個直鏈前驅體核酸環化，由此形成m個環化單股前驅體核酸之複製品。在一些實施例中，m個環化單股前驅體核酸在單股複製品中擴增至少10、100、250、500、750、1000、1500、2000、3000、4000、5000、10000倍或10000倍以上。在一些實施例中，m個環化單股核酸中之至少一者的濃度為約或至多約100 nM、10 nM、1 nM、50 pM、1 pM、100 fM、10 fM、1 fM或1 fM以下。在一些實施例中，環化包含接合。在一些實施例中，接合包含使用選自由以下組成之群之接合酶：T4 DNA接合酶、T3 DNA接合酶、T7 DNA接合酶、大腸桿菌DNA接合酶、Taq DNA接合酶及9N DNA接合酶。

在另一態樣中，本發明在各種實施例中係關於一種套組，其包含：

(a)第一轉接子；(b)可雜交至該轉接子之第一輔助寡核苷酸；(c)接合酶；及(d)第一裂解藥劑，包含至少一種選自由以下組成之群之酶：MlyI、SchI、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyD4I、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Psp6I、MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I、UbaPI、Nt.AlwI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI及Nt.BspQI及其變異體。在一些實施例中，第一藥劑包含基本上相同的功能、識別相同或基本上相同的識別序列、或在相同或基本上相同的切割位點處切割，如所列舉之第一藥劑及變異體中之任一者。在一些實施例中，該套組另外包含第二裂解藥劑。在一些實施例中，第二裂解藥劑包含選自由以下組成之群之酶：MlyI、SchI、AlwI、BccI、BceAI、BsmAI、BsmFI、FokI、HgaI、PleI、SfaNI、BfuAI、BsaI、BspMI、BtgZI、EarI、BspQI、SapI、SgeI、BceFI、BslFI、BsoMAI、Bst71I、FaqI、AceIII、BbvII、BveI、LguI、BfuCI、

DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyD4I、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI、Psp6I、MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI、BscCI、NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI、TseFI、Nb.BsrDI、Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I、UbaPI、Nt.AlwI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI及Nt.BspQI及其變異體。在一些實施例中，第二藥劑包含基本上相同的功能、識別相同或基本上相同的識別序列、或在相同或基本上相同的切割位點處切割，如所列舉之第二藥劑及變異體中之任一者。在一些實施例中，第一裂解藥劑包含MlyI。在一些實施例中，第二裂解藥劑包含BciVI或BfuCI。

在另一態樣中，本發明係關於一種核酸擴增之方法，其包含：(a)提供包含n個環化單股核酸之樣品，其中每一核酸包含不同目標序列；(b)提供可雜交至n個環化單股核酸之m個上的至少一個轉接子雜交序列的第一轉接子；(c)提供適合於使用m個環化單股核酸作為模板延伸第一轉接子的條件，由此產生m個單股擴增子核酸，其中該m個單股擴增子核酸中之每一者包含複數個來自其模板之目標序列的複製品；(d)在m個單股擴增子核酸上產生第一藥劑之雙股識別位點；及(e)在適合於第一藥劑在複數個切割位點切割m個單股擴增子核酸的條件下提供第一藥劑，由此產生m個環

化單股核酸之目標序列的複數個單股複製品。在一些實施例中，雙股識別位點包含在雙股識別位點之第一股上之第一轉接子的第一部分及在雙股識別位點之第二股上之第一轉接子的第二股。在一些實施例中，轉接子包含迴文序列。在一些實施例中，雙股識別位點藉由使第一轉接子之第一及第二部分彼此雜交來產生。在一些實施例中，m個單股擴增子核酸包含複數個雙股自雜交區。

在另一態樣中，本發明係關於一種產生長核酸分子之方法，該方法包含以下步驟：(a)提供複數個固定於表面上之核酸，其中該複數個核酸包含具有重疊互補序列的核酸；(b)將該複數個核酸釋放至溶液中；及(c)提供條件促進：i)該等重疊互補序列之雜交以形成複數個雜交核酸；及ii)該等雜交核酸之延伸或接合以合成長核酸分子。

在另一態樣中，本發明係關於一種能夠加工一或多個基板之自動系統，其包含：噴墨印刷頭，用於將包含化學物質之微滴噴霧於基板上；掃描傳送帶，用於掃描鄰近印刷頭的基板以在指定位點選擇性沈積微滴；流槽，用於藉由使基板暴露於一或多種經選擇之流體來處理上面沈積微滴之基板；對準單元，用於每當基板鄰近印刷頭安置以便沈積時，相對於印刷頭正確地對準基板；且不包含使基板在印刷頭與流槽之間移動以便在流槽中處理的處理傳送帶，其中該處理傳送帶及該掃描傳送帶為不同元件。

在另一態樣中，本發明係關於一種在基板上合成寡核苷酸之自動系統，該自動系統能夠加工一或多個基板，其包含：噴墨印刷頭，用於將包含核苷或活化核苷之溶液噴霧於基板上；掃描傳送帶，用於掃描鄰近印刷頭的基板以在指定位點選擇性沈積核苷；流槽，用於藉由使基板暴露於一或多種經選擇之流體來處理上面沈積單體之基板；對準單元，用於每當基

板鄰近印刷頭安置以便沈積時，相對於印刷頭正確地對準基板；且不包含使基板在印刷頭與流槽之間移動以便在流槽中處理的處理傳送帶，其中該處理傳送帶及該掃描傳送帶為不同元件。

在另一態樣中，本發明係關於一種自動系統，其包含：噴墨印刷頭，用於將包含化學物質之微滴噴霧於基板上；掃描傳送帶，用於掃描鄰近印刷頭的基板以在指定位點選擇性沈積微滴；流槽，用於藉由使基板暴露於一或多種經選擇之流體來處理上面沈積微滴之基板；及對準單元，用於每當基板鄰近印刷頭安置以便沈積時，相對於印刷頭正確地對準基板；且其中該系統不包含使基板在印刷頭與流槽之間移動以便在流槽中處理的處理傳送帶。

鑒於上文，更特定言之，參考出於說明性目的展示圖1-2之組合物、系統及方法中所體現之本發明的圖式。應瞭解，方法、系統及組合物可在本發明之各種實施例中在組態及個別部件之細節方面變化。另外，方法可在事件或動作之細節及次序方面變化。在各種實施例中，本發明主要就核酸(詳言之DNA寡聚物及聚核苷酸)之使用而言加以描述。然而，應理解，本發明可使用各種不同類型之分子，包括所關注之RNA或其他核酸、肽、蛋白質或其他分子。適用於所關注之此等較大分子中之每一者的建構嵌段為此項技術中已知。

本發明提供適用於製備及合成包括核酸、多肽、蛋白質及其組合之所關注分子之庫的組合物、系統及方法。在各種實施例中，本發明涵蓋靜態及動態晶圓(例如由矽基板製造之彼等晶圓)用於並行進行微升、奈升或皮升規模反應之用途。此外，同樣可應用於流體之並行微升、奈升或皮升操控以允許連接解析體積中之複數個反應。流體操控可包含流動、合併、

混合、分級分離、液滴產生、加熱、冷凝、蒸發、密封、層化、加壓、乾燥或此項技術中已知的任何其他適合之流體操控。在各種實施例中，晶圓提供建構於表面中之用於流體操控的架構。不同形狀及尺寸之特徵可架構於晶圓基板內或貫穿晶圓基板。在各種實施例中，本發明之方法及組合物利用本文進一步詳細例示之專門架構之裝置合成生物學分子。詳言之，本發明提供例如使用標準胺基磷酸酯化學方法及適合之基因組裝技術，藉由精確控制例如時間、劑量及溫度之反應條件重新合成包含長的高品質寡核苷酸及聚核苷酸的大的高密度庫。

現參照圖1C，本發明在各種實施例中涵蓋一或多個靜態或動態晶圓用於流體操控之用途。晶圓可如本文進一步所述由許多適合之材料構築，例如矽。奈米反應器晶圓可經組態以在複數個特徵中接受且容納液體。額外晶圓，例如用於就地合成反應之彼等晶圓，可與奈米反應器晶圓接觸以收集和/或混合液體。奈米反應器可收集來自複數個額外晶圓之液體。通常，當奈米反應器晶圓接觸時，使奈米反應器與額外晶圓上之一或多個解析基因座對準。可在接觸之前在奈米反應器內提供試劑及溶劑。或者，奈米反應器可在接觸額外晶圓之前為空的。在一些實施例中，奈米反應器收集在DNA合成晶圓之一或多個解析基因座中合成之寡核苷酸。此等寡核苷酸可在奈米反應器內組裝成較長基因。奈米反應器可在對準及接觸額外晶圓後藉由任何適合之方式密封，例如毛細管破裂閥、壓力、黏著劑或此項技術中已知的任何其他適合之密封方式。密封可為可剝離的。奈米反應器晶圓內之反應可在密封體積中進行且可包含溫度循環，例如PCR或PCA中所應用。諸如等溫擴增之等溫反應進一步在本發明之界限內。DNA合成晶圓可經組態以在精確控制下在表面上或表面內之解析基因座進行寡核

苷酸之就地合成。可採用噴墨印刷頭將用於合成(例如標準胺基磷酸酯合成)之試劑滴傳遞至合成晶圓之解析基因座上。複數個解析基因座共用之其他試劑可大量穿過解析基因座。在一些實施例中，DNA合成晶圓經用於就地合成除DNA寡核苷酸以外之分子的合成晶圓置換，如本文別處所進一步描述。因此，本發明涵蓋在複數個小體積中經由反應條件之精確控制快速合成具有高品質之寡核苷酸及長基因的大庫。本發明之另一益處為與此項技術中已知的傳統合成方法相比試劑使用減少。

涵蓋用於重新合成具有低錯誤率之基因庫的各種方法。圖2圖示本發明之方法及組合物用於並行合成具有長序列之大的高品質基因庫的例示性應用。在各種實施例中，靜態及動態晶圓能夠實現方法流程中之複數個反應。舉例而言，通常在DNA合成晶圓上就地進行的寡核苷酸合成後可為將合成之寡核苷酸組裝成較長序列的基因組裝反應，諸如聚合酶循環組裝(PCA)。組裝序列可例如經由PCR擴增。本文所述或此項技術中已知的適合錯誤校正反應可用以使偏離目標序列之組裝序列的數目降至最低。可建構定序庫且可將一部分產物等分以便定序，諸如下一代定序(NGS)。

如圖2中所例示之基因合成方法可根據請求者的需求加以調節。根據由初始定序步驟(例如NGS)獲得之結果，具有可接受之錯誤率的組裝基因可例如於板上運送至請求者(圖2B)。本發明之方法及組合物使得錯誤率小於約1/10 kb可易於實現，但如本文別處所進一步詳述，可設定替代錯誤臨限值。為達到較高純度，重新合成/組裝之序列可由單一菌落選殖純化。正確所需序列之一致性可經由定序(例如NGS)測試。視情況，定序資訊準確性之較高可信度可例如經由另一定序方法(諸如桑格定序)來獲得。經驗證之序列可例如於板上運送至請求者(圖2C)。產生定序庫之方法進一

步詳述於本文別處。

基板/晶圓

在一個態樣中，藉由本文所述之方法中之任一者製得之具有官能化表面之基板及在具有官能化表面之基板上合成寡核苷酸的方法描述於本文中。基板可包含具有複數個解析基因座之固體支撐物。複數個解析基因座可具有任何幾何結構、定向或組織。解析基因座可呈任何規模(例如微米規模或奈米規模)，或含有製造於基板表面中之微結構。解析基因座可位於具有至少一個維度之微通道上。基板之個別解析基因座可為彼此流體斷開的，例如用於合成第一寡核苷酸之第一解析基因座可在基板兩個表面之間的第一通孔上，且用於合成第二寡核苷酸之第二解析基因座可在基板兩個表面之間的第二通孔上，第一及第二通孔在基板未流體連接內，但起始及結束自基板之相同兩個表面。在一些情況下，解析基因座之微結構可為2-D或3-D之微通道或微孔。「3-D」微通道意味著微通道之空腔可互連或在固體支撐物內延伸。在微通道或微孔內，可存在具有任何幾何結構、定向或組織之二級微結構或特徵。二級特徵之表面可經可降低二級特徵表面之表面能的部分官能化。用於合成寡核苷酸之試劑液滴可沈積於微通道或微孔中。如本文所用，微孔係指可容納液體之微流體規模的結構。在各種實施例中，微孔允許液體在頂端及底端之間流動，穿過每一端上的流體開口，從而如微通道一般起作用。在此等情形中，術語微孔及微通道可在本說明書通篇互換使用。

圖3圖示如本文所述用於寡核苷酸合成之系統的實例，包含第一基板及視情況存在之第二基板。噴墨印刷機印刷頭可在X-Y方向移動至第一基板之位置。第二基板可在Z方向移動以與第一基板密封，形成解析反應

器。合成之寡核苷酸可自第一基板傳遞至第二基板。在另一態樣中，本發明亦關於用於寡核苷酸組裝之系統。用於寡核苷酸組裝之系統可包含用於晶圓操作之系統。圖4圖示根據本發明之各種實施例關於基板之佈局設計的實例。基板可包含複數個微孔，且微孔可以均一間距(例如1.5 mm間距)排列。或者，可在佈局之不同方向選取多個間距，例如微結構之列可由第一間距界定且在每一列內，微結構可由第二間距分開。間距可包含任何適合之尺寸，例如0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.75、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5或5 mm。微孔可經設計以具有任何適合之維度，例如圖4中所例示之80 μm直徑，或任何適合之直徑，包括10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400或500 μm，且微孔可連接至複數個較小微孔。較小微孔之表面可在選定區域經官能化以有助於試劑液體例如經由高能量表面官能化流入。如圖4所示，較小微孔之直徑可為約20 μm，或任何適合之直徑，包括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或80 μm。圖5圖示當試劑液滴藉由噴墨印刷機沈積進入微孔時的情況。液滴可在較小微孔上方展佈且填充較小微孔，在一些情況下，藉由與鄰近表面相比微孔表面之高能量表面改質來促成。

在具有官能化表面之基板上具有高密度解析基因座可為具有小裝置及/或用小裝置合成大量分子及/或合成大量不同分子所需的。基板之官能化表面可包含任何適合之密度的解析基因座(例如適合於在待合成之全部

不同寡核苷酸的給定數目、合成方法之給定時間量或每個寡核苷酸、基因或庫之給定成本下合成寡核苷酸的密度)。在一些實施例中，表面之解析基因座的密度為每1 mm^2約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個、約2000個、約3000個、約4000個、約5000個、約6000個、約7000個、約8000個、約9000個、約10000個、約20000個、約40000個、約60000個、約80000個、約100000或約500000個位點。在一些實施例中，表面之解析基因座的密度為每1 mm^2至少約50個、至少75個、至少約100個、至少約200個、至少約300個、至少約400個、至少約500個、至少約600個、至少約700個、至少約800個、至少約900個、至少約1000個、至少約1500個、至少約2000個、至少約3000個、至少約4000個、至少約5000個、至少約6000個、至少約7000個、至少約8000個、至少約9000個、至少約10000個、至少約20000個、至少約40000個、至少約60000個、至少約80000個、至少約100000個或至少約500000個位點。基板上之解析基因座可具有任何不同的組織。舉例而言(但不限於)，解析基因座可緊密接近群集形成一或多個環形區、矩形區、橢圓形區、不規則區及類似物。在一個態樣中，解析基因座緊密封裝且具有少量或無交叉污染(例如，沈積進入一個解析基因座之試劑液滴不會實質上與沈積進入另一最接近的解析基因座之試劑液滴混合)。基板上之解析基因座的組織可經設計以使其允許每一子區域或全部區域被一同覆蓋形成密封空腔，同時控制密封空腔中之濕度、壓力或氣體含量以使得在流體連接條件下，每一子區域

或全部區域可具有所允許的相同濕度、壓力或氣體含量，或實質上相似的濕度、壓力或氣體含量。基板上之解析基因座之不同設計的一些實例圖示於圖6中。舉例而言，圖6Bb為稱為洞陣列之佈局設計；圖6Bc為稱為花朵之佈局設計；圖6Bd為稱為瞄準器之佈局設計；及圖6Be為稱為輻射狀花之佈局設計。圖6C例示在97.765 μm模版上用一連串微孔覆蓋之基板的設計。如圖6C所例示之微孔群集成島狀物。微孔可用來自噴墨頭之試劑填充。

基板上之解析基因座中之每一者可具有此項技術中已知的任何形狀，或可藉由此項技術中已知之方法製得的形狀。舉例而言，解析基因座中之每一者可具有呈環形形狀、矩形形狀、橢圓形形狀或不規則形狀之區域。在一些實施例中，解析基因座可呈允許液體易於流經而不產生氣泡的形狀。在一些實施例中，解析基因座可具有環形形狀，直徑可為約、至少約或小於約1微米(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或750 μm。解析基因座可具有單分散尺寸分佈，亦即所有微結構可具有大致相同的寬度、高度及/或長度。或者，解析基因座可具有有限數目之形狀及/或尺寸，例如解析基因座可以2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20或20種以上不同形狀呈現，各自具有單分散尺寸。在

一些實施例中，相同形狀可以多個單分散尺寸分佈重複，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20或20種以上單分散尺寸分佈。單分散分佈可反映在單模分佈中，標準差小於模之25%、20%、15%、10%、5%、3%、2%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%或更小。

具有高密度解析基因座之基板通常使得解析基因座在小區域內。因此，其可產生小型微通道。微通道可含有不同體積之沈積試劑液滴。微通道可具有任何適合之維度，允許足夠大的表面積及/或體積用於本發明之各種實施例。在一個態樣中，微通道之體積適宜較大，使得沈積於微通道中之液滴中的試劑在寡核苷酸合成期間未完全耗盡。在此等態樣中，除其他之外，孔結構之體積可支配可合成寡核苷酸之時段或密度。

解析基因座中之每一者可具有任何適合之區域用於根據本文所述之本發明之各種實施例進行反應。在一些情況下，複數個解析基因座可佔據基板總表面積之任何適合之百分比。在一些情況下，解析基因座之面積可為建構於基板中之微通道或微孔之截面積。在一些實施例中，複數個微結構或解析基因座直接可佔據基板表面之約、至少約或小於約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%或95%。在一些實施例中，複數個解析基因座可佔據約、至少約或小於約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或300000 mm^2以上之總面積。

建構於基板中之微結構可包含微通道或微孔，其中該等微結構自基板之頂部表面或底部表面起始且在一些情況下，流體連接至通常相對的表面(例如底部或頂部)。術語「頂部」及「底部」不必涉及在任何給定時間基板相對於重力之位置，而是一般出於便利性及清晰性使用。微通道或微孔可具有任何適合之深度或長度。在一些情況下，微通道或微孔之深度或長度自基板表面(及/或固體支撐物之底部)至固體支撐物之頂部來量測。在一些情況下，微通道或微孔之深度或長度大致等於固體支撐物之厚度。在一些實施例中，微通道或微孔為約、小於約或大於約1微米(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或500 μm深或長。微通道或微孔可具有適合於本文所述之本發明實施例之任何周邊長度。在一些情況下，微通道或微孔之周邊作為截面積(例如垂直於穿過該微通道或微孔之流體流動方向之截面積)的周邊加以量測。在一些實施例中，微通道或微孔之周邊為約、小於約或至少約1微米(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或500 μm。在一些實施例中，微通道或微孔之標稱弧長密度可具有每μm^2平面基板面積任何適合之弧長。如本文所述，弧長密度係指微通道或微孔之截面周邊的長度/平面基板表面積。舉例而言(但不限於)，微通道或微孔之標稱弧長密度可為至少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 $\mu m/\mu m^2$或1 $\mu m/\mu m^2$以上。在一些實施例中，微通道或微孔之標稱弧長密度可為0.036 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道或微孔之標稱弧長密度可為至少0.001 $\mu m/\mu m^2$。在一些實施例中，微通道或微孔之標稱弧長密度可為至少0.01 $\mu m/\mu m^2$。另外，可使適合於本文所述之反應(例如穿過具有適合之部分的表面塗層)的微通道或微孔之標稱表面積最大化。如本文所述用適合之部分塗佈之微通道或微孔的表面積可有助於寡核苷酸附接至表面。在一些實施例中，適合於本文所述之反應(諸如寡核苷酸合成)的微通道或微孔的標稱表面積為至少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或5 μm^2平面基板面積。

微通道或微孔可具有適合於本文所述之方法及組合物的任何體積。在一些實施例中，微通道或微孔之體積小於約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或950皮升(pl)、小於約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或990奈升(nl)、小於約0.5微升(μl)、小於約1 μl、小於約1.5 μl、小於約2 μl、小於約2.5 μl、小於約3 μl、小於約3.5 μl、小於約4 μl、小於約4.5 μl、小於約5 μl、小於約5.5 μl、小於約6 μl、小於約6.5 μl、小於約7 μl、小於約7.5 μl、小於約8 μl、小於約8.5 μl、小於約9 μl、小於約9.5 μl、小於約10 μl、小於約11 μl、小於約12 μl、小於約13 μl、小於約14 μl、小於約15 μl、小於約16 μl、小於約17 μl、小於約18 μl、小於約19 μl、小於約20 μl、小於約25 μl、小於約30 μl、小於約35 μl、小於約40 μl、小於約45 μl、小於約50 μl、小於約55 μl、小於約60 μl、小於約65 μl、小於約70 μl、小於約75 μl、小於約80 μl、小於約85 μl、小於約90 μl、小於約95 μl或小於約100 μl。在一些實施例中，微通道或微孔之體積等於或大於約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或950皮升(pl)、等於或大於約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或990奈升(nl)、等於或大於約0.5微升(μl)、約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或約100 μl。

微通道或微孔可具有小於1之縱橫比。如本文所用，術語「縱橫比」係指通道之寬度與通道之深度的比率。因此，縱橫比小於1之通道深度大於寬度，而縱橫比大於1之通道寬度大於深度。在一些態樣中，微通道或微孔之縱橫比可小於或等於約0.5、約0.2、約0.1、約0.05或0.05以下。在一些實施例中，微通道或微孔之縱橫比可為約0.1。在一些實施例中，微通道或通道之縱橫比可為約0.05。本文所述之微結構，例如縱橫比小於1、0.1或0.05之微通道或微孔，可包括具有一、二、三、四、五、六個或六個以上角落、轉彎及類似物的通道。關於特定解析基因座內所含之所有微通道或微孔，例如一或多個相交通道、一些此等通道、單個通道及甚至一或多個微通道或微孔之一部分或多個部分，本文所述之微結構可包括所述縱橫比，例如，小於1、0.1或0.05。製造具有低縱橫比之微通道的其他設計及方法描述於美國專利第5,842,787號，其以引用的方式併入本文中。

具有複數個解析基因座之基板上的微結構(諸如微通道或微孔)可藉由本文所述或另外此項技術中已知的任何方法(例如微製造方法)來製造。可用於製造本文所揭示之基板的微製造方法包括(但不限於)微影；蝕刻技術，諸如濕式化學、乾式及光阻移除；微機電(MEMS)技術，包括微流體/

晶片實驗室、光學MEMS(亦稱為MOEMS)、RF MEMS、PowerMEMS及BioMEMS技術及深反應性離子蝕刻(DRIE)；奈機電(NEMS)技術；矽之熱氧化；電鍍及無電極電鍍；擴散方法，諸如硼、磷、砷及銻擴散；離子植入；膜沈積，諸如蒸發(長絲、電子束、閃蒸及遮蔽及步階覆蓋)、濺鍍、化學氣相沈積(CVD)、磊晶(氣相、液相及分子束)、電鍍、網板印刷及層壓。一般參見Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988)；Runyan等人, 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 編, Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997)。

在一個態樣中，具有複數個解析基因座之基板可使用此項技術中已知之任何方法來製造。在一些實施例中，具有複數個解析基因座之基板的材料可為半導體基板，諸如二氧化矽。基板之材料亦可為其他化合物III-V或II-VI材料，諸如砷化鎵(GaAs)，一種經由柴氏方法(Czochralski process)產生之半導體(Grovenor, C. (1989). *Microelectronic Materials*. CRC Press. 第113-123頁)。材料可呈現硬的平坦表面，向與其表面接觸之溶液展現反應性氧化(-OH)基團的均一覆蓋。此等氧化基團可為後續矽烷化方法之附接點。或者，親脂性及疏水性表面材料可模擬氧化矽之蝕刻特徵來沈積。氮化矽及碳化矽表面亦可用於根據本發明之各種實施例製造適合之基板。

在一些實施例中，鈍化層可沈積於基板上，其可能具有或可能不具有反應性氧化基團。鈍化層可包含氮化矽(Si_3N_4)或聚醯胺。在一些情況下，光刻步驟可用以界定鈍化層上形成解析基因座之區域。

產生具有複數個解析基因座之基板的方法可由基板起始。基板(例如矽)可具有任何數目之層安置在上面，包括(但不限於)導電層，諸如金屬。在一些情況下，導電層可為鋁。在一些情況下，基板可具有保護層(例如氮化鈦)。在一些情況下，基板可具有高表面能化學層。各層可藉助於各種沈積技術沈積，諸如化學氣相沈積(CVD)、原子層沈積(ALD)、電漿增強CVD (PECVD)、電漿增強ALD (PEALD)、金屬有機CVD (MOCVD)、熱絲CVD (HWCVD)、引發CVD (iCVD)、改良CVD (MCVD)、氣相軸向沈積(VAD)、外部氣相沈積(OVD)及物理氣相沈積(例如濺鍍沈積、蒸發沈積)。

在一些情況下，氧化物層沈積於基板上。在一些情況下，氧化物層可包含二氧化矽。二氧化矽可使用正矽酸四乙酯(TEOS)、高密度電漿(HDP)或其任何組合來沈積。

在一些情況下，二氧化矽可使用低溫技術沈積。在一些情況下，該方法為氧化矽之低溫化學氣相沈積。溫度一般足夠低，使得晶片上預先存在之金屬未受破壞。沈積溫度可為約50℃、約100℃、約150℃、約200℃、約250℃、約300℃、約350℃及其類似溫度。在一些實施例中，沈積溫度低於約50℃、低於約100℃、低於約150℃、低於約200℃、低於約250℃、低於約300℃、低於約350℃及其類似溫度。沈積可在任何適合之壓力下進行。在一些情況下，沈積方法使用RF電漿能。

在一些情況下，氧化物藉由乾式熱生長氧化程序(例如可使用接近或

超過1,000℃之溫度的彼等程序)沈積。在一些情況下，氧化矽藉由濕式蒸氣方法產生。

二氧化矽可沈積至適合於製造在本文別處進一步詳述之適合微結構的厚度。

二氧化矽可沈積至任何適合之厚度。在一些實施例中，二氧化矽層之厚度可為至少或至少約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或500 nm、1 μm、1.1 μm、1.2 μm、1.3 μm、1.4 μm、1.5 μm、1.6 μm、1.7 μm、1.8 μm、1.9 μm、2.0 μm或2.0 μm以上。二氧化矽層之厚度可為至多或至多約2.0 μm、1.9 μm、1.8 μm、1.7 μm、1.6 μm、1.5 μm、1.4 μm、1.3 μm、1.2 μm、1.1 μm、1.0 μm、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、5nm、4 nm、3 nm、2 nm、1 nm或1 nm以下。二氧化矽層之厚度可在1.0 nm-2.0 μm、1.1-1.9 μm、1.2-1.8 nm、1.3-1.7 μm、1.4-1.6 μm之間。熟習此項技術者應瞭解，二氧化矽層之厚度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如(1.5-1.9 μm)。二氧化矽之厚度可在由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。解析基因座(例如微通道或微孔)可使用此項技術中已知的各種製造技術在二氧化矽基板中形成。此類技術可包括半導體製造技術。在一些情況

下，解析基因座使用光刻技術形成，諸如半導體產業中所用之彼等光刻技術。舉例而言，光阻(例如當暴露於電磁輻射時改變特性之材料)可(例如藉由旋塗晶圓)在二氧化矽上塗佈至任何適合之厚度。包括光阻之基板可暴露於電磁輻射源。遮罩可用以遮蔽光阻部分免受輻射以便界定解析基因座之區域。光阻可為負性抗蝕劑或正性抗蝕劑(例如解析基因座之區域可暴露於電磁輻射或除解析基因座以外之區域可暴露於電磁輻射，如由遮罩所界定)。上覆欲形成解析基因座之位置的區域暴露於電磁輻射以界定對應於二氧化矽層中解析基因座之位置及分佈的圖案。光阻可經由界定對應於解析基因座之圖案之遮罩暴露於電磁輻射。接著，光阻之暴露部分可例如藉助於洗滌操作(例如去離子水)來移除。遮罩之移除部分可接著暴露於化學蝕刻劑以蝕刻基板且將解析基因座之圖案轉移至二氧化矽層中。蝕刻劑可包括酸，諸如硫酸(H_2SO_4)。二氧化矽層可以各向異性的方式蝕刻。使用本文所述之方法，高各向異性製造方法(諸如DRIE)可應用於在基板上或基板內製造微結構，諸如包含合成基因座之微孔或微通道，其中側壁偏離相對於基板表面之垂直線小於約±3°、2°、1°、0.5°、0.1°或0.1°以下。可實現小於約10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.1 μm或0.1 μm以下之底切值，產生高度均一的微結構。

各種蝕刻程序可用以在欲形成解析基因座之區域蝕刻二氧化矽。蝕刻可為各向同性蝕刻(亦即，僅一個方向之蝕刻速率實質上等於沿著正交方向之蝕刻速率)、或各向異性蝕刻(亦即，沿著一個方向之蝕刻速率小於僅正交方向之蝕刻速率)或其變化形式。蝕刻技術可為濕式矽蝕刻(諸如KOH、TMAH、EDP及其類似物)及乾式電漿蝕刻(例如DRIE)兩者。兩者可用於經由互連件蝕刻微結構晶圓。

在一些情況下，各向異性蝕刻移除解析基因座之大部分體積。可移除任何適合百分比之解析基因座體積，包括約60%、約70%、約80%、約90%或約95%。在一些情況下，在各向異性蝕刻中移除至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%或至少約95%之材料。在一些情況下，在各向異性蝕刻中移除至多約60%、至多約70%、至多約80%、至多約90%或至多約95%之材料。在一些實施例中，各向異性蝕刻在貫穿基板之所有通路不移除二氧化矽材料。根據一些實施例，各向同性蝕刻用於在貫穿基板之所有通路移除材料形成洞。

在一些情況下，孔使用光刻步驟蝕刻以界定解析基因座，隨後使用混合乾式-濕式蝕刻。光刻步驟可包含用光阻塗佈二氧化矽及使該光阻經由一個具有界定解析基因座之圖案之遮罩(或光罩)暴露於電磁輻射。在一些情況下，混合乾式-濕式蝕刻包含：(a)乾式蝕刻以移除光刻步驟在光阻中界定之解析基因座區域中的大多數二氧化矽；(b)清潔基板；及(c)濕式蝕刻以自解析基因座之區域中之基板移除剩餘二氧化矽。

基板可藉助於電漿蝕刻化學或暴露於氧化劑(諸如H_2O_2、O_2、O_3、H_2SO_4或其組合，諸如H_2O_2及H_2SO_4之組合)清潔。清潔可包含移除殘餘聚合物、移除可阻斷濕式蝕刻之材料，或其組合。在一些情況下，清潔為電漿清潔。清潔步驟可進行任何適合時段(例如15至20秒)。在一個實例中，清潔可用Applied Materials eMAx-CT機在100 mT、200 W、20G、20 O_2之設定下進行20秒。

乾式蝕刻可為各向異性蝕刻，實質上垂直(例如朝向基板)而不側向蝕刻或實質上側向(例如平行於基板)蝕刻。在一些情況下，乾式蝕刻包含用基於氟之蝕刻劑，諸如CF_4、CHF_3、C_2F_6、C_3F_6或其任何組合蝕刻。在一

種情況下，用具有100 mT、1000 W、20G及50 CF4之設定的Applied Materials eMax-CT機進行蝕刻400秒。本文所述之基板可由深反應性離子蝕刻法(DRIE)蝕刻。DRIE為高度各向異性蝕刻方法，用於晶圓/基板中形成深穿透、陡邊洞及溝槽，通常具有高縱橫比。基板可使用高速率DRIE之兩種主要技術蝕刻：低溫及Bosch。應用DRIE之方法描述於美國專利第5501893號，其以全文引用的方式併入本文中。

濕式蝕刻可為各向同性蝕刻，在所有方向移除材料。在一些情況下，濕式蝕刻底切光阻。底切光阻可使得光阻較易在稍後步驟中移除(例如光阻「剝離(lift off)」)。在一個實施例中，濕式蝕刻為緩衝氧化物蝕刻(BOE)。在一些情況下，濕式氧化物蝕刻在室溫基於氫氟酸進行，其可經緩衝(例如用氟化銨)以減緩蝕刻速率。蝕刻速率可視所蝕刻之膜及HF及/或NH_4F之特定濃度而定。完全移除氧化物層所需的蝕刻時間通常憑經驗決定。在一個實例中，蝕刻在22℃用15:1 BOE (緩衝氧化物蝕刻)進行。

可蝕刻二氧化矽層直至下伏材料層。舉例而言，可蝕刻二氧化矽層直至氮化鈦層。

在一個態樣中，製備具有複數個解析基因座之基板的方法包含使用以下步驟將諸如微孔或微通道之解析基因座蝕刻於基板(諸如包含上面塗佈之二氧化矽層的矽基板)中：(a)光刻步驟以界定解析基因座；(b)乾式蝕刻以移除由光刻步驟所界定之解析基因座區域中的大部分二氧化矽；及(c)濕式蝕刻以在解析基因座區域中自基板移除剩餘二氧化矽。在一些情況下，該方法另外包含移除殘餘聚合物、移除可阻斷濕式蝕刻之材料或其組合。該方法可包括電漿清潔步驟。

在一些實施例中，在一些情況下，光阻在光刻步驟或混合濕式-乾式

蝕刻後未自二氧化矽移除。保留光阻可用以在稍後步驟中引導金屬選擇性進入解析基因座而非在二氧化矽層之上表面上。在一些情況下，基板用金屬(例如鋁)塗佈且濕式蝕刻不移除金屬上之某些組分，例如保護金屬免受腐蝕之彼等組分(例如氮化鈦(TiN))。然而，在一些情況下，光阻層可諸如藉助於化學機械平坦化(CMP)移除。

基板之差異性官能化

如本文所述，表面(例如矽晶圓表面)之官能化可係指藉由將化學物質沈積於表面上使材料之表面特性改質的任何方法。用於達成官能化之常用方法為藉由化學氣相沈積來沈積有機矽烷分子。其亦可在濕式矽烷化方法中進行。

差異性官能化亦通常稱為「選擇性區域沈積」或「選擇性區域官能化」，可係指在單體結構上產生兩個或兩個以上不同區域之任何方法，當時至少一個區域具有與相同結構上之其他區域不同的表面或化學特性。特性包括(但不限於)化學部分之表面能、化學封端、表面濃度等。不同區域可為鄰接的。

主動官能化可係指表面之官能化會參與一些下游生產步驟，諸如DNA合成、或DNA或蛋白質結合。因此，如本文別處所述或另外此項技術中已知的適合官能化方法經選擇以使得特定下游生產步驟在表面上發生。

被動官能化可係指表面之官能化會致使彼等區域在主動區域之原理功能下無效。舉例而言，若主動官能化經設計以結合DNA，則被動官能化區域不會結合DNA。

光阻通常係指諸如光刻之標準工業方法中常用於形成圖案化塗層之

感光材料。其以液體形式施用，但隨著混合物中之揮發性溶劑蒸發而在基板上固化。其可在旋塗方法中以薄膜(1 μm至100 μm)形式施用於平面基板。其可藉由使其經由遮罩或光罩曝露於光，改變其在顯影劑中之溶解速率而圖案化。其可為「正性」(曝光增加溶解)或「負性」(曝光降低溶解)。其可用作犧牲層，充當改質下伏基板之後續步驟(諸如蝕刻)之阻擋層。在改質完成後，移除抗蝕劑。

光刻可係指用於使基板圖案化之方法。常用基礎方法包含1)施用光阻至基板，2)使抗蝕劑經由在一些區域不透明且在其他區域透明的二元遮罩曝露於光，且隨後3)使抗蝕劑顯影，導致基於曝露區域使抗蝕劑圖案化。在顯影後，圖案化抗蝕劑充當諸如蝕刻、離子植入或沈積之後續加工步驟的遮罩。在加工步驟後，抗蝕劑通常例如經由電漿剝除或濕式化學移除來移除。

在各種實施例中，採用使用光阻之方法，其中光阻有助於製造具有差異性官能化之基板。

根據本發明之各種實施例，一系列製造步驟可形成差異性官能化方法之基礎，其中個別步驟可經修改、移除或補充有額外步驟以在表面上達成所需官能化圖案。第一，目標表面之初始製備可例如藉由化學清潔來實現且可包括初始主動或被動表面官能化。

第二，光阻之施用可藉由各種不同技術來實現。在各種實施例中，抗蝕劑流入結構之不同部分由結構之設計來加以控制，例如藉由利用流體在結構不同點(諸如在陡階邊緣)之本質釘紮特性。在抗蝕劑之輸送溶劑蒸發後，光阻保留在固體膜後。

第三，光刻可視情況用於移除基板某些特定區域之抗蝕劑以使得彼

等區域可經進一步改質。

第四，電漿除渣，一種通常使用例如氧電漿之短電漿清潔步驟，可用於幫助移除抗蝕劑清除區域之任何殘餘有機污染物。

第五，表面可經官能化，而抗蝕劑覆蓋之區域受任何主動或被動官能化保護。本文所述或此項技術中已知之改變表面化學特性之任何適合的方法可用於使表面官能化，例如有機矽烷之化學氣相沈積。通常，此導致官能化物質之自組裝單層(SAM)的沈積。

第六，抗蝕劑可例如藉由將其溶解於適合之有機溶劑、電漿蝕刻、暴露及顯影等而剝除及移除，由此暴露已由抗蝕劑覆蓋之基板區域。在一些實施例中，選擇不會移除官能化基團或另外損壞官能化表面之方法用於抗蝕劑剝除。

第七，可視情況進行涉及主動或被動官能化之第二官能化步驟。在一些實施例中，藉由第一官能化步驟官能化之區域阻斷第二官能化步驟所用官能基之沈積。

在各種實施例中，差異性官能化有助於晶片上合成DNA之區域的空間控制。在一些實施例中，差異性官能化提供改良的可撓性以控制晶片之流體特性。在一些實施例中，因而藉由差異性官能化改良將寡核苷酸自寡核苷酸合成裝置轉移至奈米孔裝置的方法。在一些實施例中，差異性官能化用於裝置(例如奈米反應器或寡核苷酸合成裝置)之製造，其中孔壁或通道壁相對親水，如本文別處所述，且外部表面相對疏水，如本文別處所述。

圖36圖示根據本發明之各種實施例差異性官能化在微流體裝置上之例示性應用。主動及被動官能化區域著不同色作為指示。詳言之，第一通

道(通孔)及與其連接形成所謂旋轉器圖案之第二通道用於此等實例以三維圖示差異性官能化。除幫助控制抗蝕劑施用之數個準則之外，此等例示性基板內三維特徵之具體佈局很大程度上對於官能化方法而言並不重要。

圖37圖示用於產生圖37 B-D所圖示之差異性官能化圖案的例示性工作流程。因此，基板可首先例如使用強清潔性溶液清潔，隨後為O_2電漿暴露(圖37A)。光阻可施用於包埋第二通道之裝置層(亦稱旋轉器；圖37B)。光刻及/或電漿除渣步驟可用於使用適合之圖案遮罩在基板上產生所需圖案之光阻(圖37C)。遮罩圖案可變化以控制何處光阻保留且何處清除。可例如使用氟矽烷、烴矽烷或形成可鈍化表面之有機層的任何基團進行官能化步驟以在裝置上界定被動官能化區域(圖37D)。抗蝕劑可使用本文別處所述或另外此項技術中已知的適合方法剝除(圖37E)。在抗蝕劑移除後，可對暴露區域進行主動官能化，保留所需差異性官能化圖案(圖37F)。

在各種實施例中，本文所述之方法及組合物涉及光阻之施用以在選擇性區域產生經改質之表面特性，其中光阻之施用依賴於基板之流體特性界定光阻之空間分佈。在不受理論束縛的情況下，與施用流體相關之表面張力效應可界定光阻之流動。舉例而言，表面張力及/或毛細作用效應可有助於在抗蝕劑溶劑蒸發之前以受控制的方式抽取光阻至小結構中(圖38)。在一個實施例中，抗蝕劑接觸點藉由銳緣變得釘紮，由此控制流體之前進。下伏結構可基於所需流動圖案加以設計，該等圖案用於在製造及官能化方法期間施用光阻。在溶劑蒸發後保留在後面的固體有機層可用於繼續進行製造方法之後續步驟。

基板可經設計以藉由促進或抑制毛細效應控制流體流動進入鄰近流體路徑。舉例而言，圖39A圖示避免頂部與底部邊緣之間重疊的設計，其

有助於保持流體在頂部結構，允許抗蝕劑之特定安置。相比而言，圖39B圖示替代性設計，其中頂部及底部邊緣重疊，引起施用流體進入底部結構之毛細作用。可因此選擇適當設計，視抗蝕劑之所需施用而定。

圖40圖示根據圖40C所圖示之小圓盤光阻圖案經受抗蝕劑之裝置在光刻後的明視野(A)及暗視野(B)影像。

圖41圖示根據圖41C所圖示之完整圓盤光阻圖案經受抗蝕劑之裝置在光刻後的明視野(A)及暗視野(B)影像。

圖42圖示根據圖42C之圖案官能化之裝置在被動官能化及抗蝕劑剝除後的明視野(A)及暗視野(B)影像。

圖43圖示使用二甲基甲醯胺(DMSO)作為流體，根據圖43C之圖案，在明視野(A)及暗視野(B)影像中差異性官能化表面之不同流體特性。使用旋轉器內由疏水性區域圍繞之親水性表面來實現旋轉器之自發潤濕。

圖44圖示用於產生圖36F所圖示之差異性官能化圖案的另一例示性工作流程。因此，基板可首先例如使用強清潔性溶液清潔，隨後為O_2電漿暴露(圖44A)。可例如使用氟矽烷、烴矽烷或可形成可鈍化表面之有機層的任何基團進行官能化步驟以在裝置上界定被動官能化區域(圖44B)。光阻可施用於包埋第二通道之裝置層(亦稱旋轉器；圖44C)。光刻及/或蝕刻步驟可用於使用適合之圖案遮罩在基板上產生所需圖案之光阻(圖44D)。遮罩圖案可變化以控制何處光阻保留且何處清除。抗蝕劑可使用本文別處所述或另外此項技術中已知的適合方法剝除(圖44E)。在抗蝕劑移除後，可對暴露區域進行主動官能化，保留所需差異性官能化圖案(圖44F)。

在另一實施例中，官能化工作流程經設計以使得抗蝕劑自通孔(底部)側施用且流入通孔及旋轉器。可對外表面上之暴露區域進行官能化。抗蝕

劑可例如使用微影或蝕刻自裝置背(底部)側移除，允許在暴露區域主動官能化產生圖36E中所述之圖案。

在另一實施例中，可在通孔與旋轉器通道邊緣之間選擇重疊設計，如圖39B所示。抗蝕劑可自前(頂部)側施用，藉由毛細作用使流體進入通孔。被動官能化、抗蝕劑剝除、隨後主動官能化將使得圖36E所圖示之圖案產生。

包含實質上平坦的基板部分的例示性微流體裝置以圖式形式展示於圖25D中。圖式之截面展示於圖25E中。基板包含複數個叢集，其中每一叢集包含複數個分組之流體連接。每一分組包含複數個延伸自第一通道之第二通道。圖25A為包含高密度分組之叢集的裝置視圖。圖25C為圖25A之叢集的操作視圖。圖25B為圖25A之截面視圖。

分組之叢集可以任何數目之構形排列。在圖25A中，分組排列在偏移列中以形成環狀圖案叢集。圖25C描繪複數個此類叢集在例示性微流體裝置上之排列。在一些實施例中，個別叢集包含在內部形成凸集之個別叢集區內。在一些實施例中，個別叢集區彼此非重疊。個別叢集區可為環形或任何其他適合之多邊形，例如三角形、方形、矩形、平行四邊形、六邊形等。如由2503表示，三列分組之間的例示性距離可為約0.05 mm至約1.25 mm，如自每一分組之中心所量測。2、3、4、5列或5列以上分組之間的距離可為約或至少約0.05 mm、0.1 mm、0.15 mm、0.2 mm、0.25 mm、0.3 mm、0.35 mm、0.4 mm、0.45 mm、0.5 mm、0.55 mm、0.6 mm、0.65 mm、0.7 mm、0.75 mm、0.8 mm、0.9 mm、1 mm、1.1 mm、1.2 mm、1.2 mm或1.3 mm。2、3、4、5列或5列以上分組之間的距離可為約或至多約1.3 mm、1.2 mm、1.1 mm、1 mm、0.9 mm、0.8 mm、0.75

mm、0.65 mm、0.6 mm、0.55 mm、0.5 mm、0.45 mm、0.4 mm、0.35 mm、0.3 mm、0.25 mm、0.2 mm、0.15 mm、0.1 mm、0.05 mm或0.05 mm以下。2、3、4、5列或5列以上分組之間的距離可介於0.05-1.3 mm、0.1-1.2 mm、0.15-1.1 mm、0.2-1 mm、0.25-0.9 mm、0.3-0.8 mm、0.35-0.8 mm、0.4-0.7 mm、0.45-0.75 mm、0.5-0.6 mm、0.55-0.65 mm或0.6-0.65 mm之間。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.05 mm-0.8 mm。如藉由2506所示，一列分組中兩個分組之間的例示性距離可為約0.02 mm至約0.5 mm，如自每一分組之中心所量測。一列分組中兩個分組之間的距離可為約或至少約0.02 mm、0.04 mm、0.06 mm、0.08 mm、0.1 mm、0.12 mm、0.14 mm、0.16 mm、0.18 mm、0.2 mm、0.22 mm、0.24 mm、0.26 mm、0.28 mm、0.3 mm、0.32 mm、0.34 mm、0.36 mm、0.38 mm、0.4 mm、0.42 mm、0.44 mm、0.46 mm、0.48 mm或0.5 mm。一列分組中兩個分組之間的距離可為約或至多約0.5 mm、0.48 mm、0.46 mm、0.44 mm、0.42 mm、0.4 mm、0.38 mm、0.36 mm、0.34 mm、0.32 mm、0.3 mm、0.28 mm、0.26 mm、0.24 mm、0.22 mm、0.2 mm、0.18 mm、0.16 mm、0.14 mm、0.12 mm、0.1 mm、0.08 mm、0.06 mm、0.04 mm或0.2 mm或0.2 mm以下。兩個分組之間的距離可介於0.02-0.5 mm、0.04-0.4 mm、0.06-0.3 mm或0.08-0.2 mm之間。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.04 mm-0.2 mm。

每一分組之第一及第二通道的長度及寬度可根據實驗性條件而經最佳化。在一些實施例中，分組中第一通道之截面由2504表示，為約或至少約0.01 mm、0.015 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、0.085 mm、0.09 mm、0.1 mm、0.15 mm、0.2 mm、0.25 mm、0.3 mm、0.35 mm、0.4 mm、0.45 mm或0.5 mm。在一些實施例中，分組中第一通道之截面為約或至多約0.5 mm、0.45 mm、0.4 mm、0.35 mm、0.3 mm、0.25 mm、0.2 mm、0.15 mm、0.1 mm、0.09 mm、0.085 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、0.015 mm或0.01 mm或0.01 mm以下。分組中第一通道之截面可介於0.01-0.5 mm、0.02-0.45 mm、0.03-0.4 mm、0.04-0.35 mm、0.05-0.3 mm、0.06-0.25或0.07-0.2 mm之間。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.04 mm-0.2 mm。在一些實施例中，分組中第二通道之截面由2505表示，為約或至少約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或0.08 mm。在一些實施例中，分組中第二通道之截面為約或至多約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或0.001 mm以下。分組中第二通道之截面可介於0.001-0.08 mm、0.004-0.07 mm、0.008-0.06 mm、0.01-0.05 mm、0.015-0.04 mm、0.018-0.03 mm或0.02-0.025

mm之間。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.008 mm-0.04 mm。圖25B描繪包含一列11個分組之叢集的例示性截面。在一些實施例中，每一分組中第二通道之高度為約或至少約0.005 mm、0.008 mm、0.01 mm、0.015 mm、0.02 mm、0.025 mm、0.03 mm、0.04 mm、0.05 mm、0.06 mm、0.07 mm、0.08 mm、0.1 mm、0.12 mm、0.14 mm、0.16 mm、0.18 mm或0.2 mm長。在一些實施例中，在每一分組中展示為2501之第二通道的高度為約或至多約0.2 mm、0.18 mm、0.16 mm、0.14 mm、0.12 mm、0.1 mm、0.08 mm、0.07 mm、0.06 mm、0.05 mm、0.04 mm、0.03 mm、0.025 mm、0.02 mm、0.015 mm、0.01 mm、0.008 mm或0.005 mm長。每一分組中第二通道之高度可介於0.005-0.2 mm、0.008-.018 mm、0.01-0.16 mm、0.015-0.1 mm、0.02-0.08 mm或0.025-0.04 mm之間。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.01 mm-0.04 mm。在一些實施例中，每一分組內第一通道之高度展示為2502，為約或至多約5 mm、4.5 mm、4 mm、3.5 mm、3 mm、2.5 mm、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或0.05 mm。在一些實施例中，每一分組內第一通道之高度展示為2502，為約或至少約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或5 mm。每一分組內第一通道之高度可介於0.05-5

mm、0.075-4 mm、0.1-3 mm、0.15-2 mm、0.2-1 mm或0.3-0.8 mm之間。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 mm-1 mm。

分組之叢集可以適合於置放在微流體裝置之實質上平坦的基板部分的單個反應孔中的構形排列，如圖25D所示。圖25D為包含108個反應孔之微流體裝置之實質上平坦的基板部分的圖式，其中每一反應孔包含複數個分組。基板可包含任何數目之孔，包括(但不限於)在約2與約250之間的任何數目。在一些實施例中，孔數包括約2至約225個孔、約2至約200個孔、約2至約175個孔、約2至約150個孔、約2至約125個孔、約2至約100個孔、約2至約75個孔、約2至約50個孔、約2至約25個孔、約25至約250個孔、約50至約250個孔、約75至約250個孔、約100至約250個孔、約125至約250個孔、約150至約250個孔、約175至約250個孔、約200至約250個孔或約225至約250個孔。熟習此項技術者瞭解孔數可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如25-125。此外，每一孔可包含任何數目分組之叢集，包括(但不限於)在約2與約250個分組之間的任何數目。在一些實施例中，叢集包含約2至約225個分組、約2至約200個分組、約2至約175個分組、約2至約150個分組、約2至約125個分組、約2至約100個分組、約2至約75個分組、約2至約50個分組、約2至約25個分組、約25至約250個分組、約50至約250個分組、約75至約250個分組、約100至約250個分組、約125至約250個分組、約150至約250個分組、約175至約250個分組、約200至約250個分組或約225至約250個分組。熟習此項技術者瞭解分組之數目可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如25-125。舉例而言，圖25D所展示之基板之108個孔中之每一者可包含圖25A所展示之109

個分組之叢集，導致微流體裝置之實質上平坦的基板部分中存在11,772個分組。

圖25D包括由0,0 (X,Y)軸指示之參考原點，繪製在微流體裝置之例示性實質上平坦的基板部分的左下角中。在一些實施例中，實質上平坦的基板的寬度表示為2508，為沿著一個維度之約5 mm至約150 mm，如自原點所量測。在一些實施例中，實質上平坦的基板的寬度表示為2519，為沿著另一維度之約5 mm至約150 mm，如自原點所量測。在一些實施例中，基板在任何維度之寬度為約5 mm至約125 mm、約5 mm至約100 mm、約5 mm至約75 mm、約5 mm至約50 mm、約5 mm至約25 mm、約25 mm至約150 mm、約50 mm至約150 mm、約75 mm至約150 mm、約100 mm至約150 mm或約125 mm至約150 mm。熟習此項技術者瞭解寬度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如25-100 mm。圖25D所展示之實質上平坦的基板部分包含108個叢集之分組。叢集可以任何組態排列。在圖25D中，叢集成列排列形成正方形。不管排列，叢集可在距原點約0.1 mm至約149 mm之距離處起始，如在X軸或Y軸上所量測。長度2518及2509分別表示在X軸及Y軸上叢集中心之最遠距離。長度2517及2512分別表示在X軸及Y軸上叢集中心之最近距離。在一些實施例中，叢集經排列以使得在兩個叢集之間存在重複距離。如由2507及2522所示，兩個叢集之間的距離可相隔約0.3 mm至約9 mm。在一些實施例中，兩個叢集之間的距離為約或至少約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或9 mm。在一些實施例中，兩個叢集之間的距離為約或至多約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或0.3 mm。兩個叢集之間的距離可介於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或0.9-2 mm之間。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.8 mm-2 mm。

基準標誌可置於本文所述之微流體裝置上以有助於此類裝置與系統其他組件對準。本發明之微流體裝置可具有一或多個基準標誌，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10個或10個以上基準標誌。圖25D所展示之例示性微流體裝置之實質上平坦的基板部分包含三個基準標誌，用於使裝置與系統其他組件對準。基準標誌可位於微流體裝置之實質上平坦的基板部分內的任何位置。如由2513及2516所示，基準標誌可位於原點附近，其中該基準標誌比任何一個叢集更接近於原點。在一些實施例中，基準標誌位於基板部分之邊緣附近，如由2511及2521所示，其中距邊緣之距離分別由2510及2520指示。基準標誌可位於距基板部分之邊緣約0.1 mm至約10 mm。在一些實施例中，基準標誌位於距基板部分之邊緣約或至少約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或10 mm。在一些實施例中，基準標誌位於距基板部分約或至多約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或0.1 mm。基準標誌可位於距基板邊緣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或0.5-2 mm。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 mm-5 mm。基準標誌可位於叢集近距離處，其中例示性X軸及Y軸距離分別由2515及2514指示。在一些實施例中，叢集與基準標誌之間的距離為約或至少約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或8 mm。在一些實施例中，叢集與基準標誌之間的距離為約或至多約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或0.001 mm。叢集與基準標誌之間的距離可在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或0.8-1.7 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.5-2 mm。

圖25E描繪圖25D所展示之例示性微流體裝置之實質上平坦的基板部分的截面。截面展示一列11個分組，各包含分組之叢集，其中每一分組包含複數個延伸自第一通道之第二通道。如由2523所例示，分組之總長度可為約0.05 mm至約5 mm長。在一些實施例中，分組之總長度為約或至少約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或5 mm。在一些實施例中，分組之總長度為約或至多約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或0.05 mm或0.05 mm以下。分組之總長度可在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或0.3-0.7 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1-0.7 mm。在一些實施例中，微流體裝置可具有標記或連續標記之位置，如圖25F所例示，描繪微流體裝置中叢集之例示性佈局。標記可位於基板邊緣附近，如由距離2603所例示。在一些實施例中，標記位於距基板邊緣約0.1 mm至約10 mm。在一些實施例中，標記位於距基板邊緣約或至少約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或10 mm。在一些實施例中，標記位於距基板邊緣約或至多約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或0.1 mm。距離可在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或1.5 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.5-2 mm。標記可在距原點約0.1 mm至約20 mm之位置處起始，如由2602所例示。標記可具有約1 mm至約32 mm之長度，如由2601所例示。

用於高質量寡核苷酸合成之具有大尺寸通孔的晶圓

在一些實施例中，本發明提供用於控制表面上寡核苷酸合成之流動及質量轉移路徑的方法及系統。本文中提供之系統及方法的優勢允許在寡核苷酸合成期間改良結構控制及平均分佈質量轉移路徑、化學暴露時間及洗滌功效的程度。另外，本文所述之方法及系統允許增加清掃功效，諸如藉由為生長寡核苷酸提供充足體積，使得生長寡核苷酸之排斥體積不佔據可用於或適合於生長寡核苷酸之最初可用體積的超過50、45、40、35、30、25、20、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1%或1%以下。此外，本文所述之方法及系統允許足夠結構用於寡聚物生長超出80聚體至100、120、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500聚體或500聚體以上。

因此，本文所述之方法及系統提供解決方案以實現此等優勢，諸如小型並行過道之集合。諸如小通孔之結構可用於饋入較小結構，諸如「旋轉器圖案」中發現之彼等結構(圖56B)。在內表面上具有低表面能表面之結構可致使氣體懸掛於壁上。氣泡在寡核苷酸合成循環或用於基因組裝之後續水性步驟期間可能妨礙流動速率及流動均一性。因此，適合於寡核苷酸合成之結構可包含如本文別處所述表面能增加的表面。

在一些實施例中，本發明之方法及系統採用矽晶圓方法製造用於寡

核苷酸合成之基板。此類基板可具有一系列經由沈積裝置(諸如噴墨)可獲得材料沈積之位點。根據本發明之各種實施例製造之基板可支持貫穿其平面之複數個此類位點中共有的泛溢化學步驟。在各種實施例中，裝置允許水性試劑注射及彙集於大凹陷中(圖61)。

在各種實施例中，具有大通孔的此類寡核苷酸合成裝置在標準絕緣體上矽(SOI)矽晶圓上形成。寡核苷酸合成裝置之總寬度可為至少或至少約10微米(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或1000 μm以上。寡核苷酸合成裝置之總寬度可為至多或至多約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或10 μm以下。寡核苷酸合成裝置之總寬度可在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- 550μm、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或90-95 μm之間。熟習此項技術者瞭解寡核苷酸合成裝置之總寬度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如20-80 μm。寡核苷酸裝置之總寬度可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。其可細分成操作層及裝置層。裝置之全部或部分可用二氧化矽層覆蓋。二氧化矽層之厚度可為至少或至少約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 μm、1.1 μm、1.2 μm、1.3 μm、1.4 μm、1.5 μm、1.6 μm、1.7 μm、1.8 μm、1.9 μm、2.0 μm或2.0 μm以上。二氧化矽層之厚度可為至多或至多約2.0 μm、1.9 μm、1.8 μm、1.7 μm、1.6 μm、1.5 μm、1.4 μm、1.3 μm、1.2 μm、1.1 μm、1.0 μm、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、5nm、4 nm、3 nm、2 nm、1 nm或1 nm以下。二氧化矽層之厚度可在1.0 nm-2.0 μm、1.1-1.9 μm、1.2-1.8 nm、1.3-1.7 μm、1.4-1.6 μm之間。熟習此項技術者應瞭解，二氧化矽層之厚度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如(1.5-1.9 μm)。二氧化矽之厚度可在由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。

裝置層可包含複數個適合於寡核苷酸生長之結構，如本文別處所述，諸如複數個小洞(圖61)。裝置層之厚度可為至少或至少約1微米(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、200 μm、300 μm、400 μm、500 μm或500 μm以上。裝置層之厚度可為至多或至多約500 μm、400 μm、300 μm、200 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、9 μm、8 μm、7 μm、6 μm、5 μm、4 μm、3 μm、2 μm、1 μm或1 μm以下。裝置層之厚度可在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之間。熟習此項技術者瞭解裝置層之厚度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如(20-60 μm)。裝置層之厚度可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。操作及/或裝置層可包含深部特徵。此類深部特徵可使用適合之MEMS技術來製造，諸如深反應性離子蝕刻。一系列蝕刻可用於構築所需裝置幾何結構。該等蝕刻中之一者可允許持續較長時間且穿透絕緣層。因此，可構築跨越裝置全部寬度之過道。此類過道可用於使流體自基板(諸如實質上平坦的基板)之一個表面通過至另一表面。

在一些實施例中，裝置層具有至少兩個且至多500個位點、至少2個至約250個位點、至少2個至約200個位點、至少2個至約175個位點、至少2個至約150個位點、至少2個至約125個位點、至少2個至約100個位點、至少2個至約75個位點、至少2個至約50個位點、至少2個至約25個位點或至少2個至約250個位點穿透裝置層。在一些實施例中，裝置層具有至少或至少約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或500個以上位點。熟習此項技術者瞭解穿透裝置層之位點的數目可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如75-150個位點。裝置層可為至少或至少約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厚或100 μm以上。裝置層可為至多或至多約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厚或1 μm以下。裝置層可具有在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之間的任何厚度。熟習此項技術者瞭解裝置層可具有可處於由任何此等值限定的任何範圍內的任何厚度，例如4-100

μm。

裝置層之厚度可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。操作層可具有較大區域蝕刻成鄰近裝置層特徵之晶圓。操作層之厚度可為至少或至少約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或1000 μm以上。操作層之厚度可為至多或至多約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或1 μm以下。操作層可具有在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、19-550μm、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或90-95 μm之間的任何厚度。熟

習此項技術者瞭解操作層之厚度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如20-350 μm。操作層之厚度處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。

操作層中之經蝕刻區域可形成嵌入基板中之孔狀結構。在一些實施例中，操作層內之經蝕刻區域之厚度可為至少或約至少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或1000 μm或1000 μm以上。操作層內之經蝕刻區域可具有至多或約至多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或100 μm以下之任何厚度。操作層內經蝕刻區域可具有在100-1000 μm、101-950 μm、102-900 μm、103-850 μm、104-800 μm、105-750 μm、106-700 μm、105-650 μm、106-600 μm、107-550 μm、108-500 μm、109-450 μm、110-400 μm、120-350 μm、130-300 μm、140-250 μm、150-200 μm、160-190 μm、170-180 μm之間的任何厚度。熟習此項技術者瞭解操作層之厚度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如200-300 μm。

操作層內經蝕刻區域之形狀可為矩形或曲線形。在一些實施例中，

操作層內大的經蝕刻區域允許在寡核苷酸合成循環期間及/或在寡核苷酸釋放(諸如寡核苷酸釋放進入氣相)期間自氣相至液相的容易轉變。

具有大表面積合成位點之基板

在各種實施例中，本文所述之方法及系統涉及用於合成高質量寡核苷酸之寡核苷酸合成裝置。合成可為並行的。舉例而言，可並行合成至少或約至少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個或100000個以上寡核苷酸。可並行合成之寡核苷酸總數可在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之間。熟習此項技術者瞭解並行合成之寡核苷酸總數可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如25-100。並行合成之寡核苷酸總數可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。裝置內合成之寡核苷酸的總莫耳質量或寡核苷酸中之每一者的莫耳質量可為至少或至少約10、20、30、40、50、100、250、500、750、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、25000、50000、75000、100000皮莫耳或100000皮莫耳以上。裝置內寡核苷酸中之每一者的長度或寡核苷酸之平均長度可為至少或約至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200、300、400、500個核苷酸或500個核苷酸以上。裝置內寡核苷酸中之每一者的長度或寡核苷酸之平均長度可為至多或約至多

500、400、300、200、150、100、50、45、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10個核苷酸或10個核苷酸以下。裝置內寡核苷酸中之每一者的長度或寡核苷酸之平均長度可處於10-500、9-400、11-300、12-200、13-150、14-100、15-50、16-45、17-40、18-35、19-25之間。熟習此項技術者瞭解裝置內寡核苷酸中之每一者的長度或寡核苷酸之平均長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如100-300。裝置內寡核苷酸中之每一者的長度或寡核苷酸之平均長度可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。

在各種實施例中，大表面積藉由構造如圖62所例示具有升高及/或降低特徵之基板表面來實現。升高或降低特徵可具有銳緣或圓邊且可具有任何所需幾何形狀之截面(寬度)，諸如矩形、環形等。其可沿著整個基板表面或其一部分形成通道。升高或降低特徵之縱橫比可為至少或約至少1:20、2:20、3:20、4:20、5:20、6:20、10:20、15:20、20:20、20:10、20:5、20:1或20:1以上。升高或降低特徵之縱橫比可為至多或約至多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或1:20以下。升高或降低特徵之縱橫比可處於1:20-20:1、2:20-20:5、3:20-20:10、4-20:20:15、5:20-20:20、6:20-20:20之間。熟習此項技術者瞭解升高或降低特徵之縱橫比可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如3:20-4:20。升高或降低特徵之縱橫比可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。

升高或降低特徵之截面可為至少或約至少10奈米(nm)、11 nm、12 nm、20 nm、30 nm、100 nm、500 nm、1000 nm、10000 nm、100000 nm、1000000 nm或1000000 nm以上。升高或降低特徵之截面可為至多或

約至多1000000 nm、100000 nm、10000 nm、1000 nm、500 nm、100 nm、30 nm、20 nm、12 nm、11 nm、10 nm或10 nm以下。升高或降低特徵之截面可處於10 nm-1000000 nm、11 nm-100000 nm、12 nm-10000 nm、20 nm-1000 nm、30 nm-500 nm之間。熟習此項技術者瞭解升高或降低特徵之截面可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如10 nm-100 nm。升高或降低特徵之截面可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。

升高或降低特徵之高度可為至少或約至少10奈米(nm)、11 nm、12 nm、20 nm、30 nm、100 nm、500 nm、1000 nm、10000 nm、100000 nm、1000000 nm或1000000 nm以上。升高或降低特徵之高度可為至多或約至多1000000奈米(nm)、100000 nm、10000 nm、1000 nm、500 nm、100 nm、30 nm、20 nm、12 nm、11 nm、10 nm或10 nm以下。升高或降低特徵之高度可處於10 nm-1000000 nm、11 nm-100000 nm、12 nm-10000 nm、20 nm-1000 nm、30 nm-500 nm之間。熟習此項技術者瞭解升高或降低特徵之高度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如100 nm-1000 nm。升高或降低特徵之高度可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。個別升高或降低特徵可與相鄰升高或降低特徵分隔至少或至少約5奈米(nm)、10 nm、11 nm、12 nm、20 nm、30 nm、100 nm、500 nm、1000 nm、10000 nm、100000 nm、1000000 nm或1000000 nm以上之距離。個別升高或降低特徵可與相鄰升高或降低特徵分隔至多或約至多1000000奈米(nm)、100000 nm、10000 nm、1000 nm、500 nm、100 nm、30 nm、20 nm、12 nm、11 nm、10 nm、5 nm或5 nm以下之距離。升高或降低特徵之高度可處於5-1000000 nm、10-

100000 nm、11-10000 nm、12-1000 nm、20-500 nm、30-100 nm之間。熟習此項技術者瞭解個別升高或降低特徵可與相鄰升高或降低特徵分隔一定距離，該距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如100-1000 nm。個別升高或降低特徵可與相鄰升高或降低特徵分隔一定距離，該距離處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。在一些實施例中，兩個升高或降低特徵之間的距離為升高或降低特徵之截面(寬度)或平均截面之至少或約至少0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0、10.0倍或10.0倍以上。兩個升高或降低特徵之間的距離為升高或降低特徵之截面(寬度)或平均截面之至多或約至多10.0、5.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.2、0.1倍或0.1倍以下。兩個升高或降低特徵之間的距離可在升高或降低特徵之截面(寬度)或平均截面的0.1-10、0.2-5.0、1.0-3.0倍之間。熟習此項技術者瞭解兩個升高或降低特徵之間的距離可在升高或降低特徵之截面(寬度)或平均截面之由任何此等值限定的任何範圍內的任何倍數之間，例如5-10倍。兩個升高或降低特徵之間的距離可在由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。

在一些實施例中，升高或降低特徵之群組彼此分離。升高或降低特徵之群組的周邊可由不同類型之結構特徵或差異性官能化來標誌。升高或降低特徵之群組可專用於合成單個寡核苷酸。升高或降低特徵之群組可跨越至少或約至少10 μm、11 μm、12 μm、13 μm、14 μm、15 μm、20 μm、50 μm、70 μm、90 μm、100 μm、150 μm、200 μm或更寬截面之區域。升高或降低特徵之群組可跨越至多或約至多200 μm、150 μm、100 μm、90 μm、70 μm、50 μm、20 μm、15 μm、14 μm、13 μm、12 μm、11 μm、10 μm或更窄截面之區域。升高或降低特徵之群組可跨越

10-200 μm、11-150 μm、12-100 μm、13-90 μm、14-70 μm、15-50 μm、13-20 μm寬截面之區域。熟習此項技術者瞭解升高或降低特徵之群組可跨越處於由任何此等值限定的任何範圍內的區域，例如12-200 μm。升高或降低特徵之群組可跨越處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內的區域。

在各種實施例中，基板上之升高或降低特徵使寡核苷酸合成之總可用面積增加至少或至少約1.1、1.2、1.3、1.4、2、5、10、50、100、200、500、1000倍或1000倍以上。基板上之升高或降低特徵使寡核苷酸合成之總可用面積增加1.1-1000、1.2-500、1.3-200、1.4-100、2-50、5-10倍。熟習此項技術者瞭解基板上之升高或降低特徵可使寡核苷酸合成之總可用面積增加由任何此等值限定的任何倍數，例如20-80倍。基板上之升高或降低特徵使寡核苷酸合成之總可用面積增加一定因數，該因數可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。

使用大寡核苷酸合成表面之本發明之方法及系統允許並行合成許多寡核苷酸，而核苷酸添加循環時間為至多或約至多20分鐘、15分鐘、14分鐘、13分鐘、12分鐘、11分鐘、10分鐘、1分鐘、40秒、30秒或30秒以下。使用大寡核苷酸合成表面之本發明之方法及系統允許並行合成許多寡核苷酸，而核苷酸添加循環時間在30秒-20分鐘、40秒-10分鐘、1分鐘-10分鐘之間。熟習此項技術者瞭解使用大寡核苷酸合成表面之本發明之方法及系統允許並行合成許多寡核苷酸，而核苷酸添加循環時間在任何此等值之間，例如30秒-10分鐘。使用大寡核苷酸合成表面之本發明之方法及系統允許並行合成許多寡核苷酸，而核苷酸添加循環時間可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍之間。

基板上合成之每一寡核苷酸、基板上合成之至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.5%以上之寡核苷酸、或基板平均之總體錯誤率或個別類型錯誤(諸如缺失、插入或取代)之錯誤率可為至多或至多約1:100、1:500、1:1000、1:10000、1:20000、1:30000、1:40000、1:50000、1:60000、1:70000、1:80000、1:90000、1:1000000或1:1000000以下。基板上合成之每一寡核苷酸、基板上合成之至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.5%以上之寡核苷酸、或基板平均之總體錯誤率或個別類型錯誤(諸如缺失、插入或取代)之錯誤率可處於1:100與1:10000之間、1:500與1:30000之間。熟習此項技術者瞭解基板上合成之每一寡核苷酸、基板上合成之至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.5%以上之寡核苷酸、或基板平均之總體錯誤率或個別類型錯誤(諸如缺失、插入或取代)之錯誤率可處於任何此等值之間，例如1:500與1:10000之間。基板上合成之每一寡核苷酸、基板上合成之至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.5%以上之寡核苷酸、或基板平均之總體錯誤率或個別類型錯誤(諸如缺失、插入或取代)之錯誤率可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍之間。

標準矽晶圓製程可用以形成會具有如上所述之大表面積及受控流動的基板，允許化學暴露之快速交換。可形成具有一系列具有足夠間隔之結構的寡核苷酸合成基板，以允許合成大於至少或約至少20聚體、25聚體、30聚體、50聚體、100聚體、200聚體、250聚體、300聚體、400聚

體、500聚體或500聚體以上之寡聚物鏈而不隨著寡核苷酸生長例如由於排斥體積效應而對總體通道或孔隙維度產生實質性影響。可形成具有一系列具有足夠間隔之結構的寡核苷酸合成基板，以允許合成大於至多或約至多500聚體、200聚體、100聚體、50聚體、30聚體、25聚體、20聚體或20聚體以下之寡聚物鏈而不隨著寡核苷酸生長例如由於排斥體積效應而對總體通道或孔隙維度產生實質性影響。可形成具有一系列具有足夠間隔之結構的寡核苷酸合成基板，以允許合成至少或至少約20聚體、50聚體、75聚體、100聚體、125聚體、150聚體、175聚體、200聚體、250聚體、300聚體、350聚體、400聚體、500聚體或500聚體以上之寡聚物鏈而不隨著寡核苷酸生長例如由於排斥體積效應而對總體通道或孔隙維度產生實質性影響。熟習此項技術者瞭解可形成具有一系列具有足夠間隔之結構的寡核苷酸合成基板，以允許合成大於任何此等值(例如20-300聚體、200聚體)之寡聚物鏈而不隨著寡核苷酸生長例如由於排斥體積效應而對總體通道或孔隙維度產生實質性影響。

圖62展示根據本發明之實施例具有結構陣列之例示性基板。特徵之間的距離可大於至少或約至少5 nm、10 nm、20 nm、100 nm、1000 nm、10000 nm、100000 nm、1000000 nm或1000000 nm以上。特徵之間的距離可大於至多或約至多1000000 nm、100000 nm、10000 nm、1000 nm、100 nm、20 nm、10 nm、5 nm或5 nm以下。特徵之間的距離可處於5-1000000 nm、10-100000 nm、20-10000 nm、100-1000 nm之間。熟習此項技術者瞭解特徵之間的距離可處於任何此等值之間，例如20-1000 nm。特徵之間的距離可處於由任何該等值充當範圍端點所界定的任何範圍之間。在一個實施例中，特徵之間的距離大於200 nm。特徵

可藉由在本文別處所述或另外此項技術中已知之任何適合之MEMS方法來形成，諸如採用定時反應性離子蝕刻方法之方法。此類半導體製造方法可通常形成小於200 nm、100 nm、50 nm、40 nm、30 nm、25 nm、20 nm、10 nm、5 nm或5 nm以下之特徵尺寸。熟習此項技術者瞭解小於200 nm之特徵尺寸可在任何此等值之間，例如20-100 nm。特徵尺寸可處於由任何此等值充當範圍端點所界定的任何範圍內。在一個實施例中，40 μm寬柱之陣列經蝕刻以30 μm深，其約使可用於合成之表面積加倍。

可隔離升高或降低特徵之陣列，允許胺基磷酸酯化學方法之材料沈積用於產生高度複雜及密集的庫。隔離可藉由較大結構或藉由表面之差異性官能化產生寡核苷酸合成之主動及被動區域來實現。或者，用於合成個別寡核苷酸之位置可藉由在一定條件下於表面形成可裂解及不可裂解寡核苷酸附接物之區域而彼此分隔。諸如噴墨印刷機之裝置可用於沈積試劑至個別寡核苷酸合成位置。差異性官能化亦可實現基板表面兩端疏水性的交替，由此產生可致使沈積試劑成珠或潤濕之水接觸角效應。採用較大結構可降低噴濺及個別寡核苷酸合成位置與相鄰點試劑之交叉污染。

反應器

在另一態樣中，本文描述殼體陣列。殼體陣列可包含複數個包含第一基板及包含反應器蓋之第二基板的解析反應器。在一些情況下，每一反應器中含有至少兩個解析基因座。解析反應器可用可剝離密封件分開。在第二基板自第一基板剝離後，反應器蓋可保留反應器內含物。複數個解析反應器可為在每平方毫米至少1個之密度下的任何適合之密度。複數個反應器蓋可用部分塗佈。部分可為化學惰性或化學活性部分。塗佈於反應器蓋上之部分可為可使寡核苷酸之附接降至最低的部分。化學部分之類型進

一步詳細描述於本文別處。

在一些實施例中，本文所述之反應器蓋可涉及在覆蓋元件基板表面之頂部具有開口的外殼。舉例而言，反應器蓋可類似突出基板表面頂部之圓筒。反應器蓋之內徑可為約、至少約或小於約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或500 μm。反應器蓋之外徑可為約、至少約或小於約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或600 μm。圓筒輪緣之寬度可為約、至少約或小於約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或400 μm。內部量測之反應器蓋之高度可為約、至少約或小於約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或100 μm。圖7圖示反應器蓋在覆蓋元件上之例示性實施例。

反應器蓋表面(諸如輪緣表面)之全部或一部分可使用在本文別處進一步詳述及另外此項技術中已知之適合表面改質方法來改質。在一些情況下，表面不規則性經工程改造。化學表面改質及不規則性可用以調整輪緣之水接觸角。類似表面處理亦可施用於與反應器蓋緊密接近形成密封件(例如可逆密封件)之基板的表面上。毛細管破裂閥可用於兩個表面之間，如在本文別處所進一步詳述。表面處理可用於精確控制包含毛細管破裂閥

之此類密封件。

基板中包含之反應器蓋可呈此項技術中已知的任何形狀或設計。反應器蓋可含有能夠封閉反應器內含物之空腔體積。反應器內含物可源自鄰近基板上之複數個解析基因座。反應器蓋可成環形、橢圓形、矩形或不規則形狀。反應器蓋可具有尖角。在一些情況下，反應器蓋可具有圓角以使保留任何空氣氣泡降至最低及有助於反應器內含物之較佳混合。反應器蓋可製造成允許控制反應器內含物之轉移或混合的任何形狀、組織或設計。反應器蓋可呈與如本申請案中所述之基板上之解析基因座類似的設計。在一些實施例中，反應器蓋可呈允許液體易於流入而不產生氣泡的形狀。在一些實施例中，反應器蓋可具有環形形狀，直徑可為約、至少約或小於約1微米(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或750 μm。反應器蓋可具有單分散尺寸分佈，亦即所有微結構可具有大致相同的寬度、高度及/或長度。或者，反應器蓋可具有有限數目之形狀及/或尺寸，例如反應器蓋可以2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20或20種以上不同形狀呈現，各自具有單分散尺寸。在一些實施例中，相同形狀可以多個單分散尺寸分佈重複，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20或20種以上單分散尺寸分佈。單分散分佈可反映在單

模分佈中，標準差小於模之25%、20%、15%、10%、5%、3%、2%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.001%或更小。

反應器蓋中之每一者可具有任何適合之區域用於根據本文所述之本發明之各種實施例進行反應。在一些情況下，複數個反應器蓋可佔據基板總表面積之任何適合之百分比。在一些實施例中，複數個反應器蓋可佔據基板表面之約、至少約或小於約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%或95%。在一些實施例中，反應器蓋可佔據約、至少約或小於約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或300000 mm^2以上之總面積。解析反應器、解析基因座及反應器蓋可為任何密度。在一些實施例中，表面之解析反應器、解析基因座

或反應器蓋之密度可為每1 mm^2約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個、約2000個、約3000個、約4000個、約5000個、約6000個、約7000個、約8000個、約9000個、約10000個、約20000個、約40000個、約60000個、約80000個、約100000個或約500000個位點。在一些實施例中，表面之解析反應器、解析基因座或反應器蓋之密度為每1 mm^2至少約50個、至少75個、至少約100個、至少約200個、至少約300個、至少約400個、至少約500個、至少約600個、至少約700個、至少約800個、至少約900個、至少約1000個、至少約1500個、至少約2000個、至少約3000個、至少約4000個、至少約5000個、至少約6000個、至少約7000個、至少約8000個、至少約9000個、至少約10000個、至少約20000個、至少約40000個、至少約60000個、至少約80000個、至少約100000或至少約500000個位點。

考慮到鄰近基板表面上解析基因座之密度，反應器蓋之密度、分佈及形狀可經相應設計以便經配置以與每一反應器中較佳數目之解析基因座對準。複數個解析反應器中之每一者可包含許多解析基因座。舉例而言(但不限於)，每一反應器可包含約、至少約、小於約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或1000個解析基因座。在一些情況下，每一反應器可包含至少100個解析基

因座。

包含在複數個殼體之陣列內的解析基因座或反應器蓋可位於製造於支撐表面中之微結構上。微結構可藉由此項技術中任何已知的方法來製造，如本文其他段落中所述。微結構可為在2D或3D中具有任何形狀及設計之微通道或微孔。微結構(例如微通道或微孔)可包含至少兩個彼此流體連通之通道。舉例而言，微通道可互連，允許流體在給定條件(諸如真空吸引)下灌注穿過。個別微結構可單獨定址及解析，使得兩個解析基因座之內含物保持未混合。微通道可包含至少2、3、4、5、6、7、8、9或10個以任何組合流體連通之通道，允許控制流體之混合、連通或分佈。微通道之連接性可由微流體設計技術中已知的閥系統來控制。舉例而言，基板之流體控制層可直接製造於基板之流體連通層頂部。不同微流體閥系統描述於Marc A. Unger等人，「Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography,」 Science, 第288卷, 第7號, 第113-116頁, 2000年4月，及David C. Duffy等人, 「Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane), 」 Analytical Chemistry, 第70卷, 第23號, 第4974-4984頁, 1998年12月。

包含在複數個殼體之陣列內的解析基因座或反應器蓋可位於諸如微通道或通道之微結構上。鄰近基板表面上之解析基因座之微通道的維度及設計描述於本文別處。微結構可包含至少兩個流體連通之通道，其中該至少兩個通道可包含具有不同寬度之至少兩個通道。在一些情況下，至少兩個通道可具有相同寬度，或相同或不同寬度之組合。舉例而言(但不限於)，通道或微通道之寬度可為約、至少約或小於約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或100 μm。通道或微通道可具有允許解析基因座流體連通之任何長度。至少一個通道可包含約、至少約、小於約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或100 μm之表面積與長度之比率或周邊。至少一個通道可具有呈環形形狀之截面積且可包含約、至少約、小於約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或100 μm之截面積半徑。

如本文所述，殼體陣列可包含複數個包含第一基板及包含反應器蓋之第二基板的解析反應器。解析反應器可藉由將第二基板組合或覆蓋於第一基板上而形成，且將其密封在一起。密封件可為可逆或不可逆的。在較佳實施例中，密封件為可逆或可剝離的。在密封解析反應器後，諸如寡核苷酸或用於擴增或其他下游反應所需之試劑的反應器內含物可釋放且混合在解析反應器內。解析反應器可與可剝離密封件分開且其中在第二基板自第一基板剝離後，反應器蓋可保留反應器內含物之全部或一部分。視第一基板及第二基板之材料而定，密封件可經不同設計以使得第一基板與第二基板之間的密封件可逆及形成解析反應器。當形成密封件時，第一基板及第二基板可直接物理接觸。在一些情況下，第一基板及第二基板可緊密接近而其相應表面未立即在奈米反應器周圍或兩個奈米反應器之間形成直接物理接觸。密封件可包含毛細管破裂閥。當形成密封件時，第一基板與第

二基板之間的距離可為約、至少約、小於約0.1 μm、0.2 μm、0.3 μm、0.4 μm、0.5 μm、0.6 μm、0.7 μm、0.8 μm、0.9 μm、1 μm、1.1 μm、1.2 μm、1.3 μm、1.4 μm、1.5 μm、1.6 μm、1.7 μm、1.8 μm、1.9 μm、2 μm、2.5 μm、3 μm、3.5 μm、4 μm、4.5 μm、5 μm、5.5 μm、6 μm、6.5 μm、7 μm、7.5 μm、8 μm、8.5 μm、9 μm、9.5 μm或10 μm。密封件可包含毛細管破裂閥。

在一些情況下，解析殼體可包含壓力釋放洞。壓力釋放洞可使得第一基板與第二基板分開。具有壓力釋放系統之微流體系統的設計描述於歐洲專利第EP 1987275 A1號中，其以全文引用的方式併入本文中。

基板上之複數個解析反應器蓋可藉由本文所述或另外此項技術中已知的任何方法(例如微製造方法)來製造。可用於製造本文所揭示之具有複數個反應器蓋之基板或反應器的微製造方法包括(但不限於)微影；蝕刻技術，諸如濕式化學、乾式及光阻移除；微機電(MEMS)技術，包括微流體/晶片實驗室、光學MEMS(亦稱為MOEMS)、RF MEMS、PowerMEMS及BioMEMS技術及深反應性離子蝕刻(DRIE)；奈機電(NEMS)技術；矽之熱氧化；電鍍及無電極電鍍；擴散方法，諸如硼、磷、砷及銻擴散；離子植入；膜沈積，諸如蒸發(長絲、電子束、閃蒸及遮蔽及步階覆蓋)、濺鍍、化學氣相沈積(CVD)、磊晶(氣相、液相及分子束)、電鍍、網板印刷及層壓。一般參見Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988)；Runyan等人, 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, 編, Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997)。

在一個態樣中，具有複數個解析反應器蓋之基板可使用此項技術中已知之任何方法來製造。在一些實施例中，具有複數個反應器蓋之基板的材料可為半導體基板，諸如二氧化矽。基板之材料亦可為其他化合物III-V或II-VI材料，諸如(GaAs)，一種經由柴氏方法產生之半導體(Grovenor, C. (1989). *Microelectronic Materials*. CRC Press. 第113-123頁)。材料可呈現硬的平坦表面，向與其表面接觸之溶液展現反應性氧化(-OH)基團的均一覆蓋。此等氧化基團可為後續矽烷化方法之附接點。或者，親脂性及疏水性表面材料可模擬氧化矽之蝕刻特徵來沈積。氮化矽及碳化矽表面亦可用於根據本發明之各種實施例製造適合之基板。

在一些實施例中，鈍化層可沈積於基板上，其可能具有或可能不具有反應性氧化基團。鈍化層可包含氮化矽(Si_3N_4)或聚醯胺。在一些情況下，光刻步驟可用以界定鈍化層上形成解析基因座之區域。

產生具有複數個反應器蓋之基板的方法可由基板起始。基板(例如矽)可具有任何數目之層安置在上面，包括(但不限於)導電層，諸如金屬。在一些情況下，導電層可為鋁。在一些情況下，基板可具有保護層(例如氮化鈦)。在一些情況下，基板可具有高表面能化學層。各層可藉助於各種沈積技術沈積，諸如化學氣相沈積(CVD)、原子層沈積(ALD)、電漿增強CVD (PECVD)、電漿增強ALD (PEALD)、金屬有機CVD (MOCVD)、熱絲CVD (HWCVD)、引發CVD (iCVD)、改良CVD (MCVD)、氣相軸向沈積(VAD)、外部氣相沈積(OVD)及物理氣相沈積(例如濺鍍沈積、蒸發

沈積)。

在一些情況下，氧化物層沈積於基板上。在一些情況下，氧化物層可包含二氧化矽。二氧化矽可使用正矽酸四乙酯(TEOS)、高密度電漿(HDP)或其任何組合來沈積。

在一些情況下，二氧化矽可使用低溫技術沈積。在一些情況下，該方法為氧化矽之低溫化學氣相沈積。溫度一般足夠低，使得晶片上預先存在之金屬未受破壞。沈積溫度可為約50℃、約100℃、約150℃、約200℃、約250℃、約300℃、約350℃及其類似溫度。在一些實施例中，沈積溫度低於約50℃、低於約100℃、低於約150℃、低於約200℃、低於約250℃、低於約300℃、低於約350℃及其類似溫度。沈積可在任何適合之壓力下進行。在一些情況下，沈積方法使用RF電漿能。

在一些情況下，氧化物藉由乾式熱生長氧化程序(例如可使用接近或超過1,000℃之溫度的彼等程序)沈積。在一些情況下，氧化矽藉由濕式蒸氣方法產生。

二氧化矽可沈積至適合於形成反應器蓋之厚度，反應器蓋可形成複數個解析反應器，該等解析反應器包含一定體積之待沈積及混合之試劑，可適用於擴增任何所需量之寡核苷酸或如本發明其他段落中所述之其他下游反應。

二氧化矽可沈積至任何適合之厚度。在一些實施例中，二氧化矽為約、至少約或小於約1奈米(nm)、約2 nm、約3 nm、約4 nm、約5 nm、約6 nm、約7 nm、約8 nm、約9 nm、約10 nm、約15 nm、約20 nm、約25 nm、約30 nm、約35 nm、約40 nm、約45 nm、約50 nm、約55 nm、約60 nm、約65 nm、約70 nm、約75 nm、約80 nm、約85 nm、約90

nm、約95 nm、約100 nm、約125 nm、約150 nm、約175 nm、約200 nm、約300 nm、約400 nm或約500 nm厚。

反應器蓋可使用此項技術中已知的各種製造技術在二氧化矽基板中形成。此類技術可包括半導體製造技術。在一些情況下，反應器蓋使用光刻技術形成，諸如半導體產業中所用之彼等光刻技術。舉例而言，光阻(例如當暴露於電磁輻射時改變特性之材料)可(例如藉由旋塗晶圓)在二氧化矽上塗佈至任何適合之厚度。包括光阻之基板可暴露於電磁輻射源。遮罩可用以遮蔽光阻部分免受輻射以便界定解析基因座之區域。光阻可為負性抗蝕劑或正性抗蝕劑(例如反應器蓋之區域可暴露於電磁輻射或除反應器蓋以外之區域可暴露於電磁輻射，如由遮罩所界定)。上覆欲形成反應器蓋之位置的區域暴露於電磁輻射以界定對應於二氧化矽層中反應器蓋之位置及分佈的圖案。光阻可經由界定對應於反應器蓋之圖案之遮罩暴露於電磁輻射。接著，光阻之暴露部分可例如藉助於洗滌操作(例如去離子水)來移除。遮罩之移除部分可接著暴露於化學蝕刻劑以蝕刻基板且將反應器蓋之圖案轉移至二氧化矽層中。蝕刻劑可包括酸，諸如硫酸(H_2SO_4)。二氧化矽層可以各向異性的方式蝕刻。使用本文所述之方法，高各向異性製造方法(諸如DRIE)可應用於在基板上或基板內製造微結構，諸如反應器蓋，其中側壁偏離相對於基板表面之垂直線小於約±3°、2°、1°、0.5°、0.1°或0.1°以下。可實現小於約10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.1 μm或0.1 μm以下之底切值，產生高度均一的微結構。

各種蝕刻程序可用以在欲形成反應器蓋之區域蝕刻二氧化矽。蝕刻可為各向同性蝕刻(亦即，僅一個方向之蝕刻速率等於沿著正交方向之蝕刻速率)、或各向異性蝕刻(亦即，沿著一個方向之蝕刻速率小於僅正交方

向之蝕刻速率)或其變化形式。蝕刻技術可為濕式矽蝕刻(諸如KOH、TMAH、EDP及其類似物)及乾式電漿蝕刻(例如DRIE)兩者。兩者可用於經由互連件蝕刻微結構晶圓。

在一些情況下，各向異性蝕刻移除反應器蓋之大部分體積。可移除任何適合百分比之反應器蓋體積，包括約60%、約70%、約80%、約90%或約95%。在一些情況下，在各向異性蝕刻中移除至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%或至少約95%之材料。在一些情況下，在各向異性蝕刻中移除至多約60%、至多約70%、至多約80%、至多約90%或至多約95%之材料。在一些實施例中，各向異性蝕刻在貫穿基板之所有通路不移除二氧化矽材料。在一些情況下，各向同性蝕刻在貫穿基板之所有通路移除二氧化矽材料形成洞。

在一些情況下，使用光刻步驟界定反應器蓋，隨後使用混合乾式-濕式蝕刻來蝕刻反應器蓋。光刻步驟可包含用光阻塗佈二氧化矽及使光阻經由具有界定反應器蓋之圖案之遮罩(或光罩)暴露於電磁輻射。在一些情況下，混合乾式-濕式蝕刻包含：(a)乾式蝕刻以移除由光刻步驟在光阻中界定之反應器蓋區域中的大多數二氧化矽；(b)清潔基板；及(c)濕式蝕刻以在反應器蓋之區域自基板移除剩餘二氧化矽。

基板可藉助於電漿蝕刻化學方法或暴露於氧化劑(諸如H_2O_2、O_2、O_3、H_2SO_4或其組合，諸如H_2O_2及H_2SO_4之組合)來清潔。清潔可包含移除殘餘聚合物、移除可阻斷濕式蝕刻之材料或其組合。在一些情況下，清潔為電漿清潔。清潔步驟可進行任何適合之時段(例如15至20秒)。在一個實例中，清潔可用Applied Materials eMAx-CT機在100 mT、200 W、20G、20 O_2之設置下進行20秒。

乾式蝕刻可為實質上垂直(例如朝向基板)而不側向或實質上側向(例如平行於基板)蝕刻之各向異性蝕刻。在一些情況下，乾式蝕刻包含用基於氟之蝕刻劑蝕刻，諸如CF_4、CHF_3、C_2F_6、C_3F_6或其任何組合。在一種情況下，用具有100 mT、1000 W、20G及50 CF4之設置的Applied Materials eMax-CT機進行蝕刻400秒。本文所述之基板可藉由深反應性離子蝕刻(DRIE)來蝕刻。DRIE為高度各向異性蝕刻方法，用於在晶圓/基板中形成通常具有高縱橫比的深穿透、陡邊洞及溝槽。基板可使用高速率DRIE之兩種主要技術蝕刻：低溫及Bosch。應用DRIE之方法描述於美國專利第5501893號，其以全文引用的方式併入本文中。

濕式蝕刻可為在所有方向移除材料的各向同性蝕刻。在一些情況下，濕式蝕刻底切光阻。底切光阻可使得光阻較易於在稍後步驟(例如光阻「揭去」)中移除。在一個實施例中，濕式蝕刻為緩衝氧化物蝕刻(BOE)。在一些情況下，濕式氧化物蝕刻在室溫下基於氫氟酸來進行，其可經緩衝(例如用氟化銨)以減緩蝕刻速率。蝕刻速率可視所蝕刻之膜及HF及/或NH_4F之具體濃度而定。完全移除氧化物層所需的蝕刻時間通常憑經驗確定。在一個實例中，蝕刻在22℃下用15:1 BOE (緩衝氧化物蝕刻)來進行。

可蝕刻二氧化矽層直至下伏材料層。舉例而言，可蝕刻二氧化矽層直至氮化鈦層。

在一個態樣中，製備具有複數個反應器蓋之基板的方法包含使用以下步驟將反應器蓋之空腔蝕刻於基板(諸如包含上面塗佈之二氧化矽層的矽基板)中：(a)光刻步驟以界定解析基因座；(b)乾式蝕刻以移除由光刻步驟所界定之反應器蓋區域中的大部分二氧化矽；及(c)濕式蝕刻以在反應

器蓋區域中自基板移除剩餘二氧化矽。在一些情況下，該方法另外包含移除殘餘聚合物、移除可阻斷濕式蝕刻之材料或其組合。該方法可包括電漿清潔步驟。

在一些實施例中，在一些情況下，光阻在光刻步驟或混合濕式-乾式蝕刻後未自二氧化矽移除。保留光阻可用以在稍後步驟中引導金屬選擇性進入反應器蓋而非在二氧化矽層之上表面上。在一些情況下，基板用金屬(例如鋁)塗佈且濕式蝕刻不移除金屬上之某些組分，例如保護金屬免受腐蝕之彼等組分(例如氮化鈦(TiN))。然而，在一些情況下，光阻層可諸如藉助於化學機械平坦化(CMP)移除。

例示性奈米反應器展示於圖26 A-D之各種視圖中。此奈米反應器包含108個由奈米反應器之鹼基單獨培養之孔。奈米反應器之截面展示於圖26A中。奈米反應器之裝置視圖展示於圖26B及26C中。奈米反應器之操作視圖展示於圖26D中。奈米反應器可經組態以接受且容納液體在複數個特徵中。圖26之奈米反應器經設計以容納液體在任意數目之108個孔中。奈米反應器可與基板接觸及/或對準，諸如圖25中所例示。奈米反應器之孔不限於圖26中所示之組態，因為任何組態之任意數目之孔可排列在奈米反應器內。在一些實施例中，奈米反應器孔以與基板組態對準之組態排列。如由**2701**所表示，奈米反應器之高度可為約或至少約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、1.5 mm、2 mm、2.5 mm、3 mm、3.5 mm、4 mm、4.5 mm、5 mm、5.5 mm、6 mm、6.5 mm、7 mm、7.5 mm、8 mm、8.5 mm、9 mm、9.5 mm或10 mm。在一些實施例中，奈米反應器之高度可為約或至多約10 mm、9.5 mm、9 mm、8.5 mm、8 mm、7.5 mm、7

mm、6.5 mm、6 mm、5.5 mm、5 mm、4.5 mm、4 mm、3.5 mm、3 mm、2.5 mm、2 mm、1.5 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或0.1 mm或0.1 mm以下。在一些實施例中，奈米反應器之高度可在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或0.9 - 2 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.2 mm - 0.8 mm。如由**2702**所表示，奈米反應器之孔之高度可為約或至少約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、1.5 mm、2 mm、2.5 mm、3 mm、3.5 mm、4 mm、4.5 mm、5 mm、5.5 mm、6 mm、6.5 mm、7 mm、7.5 mm、8 mm、8.5 mm、9 mm、9.5 mm或10 mm。在一些實施例中，奈米反應器之孔之高度可為約或至多約10 mm、9.5 mm、9 mm、8.5 mm、8 mm、7.5 mm、7 mm、6.5 mm、6 mm、5.5 mm、5 mm、4.5 mm、4 mm、3.5 mm、3 mm、2.5 mm、2 mm、1.5 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或0.1 mm或0.1 mm以下。在一些實施例中，奈米反應器之孔之高度可在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或0.9 - 2 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 mm - 0.6 mm。

圖26B包括由0,0 (X,Y)軸指示的參考原點，繪製在例示性奈米反應器的左上角。在一些實施例中，如自原點所量測，表示為**2703**之奈米反應器的寬度為沿著一個維度約5 mm至約150 mm。在一些實施例中，如自

原點所量測，表示為**2704**之奈米反應器的寬度為沿著另一維度約5 mm至約150 mm。在一些實施例中，奈米反應器在任何維度之寬度為約5 mm至約125 mm、約5 mm至約100 mm、約5 mm至約75 mm、約5 mm至約50 mm、約5 mm至約25 mm、約25 mm至約150 mm、約50 mm至約150 mm、約75 mm至約150 mm、約100 mm至約150 mm或約125 mm至約150 mm。熟習此項技術者瞭解寬度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如5 - 25 mm。在一些實施例中，奈米反應器在任何維度之寬度為約或至少約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或150 mm。在一些實施例中，奈米反應器在任何維度之寬度為約或至多約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或5 mm或5 mm以下。

圖26B所示之奈米反應器包含108個孔。孔可以任何組態排列。在圖26B中，孔成列排列形成正方形。不考慮排列，如在X軸或Y軸上所量測，孔可在距離原點約0.1 mm至約149 mm處開始且在距離原點約1 mm至約150 mm處結束。長度**2706**及**2705**分別表示在X軸及Y軸上孔中心距原點最遠的距離。長度**2710**及**2709**分別表示在X軸及Y軸上孔中心距原點最近的距離。在一些實施例中，孔中心在任何維度距原點最遠的距離為約或至少約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或150 mm。在一些實施例中，孔中心在任何維度之最遠距離為約或至多約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或1 mm以下。在一些實施例中，孔中心在任何維度之最遠距離為約5 mm至約125 mm、約5 mm至約100 mm、約5 mm至約75 mm、約5 mm至約50 mm、約5 mm至約25 mm、約25 mm至約150 mm、約50 mm至約150 mm、約75 mm至約150 mm、約100 mm至約150 mm或約125 mm至約150 mm。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如5 - 25 mm。在一些實施例中，孔中心在任何維度距原點之最近距離為約或至少約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或149 mm。在一些實施例中，孔中心在任何維度之最近距離為約或至多約149 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、4 mm、3 mm、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或0.1 mm以下。在一些實施例中，孔中心在任何維度之最近距離為約0.1 mm至約125 mm、約0.5 mm至約100 mm、約0.5 mm至約75 mm、約0.5 mm至約50 mm、約0.5 mm至約25 mm、約1 mm至約50 mm、約1 mm至約40 mm、約1 mm至約30 mm、約1 mm至約20 mm、或約1 mm至約5 mm。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 - 5 mm。

奈米反應器之孔可位於距奈米反應器邊緣之任何距離處。奈米反應器之孔與邊緣之間的例示性距離由**2707**及**2708**展示。在一些實施例中，奈米反應器之孔中心與邊緣之間在任何維度之距離為約或至少約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或149 mm。在一些實施例中，奈米反應器之孔中心與邊緣之間在任何維度之距離為約或至多約149 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、4 mm、3 mm、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或0.1 mm以下。在一些實施例中，奈米反應器之孔中心與邊緣之間在任何維度之距離為約0.1 mm至約125 mm、約0.5 mm至約100 mm、約0.5 mm至約75 mm、約0.5 mm至約50 mm、約0.5 mm至約25 mm、約1 mm至約50 mm、約1 mm至約40 mm、約1 mm至約30 mm、約1 mm至約20 mm、或約1 mm至約5 mm。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 - 5 mm。

在一些實施例中，各孔經排列以便在兩個孔之間存在重複距離。如由**2711**及**2712**所示，兩個孔之間的距離可相距約0.3 mm至約9 mm。在一些實施例中，兩個孔之間的距離為約或至少約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或9 mm。在一些實施例中，兩個孔之間的距離為約或至多約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或0.3 mm。兩個孔之間的距離可在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或0.9-2 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.8 mm - 2 mm。

在一些實施例中，如由**2721**所示之孔內截面為約或至少約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或9 mm。在一些實施例中，孔內截面為約或至多約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或0.3 mm。孔內截面可在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或0.9-2 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解截面可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.8 mm - 2 mm。在一些實施例中，如由**2720**所示之包括孔輪緣的孔截面為約或至少約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或9 mm。在一些實施例中，包括孔輪緣的孔截面為約或至多約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或0.3 mm。包括孔輪緣的孔截面可在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或0.9-2 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解截面可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.8 mm - 2 mm。

奈米反應器可包含任意數目的孔，包括(但不限於)在約2與約250之間的任意數目。在一些實施例中，孔數包括約2至約225個孔、約2至約200個孔、約2至約175個孔、約2至約150個孔、約2至約125個孔、約2至約100個孔、約2至約75個孔、約2至約50個孔、約2至約25個孔、約25至約250個孔、約50至約250個孔、約75至約250個孔、約100至約250個孔、約125至約250個孔、約150至約250個孔、約175至約250個孔、約200至約250個孔或約225至約250個孔。熟習此項技術者瞭解孔數可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如25 - 125。

基準標誌可置於本文所述之奈米反應器上以有助於奈米反應器與系統其他組件(例如微流體裝置或微流體裝置組件)的對準。本發明之奈米反應器可具有一或多個基準標誌，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10個或10個以上基準標誌。圖25B中所示之奈米反應器的裝置視圖包含三個用於使裝置與系統其他組件對準的基準標誌。基準標誌可位於奈米反應器內的任何位置。如由**2716**及**2717**所示，基準標誌可位於原點附近，其中該基準標誌與任一個孔相比更接近於原點。在一些實施例中，基準標誌位於奈米反應器之邊緣附近，如由**2713**所示，其中距邊緣之距離由**2714**及**2715**例示。基準標誌可位於距奈米反應器邊緣約0.1 mm至約10 mm。在一些實施例中，基準標誌位於距奈米反應器邊緣約或至少約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或10 mm。在一些實施例中，基準標誌位於距奈米反應器邊緣約或至多約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或0.1 mm。基準標誌可位於距奈米反應器邊緣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或0.5-2 mm。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 mm - 5 mm。基準標誌可位於孔近距離處，其中例示性X軸及Y軸距離分別由**2719**及**2718**指示。在一些實施例中，孔與基準標誌之間的距離為約或至少約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或8 mm。在一些實施例中，孔與基準標誌之間的距離為約或至多約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或0.001 mm。孔與基準標誌之間的距離可在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或0.8-1.7 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.5 - 2 mm。

圖26D中所示之奈米反應器的操作視圖包含四個用於使裝置與系統其他組件對準的基準標誌。基準標誌可位於奈米反應器內的任何位置。如在基準標誌**H**之詳細視圖上由**2722**及**2723**所示，基準標誌可位於奈米反應器操作側一角的附近。基準標誌可位於距奈米反應器角落約0.1 mm至約10 mm。在一些實施例中，基準標誌位於距奈米反應器角落約或至少約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或10 mm。在一些實施例中，基準標誌位於距奈米反應器角落約或至多約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或0.1 mm。基準標誌可位於距奈米反應器角落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或0.5-2 mm。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 mm - 5 mm。基準標誌可具有適於功能的任何寬度。在一些實施例中，如由**2724**及**2725**例示，基準標誌之寬度為約或至少約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或10 mm。在一些實施例中，基準標誌之寬度為約或至多約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或0.1 mm。基準標誌寬度可在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或0.5-2 mm長的範圍內。熟習此項技術者瞭解寬度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.1 mm - 5 mm。基準標誌之截面可具有任何適合之尺寸，如由**2726**所示。在一些實施例中，基準標誌之截面為約或至少約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或0.5 mm。在一些實施例中，基準標誌之截面為約或至多約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或0.001 mm以下。基準標誌之截面可在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或0.02-0.05 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解截面可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.02 mm - 0.1 mm。

在一些實施例中，奈米反應器可具有標記或連續標記之位置，如圖26E中所例示描繪奈米反應器中孔的例示性佈局。在一些實施例中，標記

為序號。標記可位於奈米反應器邊緣附近，如由距離**2728**及**2727**例示。在一些實施例中，任何部分之標記位於距奈米反應器邊緣約0.1 mm至約10 mm。在一些實施例中，任何部分之標記位於距奈米反應器邊緣約或至少約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或10 mm。在一些實施例中，任何部分之標記位於距奈米反應器邊緣約或至多約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或0.1 mm。該距離可在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或1.5 mm之間的範圍內。熟習此項技術者瞭解距離可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如0.5 - 2 mm。標記可具有任何長度，包括約1 mm至約25 mm，如由**2726**所例示。在一些實施例中，標記之長度為約或至少約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或150 mm。在一些實施例中，標記之長度為約或至多約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或1 mm以下。在一些實施例中，標記之長度為約5 mm至約125 mm、約5 mm至約100 mm、約5 mm至約75 mm、約5 mm至約50 mm、約5 mm至約25 mm、約25 mm至約150 mm、約50 mm至約150 mm、約75 mm至約150 mm、約100 mm至約150 mm或約125 mm至約150 mm。熟習此項技術者瞭解長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如5 - 25 mm。

材料

基板、固體支撐物或微結構或其中之反應器可由適用於本文所述之本發明方法及組合物的多種材料來製造。在某些實施例中，製造本發明之基板/固體支撐物之材料顯示出低水準的寡核苷酸結合。在一些情況下，可採用對可見光及/或UV光透明的材料。可使用充分導電的材料，例如可在本文所述之基板/固體支撐物之全部或一部分的兩端形成均勻電場的彼等材料。在一些實施例中，此類材料可連接至電接地。在一些情況下，基板或固體支撐物可導熱或隔熱。材料可耐化學試劑及耐熱以支撐華夏或生化反應，諸如一系列寡核苷酸合成反應。對於可撓性材料，所關注之材料可包括：耐綸(經修飾及未修飾)、硝化纖維素、聚丙烯及其類似物。對於剛性材料，所關注之特定材料包括：玻璃；熔融矽石；矽；塑膠(例如聚四氟乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯及其摻合物及其類似物)；金屬(例如金、鉑及其類似物)。基板、固體支撐物或反應器可由選自由以下組

成之群之材料製造：矽、聚苯乙烯、瓊脂糖、葡聚糖、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、聚二甲基矽氧烷(PDMS)及玻璃。基板/固體支撐物或微結構、其中之反應器可用本文中列舉之材料的組合或此項技術中已知的任何其他適合材料來製造。

表面改質

在各種實施例中，表面改質藉由添加或消減方法用於表面之化學及/或物理變化，以改變基板表面或基板表面之所選位點或區域的一或多種化學及/或物理特性。舉例而言，表面改質可涉及(1)改變表面之潤濕特性，(2)使表面官能化，亦即提供、修飾或取代表面官能基，(3)使表面去官能化，亦即移除表面官能基，(4)另外更改表面之化學組成，例如經由蝕刻，(5)增加或降低表面粗糙度，(6)在表面上提供塗層，例如展現不同於表面潤濕特性之潤濕特性的塗層，及/或(7)沈積粒子於表面上。

上面沈積寡核苷酸或其他部分之基板表面或解析基因座可為平滑的或實質上平坦的，或具有不規則處，諸如凹陷或隆起。表面可經用於以所需方式改質表面特性之一或多個不同層化合物改質。所關注之此類改質層包括：無機及有機層，諸如金屬、金屬氧化物、聚合物、小有機分子及其類似物。所關注之聚合層包括以下層：肽、蛋白質、核酸或其模擬物(例如肽核酸及其類似物)；多醣、磷脂、聚胺基甲酸酯、聚酯、聚碳酸酯、聚脲、聚醯胺、聚乙烯胺、聚伸芳基硫化物、聚矽氧烷、聚醯亞胺、聚乙酸酯及其類似物，或本文所述或另外此項技術中已知之任何其他適合之化合物，其中該等聚合物可為雜聚物或同聚物，且可能具有或可能不具有單獨的官能性部分與其附接(例如結合)。用於基板之表面改質或固體支撐物之塗佈的其他材料及方法描述於美國專利第6,773,888號及美國公開案第

2007/0054127號中，其以全文引用之方式併入本文中。

解析基因座可經可增加或降低固體支撐物表面能之部分官能化。部分可為化學惰性的或適於支持所需化學反應的部分。表面之表面能或疏水性可決定寡核苷酸附接至表面上之親和力。製備基板之方法可包含：(a)提供具有包含二氧化矽之表面的基板；及(b)使用本文所述或另外此項技術中已知之適合矽烷化劑，例如有機官能性烷氧基矽烷分子，使表面矽烷化。在一些情況下，有機官能性烷氧基矽烷分子可為二甲基氯-十八烷基-矽烷、甲基二氯-十八烷基-矽烷、三氯-十八烷基-矽烷、三甲基-十八烷基-矽烷、三乙基-十八烷基-矽烷或其任何組合。

基板表面亦可使用此項技術中已知的任何方法來製備以具有低表面能。降低表面能可有助於寡核苷酸附接至表面。表面可經官能化以能夠共價結合可降低表面能之分子部分，使得可濕性可降低。在一些實施例中，表面之官能化能夠增加表面能及可濕性。

在一些實施例中，基板表面在有效使矽烷偶合至基板表面之反應條件下，通常經由基板表面上存在之反應性親水部分，與含有矽烷混合物之衍生組合物接觸。矽烷化一般可用以經由自組裝用有機官能性烷氧基矽烷分子覆蓋表面。各種矽氧烷官能化試劑可如當前此項技術中已知進一步用於例如降低或增加表面能。有機官能性烷氧基矽烷根據其有機官能加以分類。矽氧烷官能化試劑之非限制性實例包括羥基烷基矽氧烷類(使表面矽烷化，經二硼烷官能化及藉由過氧化氫氧化醇)、二醇(二羥基烷基)矽氧烷類(使表面矽烷化，及水解成二醇)、胺基烷基矽氧烷類(胺不需要中間官能化步驟)、縮水甘油氧基矽烷類(3-縮水甘油氧基丙基-二甲基-乙氧基矽烷、縮水甘油氧基-三甲氧基矽烷)、巰基矽烷類(3-巰基丙基-三甲氧基

矽烷、3-4環氧環己基-乙基三甲氧基矽烷或3-巰基丙基-甲基-二甲氧基矽烷)、雙環庚烯基-三氯矽烷、丁基-醛基-三甲氧基矽烷或二聚二級胺基烷基矽氧烷類。羥基烷基矽氧烷類可包括烯丙基三氯氯矽烷變成3-羥丙基、或7-辛-1-烯基三氯氯矽烷變成8-羥基辛基。二醇(二羥基烷基)矽氧烷類包括縮水甘油基三甲氧基矽烷衍生之(2,3-二羥基丙氧基)丙基。胺基烷基矽氧烷類包括3-胺基丙基三甲氧基矽烷變成3-胺基丙基(3-胺基丙基-三乙氧基矽烷、3-胺基丙基-二乙氧基-甲基矽烷、3-胺基丙基-二甲基-乙氧基矽烷或3-胺基丙基-三甲氧基矽烷)。二聚二級胺基烷基矽氧烷類可為雙(3-三甲氧基矽烷基丙基)胺變成雙(矽烷基氧基丙基)胺。此外，許多替代性官能化表面可用於本發明。非限制性實例包括以下：1.聚乙烯/聚丙烯(藉由γ輻射或鉻酸氧化官能化，及還原成羥基烷基表面)；2.高度交聯聚苯乙烯-二乙烯苯(藉由氯甲基化衍生，及胺化成苯甲胺官能性表面)；3.耐綸(末端胺基已基為直接反應性的)；或4.經蝕刻、還原之聚四氟乙烯。其他方法及官能化劑描述於美國專利第5474796號中，其以全文引用的方式併入本文中。例如矽烷類之官能化基團之混合物可呈任何不同比率。舉例而言(但不限於)，混合物可包含至少兩種不同類型之官能化劑，例如矽烷類。至少兩種類型之表面官能化劑(例如矽烷類)於混合物中之比率可為約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、9:11、9:13、9:14、9:16、9:17、9:19、10:11、10:13、10:17、10:19、11:12、11:13、11:14、11:15、11:16、11:17、11:18、11:19、11:20、12:13、12:17、12:19、13:14、13:15、13:16、13:17、13:18、13:19、13:20、14:15、14:17、14:19、15:16、15:17、15:19、16:17、16:19、17:18、17:19、17:20、18:19、19:20或任何其他比率以實現兩種基團之所需表面表示。在不受理論束縛的情況下，應瞭解表面表示應與混合物中兩種基團之比率高度成比例。根據本發明之方法及組合物之所需表面張力、可濕性、水接觸角或其他適合溶劑之接觸角可藉由提供一定比率之官能化劑來實現。另外，混合物中之試劑可選自根據本發明之方法及組合物適用於下游反應、稀釋反應性基團之表面密度至所需水準之反應性及惰性部分。在一些實施例中，在寡核苷酸合成反應中反應形成生長寡核苷酸之表面官能基之部分的密度為約、小於約或大於約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 $\mu Mol/m^2$。

在各種實施例中，表面經反應性親水部分之塗層改質以具有較高表面能或變得更親水。藉由改變基板表面不同部分之表面能，可調節(在一些情況下促進)沈積試劑液體之展佈。舉例而言，圖5圖示當試劑液滴藉由噴墨印刷機沈積於微孔中時的情況。液滴可展佈在較小微孔上且填充較小微孔，因為微孔表面與在此情況下附近的其他表面相比具有較高表面能。基板表面上之反應性親水部分可為羥基、羧基、硫醇基及/或經取代或未經取代之胺基。適合之材料包括(但不限於)可用於固相化學合成之支撐

物，例如交聯聚合材料(例如基於二乙烯苯苯乙烯之聚合物)、瓊脂糖(例如Sepharose®)、葡聚糖(例如Sephadex®)、纖維素聚合物、聚丙烯醯胺、矽石、玻璃(尤其受控微孔玻璃或「CPG」)、陶瓷及其類似物。支撐物可市售獲得且原樣使用，或其可在官能化之前經處理或經塗佈。

親水性及疏水性表面

表面之表面能或疏水性可藉由量測水接觸角加以評估或量測。水接觸角為液滴與固體表面之間的角，其中水滴與固體表面相接。固體表面可為平滑、平直或平坦表面。其可經由楊氏方程(Young equation)定量固體表面藉由液體(例如水)之潤濕。在一些情況下，可觀察到水接觸角滯後，範圍介於所謂前進(最大)水接觸角至後退(最小)水接觸角。平衡水接觸可在彼等值內發現且可由其計算得到。疏水性及親水性可使用水接觸角以相對定量項表示。水接觸角小於90°之表面，該固體表面可視為親水性或極性的。水接觸角大於90°之表面，該固體表面可視為疏水性或非極性的。具有低表面能之高度疏水性表面可具有大於120°之水接觸角。

經塗佈之表面的表面特徵可以適用於寡核苷酸合成之各種方式加以調節。表面可經選擇而對普通寡核苷酸合成之條件呈惰性；例如，固體表面可在單體添加期間相對於大部分溶劑介面不含游離羥基、胺基或羧基，視所選化學方法而定。或者，表面可在寡核苷酸合成之第一循環或前幾個循環開始之前包含反應性部分，且此等反應性部分可在寡核苷酸合成反應之一個、兩個、三個、四個、五個或五個以上循環後快速耗盡至不可量測之密度。表面可例如藉由常用有機溶劑(諸如乙腈及乙二醇醚)或水性溶劑進一步經最佳化以相對於周圍表面較佳或不佳潤濕。

在不受理論束縛的情況下，潤濕現象理解為在固-液介面之分子間表

面張力或吸引力之量度且以達因/平方公分為單位來表示。舉例而言，碳氟化合物具有極低表面張力，其通常歸因於碳-氟鍵之獨特極性(電負性)。在緊密構造之朗繆爾-布勞傑類型膜(Langmuir-Blodgett type film)中，層之表面張力可主要由烷基鏈末端中氟之百分比來決定。對於緊密排序之膜，單個末端三氟甲基可致使表面幾乎與全氟烷基層一樣疏脂。當碳氟化合物共價附接至下伏衍生固體(例如高度交聯聚合)支撐物時，反應性位點之密度可低於朗繆爾-布勞傑及基團密度。舉例而言，甲基三甲氧基矽烷表面之表面張力可為約22.5 mN/m且胺丙基三乙氧基矽烷表面可為約35 mN/m。矽烷表面之其他實例描述於Arkles B等人，「The role of polarity in the structure of silanes employed in surface modification」, Silanes and Other Coupling Agents, 第5卷中，其以全文引用的方式併入本文中。簡言之，表面之親水性行為一般視為當臨界表面張力大於45 mN/m時出現。隨著臨界表面張力增加，預期的接觸角減小伴有更強的吸附行為。表面之疏水性行為一般視為當臨界表面張力小於35 mN/m時出現。首先，臨界表面張力減小與親油性行為相關聯，亦即表面藉由烴油潤濕。隨著臨界表面張力減小在20 mN/m以下，表面抗藉由烴油潤濕且視為疏油性以及疏水性的。舉例而言，矽烷表面改質可用以產生大範圍臨界表面張力。因此，本發明之方法及組合物可使用表面塗層，例如涉及矽烷之彼等表面塗層，以實現表面張力小於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或120 mN/m以上。另外，本發明之方法及組合物可使用表面塗層，例如涉及矽烷之彼等表面塗層，以實現表面張力大於115、110、100、90、80、70、60、50、45、40、35、30、25、20、15、12、10、

9、8、7、6 mN/m或6 mN/m以下。表面塗層(例如涉及矽烷之彼等表面塗層)之非限制性實例的水接觸角及表面張力描述於Arkles等人 (Silanes and Other Coupling Agents, 第5v卷: The Role of Polarity in the Structure of Silanes Employed in Surface Modification. 2009)之表1及表2中，其以全文引用之方式併入本文中。該等表複製如下。

表1.

平滑表面上之水接觸角(度)	
十七氟癸基三甲氧基矽烷	113-115
聚(四氟乙烯)	108-112
聚丙烯	108
十八基二甲基氯矽烷	110
十八基三氯矽烷	102-109
參(三甲基矽烷氧基)矽烷基乙基二甲基氯矽烷	103-104
辛基二甲基氯矽烷	104
丁基二甲基氯矽烷	100
三甲基氯矽烷	90-100
聚乙烯	88-103
聚苯乙烯	94
聚(氯三氟乙烯)	90
人類皮膚	75-90
金剛石	87
石墨	86
矽(經蝕刻)	86-88
滑石	82-90
聚葡萄胺糖	80-81
鋼	70-75
甲氧基乙氧基十一基三氯矽烷	73-74
甲基丙烯醯氧基丙基三甲氧基矽烷	70
金，典型(參見純金)	66
腸道黏膜	50-60
高嶺土	42-46
鉑	40
氮化矽	28-30
碘化銀	17
[甲氧基(聚乙烯氧基)丙基]三甲氧基矽烷	15-16
鹼石灰玻璃	<15
純金	<10
三甲氧基矽烷基丙基取代之聚(伸乙亞胺)，鹽酸鹽	<10

註釋：在表1中，矽烷之接觸角係指矽烷水解沈積於平滑表面上。此

處資料取自各種文獻來源及作者之作品。基板之間的精確比較並未考慮測試方法之差異或是否報導前進、後退或平衡接觸角。

表2.

臨界表面張力(mN/m)	
十七氟癸基三氯矽烷	12
聚(四氟乙烯)	18.5
十八基三氯矽烷	20-24
甲基三甲氧基矽烷	22.5
九氟己基三甲氧基矽烷	23
乙烯基三乙氧基矽烷	25
石蠟	25.5
乙基三甲氧基矽烷	27.0
丙基三甲氧基矽烷	28.5
鹼石灰玻璃(濕潤)	30.0
聚(氯三氟乙烯)	31.0
聚丙烯	31.0
聚(氧化丙烯)	32
聚乙烯	33.0
三氟丙基三甲氧基矽烷	33.5
3-(2-胺基乙基)胺基丙基三甲氧基矽烷	33.5
聚苯乙烯	34
對甲苯基三甲氧基矽烷	34
氰基乙基三甲氧基矽烷	34
胺基丙基三乙氧基矽烷	35
乙醯氧基丙基三甲氧基矽烷	37.5
聚(甲基丙烯酸甲酯)	39
聚(氯乙烯)	39
苯基三甲氧基矽烷	40.0
氯丙基三甲氧基矽烷	40.5
巰基丙基三甲氧基矽烷	41
縮水甘油氧基丙基三甲氧基矽烷	42.5
聚(對苯二甲酸伸乙酯)	43
銅(乾燥)	44
聚(氧化乙烯)	43-45
鋁(乾燥)	45
耐綸6/6	45-46
鐵(乾燥)	46
鹼石灰玻璃(乾燥)	47
氧化鈦(銳鈦礦)	91
氧化鐵	107
氧化錫	111

量測水接觸角之方法可使用此項技術中已知的任何方法，包括靜態座滴法、動態座滴法、動態威廉法(dynamic Wilhelmy method)、單纖維威廉法、粉末接觸角法及其類似方法。在一些情況下，本發明中如本文所述之基板表面或基板表面之一部分可經官能化或經改質以呈疏水性、具有低表面能或具有如本文所述將在基板之相關官能化表面的未彎曲、平滑或平坦的等效物上量測大於約90°、95°、100°、105°、110°、115°、120°、125°、130°、135°、140°、145°或150°之水接觸角。本文所述之官能化表面之水接觸角可指未彎曲、平滑、平直及平坦的幾何結構中水滴於官能化表面上之接觸角。在一些情況下，本發明中如本文所述之基板表面或基板表面之一部分可經官能化或經改質以呈親水性、具有高表面能或具有如本文所述將在基板之相關官能化表面的未彎曲、平滑或平坦的等效物上量測小於約90°、85°、80°、75°、70°、65°、60°、55°、50°、45°、40°、35°、30°、25°、20°、15°或10°之水接觸角。基板表面或基板表面之一部分可經官能化或經改質以與在官能化或改質之前的表面或表面之一部分相比更親水或更疏水。

在一些情況下，一或多個表面可經改質以具有如在一或多個未彎曲、平滑或平坦的等效表面上所量測大於90°、85°、80°、75°、70°、65°、60°、55°、50°、45°、40°、35°、30°、25°、20°、15°或10°之水接觸角差異。在一些情況下，基板之微結構、通道、解析基因座、解析反應器蓋或其他部分之表面可經改質以具有對應於如在此類結構之未彎曲、平滑或平坦的等效表面上所量測大於90°、85°、80°、75°、70°、65°、60°、55°、50°、45°、40°、35°、30°、25°、20°、15°或10°之水接觸角差異的差異性疏水性。除非另外陳述，否則本文提及之水接觸角對應於將

在所討論之表面的未彎曲、平滑或平坦的等效物上所獲取的量測值。

用於使表面官能化之其他方法描述於美國專利第6,028,189號中，其以全文引用的方式併入本文中。舉例而言，親水性解析基因座可藉由首先將保護劑或抗蝕劑施用在基板內之每一基因座上來產生。未受保護之區域可接著用疏水劑塗佈以產生非反應性表面。舉例而言，疏水性塗層可藉由使(十三氟四氫辛基)-三乙氧基矽烷化學氣相沈積於受保護之環周圍的暴露氧化物上而形成。最後，可移除保護劑或抗蝕劑，暴露基板之基因座區域用於進一步改質及寡核苷酸合成。在一些實施例中，此類未受保護之區域的初始改質可抗進一步改質且保留其表面官能化，而新的未受保護之區域可經受後續改質步驟。

多個並行微流體反應

在另一態樣中，本文描述用於進行一組並行反應之系統及方法。該系統可包含兩個或兩個以上可彼此密封(例如可剝離地密封)、在密封後形成複數個可單獨定址之反應體積或反應器的基板。新反應器組可藉由自第二基板剝離第一基板且使其與第三基板對準來形成。每一基板可攜帶用於所需反應之試劑，例如寡核苷酸、酶、緩衝劑或溶劑。在一些實施例中，該系統包含具有在第一適合密度下之複數個解析基因座的第一表面及具有在第二適合密度下之複數個解析反應器蓋的覆蓋元件。該系統可使複數個解析反應器蓋與第一表面上之複數個解析基因座對準，在第一表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件。對準基板之間的臨時密封件可將第一表面上之基因座以物理方式分成約、至少約或小於約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、100、125、150、

200個或200個以上基因座之群。可根據本發明之方法及組合物進行本文所述之一組平行反應。可對準具有在第一密度下之複數個解析基因座的第一表面與具有在第二密度下之複數個解析反應器蓋的覆蓋元件，使得該複數個解析反應器蓋與第一表面上之該複數個解析基因座在第一表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件且由此將第一表面上之基因座以物理方式分成約、至少約或小於約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、100、125、150、200個或200個以上基因座之群。可進行第一反應，形成第一組試劑。覆蓋元件可自第一表面剝離。在剝離後，反應器蓋可各保留先前密封之反應體積中之第一組試劑的至少一部分。複數個解析基因座之密度可為每1 mm^2約、至少約或小於約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個、約2000個、約3000個、約4000個、約5000個、約6000個、約7000個、約8000個、約9000個、約10000個、約20000個、約40000個、約60000個、約80000個、約100000個或約500000個。在一些實施例中，複數個解析基因座之密度可為每平方毫米約、至少約、小於約100個。複數個解析反應器蓋之密度可為每平方毫米約、至少約、小於約1個。在一些實施例中，複數個解析反應器蓋之密度可為每1 mm^2約、至少約或小於約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200

個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個、約2000個、約3000個、約4000個、約5000個、約6000個、約7000個、約8000個、約9000個、約10000個、約20000個、約40000個、約60000個、約80000個、約100000個或約500000個。本文所述之方法可另外包含提供具有在第三密度下之複數個解析基因座的第二表面，使複數個解析反應器蓋與第二表面上之複數個解析基因座對準及在第二表面與覆蓋元件之間形成密封件，通常為臨時或可剝離的密封件。新形成之密封可將第二表面上之基因座以物理方式分成約、至少約或小於約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、100、125、150、200個或200個以上基因座之群。可視情況使用第一組試劑之一部分進行第二反應，由此形成第二組試劑。覆蓋元件可自第二表面剝離。在剝離後，反應器蓋可各保留先前密封之第二反應體積中之第二組試劑的至少一部分。在一些情況下，具有複數個解析基因座之第二表面的基因座密度可為每1 mm^2至少約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個、約2000個、約3000個、約4000個、約5000個、約6000個、約7000個、約8000個、約9000個、約10000個、約20000個、約40000個、約60000個、約80000個、約100000個或約500000個。本文描述系統、方法及儀器使用之實施例的各種態樣。

系統總成可包含任意數目之靜態晶圓及任意數目之動態晶圓。舉例

而言，該系統可包含一行三個基板及一列四個基板。傳送系統可包含三個靜態晶圓(或基板)及一個動態晶圓(或基板)。動態晶圓可在複數個靜態晶圓之間移動或傳送。動態晶圓可在三個靜態安裝之晶圓之間傳送。在一些實施例中，動態晶圓之直徑可為約50、100、150、200或250 mm或2、4、6或8 in或更大。動態晶圓可安裝於溫度控制之真空夾盤中。本發明之系統允許以下組態，其中動態晶圓可在Z方向移動，Z方向可為與面向第二晶圓之表面的晶圓表面垂直的方向，控制z-位置在約或小於約0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5或3 μm處，且可例如藉由使動態晶圓上之圖案與靜態晶圓上之另一圖案在容限範圍內匹配來對準晶圓之θ_z，亦即面向彼此之兩個晶圓表面的法線之間的角度。晶圓位置公差可為與x-y平面中之轉動角相差約或小於約1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500微弧度。在一些實施例中，晶圓位置公差可為與x-y平面中之轉動角相差約或小於約50微弧度。晶圓位置公差可為在x-方向約或小於約0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15 μm之距離。晶圓位置公差可為在y-方向約或小於約0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15 μm之距離。晶圓位置公差可為x-y平面在z-方向旋轉約或小於約1、2、3、4、5、6、7、8、9或10微弧度。在一些實施例中，晶圓位置公差可為x-y平面在z-方向旋轉約或小於約5微弧度。在一些實施例中，晶圓位置公差可為在z-方向約或小於約0.01、0.05、0.1、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5或5 μm距離。在一些實施例中，晶圓位置公差可為在z-方向約或小於約0.5 μm之距離。

在一些情況下，用於進行一組並行反應之系統及方法可另外包含具有複數個解析基因座之第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十表面及/或具有複數個解析反應器蓋之覆蓋元件。第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十表面可對準且可在兩個表面與對應覆蓋元件之間形成臨時密封件，由此以物理方式劃分表面上之基因座及/或反應器蓋。第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十反應可使用先前反應所保留之一部分試劑，亦即第二、第三、第四、第五、第六、第七、第八或第九組試劑來進行，由此形成第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十組試劑。本文所述之各覆蓋元件可自其對應表面剝離，其中反應器蓋可保留另一反應體積之前一組試劑的至少一部分。在一些情況下，具有複數個解析基因座之第二表面之密度可為每平方毫米至少2個。在一些實施例中，具有複數個解析基因座之第二表面的基因座密度可為每1 mm^2至少約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個、約2000個、約3000個、約4000個、約5000個、約6000個、約7000個、約8000個、約9000個、約10000個、約20000個、約40000個、約60000個、約80000個、約100000個或約500000個。每次保留之部分試劑可為不同的且控制在視待進行之反應而定的所需部分處。

在各種實施例中，本發明涵蓋一種用於進行一組並行反應之系統，包含具有複數個解析基因座之第一表面及具有複數個解析反應器蓋之覆蓋元件。複數個解析基因座及具有複數個解析反應器蓋之覆蓋元件可組合形

成複數個解析反應器，如本文別處所進一步詳述。在一些情況下，第一基板之第一表面的解析基因座可包含試劑塗層。第二基板之第二表面的解析基因座可包含試劑塗層。在一些實施例中，試劑塗層可共價連接至第一或第二表面。在存在第三、第四、第五、第六、第七、第八、第九或第十表面時之情況中，各表面可包含試劑塗層。

第一表面或第二表面上之試劑塗層可包含寡核苷酸。如本文別處所進一步描述，寡核苷酸可為任何長度，例如至少25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300 bp或300 bp以上。在用解析反應器蓋密封解析基因座後，可釋放包含在試劑塗層內之寡核苷酸。在複數個解析反應器內部可進行多種反應，例如寡核苷酸擴增反應、PCA、定序庫生成或錯誤校正。

寡核苷酸可藉由如本文別處所進一步詳述及此項技術中已知的各種適合方法，如該項技術中所熟知，例如藉由酶促裂解而自經塗佈之表面釋放。此類酶促裂解之實例包括(但不限於)使用諸如MIyI之限制酶或其他酶、或能夠裂解單股或雙股DNA之酶的組合，諸如(但不限於)尿嘧啶DNA醣苷酶(UDG）及DNA核酸內切酶IV。此項技術中已知的其他裂解方法亦可有利地用於本發明中，包括(但不限於)化學(鹼不穩定)裂解DNA分子或自表面光學(光不穩定)裂解。PCR或其他擴增反應亦可用於藉由複製寡核苷酸而產生用於基因合成之建構材料，同時該等寡核苷酸仍錨定於基板。釋放寡核苷酸之方法描述於P.C.T.專利公開案第WO2007137242號及美國專利第5,750,672號中，其以全文引用的方式併入本文中。

在一些情況下，自第一表面剝離覆蓋元件及自第二表面剝離覆蓋元件之剝離可以不同速度進行。在自對應表面剝離覆蓋元件後所保留之試劑

部分的量可由速度或覆蓋元件及對應表面之表面能來控制。在一些情況下，第一或第二表面包含在給定液體(諸如水)下之不同表面張力、表面能或疏水性。在一些情況下，第一表面之解析基因座可包含高表面能、表面張力或疏水性。覆蓋元件與對應表面之表面能或疏水性的差異可為控制在剝離後所保留之試劑部分的參數。第一及第二反應之體積可為不同的。

在一些情況下，解析反應器外之氣壓可能大於解析反應器內之壓力。在其他情況下，解析反應器外之氣壓可能小於解析反應器內之壓力。解析反應器外與解析反應器內之氣壓差(或差壓)可影響解析反應器之密封。藉由改質第一表面及第二表面之表面能或疏水性，差壓可在第一表面與第二表面之反應器蓋之間的間隙內產生曲線或直線氣/液介面。此外，自表面剝離覆蓋元件所需的力可由差壓及差異性表面能來控制。在一些情況下，表面可經改質以具有差異性表面能及差壓，使得覆蓋元件能夠易於自表面剝離。

第一或第二反應或在第二反應後之任何反應可包含如本文所述之各種分子或生物化學分析或此項技術中已知的任何適合反應。在一些情況下，第一或第二反應可包含聚合酶循環組裝。在一些情況下，第一或第二反應可包含酶促基因合成、黏接及接合反應、經由雜交基因之兩個基因的同時合成、鳥槍法接合及共接合、插入基因合成、經由DNA之一股的基因合成、模板引導之接合、接合酶鏈反應、微陣列介導之基因合成、固相組裝、Sloning建構嵌段技術或RNA接合介導之基因合成。反應或用於進行一組並行反應之方法可進一步包含冷卻覆蓋元件或冷卻第一表面(第二表面)。

使用本文所述之系統之本發明之方法及組合物的一般方法工作流程

圖示於圖8中。

輔助儀器使用

在一個態樣中，本發明係關於用於寡核苷酸合成之系統及方法。用於寡核苷酸合成之系統可包含掃描沈積系統。用於寡核苷酸合成之系統可包含具有官能化表面及複數個解析基因座之第一基板(例如寡核苷酸合成晶圓)及通常包含複數個印刷頭之噴墨印刷機。每一印刷頭通常經組態以沈積各種建構嵌段中之一者用於在第一基板之解析基因座中進行之反應，例如用於胺基磷酸酯合成之核苷酸建構嵌段。寡核苷酸合成晶圓之解析基因座可位於如本文別處所進一步詳述之微通道中。基板可例如藉由提供液體之連續流而密封在流槽內，諸如含有用於解析基因座內之反應的必需試劑(例如甲苯中之氧化劑)或允許精確控制試劑在合成位點(例如寡核苷酸合成晶圓之解析基因座)之劑量及濃度的溶劑(例如乙腈)的彼等液體。諸如氮氣之惰性氣體流可用於乾燥基板，通常經由增強揮發性基板之蒸發。例如真空源/減壓泵或真空罐之各種構件可用以形成降低的相對壓力(負壓)或真空來改良乾燥及減少表面上之殘餘水分量及任何液滴。因此，直接圍繞基板或其解析基因座之壓力可量測為約或小於約100、75、50、40、30、20、15、10、5、4、3、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01 mTorr或0.01 mTorr以下。

圖3圖示用於寡核苷酸合成之系統的實例。因此，寡核苷酸合成晶圓經配置以提供用於寡核苷酸合成之解析基因座及經由入口歧管及視情況存在之出口歧管提供必需的大部分試劑。大部分試劑可包括任何適用於在各種實施例中之複數個解析基因座當中通常所需的寡核苷酸合成之試劑、載劑、溶劑、緩衝劑或氣體，諸如氧化劑、去阻斷劑、乙腈或氮氣。噴墨印

刷機印刷頭可以X-Y方向移動至第一基板之可定址位置。第二基板(諸如覆蓋元件)如本文別處所進一步詳述，可以Z方向及(若需要)以X及Y方向移動以便與第一基板密封在一起，形成複數個解析反應器。或者，第二基板可為靜止的。在此類情況下，合成基板可以Z方向及(若需要)以X及Y方向移動，以便與第二基板對準且密封。合成之寡核苷酸可自第一基板傳遞至第二基板。適量流體可穿過入口歧管及第一基板之解析基因座進入第二基板以有助於來自第一基板/其解析基因座之試劑傳遞至第二基板中。在另一態樣中，本發明係關於一種用於包含晶圓操作之寡核苷酸組裝的系統。

在各種實施例中，本發明利用掃描沈積系統。掃描沈積系統可包含噴墨機，可用於使試劑沈積至解析基因座或蝕刻於基板中之微孔。在一些實施例中，掃描沈積系統可使用有機溶劑或墨水。在一些情況下，掃描沈積系統可包含複數個晶圓，諸如矽晶圓，通常直徑約200 mm。在一些情況下，整個系統可在大氣控制之殼體中置放且起作用。掃描沈積系統可包含工作包封、印刷頭總成、流槽總成及/或服務包封。在一些情況下，印刷頭總成可移動，而流槽總成保持靜止。掃描沈積系統可包含一或多個流槽，諸如2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50個或50個以上流槽為一或多個基板/晶圓服務，諸如2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50個或50個以上基板/晶圓。晶圓可保持固定在流槽內。在一些情況下，該系統可有助於基板經由θ_z自動化對準。工作包封可包括包含掃描方向行程之區域，例如在一個特定實施例中，約(n-1)印刷頭間距+晶圓直徑 = 9×20mm + 200 mm = 380 mm。可在等效設置下設想適合之工作包封。服務包封可包含停放用於維護之印刷頭。在一些情

況下，服務包封可與較大盒體環境隔離。在各種實施例中，用於本文所述之方法及組合物之系統包含用於寡核苷酸合成、寡核苷酸組裝或更一般用於製造試劑之掃描沈積系統。

複數個解析基因座及複數個解析反應器蓋可位於具有互連性或流體連通之微結構上。此類流體連通允許洗滌及以液滴形式灌注新試劑或使用連續流用於反應之不同步驟。流體連通微通道可含有去往及/或來自複數個解析基因座及複數個解析反應器之入口及出口。入口及/或出口可藉由此項技術中之任何已知方法來製得。舉例而言，入口及/或出口可提供於基板之前側及背側。形成入口及/或出口之方法描述於美國專利公開案第US 20080308884 A1號中，其以全文引用的方式併入本文中，可包含藉由微影及蝕刻方法在前側製造適合之微結構組件；自該基板之背側鑽孔，與前側上之微結構精確對準，以便提供去往及/或來自該微機械結構之入口及/或出口。入口及/或出口可為赫爾-肖型流槽(Hele-Shaw type flowcell)，其中流體藉由歧管在薄間隙進料中流動。如圖9A所圖示，本文所述之基板可形成流槽之一部分。流槽可藉由在基板(亦即晶圓)頂部上方滑動封蓋封閉且可夾持於在基板邊緣周圍形成耐壓密封件的位置中。在一些實施例中，密封件可相對於真空或約1、2、3、4、5、6、7、8、9或10個大氣壓之壓力足夠密封。試劑可引入基板(亦即晶圓)下方之薄間隙中且向上流動穿過基板。試劑可接著如圖9B所圖示收集於楔形廢料收集器中。在最終溶劑洗滌步驟後，在一些實施例中，晶圓可排出例如穿過總成底部且隨後用氮氣吹掃。腔室可接著抽降至真空以乾燥任何微結構中之剩餘溶劑，使殘餘液體或水分減至以體積計小於50%、30%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%、

0.001%、0.0001%、0.00001%或0.00001%以下。腔室可接著抽降至真空以使基板周圍的壓力減小至小於0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、75、100、200、300、400、500或1000 mTorr。在一些情況下，腔室可在真空步驟之後用氮氣填充，且腔室頂可再次滑動開以允許系統之輔助部分(例如印刷機)進入。在一些情況下，流槽可為打開的。基板/晶圓可經安裝以使得廢料歧管側向移位，如圖9B所圖示。此裝配可允許噴墨機較易於接近晶圓。此時，試劑可沈積於微孔中。在一些實施例中，解析殼體(亦即流槽)之封蓋可充當廢料收集器，且試劑液體可流至其中。圖9B及9C中之箭頭表示試劑之例示性流動方向。在一些情況下，試劑可如圖9C所圖示經由底部上之薄間隙進入，通過基板(例如矽晶圓)中之洞且收集於廢料收集器中。在一些情況下，氣體可吹掃穿過上部或底部歧管以將液體驅逐出，例如穿過流槽之底部或頂部。出口端或入口端可連接至真空以完全乾燥。真空端可連接至廢料側或入口側，如圖10所圖示。在一些實施例中，可存在複數個通過基板(亦即晶圓)之壓力釋放洞。複數個洞可大於約1000、5000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000或2,000,000個。在一些情況下，複數個洞可大於5百萬個。在一些情況下，如本文別處所進一步詳述之用於合成之微結構充當壓力釋放洞。此等洞可隨著解析殼體抽空以使基板乾透而允許氣體自晶圓一側通過。在一些情況下，例如若空氣自廢料收集器側驅逐出，廢料收集器側之氣壓$P_{廢料}$可與入口側之氣壓$P_{入口}$保持在實質上相同的水準下。在一些實施例中，可使用將入口歧管連接至廢料收集器之端口。因此，可在不傳送晶圓基板的情況下進行本文所述之複數個步驟，諸如掃描、沈積、淹沒、洗滌、吹掃及/或乾燥。

藉由密封第一基板及第二基板所形成之解析反應器可封閉在具有受控濕度、空氣含量、蒸氣壓及/或壓力之腔室中，形成在受控環境下之總成。在一些實施例中，腔室之濕度可為飽和的或約100%以防止液體在反應期間自解析反應器蒸發。舉例而言，濕度可控制在約、小於約或大於約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%或25%。

本文所述之系統，諸如在上述受控環境總成下之彼等系統，可包括真空裝置/夾盤及/或可操作地與複數個解析反應器連接之溫度控制系統。基板可安置在真空夾盤上。真空夾盤可包括直接安置在基板下方的表面不規則處。在各種實施例中，表面不規則處可包含通道或凹座。真空夾盤可與基板流體連通以便自由通道界定之空間抽出氣體。使基板維持在真空裝置上之方法進一步詳細描述於美國專利第8247221號中，其以全文引用的方式併入本文中。

在各種實施例中，基板(例如矽晶圓)可安置於夾盤上，諸如上述真空夾盤。圖10例示在基板與溫度控制裝置之間單凹槽真空夾盤及燒結金屬片之系統總成。真空夾盤可包含具有適合於容納基板之維度的單凹槽。在一些實施例中，真空夾盤經設計以使得基板可在本文所述之方法中之一或多者期間保持在原地。舉例而言，圖10A所圖示之真空夾盤包含直徑大致198 mm之單個1-5 mm凹槽。在一些情況下，單凹槽真空夾盤設計可用於為基板提供改良之熱傳遞。圖10B圖示位於基板(例如矽晶圓)與用黏著劑固定在原地之真空夾盤之間的燒結金屬插入物。在一些實施例中，夾盤可

為靜電夾盤，如美國專利第5,530,516號中所進一步描述，其以全文引用的方式併入本文中。

可使用此項技術中已知的任何方法使複數個解析反應器蓋與第一表面上之複數個解析基因座對準，在第一表面與覆蓋元件之間形成臨時密封件，如美國專利第8,367,016號及歐洲專利第EP 0126621 B1號所述，其均以全文引用之方式併入本文中。舉例而言，對於具有複數個解析基因座、解析基因座具有x、y及z維度及沿著z維度定位之基因座深度中心點的基板，基因座深度中心點可位於距嵌入基板內之基準標誌之已知z維度距離處。基板可置放在可包括能夠偵測基準標誌之光學裝置的成像系統內。光學裝置可界定與z維度軸向對準之光學路徑且可具有垂直於光學路徑的焦平面。當焦平面沿著光學路徑移動時，與當焦平面實質上未與z深度共平面時相比，當焦平面處於z深度時可最大限度地偵測到基準標誌。基準標誌可以適合之空間排列選擇性置放在第一基板(例如包含複數個解析基因座之合成晶圓)及/或第二基板(例如包含複數個覆蓋元件之反應器元件)上。在一些實施例中，可靠近解析基因座形成全域對準基準標誌。視應用而定，可存在變化形式、替代方案及修改方案。舉例而言，兩個基準標誌可處於解析基因座附近以內且第三基準標誌可處於基板邊緣。舉另一例而言，本文所述之基板中微結構之圖案本身可以適於對準之可識別方式加以選擇，例如呈不對稱圖案，且可用於對準。在一些情況下，基準標誌充當對準點以校正場或其他光學特徵之深度。美國專利第4,123,661號以全文引用的方式併入本文中，揭示在基板上進行電子束對準，標誌彼此鄰近但隔開一定距離，使得標誌之上升斜率及下降斜率可藉由視訊信號偵測到，從而允許對準。

該系統可包含加熱組件、冷卻組件或溫度控制元件(例如熱循環裝置)。在各種實施例中，與複數個解析反應器一起使用之熱循環裝置可經組態以進行核酸擴增或組裝，諸如PCR或PCA或本文所述或此項技術中已知之任何其他適合之核酸反應。溫度可經控制以使得反應器內之溫度可為均一的且可快速傳熱。在各種實施例中，本文所述之系統可具有用於例如在寡核苷酸合成、基因組裝或核酸擴增期間基板內之反應器或個別微結構之端點或即時偵測的偵測組件。

本文所述之系統中之任一者可操作地連接於電腦且可經由本端或遠端電腦而自動化。用於控制本文所述之系統組件的電腦及電腦系統進一步描述於本文別處。

主要組合物-寡核苷酸

如本文所用，術語「預選序列」、「預定義序列」或「預定序列」可互換使用。該等術語意指聚合物之序列為在聚合物之合成或組裝之前已知及選擇的。詳言之，本文主要就核酸分子之製備描述本發明之各種態樣，寡核苷酸或聚核苷酸之序列為在核酸分子之合成或組裝之前已知及選擇的。在一個實施例中，寡核苷酸為短核酸分子。舉例而言，寡核苷酸可為約10至約300個核苷酸、約20至約400個核苷酸、約30至約500個核苷酸、約40至約600個核苷酸或大於約600個核苷酸長。熟習此項技術者瞭解，寡核苷酸長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如約10至約400個核苷酸或約300至約400個核苷酸等)。適當短或長的寡核苷酸可如具體應用所需要來加以使用。個別寡核苷酸可經設計以具有與庫中之其他寡核苷酸不同的長度。寡核苷酸可為相對較短，更特定言之，例如短於200、100、80、60、50、40、30、25、20、15、12、10、9、8、7、6、5或4

個核苷酸。亦涵蓋相對較長寡核苷酸；在一些實施例中，寡核苷酸長於或等於7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、125、150、200、250、300、350、400、500、600個或600個以上寡核苷酸。通常，寡核苷酸為單股DNA或RNA分子。

在本發明之一個態樣中，提供用於合成複數個具有預定序列之核酸的裝置。該裝置可包括具有複數個特徵之支撐物，每一特徵具有複數個寡核苷酸。在一些實施例中，具有預定義序列之複數個寡核苷酸固定在固體支撐物之不同離散特徵處。在一些實施例中，寡核苷酸為單股。在一些實施例中，複數個寡核苷酸序列可包含簡併序列。在一些實施例中，寡核苷酸為支撐物結合的。在一些實施例中，該裝置包含具有複數個樣點或特徵之固體支撐物，且複數個樣點中之每一者包括複數個支撐物結合之寡核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸經由其3'端共價連接至固體支撐物。然而，在其他實施例中，寡核苷酸經由其5'端共價連接至固體支撐物。

在一些實施例中，表面或支撐物結合之寡核苷酸經由其3'端固定。應瞭解，3'端意指5'端下游之序列，例如5'端下游之2、3、4、5、6、7、10、15、20個或20個以上核苷酸，再如關於序列之3'一半、三分之一或四分之一，再如相距絕對3'端小於2、3、4、5、6、7、10、15或20個核苷酸，且5'端意指3'端上游之序列，例如3'端上游2、3、4、5、6、7、10、15、20個或20個以上核苷酸，再如關於序列之5'一半、三分之一或四分之一，再如相距絕對5'端小於2、3、4、5、6、7、10、15或20個核苷酸。舉例而言，寡核苷酸可經由核苷酸序列(例如簡併結合序列)、連接基團或間隔基團(例如未參與雜交之部分)固定於支撐物上。在一些實施例中，寡

核苷酸包含使寡核苷酸序列與支撐物分開之間隔基團或連接基團。適用之間隔基團或連接基團包括可光裂解連接基團或其他傳統化學連接基團。在一個實施例中，寡核苷酸可經由可裂解鍵聯部分附接至固體支撐物。舉例而言，固體支撐物可經官能化以提供共價附接至寡核苷酸之可裂解連接基團。連接基團部分可為六個或六個以上原子長。或者，可裂解部分可在寡核苷酸內且可在就地合成期間引入。廣泛多種可裂解部分為固相及微陣列寡核苷酸合成技術中可用的(參見例如Pon, R., Methods Mol. Biol. 20:465- 496 (1993)；Verma等人，Annu. Rev. Biochem. 67:99-134 (1998)；美國專利第5,739,386號、第5,700,642號及第5,830,655號；及美國專利公開案第2003/0186226號及第2004/0106728號)。適合之可裂解部分可經選擇以尤其與核苷鹼基之保護基的性質、固體支撐物之選擇及/或試劑傳遞模式相容。在一個例示性實施例中，自固體支撐物裂解之寡核苷酸含有游離3'-OH端。或者，游離3'-OH端亦可在寡核苷酸裂解之後藉由化學或酶促處理來獲得。在各種實施例中，本發明係關於將支撐物或表面結合之寡核苷酸釋放至溶液中之方法及組合物。可裂解部分可在不降解寡核苷酸之條件下移除。連接基團較佳可使用兩種方法裂解，在與脫除保護基步驟相同的條件下同時或在脫除保護基步驟完成後接著利用不同條件或試劑用於連接基團裂解。

在其他實施例中，寡核苷酸在溶液中。舉例而言，寡核苷酸可提供在離散體積內，諸如在不同離散特徵之液滴或微滴。在一些實施例中，可使用在約0.5 pL與約100 nL之間的離散微體積。然而，可使用更小或更大的體積。在一些實施例中，適合之施配器或連續流(諸如由泵致動穿過微結構之流體)可用於將小於100 nL、小於10 nL、小於5 nL、小於100 pL、

小於10 pL或小於0.5 pL之體積轉移至本文所述之基板的微結構及其之間。舉例而言，來自寡核苷酸合成晶圓之一或多個微結構的小體積可藉由推動流體穿過寡核苷酸合成晶圓而施配至覆蓋元件之反應器蓋中。

在一些實施例中，複數個核苷酸酸構築體提供在支撐物之不同特徵處。在一些實施例中，包括短寡核苷酸及較長/組裝聚核苷酸之核酸構築體為部分雙股或雙螺旋體寡核苷酸。如本文所用，術語「雙螺旋體」係指至少部分雙股之核酸分子。術語「核苷」或「核苷酸」意欲包括不僅含有已知嘌呤及嘧啶鹼基，而且含有已經修飾之其他雜環鹼基的彼等部分。此類修飾包括使嘌呤或嘧啶甲基化、使嘌呤或嘧啶醯基化、使核糖或其他雜環烷基化或本文所述或另外此項技術中已知之任何其他適合之修飾。此外，術語「核苷」及「核苷酸」包括不僅含有習知核糖及脫氧核糖，而且亦含有其他糖之彼等部分。經修飾之核苷或核苷酸亦包括對糖部分之修飾，例如其中羥基中之一或多者經鹵素原子或脂族基置換或經官能化為醚、胺或其類似物。

應瞭解，如本文所用之術語「核苷」及「核苷酸」係指不僅含有習知嘌呤及嘧啶鹼基，亦即腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)及尿嘧啶(U)，而且含有其受保護之形式，例如其中鹼基受諸如乙醯基、二氟乙醯基、三氟乙醯基、異丁醯基或苯甲醯基之保護基保護，及嘌呤及嘧啶類似物的核苷及核苷酸。適合之類似物應為熟習此項技術者已知且描述於相關文字及文獻中。常用類似物包括(但不限於)1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6-異戊基腺嘌呤、2-甲硫基-N6-異戊基腺嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、2-硫胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-乙基胞嘧啶、4-乙醯基胞嘧啶、1-甲基鳥嘌呤、2-

甲基鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、2,2-二甲基鳥嘌呤、8-溴鳥嘌呤、8-氯鳥嘌呤、8-胺基鳥嘌呤、8-甲基鳥嘌呤、8-硫鳥嘌呤、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、5-羥甲基尿嘧啶、5-(羧基羥甲基)尿嘧啶、5-(甲基胺基甲基)尿嘧啶、5-(羧甲基胺基甲基)-尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、5-(2-溴乙烯基)尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶、Q核苷(queosine)、肌苷、1-甲基肌苷、次黃嘌呤、黃嘌呤、2-胺基嘌呤、6-羥胺基嘌呤、6-硫嘌呤及2,6-二胺基嘌呤。此外，術語「核苷」及「核苷酸」包括不僅含有習知核糖及脫氧核糖，而且亦含有其他糖之彼等部分。經修飾之核苷或核苷酸亦包括對糖部分之修飾，例如其中羥基中之一或多者經鹵素原子或脂族基置換或經官能化為醚、胺或其類似物。

如本文所用，術語「寡核苷酸」應泛指聚脫氧核苷酸(含有2-脫氧-D-核糖)、聚核糖核苷酸(含有D-核糖)、任何其他類型之聚核苷酸(亦即嘌呤或嘧啶鹼基之N-糖苷)及含有非核苷酸主鏈之其他聚合物(例如PNA)，其限制條件為該等聚合物含有呈諸如DNA及RNA中所發現之組態允許鹼基配對及鹼基堆疊之核鹼基。因此，此等術語包括已知類型之寡核苷酸修飾，例如天然存在之核苷酸中之一或多者經類似物取代；核苷酸內修飾，諸如具有不帶電荷之鍵聯(例如膦酸甲酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等)、具有帶負電荷之鍵聯(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)及具有帶正電荷之鍵聯(例如胺基烷基胺基磷酸酯、胺基烷基磷酸三酯)之彼等修飾、含有側位部分(諸如蛋白質(包括核酸酶、毒素、抗體、信號肽、聚-L-離胺酸等))之彼等修飾、具有嵌入劑(例如吖啶、補骨脂素(psoralen)

等)之彼等修飾、含有螯合劑(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化金屬等)之彼等修飾。在術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」之間不存在預期長度區別，且此等術語應可互換使用。

如例如具有部分「附接」至上面的基板表面中之術語「附接」包括共價結合、吸收及物理固定。術語「結合(binding)」及「結合(bound)」含義與術語「附接」相同。

在各種實施例中，本發明係關於除核酸以外之分子的合成，諸如化學合成。如本說明書及申請專利範圍通篇所用之術語「肽」、「肽基」及「肽的」意欲包括包含兩個或兩個以上胺基酸之任何結構。對於大部分而言，本發明陣列中之肽包含約5至10,000個胺基酸，較佳約5至1000個胺基酸。形成全部或一部分肽之胺基酸可為二十種習知天然存在之胺基酸中之任一者，亦即丙胺酸(A)、半胱胺酸(C)、天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)、苯丙胺酸(F)、甘胺酸(G)、組胺酸(H)、異白胺酸(I)、離胺酸(K)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、天冬醯胺(N)、脯胺酸(P)、麩醯胺酸(Q)、精胺酸(R)、絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)、纈胺酸(V)、色胺酸(W)及酪胺酸(Y)。形成本發明陣列之肽分子中之胺基酸中之任一者可由非習知胺基酸置換。一般，保守置換為較佳的。保守置換用在一或多個特性(例如電荷、疏水性、硬脂酸主體；例如吾人可用Nval置換Val)方面類似原始胺基酸之非習知胺基酸取代原始胺基酸。術語「非習知胺基酸」係指除習知胺基酸以外之胺基酸，且包括例如習知胺基酸之異構體及修飾物(例如D-胺基酸)、非蛋白質胺基酸、經轉譯後修飾之胺基酸、經酶促修飾之胺基酸、經設計以模擬胺基酸之構築體或結構(例如α,α-二取代之胺基酸、N-烷基胺基酸、乳酸、β-丙胺酸、萘基丙胺酸、3-吡啶基丙胺酸、4-羥脯胺酸、O-磷絲胺

酸、N-乙醯基絲胺酸、N-甲醯甲硫胺酸、3-甲基組胺酸、5-羥基離胺酸及正-白胺酸)及在肽主鏈內之一或多個位點處具有天然存在之醯胺-CONH-鍵經以下非習知鍵置換之肽，諸如N-取代之醯胺、酯、硫醯胺、逆向肽(-NHCO-)、逆向硫醯胺(-NHCS-)、磺醯胺基(-SO2NH-)及/或類肽(N-取代之甘胺酸)鍵。因此，陣列之肽分子包括假肽及肽模擬物。本發明之肽可為(a)天然存在的，(b)藉由化學合成產生，(c)藉由重組DNA技術產生，(d)藉由較大分子之生物化學或酶促斷裂產生，(e)藉由以上列出之方法(a)至(d)之組合產生的方法產生，或(f)藉由用於產生肽之任何其他方式產生。

術語「寡聚物」意欲涵蓋任何聚核苷酸或多肽或具有諸如核苷酸、胺基酸、碳水化合物及其類似物之重複部分的其他化合物。

在一些實例中，裝置在特定位置(亦即「位址」)具有至少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個或1,000,000個以上不同特徵(或「區域」或「樣點」)。應瞭解，裝置可包含一或多個固體支撐物。裝置之每一可定址位置可容納不同組合物，諸如不同寡核苷酸。或者，裝置之可定址位置之群可容納完全或實質上類似的組合物，例如寡核苷酸，與裝置微結構之其他群中所容納的彼等組合物不同。

在可單獨定址之位置及/或混合群體中可藉由本發明之方法製備之各種寡核苷酸的數目可在5至500,000個、500至500,000個、1,000至500,000個、5,000至500,000個、10,000至500,000個、20,000至500,000個、30,000至500,000個、5,000至250,000個、5,000至100,000個、5至5,000個、5至50,000個、5,000至800,000個、5,000至1,000,000個、5,000至

2,000,000個、10,000至2,000,000個、20,000至1,000,000個、30,000至2,000,000個等範圍內。在各種實施例中，可合成約或大於約5個、10個、20個、50個、100個、500個、1000個、10000個、100000個、1000000個、10000000個、100000000個或100000000個以上各種寡核苷酸之複本。在一些情況下，可合成小於100000000個、10000000個、1000000個、100000個、10000個、1000個、100個或100個以下寡核苷酸複本。

寡核苷酸硫代磷酸酯(OPS)為經修飾之寡核苷酸，其中磷酸酯部分中之一個氧原子經硫置換。廣泛使用在非橋聯位置處具有硫之硫代磷酸酯。OPS朝向藉由核酸酶水解實質上更穩定。此特性致使OPS成為欲作為反義寡核苷酸用於包含廣泛暴露於核酸酶之活體外及活體內應用的有利候選。類似地，為改良siRNA之穩定性，常常在有義股及/或反義股之3'-端引入至少一個硫代磷酸酯鍵。在一些實施例中，本發明之方法及組合物係關於OPS之重新/化學合成。可使用本文所述之方法及組合物並行進行大量OPS之合成。

單股核酸之擴增

在各種實施例中，方法及系統係關於單股核酸之擴增。因此，單股核酸，例如單股DNA(ssDNA)，可在經分離之樣品中、在複數個並行樣品中或在具有相同樣品內之複數個不同單股核酸的經多重格式中擴增。可在並行格式中擴增之複數個樣品可為至少或約至少1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、25個、50個、55個、100個、150個、200個、250個、300個、350個、500個、550個、600個、650個、700個、750個、800個、850個、900個、950個、1000個或1000個以上。可在並行格式中擴增之複數個樣品可為1-1000個、2-950個、3-900個、4-850個、5-800個、

10-800個、20-750個、25-700個、30-650個、35-600個、40-550個、45-500個、50-450個、55-400個、60-350個、65-250個、70-200個、75-150個、80-100個。熟習此項技術者應瞭解，可在並行格式中擴增之複數個樣品可處於由任何此等值限定的任何範圍之間，例如3-800個。經多重擴增反應之數目可為至少或約至少1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、25個、50個、100個或100個以上。經多重擴增反應之數目可為1-100個、2-50個、3-25個、4-20個、5-10個。熟習此項技術者應瞭解，經多重擴增反應之數目可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如3-100個。

相同樣品內之不同單股核酸的數目可為至少或約至少1個、2個、3個、10個、50個、100個、150個、200個、1000個、10000個、100000個或100000個以上。相同樣品內之不同單股核酸的數目可為至多或約至多10000個、10000個、1000個、200個、150個、100個、50個、10個、3個、2個、1個或1個以下。相同樣品內之不同單股核酸的數目可為1-100000個、2-10000個、3-1000個、10-200個、50-100個。熟習此項技術者瞭解，相同樣品內之不同單股核酸的數目可為由任何此等值限定的任何此等範圍之間，例如3-100個。

單股目標核酸可為至少或約至少10個、20個、50個、100個、200個、500個、1000個、3000個或3000個以上核苷酸長。單股目標核酸可為至多或約至多3000個、1000個、500個、200個、100個、50個、20個、10個或10個以下核苷酸長。單股目標核酸可為50-500個、75-450個或100-400個核苷酸長。熟習此項技術者瞭解，單股目標核酸之長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如50-1000個。

現參照圖64，單股目標核酸可側接一或多個轉接子雜交序列。此等

轉接子雜交序列可為至少或約至少12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個或20個以上核苷酸長。此等轉接子雜交序列可為至少或約至少20個、19個、18個、17個、16個、15個、14個、13個、12個或12個以下核苷酸長。轉接子雜交序列可為15-20個、16-19個、17-18個核苷酸長。熟習此項技術者瞭解，轉接子雜交序列之長度可處於由任何此等值限定的範圍內，例如15-17個、12-20個或13-25個。轉接子雜交序列可由樣品內之複數個核酸共用，其中該複數個單股核酸具有變化的單股目標核酸區。每一組具有不同轉接子雜交序列之多組單股核酸可共存於樣品內且經受本文所述之擴增方法。不同轉接子雜交序列可彼此至少或至少約1個、2個、5個、10個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個或50個以上核苷酸不同。不同轉接子雜交序列可彼此至多或至多約50個、45個、40個、35個、30個、25個、20個、15個、10個、5個、2個、1個或1個以下核苷酸不同。不同轉接子雜交序列可彼此1-50個、2-45個、5-40個、10-35個、15-25個或20-30個數目之核苷酸不同。熟習此項技術者瞭解，不同轉接子雜交序列可彼此一定數目之核苷酸不同，該數目處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如2-50個。因此，許多共用末端序列之單股核酸可使用單個通用轉接子，使得通用轉接子可雜交至所有該等核酸。複數個轉接子可用於具有複數個單股核酸之組的樣品中，其中該等轉接子中之每一者可雜交至該等組中之一或多者中的末端序列。至少或至少約1個、2個、3個、4個、5個、10個、20個、25個、30個、50個、100個或100個以上轉接子可以經多重方式使用。至多或約至多100個、50個、30個、25個、20個、10個、5個、4個、3個、2個、1個或1個以下轉接子可以經多重方式使用。1-100個、2-50個、3-30個、4-25

個、5-20個轉接子可以經多重方式使用。熟習此項技術者瞭解，可以經多重方式使用之轉接子的數目可處於由任何此等值限定的任何範圍內，例如2-30個。轉接子上之第一序列可雜交至單股核酸之5'端且轉接子上之第二序列可雜交至相同單股核酸之3'端，有助於該單股核酸之環化。

單股核酸可在與轉接子雜交後環化。環化單股核酸可在其5'及3'端接合，形成鄰接環。各種接合方法及酶適用於如本文別處所述及另外此項技術中已知的反應。

可使用環化單股核酸作為模板使轉接子延伸。或者，一或多個不同引子可用於另外黏接在環上別處或代替轉接子，且可使用聚合酶延伸。延伸反應，諸如圓周開捲擴增、多引子圓周開捲擴增或任何其他適合之延伸反應，可有助於形成一種包含單股模板核酸及轉接子雜交序列之交替複製品的長直鏈單股擴增子核酸。在一些實施例中，轉接子雜交序列之組合複製品為轉接子序列之複本或相差不到8個、7個、6個、5個、4個、3個或2個核苷酸。此等序列將共同簡稱為「轉接子複本」，但應瞭解，其可係指使用環作為模板由延伸反應產生之許多不同類型之序列。

可提供一或多個輔助寡核苷酸以黏接至單股擴增子核酸。輔助寡核苷酸可與轉接子複本部分或完全互補。輔助寡核苷酸與單股擴增子核酸雜交可形成交替的單股區及雙股區。單股區可對應於單股模板核酸序列之複製品。輔助寡核苷酸與單股擴增子核酸例如在轉接子複本處之雜交可產生裂解劑之識別位點，諸如限制性核酸內切酶，例如IIS型限制性核酸內切酶。序列可以一種方式加以設計，該方式使得裂解劑之切割位點落在單股區及雙股區之接合點處或附近。在一些情況下，在用一或多種裂解劑裂解後，將形成單股目標核酸之複數個單股複製品，其中該等單股目標核酸不

含有轉接子複本之任何部分，或含有不到15個、14個、13個、12個、11個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個或1個來自轉接子複本之核苷酸。

輔助寡核苷酸可具有親和標籤，諸如生物素或生物素衍生物。親和標籤可處於寡核苷酸之5'端、3'端或中間。可在純化介質(諸如抗生蛋白鏈菌素塗佈之珠粒表面)上使用親和力結合搭配物或任何其他適合之親和純化方法促進來自樣品之輔助寡核苷酸的純化。經裂解之轉接子複本或其部分亦可連同輔助寡核苷酸一起純化，藉由其與輔助寡核苷酸之雜交來促進。在使用複數個轉接子之經多重反應中，可使用複數個輔助寡核苷酸，每一者雜交至不同組之單股擴增子核酸，例如在轉接子複本之位置處。諸如HPLC或PAGE純化之替代性純化方法可在存在或不存在親和標籤寡核苷酸的情況下使用。

現參照圖65，單股核酸亦可以與圖64所述之方法類似的方式擴增，除了序列及裂解劑經選擇以使得切割位點落在轉接子複本內，從而形成具有側接區之單股目標核酸序列的單股複製品。此類側接區可為原始單股目標核酸序列之側接區的反向互補序列。或者，視切割位點之精確位置而定，其可使核苷酸自一個側接區「移位」至另一者。在此類情況下，轉接子核苷酸之反向互補寡核苷酸可仍實際上雜交至兩端以促進另一輪環化。因此，圖65所圖示之方法可單獨或作為圖64所圖示之方法的前驅反應重複複數次，諸如至少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次或30次以上以擴增單股目標核酸。圖64所圖示之方法可用作最後一輪以擺脫側接區，保留後面單股目標核酸之擴增單股複本或複製品。

包含擴增的所需寡核苷酸及轉接子寡核苷酸的單股重複單元的延伸反應產物，諸如圓周開捲擴增產物，可在轉接子寡核苷酸內或附近裂解以產生釋放的所需寡核苷酸，其中該等釋放的所需寡核苷酸在所需寡核苷酸之5'或3'端處可能包含或可能不包含轉接子核苷酸。在一些實施例中，裂解在擴增的所需寡核苷酸及轉接子序列之單股重複單元的絕對接合點處實現。在一些實施例中，轉接子序列之一或多個區包含分子條碼、蛋白質結合位點、限制性核酸內切酶位點或其任何組合。在一些實施例中，擴增產物在限制性核酸內切酶識別位點處或附近用一或多種限制性核酸內切酶裂解，其中該識別位點位於轉接子寡核苷酸序列內。在用核酸內切酶裂解之前，擴增產物可與輔助寡核苷酸雜交，該輔助寡核苷酸包含與包含限制性核酸內切酶識別位點之轉接子寡核苷酸序列互補的序列。

擴增產物可在識別位點之5'端由II型核酸內切酶裂解。切割位點可為識別位點之第一個核苷酸上游的1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個或25個以上核苷酸。識別位點之5'或3'端可形成0個、1個、2個、3個、4個或5個核苷酸突出物。裂解產生0個核苷酸突出物的鈍端II型核酸內切酶包括MlyI及SchI。產生5'突出物(例如1個、2個、3個、4個、5個核苷酸突出物)之例示性IIS型核酸內切酶包括(但不限於)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及LguI。移除識別位點且在識別位點之5'位點上裂解之切口核酸內切酶包括(但不限於)Nb.BsrDI、Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、

BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I及UbaPI。

擴增產物可由在兩股上之識別位點的5'端裂解的非IIS型核酸內切酶裂解以產生鈍端。擴增產物可由在一股上之識別位點的5'端及另一股上之識別位點的中間裂解的非IIS型核酸內切酶裂解，產生5'突出物。產生5'突出物之核酸內切酶的實例包括(但不限於)BfuCI、DpnII、FatI、MboI、MluCI、Sau3AI、Tsp509I、BssKI、PspGI、StyD4I、Tsp45I、AoxI、BscFI、Bsp143I、BssMI、BseENII、BstMBI、Kzo9I、NedII、Sse9I、TasI、TspEI、AjnI、BstSCI、EcoRII、MaeIII、NmuCI及Psp6I。

擴增產物可由在識別位點之5'端裂解的切口核酸內切酶裂解以產生切口。切口位點可為識別位點之第一個核苷酸上游的1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個或25個以上核苷酸。例示性切口核酸內切酶包括(但不限於)Nb.BsrDI、Nb.BtsI、AspCNI、BscGI、BspNCI、EcoHI、FinI、TsuI、UbaF11I、UnbI、Vpak11AI、BspGI、DrdII、Pfl1108I及UbaPI。

擴增產物可在識別位點之3'端由IIS型核酸內切酶裂解。識別位點之5'或3'端可形成0個、1個、2個、3個、4個或5個核苷酸突出物。切割位點可為識別位點之最後一個核苷酸下游的1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個或25個以上核苷酸。在識別位點之最後一個核苷酸下游的0個核苷酸處裂解之IIS型核酸內切酶包括MlyI及SchI。產生3'突出物(例如1個、2個、3個、4個、5個核

苷酸突出物)之例示性IIS型核酸內切酶包括(但不限於)MnlI、BspCNI、BsrI、BtsCI、HphI、HpyAV、MboII、AcuI、BciVI、BmrI、BpmI、BpuEI、BseRI、BsgI、BsmI、BsrDI、BtsI、EciI、MmeI、NmeAIII、Hin4II、TscAI、Bce83I、BmuI、BsbI及BscCI。在一股上移除識別位點且在另一股上產生3'突出物或鈍端之非II型核酸內切酶包括(但不限於)NlaIII、Hpy99I、TspRI、FaeI、Hin1II、Hsp92II、SetI、TaiI、TscI、TscAI及TseFI。移除識別位點且在識別位點之3'端切割的切口核酸內切酶包括Nt.AlwI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI及Nt.BspQI。

識別位點與裂解位點之間的距離可視用於裂解之限制性核酸內切酶而定。舉例而言，在最佳反應條件下可有效裂解之切割位點位於識別位點下游或上游之1個鹼基對的限制性核酸內切酶包括(但不限於)AgeI、ApaI、AscI、BmtI、BsaI、BsmBI、BsrGI、DdeI、DraIII、HpaI、MseI、PacI、PciI、PmeI、PvuI、SacII、SapI、Sau3AI、ScaI、SfiI、SmaI、SphI、StuI及XmaI。在最佳反應條件下可有效裂解之切割位點位於識別位點下游或上游之2個鹼基對的限制性核酸內切酶包括(但不限於)AgeI、AluI、ApaI、AscI、BglII、BmtI、BsaI、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssHII、DdeI、DraIII、EagI、HpaI、KpnI、MseI、NlaIII、PacI、PciI、PmeI、PstI、PvuI、RsaI、SacII、SapI、Sau3AI、SbfI、ScaI、SfiI、SmaI、SphI、SspI、StuI、StyI及XmaI。在最佳反應條件下可有效裂解之切割位點位於識別位點下游或上游之3個鹼基對的限制性核酸內切酶包括(但不限於)AgeI、AluI、ApaI、AscI、AvrII、BamHI、BglII、BmtI、BsaI、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssHII、DdeI、DraIII、EagI、FseI、HindIII、HpaI、KpnI、MfeI、MluI、MseI、NcoI、

NdeI、NheI、NlaIII、NsiI、PacI、PciI、PmeI、PstI、RsaI、SacI、SacII、SaII、SapI、Sau3AI、Sbfl、ScaI、Sfil、SmaI、SphI、SspI、StuI、StyI及XmaI。在最佳反應條件下可有效裂解之切割位點位於識別位點下游或上游之4個鹼基對的限制性核酸內切酶包括(但不限於)AgeI、AluI、ApaI、AscI、AvrII、BamHI、BglII、BmtI、BsaI、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssHII、ClaI、DdeI、DraIII、EagI、EcoRI、FseI、HindIII、HpaI、KpnI、MfeI、MluI、MseI、NcoI、NdeI、NheI、NlaIII、NsiI、PacI、PciI、PmeI、PstI、PvuI、PvuII、RsaI、SacI、SacII、SaII、SapI、Sau3AI、Sbfl、ScaI、Sfil、SmaI、SphI、SspI、StuI、StyI、XhoI及XmaI。在最佳反應條件下可有效裂解之切割位點位於識別位點下游或上游之5個鹼基對的限制性核酸內切酶包括(但不限於)AgeI、AluI、ApaI、AscI、AvrII、BamHI、BglII、BmtI、BsaI、BsiWI、BsmBI、BsrGI、BssHII、ClaI、DdeI、DraIII、EagI、EcoRI、EcoRV、FseI、HindIII、HpaI、KpnI、MfeI、MluI、MseI、NcoI、NdeI、NheI、NlaIII、NsiI、NspI、PacI、PciI、PmeI、PstI、PvuI、PvuII、RsaI、SacI、SacII、SaII、SapI、Sau3AI、Sbfl、ScaI、Sfil、SmaI、SphI、SspI、StuI、StyI、XhoI及XmaI。

轉接子序列可包含一或多個限制性識別位點。在一些實施例中，識別位點為至少4個、5個或6個鹼基對長。在一些實施例中，識別位點為非迴文的。在一些實施例中，轉接子寡核苷酸包含兩個或兩個以上識別位點。兩個或兩個以上識別位點可用一或多種限制酶裂解。熟習此項技術者應已知，用兩種或兩種以上限制酶裂解兩個或兩個以上識別位點可藉由緩衝液及反應溫度最佳化而實現及/或完善。轉接子序列中之例示性識別位

點對包括(但不限於)MlyI-MlyI、MlyI-Nt.AlwI、BsaI-MlyI、MlyI-BciVI及BfuCI-MlyI。

基因

在各種實施例中，本發明之方法及組合物允許構築包含可單獨獲得之所關注之聚核苷酸之集合的基因庫。聚核苷酸可為直鏈、可保持在載體(例如質體或噬菌體)、細胞(例如細菌細胞)中、作為經純化之DNA或呈此項技術中已知的其他適合形式。庫成員(不同地稱為純系、構築體、聚核苷酸等)可以多種方式儲存用於擷取及使用，包括例如在多孔培養或微量滴定板中、在小瓶中、在適合之細胞環境(例如大腸桿菌細胞)中、作為適合之儲存培養基(例如Storage IsoCodeD IDTM DNA庫卡；Schleicher & Schuell BioScience)上之經純化之DNA組合物、或此項技術中已知的多種其他適合之庫形式。基因庫可包含至少約10個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、750個、1000個、1500個、2000個、3000個、4000個、5000個、6000個、7500個、10000個、15000個、20000個、30000個、40000個、50000個、60000個、75000個、100000個或100000個以上成員。本文所述之核酸分子可在微尺度數量下產生(例如飛莫耳至奈莫耳數量，諸如約0.001飛莫耳至約1.0奈莫耳、約0.01飛莫耳至約1.0奈莫耳、約0.1飛莫耳至約1.0奈莫耳、約0.001飛莫耳至約0.1奈莫耳、約0.001飛莫耳至約0.01奈莫耳、約0.001飛莫耳至約0.001奈莫耳、約1.0飛莫耳至約1.0奈莫耳、約1.0飛莫耳至約0.1奈莫耳、約1.0飛莫耳至約0.01奈莫耳、約1.0飛莫耳至約0.001奈莫耳、約10飛莫耳至約1.0奈莫耳、約10飛莫耳至約0.001奈莫耳、約20飛莫耳至約1.0奈莫耳、約100飛莫耳至約1.0奈莫耳、約500飛莫耳至約1.0奈莫耳、約1奈莫耳至約800奈莫耳、

約40奈莫耳至約800奈莫耳、約100奈莫耳至約800奈莫耳、約200奈莫耳至約800奈莫耳、約500奈莫耳至約800奈莫耳、約100奈莫耳至約1,000奈莫耳等)。熟習此項技術者瞭解，核酸數量可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如約0.001飛莫耳至約1000奈莫耳或約0.001飛莫耳至約0.01飛莫耳)。一般，核酸分子可在約或大於約0.001、0.01、0.1、1、10、100飛莫耳、1、10、100皮莫耳、1、10、100奈莫耳、1微莫耳或1微莫耳以上之數量下產生。在一些實施例中，核酸分子可在小於約1微莫耳、100、10、1奈莫耳、100、10、1皮莫耳、100、10、1、0.1、0.001、0.001飛莫耳或0.001飛莫耳以下之數量下產生。在一些實施例中，核酸分子可在約或大於約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之濃度下產生。在一些實施例中，基因庫在小於1000、100、10、1 m^3、100、10、1 dm^3、100、10、1 cm^3或1 cm^3以下之空間中合成/組裝及/或容納。

可單獨獲得之成員的位置可為可用或易於確定的。可單獨獲得之成員可易於自庫擷取。

在各種實施例中，本發明之方法及組合物允許產生合成(亦即重新合成)基因。包含合成基因之庫可藉由本文別處所進一步詳述之多種方法，諸如PCA、非PCA基因組裝法或階層式基因組裝，組合(「縫合」)兩個或兩個以上雙股聚核苷酸(此處稱為「合成子」)以產生較大DNA單元(亦即多合成子或底盤)來構築。大構築體之庫可涉及至少1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、400、500 kb長或更長之聚核苷酸。

大構築體可由獨立選擇之約5000、10000、20000或50000個鹼基對之上限所限定。合成任意數目之多肽區段編碼核苷酸序列，包括編碼非核糖體肽(NRP)之序列、編碼非核糖體肽合成酶(NRPS)模組及合成變體、其他模組蛋白質(諸如抗體)之多肽區段、來自其他蛋白質家族之多肽區段之序列，包括非編碼DNA或RNA，諸如調節序列，例如啟動子、轉錄因子、強化子、siRNA、shRNA、RNAi、miRNA、來源於微RNA之小核仁RNA、或所關注之任何功能性或結構性DNA或RNA單元。如本文所用之術語「基因」泛指任何類型之編碼或非編碼、長聚核苷酸或聚核苷酸類似物。

在各種實施例中，本發明之方法及組合物係關於基因庫。基因庫可包含複數個子區段。在一或多個子區段中，庫基因可共價連接在一起。在一或多個子區段中，庫基因可編碼第一代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物之製造方法來選擇。一或多種代謝最終產物包含生物燃料。在一或多個子區段中，庫基因可編碼第二代謝路徑之組分及一或多種代謝最終產物。第一及第二代謝路徑之一或多種最終產物可包含一或多種共有最終產物。在一些情況下，第一代謝路徑包含在第二代謝路徑中操控之最終產物。

在一些實施例中，庫之子區段可包含編碼合成生物體(例如病毒或細菌)之部件或全部基因組的基因、由該等基因組成或基本上由該等基因組成。因此，術語「基因」、「聚核苷酸」、「核苷酸」、「核苷酸序列」、「核酸」及「寡核苷酸」可互換使用且係指核苷酸聚合物。除非另外限制，否則同樣包括可以與天然存在之核苷酸類似的方式(例如雜交)起作用之天然核苷酸的已知類似物。其可為任何長度之核苷酸(去氧核糖核苷酸或核糖

核苷酸)或其類似物的聚合形式。聚核苷酸可具有任何三維結構，且可執行任何已知或未知的功能。以下為聚核苷酸之非限制性實例：基因或基因片段之編碼或非編碼區、基因間DNA、由連鎖分析界定之基因座、外顯子、內含子、信使RNA(mRNA)、轉移RNA、核糖體RNA、短干擾RNA(siRNA)、短髮夾RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、小核仁RNA、核酶、互補DNA(cDNA)，其為mRNA之DNA表示，通常藉由信使RNA(mRNA)之反轉錄或藉由擴增獲得；以合成方式或藉由擴增產生之DNA分子、基因體DNA、重組聚核苷酸、分支鏈聚核苷酸、質體、載體、任何序列之經分離之DNA、任何序列之經分離之RNA、核酸探針及引子。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及核苷酸類似物。若存在，可在聚合物組裝之前或之後賦予核苷酸結構之修飾。核苷酸之序列可間雜有非核苷酸組分。聚核苷酸可在聚合後諸如藉由與標記組分結合而經進一步修飾。除非另外說明，否則聚核苷酸序列在提供時以5'至3'方向列出。

術語核酸涵蓋雙股或三股核酸以及單股分子。在雙股或三股核酸中，核酸股無需同延(亦即雙股核酸無需雙股沿著兩股的整個長度)。

術語核酸亦涵蓋其任何化學修飾，諸如藉由甲基化及/或藉由封端。核酸修飾可包括添加併入額外電荷、極化性、氫鍵結、靜電相互作用及官能性之化學基團至個別核酸鹼基或作為整體之核酸。此類修飾可包括鹼基修飾，諸如2'-位置糖修飾、5-位置嘧啶修飾、8-位置嘌呤修飾、在胞嘧啶環外胺處之修飾、5-溴-尿嘧啶之取代、主鏈修飾、反常鹼基配對組合，諸如異鹼基異胞苷及異胍，及其類似物。

更特定言之，在某些實施例中，核酸可包括聚脫氧核糖核苷酸(含有

2-脫氧-D-核糖)、聚核糖核苷酸(含有D-核糖)及任何其他類型之核酸(亦即嘌呤或嘧啶鹼基之N-或C-糖苷)以及含有非核苷酸主鏈之其他聚合物，例如聚醯胺(例如肽核酸(PNA))及聚嗎啉基(可購自Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oreg., 如Neugene)聚合物，及其他合成序列特定的核酸聚合物，其限制條件為該等聚合物含有呈諸如DNA及RNA中所發現之組態允許鹼基配對及鹼基堆疊之核鹼基。術語核酸亦涵蓋連接核酸(LNA)，其描述於美國專利第6,794,499號、第6,670,461號、第6,262,490號及第6,770,748號中，其關於LNA之揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

如本文所用，術語「互補」係指兩個核苷酸之間精確配對的能力。若在核酸給定位置處之核苷酸能夠與另一核酸之核苷酸氫鍵結，則該兩個核酸視為在該位置彼此互補。兩個單股核酸分子之間的互補可為「部分的」，其中僅一些核苷酸結合，或當單股分子之間存在完整互補時，其可為完全的。核酸股間之互補程度對核酸股間雜交之效率及強度具有顯著影響。

「雜交」及「黏接」係指一或多個聚核苷酸經由核苷酸殘基之鹼基間的氫鍵結反應形成穩定複合物的反應。氫鍵結可藉由沃森克里克鹼基配對(Watson Crick base pairing)、胡格斯坦結合(Hoogstein binding)或以任何其他序列特定的方式而發生。複合物可包含兩股形成雙螺旋體結構、三股或三股以上形成多股複合物、單個自雜交股或其任何組合。雜交反應可構成諸如啟動PCR或其他擴增反應或藉由核糖核酸酶酶促裂解聚核苷酸之較廣泛方法中之步驟。可經由與第二序列之核苷酸殘基的鹼基氫鍵結而穩定的第一序列稱為「可雜交」至該第二序列。在此類情況下，第二序列亦可稱為可雜交至第一序列。

如應用於聚核苷酸之術語「雜交」係指經由核苷酸殘基之鹼基間的氫鍵結而穩定的複合物中的聚核苷酸。氫鍵結可藉由沃森克里克鹼基配對、胡格斯坦結合或以任何其他序列特定的方式而發生。複合物可包含兩股形成雙螺旋體結構、三股或三股以上形成多股複合物、單個自雜交股或其任何組合。雜交反應可構成諸如啟動PCR反應或藉由核糖核酸酶酶促裂解聚核苷酸之較廣泛方法中之步驟。與給定序列雜交之序列稱為給定序列之「互補序列」。

「特異性雜交」係指在所定義之嚴格性條件下核酸與目標核苷酸序列之結合，不存在與雜交混合物中存在之其他核苷酸序列的實質性結合。熟習此項技術者認識到，放鬆雜交條件之嚴格性使得序列錯配為容許的。

一般，給定序列之「互補序列」為與給定序列完全或實質上互補且可雜交至給定序列的序列。一般，可雜交至第二序列或第二序列組的第一序列特異性或選擇性可雜交至第二序列或第二序列組，使得在雜交反應期間雜交至第二序列或第二序列組較佳(例如在給定條件組(諸如此項技術中常用的嚴格條件)下熱力學上更穩定)於與非目標序列雜交。通常，可雜交序列在其相應長度之全部或一部分上共有一定程度之序列互補，諸如25%-100%互補，包括至少約25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及100%序列互補。

術語「引子」係指能夠與核酸雜交(亦稱為「黏接」)且在適當條件下(亦即在四種不同三磷酸核苷及諸如DNA或RNA聚合酶或逆轉錄酶之聚合劑存在下)，在適當緩衝液中及在適合之溫度下，充當核苷酸(RNA或DNA)聚合之起始位點的寡核苷酸。引子之適當長度視引子之預期用途而

定，但引子通常為至少7個核苷酸長，且長度更通常介於10至30個核苷酸之範圍內，或甚至更通常為15至30個核苷酸。其他引子可略微較長，例如30至50個或40-70個核苷酸長。熟習此項技術者瞭解，引子長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如7至70個或50至70個)。如本文進一步所述之各種長度的寡核苷酸可用作引子或建構嵌段用於擴增及/或基因組裝反應。在此上下文中，「引子長度」係指雜交至互補「目標」序列且引發核苷酸合成之寡核苷酸或核酸之部分。短引子分子一般需要較冷溫度以與模板形成足夠穩定的雜交複合物。引子無需反映模板之精確序列，但必須足夠互補以與模板雜交。術語「引子位點」或「引子結合位點」係指目標核酸與引子雜交之區段。呈現引子結合位點之構築體常常稱為「引發備用構築體」或「擴增備用構築體」。

若引子或其部分雜交至核酸內之核苷酸序列，則稱為引子黏接至另一核酸。引子雜交至特定核苷酸序列之表述並不意欲暗示引子完全或排外地雜交至該核苷酸序列。

寡核苷酸合成

在本文所述之基板上合成之寡核苷酸較佳在小於20、10、5、1、0.1 cm^2或更小的表面積中可包含大於約100個、較佳大於約1000個、更佳大於約16,000個且最佳大於50,000或250,000個或甚至大於約1,000.000個不同寡核苷酸探針。

在基板上快速合成n聚體(諸如約或至少約100聚體、150聚體、200聚體、250聚體、300聚體、350聚體或更長核苷酸、寡核苷酸)之方法進一步描述於本文各種實施例中。該方法可使用具有經適用於核苷酸偶合之化學部分官能化之解析基因座的基板。在一些情況下可使用標準胺基磷酸酯

化學方法。因此，至少兩個建構嵌段以較快速率偶合至各自位於解析基因座中之一者上的複數個生長寡核苷酸鏈，諸如每小時至少3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、35個、40個、45個、50個、55個、60個、70個、80個、90個、100個、125個、150個、175個、200個或200個以上核苷酸之速率。在一些實施例中，如本文別處所進一步詳述使用腺嘌呤、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或尿苷建構嵌段或其類似物/經修飾之版本。在一些情況下，所添加之建構嵌段包含二核苷酸、三核苷酸或基於建構嵌段之更長核苷酸，諸如含有約或至少約4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、25個、30個、35個、40個、45個、50個或50個以上核苷酸建構嵌段。在一些實施例中，n聚體寡核苷酸之大庫在基板上並行合成，例如具有約或至少約100個、1000個、10000個、100000個、1000000個、2000000個、3000000個、4000000個、5000000個代管寡核苷酸合成之解析基因座的基板。個別基因座可代管彼此不同之寡核苷酸的合成。在一些實施例中，在胺基磷酸酯化學方法之流程(例如具有偶合、封端、氧化及去阻斷步驟之方法)期間，試劑劑量可經由液體之連續/移位流動及真空乾燥步驟(諸如在新建構嵌段偶合之前的真空乾燥步驟)之循環而得以精確控制。基板可包含通孔，諸如至少約100個、1000個、10000個、100000個、1000000個或1000000個以上通孔，在基板之第一表面與基板之第二表面之間提供流體連通。基板可在胺基磷酸酯化學方法循環內之一個或全部步驟期間保持在原地，且流動試劑可通過基板。

用於製備合成核酸之常用方法基於Caruthers之基礎工作且稱為胺基磷酸酯法(M. H. Caruthers, Methods in Enzymology 154, 287-313, 1987；以全文引用之方式併入本文中)。所得分子之序列可由合成次序來控制。其他方法，諸如H-膦酸酯法，提供由其次單位連續合成聚合物之相同目的。

通常，藉由本發明之方法合成DNA寡聚物可經由傳統胺基磷酸酯化學方法實現。核酸之基於胺基磷酸酯之化學合成為熟習此項技術者所熟知，回顧以引用的方式併入本文中之Streyer, Biochemistry (1988) 第123-124頁及美國專利第4,415,732號。胺基磷酸酯試劑包括本發明可用之胺基磷酸B-氰基乙基(CE)酯單體及CPG(受控多孔玻璃)，可購自許多商業來源，包括American International Chemical (Natick Mass.)、BD Biosciences (Palo Alto Calif.)及其他。

在各種實施例中，核酸之化學合成絕大多數在固體表面上使用胺基磷酸酯化學方法之變化形式來進行(Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Lett. 1981;22:1859-1862；Caruthers MH. Gene synthesis machines - DNA chemistry and its uses. Science. 1985;230:281-285.)，其均以全文引用的方式併入本文中。

舉例而言，基於胺基磷酸酯之方法可用以合成脫氧核糖核酸及核糖核酸之豐富鹼基、主鏈及糖修飾，以及核酸類似物(Beaucage SL, Iyer RP. Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. Tetrahedron. 1992;48:2223-2311；

Beigelman L, Matulic-Adamic J, Karpeisky A, Haeberli P, Sweedler D. Base-modified phosphoramidite analogs of pyrimidine ribonucleosides for RNA structure-activity studies. Methods Enzymol. 2000;317:39-65；Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. Drug Discov. Today. 2005;10:587-593；Pankiewicz KW. Fluorinated nucleosides. Carbohydrate Res. 2000;327:87-105；Lesnikowski ZJ, Shi J, Schinazi RF. Nucleic acids and nucleosides containing carboranes. J. Organometallic Chem. 1999;581:156-169；Foldesi A, Trifonova A, Kundu MK, Chattopadhyaya J. The synthesis of deuterionucleosides. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2000;19:1615-1656；Leumann CJ. DNA Analogues: from supramolecular principles to biological properties. Bioorg. Med. Chem. 2002;10:841-854；Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. Trends Biotechnol. 2003;21:74-81；De Mesmaeker A, Altmann K-H, Waldner A, Wendeborn S. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. Curr. Opin. Struct. Biol. 1995;5:343-355)，其均以全文引用的方式併入本文中。

胺基磷酸酯化學方法已適合於在固體基板(例如微陣列)上就地合成DNA。此類合成通常藉由空間控制合成循環之一個步驟，導致數千至幾十萬獨特的寡核苷酸分佈在小面積(例如數平方公分之面積)中來實現。用於合成寡核苷酸之面積及基板架構進一步更詳細地描述於本文別處。適用於實現空間控制之方法可包括(i)藉由噴墨印刷(Agilent, Protogene；

Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, 等人 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, 等人 In situ synthesis of oligonucleotide arrays by using surface tension. J. Am. Chem. Soc. 2001;123:8887-8894)或物理遮罩(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.)控制偶合步驟，(ii)藉由光不穩定單體之經典(Affymetrix; Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid dna-sequence analysis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994;91:5022-5026.)及無遮罩(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)光刻脫除保護基控制5'-羥基去阻斷步驟或(iii)數位活化光生酸以進行標準去三苯甲基化(Xeotron/Atactic; Gao XL, LeProust E, Zhang H, Srivannavit O, Gulari E, Yu PL, Nishiguchi C, Xiang Q, Zhou XC. A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. Nucleic Acids Res. 2001;29:4744-4750)，其均以全文引用的方式併入本文中。

在基板上製得之寡核苷酸可自其固體表面裂解且視情況彙集以能夠用於新應用，諸如基因組裝、核酸擴增、定序庫、shRNA庫等(Cleary MA, Kilian K, Wang YQ, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, 等人 Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nature Methods. 2004;1:241-248)、基因合成(Richmond KE, Li MH, Rodesch MJ, Patel M, Lowe AM, Kim C, Chu LL, Venkataramaian N, Flickinger SF, Kaysen J, 等人 Amplification and assembly of chip-eluted DNA (AACED): a method for high-throughput gene synthesis. Nucleic Acids Res. 2004;32:5011-5018；Tian JD, Gong H, Sheng NJ, Zhou XC, Gulari E, Gao XL, Church G. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. Nature. 2004;432:1050-1054)及定點突變誘發(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)，其均以全文引用的方式併入本文中。

高品質長寡核苷酸之成功合成由高逐步偶合產率強有力地證實，例如至少約99.5%之逐步偶合產率。在各種實施例中，本發明之方法及組合物涵蓋大於98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%、99.96%、99.97%、99.98%、99.99%或99.99%以上之偶合產率。在不受理論束縛的情況下，若偶合效率降低，例如低於99%，對序列完整性之影響通常遵循以下兩個情境中之一者。若使用封端，低偶合效率將由截頭短序列證明。若未使用封端或若封端不成功，將在寡核苷

酸中出現單鹼基缺失且因此，將形成大量缺乏一個或兩個核苷酸之失敗序列。5'-羥基保護基之高效移除進一步證實在合意地高產率下合成高品質長寡核苷酸，諸如在每一循環內接近100%之極高效率下，例如大於或等於98%、98.5%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.95%、99.96%、99.97%、99.98%、99.99%或99.99%以上。此步驟可在精確控制之試劑劑量以及其他環境參數下，使用本文所述之方法及組合物而經最佳化，避免最終產物混合物包含除所需產物之外的具有單鹼基缺失的寡聚物家族。

另外，對於長寡核苷酸之合成，重要的是使最普遍的副反應-去嘌呤降至最低(Carr PA, Park JS, Lee YJ, Yu T, Zhang SG, Jacobson JM. Protein-mediated error correction for de novo dna synthesis. Nucleic Acids Res. 2004; 32:e162)。去嘌呤導致無鹼基位點之形成，通常不干擾鏈延伸。關鍵DNA損壞發生於鹼性條件下最終核鹼基脫除保護期間，其亦在無鹼基位點裂解寡核苷酸鏈。在不受理論束縛下，去嘌呤可由產生通常可定位於嘌呤核鹼基之截頭短序列而影響序列完整性。因此，藉由去嘌呤之控制與高效偶合及5'-羥基脫除保護反應組合來支持寡核苷酸之高產率、高品質合成。在高偶合產率及低去嘌呤作用下，可合成高品質長寡核苷酸而無需廣泛純化及/或PCR擴增以補償低產率。在各種實施例中，本發明之方法及組合物提供達成此高偶合產率、低去嘌呤作用及有效移除保護基團的條件。

在各種實施例中，本文所述之本發明之方法及組合物依賴標準胺基磷酸酯化學用於官能化基板，例如視情況使用適合修飾的矽烷化晶圓，在此項技術中已知。通常，在例如具有適合修飾的單核苷酸、二核苷酸或更

長寡核苷酸之單體沈積後，就胺基磷酸酯化學而言，可進行以下步驟中之一或多者至少一次以就地實現高品質聚合物之逐步合成：1)偶合、2)封端、3)氧化、4)硫化、5)去阻斷(去三苯甲基化)及6)洗。通常，使用氧化或硫化作為一個步驟，但不使用兩者。圖11例示包含偶合、封端、氧化及去阻斷步驟之四步驟胺基磷酸酯合成方法。

生長寡脫氧核苷酸之伸長可經由後續添加胺基磷酸酯建構嵌段通常經由形成磷酸三酯核苷酸間鍵來實現。在偶合步驟期間，通常0.02-0.2 M濃度之胺基磷酸酯建構嵌段，例如核苷胺基磷酸酯(或數個胺基磷酸酯之混合物)於乙腈中之溶液可例如藉由通常0.2-0.7 M濃度之酸性唑催化劑1H-四唑、2-乙硫基四唑(Sproat等人, 1995,「An efficient method for the isolation and purification of oligoribonucleotides」. Nucleosides & Nucleotides 14 (1&2): 255-273)、2-苯甲硫基四唑(Stutz等人, 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等人, 2002,「5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis」, Tetrahedron Lett., 43 (5): 795-797)、4,5-二氰基咪唑(Vargeese等人, 1998,「Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis」, Nucl. Acids Res., 26 (4): 1046-1050)或許多類似化合物之溶液活化。當組分傳遞至本文別處所進一步詳述之適合之基板的所選樣點時，可在噴墨機之流體管線中實現混合。胺基磷酸酯建構嵌段，諸如彼等如上所述活化之胺基磷酸酯建構嵌段，通常以超過基板結合之材料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倍或100倍以上之過量提供，接著與起始固體支撐物(第一偶合)或支撐物結合之寡核苷酸前驅體(隨後的偶合)接觸。在3'至5'合成中，前驅體之5'-羥基可設定成與進入的核苷胺基磷酸酯之活化胺基磷酸酯部分反應以形成亞磷酸三酯鍵。反應亦對水之存在高度敏感，尤其當使用胺基磷酸酯之稀釋溶液時，且通常在無水乙腈中進行。在偶合完成後，可藉由洗滌步驟移除任何未結合之試劑及副產物。

偶合反應之產物可用可例如酯化失敗序列及/或在雜環鹼基上裂解磷酸酯反應產物之封端劑處理。封端步驟可藉由用乙酸酐及1-甲基咪唑或DMAP之混合物作為催化劑處理固體支撐物結合之材料來進行且可提供兩個目的：在偶合反應完成後，部分固體支撐物結合之5'-OH基團(例如0.1至1%)可保持不反應。此等不反應之基團可永久阻斷鏈進一步伸長以防止形成通常稱為(n-1)短聚體之具有內部鹼基缺失的寡核苷酸。不反應之5'-羥基可藉由封端混合物乙醯化。另外，用1H-四唑活化之胺基磷酸酯理解為在小程度上與鳥苷之O6位置反應。在不受理論束縛的情況下，在用I_2/水氧化後，此副產物可能經由O6-N7電子遷移而可進行去嘌呤。無嘌呤位點可在寡核苷酸最終脫除保護基之過程中裂解而終止，由此降低全長產物之產率。O6修飾可在用I_2/水氧化之前藉由用封端試劑處理而移除。

硫代磷酸寡核苷酸(OPS；在本文別處所進一步詳述)之合成通常不涉及用I_2/水氧化，且在該程度上，不遭受上述副反應。另一方面，封端混合物可干擾硫轉移反應。在不受理論束縛的情況下，封端混合物可致使代替所需PS三酯的磷酸三酯核苷間鍵廣泛形成。因此，為合成OPS，硫化步驟

可在任何封端步驟之前進行。

支撐物結合之材料可通常在弱鹼(例如吡啶、二甲基吡啶或三甲基吡啶)存在下，用碘及水處理以影響亞磷酸三酯氧化成四配位磷酸三酯，亦即天然存在之磷酸二酯核苷間鍵之受保護之前驅體。氧化可在無水條件下使用例如氫過氧化第三丁基或(1S)-(+)-(10-樟腦磺醯基)-噁吖丙啶(CSO)進行。氧化步驟可經硫化步驟取代以獲得硫代磷酸寡核苷酸。

硫代磷酸寡核苷酸(OPS)之合成可類似於天然寡核苷酸之合成使用各種實施例中本發明之方法及組合物來實現。簡言之，氧化步驟可藉由硫轉移反應(硫化)置換且可在硫化後進行任何封端步驟。許多試劑能夠實現高效硫轉移，包括(但不限於)3-(二甲基胺基亞甲基)胺基)-3H -1,2,4-二噻唑-3-硫酮(DDTT)、3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮1,1-二氧化物(亦稱為畢考格試劑(Beaucage reagent))及N,N,N'N'-四乙基甲硫碳醯胺二硫化物(TETD)。

去阻斷(或去三苯甲基化)步驟可用以移除阻斷基團，諸如DMT基團，例如使用諸如2%三氯乙酸(TCA)或3%二氯乙酸(DCA)之酸於惰性溶劑(二氯甲烷或甲苯)中之溶液。可進行洗滌步驟。固體支撐物結合之寡核苷酸前驅體受影響以攜有游離5'-端羥基。進行去三苯甲基化持續一段延長時間或使用比建議酸溶液更強的酸溶液可使得固體支撐物結合之寡核苷酸的去嘌呤增強且因此降低所需全長產物之產率。本文所述之本發明之方法及組合物提供受控去阻斷條件限制不當去嘌呤反應。

在一些實施例中，可使用包含約0.02 M I_2於THF/吡啶/H_2O中之氧化溶液或對熟習此項技術者顯而易見的任何適合之變化形式。去三苯甲基化溶液可為含3%二氯乙酸(DCA)或2%三氯乙酸(TCA)之甲苯或二氯甲烷或任何其他適合之惰性溶劑。去三苯甲基化溶液之適合之變化形式理解為對

熟習此項技術者顯而易見的。本發明之方法及組合物允許置換去三苯甲基化溶液而不允許顯著蒸發溶劑，防止例如DCA或TCA之去嘌呤組分之點集中。舉例而言，追加溶液可追趕去三苯甲基化溶液。追加溶液之密度可經調節以實現先進先出方法。略微更稠密之追加溶液可用於實現此結果。舉例而言，去三苯甲基化溶液可追隨氧化溶液。追加溶液可包含抑制劑，諸如吡啶。在一些實施例中，使用連續液體條件直至去阻斷溶液實質上自基板上之寡核苷酸合成基因座移除。去嘌呤組分之濃度可受到嚴格控制，例如限制其於基板之寡核苷酸合成基因座上之值小於原始濃度之3倍、2.5倍、2倍、1.5倍、1.4倍、1.3倍、1.25倍、1.2倍、1.15倍、1.1倍、1.05倍、1.04倍、1.03倍、1.02倍、1.01倍、1.005倍或1.005倍以下。

置換方法可經最佳化以恰當控制寡核苷酸合成基因座上之化學劑量在適用範圍內。劑量可共同指代時間、濃度及溫度對於預期反應(去三苯甲基化)之完成及副反應(去嘌呤)程度之總計動力學效應。

另外，去三苯甲基化由於為可逆的，故可導致一系列缺乏正確核苷酸中之一或多者的寡聚物合成。由Sierzchala等人提出之兩步驟化學方法(Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: A two-step cycle using peroxy anion deprotection. J. Am. Chem. Soc. 2003;125:13427-13441)可藉由排除生長鏈之5'或3'端之酸脫除保護基的使用而解決去嘌呤之問題。兩步驟合成循環利用在適度鹼性條件(例如約pH 9.6)下緩衝之水性過氧陰離子移除芳氧基羰基，芳氧基羰基取代四步驟胺基磷酸酯合成中常用之DMT基團。因此，過氧陰離子溶液或具有強親核特性及適度氧化特性之任何適合之變化形式准許使去阻斷及氧化步驟合併成一個。另外，高環狀產率允許排除封端步驟。

來自基板之DNA的脫除保護基及裂解可如Cleary等人(Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nature Methods. 2004;1:241-248)所述來進行，例如藉由用NH_4OH處理、藉由施用紫外光至可光裂解連接基團、藉由靶向(例如熱處理)無嘌呤位點(諸如藉由尿嘧啶-DNA醣苷酶處理併入之dU殘基產生之彼等無嘌呤位點)或此項技術中已知任何適合之裂解方法。寡核苷酸可在裂解後藉由凍乾回收。

為代管胺基磷酸酯化學方法，基板之寡核苷酸合成基因座的表面可經化學改質以提供生長核苷酸鏈鍵聯至表面之恰當位點。存在各種類型之表面改質化學方法，其允許核苷酸附接至基板表面。表面改質可在其實施方面變化，視寡核苷酸鏈是否將自表面裂解且伴隨有核酸鹼基之脫除保護基，或在脫除保護基後保持附接至表面而定。各種類型之適合表面改質化學反應為此項技術中已知且描述在www.glenresearch.com，其以全文引用之方式併入本文中。一種表面改質技術允許A、G及C鹼基之環外N原子脫除保護基，同時使得寡核苷酸鏈保持附接至基板。

另一流程包含使三烷氧基矽烷基胺(例如(CH3CH2O)3Si-(CH2)2-NH2)與玻璃或矽石表面SiOH基團反應，隨後與丁二酸酐及胺反應以形成醯胺鍵及游離OH，在上面可開始核苷酸鏈生長。

第三類連接基團可基於可光裂解引子。此類連接基團允許寡核苷酸自基板移除(藉由用光照射，例如約350 nm光)而不裂解每一鹼基上之含氮官能基的保護基團。典型氨或NH3處理當用作自基板裂解寡聚物之試劑時使所有事物脫除保護基。此種可光裂解連接基團之使用描述在www.glenresearch.com。各種其他適合之可裂解連接基團為此項技術中已

知且可替代使用。

氧化及去三苯甲基化之時間範圍可通常分別為約30 s及60 s。試劑可排出，隨後為乙腈(ACN)洗滌。在去嘌呤受控之去三苯甲基化方法中，去三苯甲基化溶液可使用連續流入之氧化溶液驅逐出而無需兩者之間的排出步驟。

在就地合成步驟期間精確控制試劑流動允許改良產物之產率、均一性及品質。舉例而言，可精確控制酸濃度及去三苯甲基化時間。基板(詳言之就地合成之區域及/或周圍區域)之水接觸角可經選擇以減少去嘌呤及/或降低合成速度。水接觸角之恰當所需值描述在本文別處。在一些實施例中，較低量之去嘌呤可在較高表面能(亦即較低接觸角)之表面上實現。

本發明之方法及組合物允許在寡核苷酸合成期間去嘌呤之速率降低，例如在每一循環小於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%或0.0001%以下之速率下。另外，本文所述之本發明之方法及組合物允許基板表面兩端之去嘌呤梯度減小或消除證實寡核苷酸之就地合成。因此，高度均一、高品質及高產率寡核苷酸合成可在可代管高密度解析寡核苷酸基因座之基板上實現。

寡核苷酸之就地合成通常由相對疏水的固體支撐物開始，且隨後由於寡核苷酸特徵之合成影響其表面能而變得愈來愈親水。寡核苷酸特徵可隨著寡核苷酸長度增加而獲得實質性表面能。一般而言，由受保護之寡核苷酸組成之此等位點或特徵獲得足夠表面能以便在約10-20個合成循環

後，對胺基磷酸酯合成中常用之高表面張力有機溶劑(諸如乙腈或碳酸伸丙酯)自發變得潤濕。本發明之方法及組合物允許在生長寡核苷酸合成期間隨長度而變化諸如時間、流動速率、溫度、體積、黏度或試劑濃度之參數，以造成寡核苷酸合成基因座上表面特性之改變。此類變化可藉由以恆定或變化增量不斷改變參數而應用在合成之重複循環。或者，參數可僅在所選合成循環改變且可視情況遵循一定模式，諸如每隔一個循環、每三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個、十個循環等。

在各種實施例中，本發明之方法及組合物涵蓋在基板上合成之寡核苷酸庫，其中該庫包含不同尺寸之寡核苷酸，如本文別處所進一步詳述。另外，本發明之方法及組合物允許在基板上合成不同尺寸、序列或核苷酸組成之實質上類似量之寡核苷酸，或在一些情況下，不同預選量之寡核苷酸。任何兩個合成寡核苷酸之間的量變化可限制為小於50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%或0.1%以下，或者作為庫中之相對錯誤或偏差百分比。本文所述之本發明之方法及組合物涵蓋以如本文別處所進一步詳述之所需量在基板上合成之寡核苷酸。

在一些實施例中，本發明之方法及組合物准許在基板上合成寡核苷酸庫，其中每一寡核苷酸之化學計量受到嚴格控制且藉由變化所合成特徵之相對數目可調。在基板之解析基因座上微調生長寡核苷酸之密度的適合表面官能化及塗層進一步詳述於本文別處且可均一施用於基板之全部微結構，或者可以所選量及比率施用於個別微結構。

就地合成方法包括美國專利第5,449,754號中所述用於合成肽陣列之彼等方法以及WO 98/41531及其中所引用之參考文獻所述使用胺基磷酸酯

或其他化學方法合成聚核苷酸(特定言之，DNA)之彼等方法。描述就地核酸陣列合成方案及裝置之額外專利包括美國公開案第2013/0130321號及美國公開案第2013/0017977號及其中所引用之參考文獻，其以全文引用的方式併入本文中。

此類就地合成方法可基本上視為反覆以下工序：沈積受保護之單體液滴於基板之預定位置上以與適當活化之基板表面(或與先前沈積之脫除保護基之單體)連接；使沈積之單體脫除保護基以使其可與隨後沈積之受保護之單體反應；及沈積另一受保護之單體用於連接。不同單體可在任何一個循環期間沈積在基板上之不同區域，以使得完成陣列之不同區域應按完成陣列中所需要攜帶不同生物聚合物序列。另外一或多個中間步驟可為每次反覆中所需的，諸如氧化、硫化及/或洗滌步驟。

可用以在單個基板上產生寡核苷酸陣列之各種方法描述於美國專利第5,677,195號、第5,384,261號及PCT公開案第WO 93/09668號中。在此等申請案中所揭示之方法中，試劑藉由(1)在預定義區域上所界定的通道內流動或(2)在預定義區域上「點樣」或(3)經由使用光阻傳遞至基板。然而，可採用其他方法以及點樣與流動之組合。在每一情況中，當單體溶液傳遞至不同反應位點時，基板之某些活化區域與其他區域機械分離。因此，寡核苷酸之就地合成可藉由將此項技術中已知的各種適合之合成方法應用於本文所述之方法及組合物來實現。一種此類方法基於光刻技術，其涉及使用光不穩定保護基團在固體或聚合表面上之解析預定位點直接就地合成寡核苷酸(Kumar等人，2003)。羥基可在表面上產生且藉由光不穩定保護基團阻斷。當表面曝露於~UV光時，例如經由光刻遮罩，可在表面上產生游離羥基之圖案。此等羥基可根據胺基磷酸酯化學方法與光保護之核

苷胺基磷酸酯反應。可應用第二光刻遮罩且表面可曝露於UV光以產生羥基之第二圖案，隨後與5'-光保護之核苷胺基磷酸酯偶合。同樣，可產生圖案且寡聚物鏈可延伸。可乾淨且迅速自5'-羥基官能基移除之數個光不穩定保護基團為此項技術中已知的。在不受理論束縛的情況下，可光裂解基團之不穩定性視所用溶劑之波長及極性而定，且光裂解之速率可受曝露持續時間及光強度影響。此方法可充分利用許多因素，例如遮罩對準之準確性、移除光保護基團之效率及胺基磷酸酯偶合步驟之產率。另外，可使光無意洩漏至相鄰位點降至最低。每一樣點之合成寡聚物的密度可藉由調節合成表面上前導核苷之負載來監控。

應瞭解，本發明之方法及組合物可利用此項技術中所熟知的許多適合之構築技術，例如無遮罩陣列合成器、利用遮罩之光引導方法、流動通道方法、點樣方法等。在一些實施例中，構築及/或選擇寡核苷酸可在固體支撐物上使用無遮罩陣列合成器(MAS)來合成。無遮罩陣列合成器描述於例如PCT申請案第WO 99/42813號及對應美國專利第6,375,903號中。已知無遮罩儀器之其他實例，其可製造定製DNA微陣列，其中陣列中之每一特徵具有所需序列之單股DNA分子。合成構築及/或選擇寡核苷酸之其他方法包括例如利用遮罩之光引導方法、流動通道方法、點樣方法、基於插腳之方法及利用多個支撐物之方法。用於寡核苷酸合成之利用遮罩之光引導方法(例如VLSIPS™方法)描述於例如美國專利第5,143,854號、第5,510,270號及第5,527,681號。此等方法涉及活化固體支撐物之預定義區域且隨後使支撐物與預選單體溶液接觸。所選區域可藉由以積體電路製造中所用之光刻技術的方式，經由遮罩用光源大量照射而活化。支撐物之其他區域保持惰性，因為光照由遮罩阻斷且其仍受化學保護。因此，光圖案

界定與給定單體反應之支撐物的區域。藉由重複活化不同組預定義區域且使不同單體溶液與支撐物接觸，在支撐物上產生不同陣列之聚合物。可視情況使用其他步驟，諸如自支撐物洗滌未反應之單體溶液。其他可適用之方法包括機械技術，諸如美國專利第5,384,261號中所述之彼等機械技術。適用於在單個支撐物上合成構築及/或選擇寡核苷酸之額外方法描述於例如美國專利第5,384,261號中。舉例而言，試劑可藉由在預定義區域上所界定之通道內流動或在預定義區域上「點樣」而傳遞至支撐物。亦可使用其他方法以及點樣與流動之組合。在每一情況中，當單體溶液傳遞至不同反應位點時，支撐物之某些活化區域與其他區域機械分離。流動通道方法涉及例如微流體系統以控制寡核苷酸在固體支撐物上之合成。舉例而言，可藉由在支撐物之表面上或表面中形成適當試劑流經或置放適當試劑之流動通道而在固體支撐物之所選區域合成不同聚合物序列。用於在固體支撐物上製備寡核苷酸之點樣方法涉及藉由將反應物直接沈積在所選區域或與其流體連接之結構而以相對較少數量傳遞該等反應物。在一些步驟中，整個支撐表面可用溶液噴塗或以其他方式塗佈。單體溶液之精確量測之等分試樣可藉由在區域間移動之施配器逐滴沈積。用於在固體支撐物上合成寡核苷酸之基於插腳之方法描述於例如美國專利第5,288,514號中。基於插腳之方法利用具有複數個插腳或其他延伸部分之支撐物。插腳各自同時插入至托盤之個別試劑容器中。

在替代性方法中，高密度微陣列之光引導合成可在5'-3'方向上實現(Albert等人，2003)。此方法允許下游反應，諸如並行基因分型或定序在合成表面上進行，因為3'-端可用於酶促反應，諸如序列特異性引子延伸及接合反應。光保護之5'-OH基團完全或實質上完全脫除保護基可使用

NPPOC (2-(2-硝基苯基)丙氧基羰基)之鹼輔助之光脫除保護基(Beier等人，2002)。

本文所述之方法及組合物可有助於使用在各種幾何形狀之基板(包括平坦或不規則表面)上就地合成產生合成核酸。適用於此等基板之各種材料(例如矽)描述於本文且另外為此項技術中已知的。基板可在合成期間負載有大量不同序列。在基板上之就地合成方法允許在常用支撐物上之可定址位置製備大量具有不同且定義序列之寡聚物。本文所述之方法及組合物允許就地合成如本文別處所進一步描述之較長且較高品質之寡核苷酸。合成步驟可併入不同組饋入材料，在寡核苷酸合成之情況下，通常為4種鹼基A、G、T及C，以及此項技術中已知的適合之經修飾鹼基，其中一些描述於本文，可用於在支撐物或基板上以解析方式建構核酸聚合物之所需序列。

在例如陣列之固體支撐物上製造及施用高密度寡核苷酸先前已進一步揭示於例如PCT公開案第WO 97/10365號、第WO 92/10588號、1996年12月23日申請之美國專利第6,309,822號、1995年9月15日申請之序號6,040,138、1993年12月15日申請之序號08/168,904、1990年12月6日申請之序號07/624,114、1990年6月7日申請之序號07/362,901及U. S. 5,677,195中，其出於所有目的全部以引用的方式併入本文中。在使用高密度陣列之一些實施例中，使用諸如美國專利第5,445,934號及第6,566,495號中所揭示之極大規模固定化聚合物合成(VLSIPS)之方法合成高密度寡核苷酸陣列，該等專利出於所有目的均以引用的方式併入本文中。每一寡核苷酸佔據基板上之已知位置。

以最小數目之合成步驟形成寡核苷酸、肽及其他聚合物序列之高密

度陣列之各種其他適合之方法為此項技術中已知。寡核苷酸類似物陣列可藉由多種方法在固體基板上合成，包括(但不限於)光引導化學偶合及機械引導偶合。參見Pirrung等人, 美國專利第5,143,854號 (亦參見PCT申請案第WO 90/15070號)及Fodor等人, PCT申請案第WO 92/10092號及第WO 93/09668號及美國序號07/980,523，其揭示使用例如光引導合成技術形成肽、寡核苷酸及其他分子之巨大陣列的方法。亦參見Fodor等人, Science, 251, 767-77 (1991)。用於合成聚合物陣列之此等程序現稱為VLSIPS程序。使用VLSIPS方法，經由在許多反應位點同時偶合將一個不均勻的聚合物陣列轉化成不同的不均勻陣列。參見美國申請案序號07/796,243及07/980,523。

在具有聚醯胺主鏈之寡核苷酸類似物用於VLSIPS程序之情況下，常常不適於使用胺基磷酸酯化學方法進行合成步驟，因為單體並未經由磷酸酯鍵彼此附接。實際上，肽合成方法可如Pirrung等人在美國專利第5,143,854號中所述經取代，其以全文引用的方式併入本文中。

個別分子種類可由用於添加合成饋入材料之單獨的流體隔間分界，如例如基於噴墨印刷技術之所謂就地點樣方法或壓電技術中之情況(A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, 第20卷, J. Sedlow編, 111-124, Plenum Press；A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996)。寡核苷酸之解析就地合成可進一步藉由合成位點之空間解析活化來實現，該活化經由選擇性光照、經由選擇性或空間解析產生活化試劑(脫除保護基試劑)或經由選擇性添加活化試劑(脫除保護基試劑)為可能的。

迄今已知用於就地合成陣列之方法的實例為基於光之光刻合成(McGall, G.等人; J. Amer. Chem. Soc. 119; 5081-5090; 1997)、基於投影儀之基於光之合成(PCT/EP99/06317)、藉助於反應空間之物理間隔的流體合成(由來自Prof. E. Southern, Oxford, UK及the company Oxford Gene Technologies, Oxford, UK之研究的熟習此項技術者已知)、藉由光活化之光酸及反應支撐物中適合之反應室或以物理方式分開之反應空間的間接基於投影儀之光控合成、藉由在支撐物之個別電極上使用由電極誘導之質子產生之空間解析脫除保護基的電子誘導合成、及藉由空間解析沈積活化之合成單體的流體合成(自A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, 第20卷, J. Sedlow編輯, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996已知)。

在常用固體支撐物上製備合成核酸(詳言之核酸雙股)之方法亦自PCT公開案WO 00/49142及WO 2005/051970已知，其均以全文引用之方式併入本文中。

核酸陣列之就地製備可以3'至5'以及更傳統的5'至3'方向實現。試劑添加可藉由脈衝噴射沈積例如適當核苷酸胺基磷酸酯及活化劑至基板表面(例如，經塗佈之矽晶圓表面)上或其中之每一解析基因座來實現。基板之解析基因座可進一步經受其他胺基磷酸酯循環步驟(5'-羥基脫除保護基、氧化、硫化及/或硫化)之額外試劑，其可並行進行。沈積及常用胺基磷酸酯循環步驟可在不移動寡核苷酸合成晶圓的情況下進行。舉例而言，試劑可藉由使其穿過基板自一個表面流動至基板相對表面而越過基板內之解析基因座。或者，對於一些胺基磷酸酯循環步驟，可將基板移動例如至流

槽。基板可接著再定位、再登記及/或再對準，隨後印刷下一層單體。

具有寡核苷酸之基板可使用在就地製造之情況下的聚核苷酸前驅體單元(諸如單體)或先前合成之聚核苷酸的脈衝噴射物的液滴沈積來製造。此類方法詳細描述於例如美國公開案第2013/0130321號及美國公開案第2013/0017977號及其中所引用之參考文獻中，其以全文引用的方式併入本文中。此等參考文獻以引用的方式併入本文中。可將其他液滴沈積法用於製造，如本文別處所述。此外，可使用光引導製造方法代替液滴沈積法，如此項技術中已知。特徵間區域無需呈現，尤其當藉由光引導合成方案製備陣列時。

多種已知就地製造裝置可為適合的，其中代表性脈衝噴射裝置包括(但不限於)美國公開案第US2010/0256017號、美國專利公開案第US20120050411號及美國專利第6,446,682號中所述之彼等裝置，該等專利之揭示內容以全文引用之方式併入本文中。

在各種實施例中，基板上或基板內部之生物聚合物陣列可使用沈積先前獲得之生物聚合物或就地合成方法來製造。沈積法通常涉及將生物聚合物沈積在基板上或基板中之預定位置，該等位置經適當活化以使得生物聚合物可連接至其中。不同序列之生物聚合物可沈積在基板上或基板中之不同區域。此項技術中已知用於沈積先前獲得之聚核苷酸(尤其DNA，諸如完整寡聚物或cDNA)之典型程序包括(但不限於)將聚核苷酸負載至呈脈衝噴射頭形式之液滴施配器中且發射至基板上。此類技術已描述於WO 95/25116及WO 98/41531中，其均以全文引用之方式併入本文中。用於液滴沈積至基板之解析位點的各種適合之噴墨形式為此項技術中已知。

在一些實施例中，本發明可在整個寡核苷酸庫或其部分(例如固定於

表面上之寡核苷酸庫)內依賴於預先合成之寡核苷酸的使用。支撐高密度核酸陣列之基板可藉由在基板上、基板中或穿過基板之預定位置沈積預先合成之核酸或天然核酸來製造。合成核酸或天然核酸可藉由光引導之靶向、寡核苷酸引導之靶向或此項技術中已知的任何其他適合之方法沈積於基板之特定位置上。核酸亦可引導至特定位置。可使用在區域間移動以在特定點沈積核酸之施配器。施配器可經由通向所選區域之微通道沈積核酸。典型施配器包括傳遞核酸至基板之微量吸管或毛細管插腳及控制微量吸管相對於基板之位置的機器人系統。在其他實施例中，施配器包括一系列管、歧管、吸液管或毛細管插腳之陣列或其類似物，使得各種試劑可同時傳遞至反應區域。

使用光引導方法、流動通道及點樣方法、噴墨方法、基於插腳之方法及基於珠粒之方法將預先合成之寡核苷酸及/或聚核苷酸序列附接至支撐物及其就地合成進一步闡述於以下參考文獻中：McGall等人 (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 13555; Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering, 第20卷: 111, Plenum Press (1998)；Duggan等人 (1999) Nat. Genet. S21 : 10 ; Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, 2003；美國專利申請公開案第2003/0068633號及第2002/0081582號；美國專利第6,833,450號、第6,830,890號、第6,824,866號、第6,800,439號、第6,375,903號及第5,700,637號；及PCT公開案第WO 04/031399號、第WO 04/031351號、第WO 04/029586號、第WO 03/100012號、第WO 03/066212號、第WO 03/065038號、第WO 03/064699號、第WO 03/064027號、第WO 03/064026號、第WO 03/046223號、第WO

03/040410號及第WO 02/24597號；其揭示內容出於所有目的以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，預先合成之寡核苷酸使用點樣方法附接至支撐物或合成，其中單體溶液藉由在區域間移動之施配器(例如噴墨機)逐滴沈積。在一些實施例中，寡核苷酸使用例如機械波致動施配器點樣在支撐物上。

本文所述之系統可另外包括用於向具有複數個支撐物結合之寡核苷酸的第一樣點(或特徵)提供液滴之構件。在一些實施例中，液滴可包括一或多種包含核苷酸或具有欲添加之特定或預定核苷酸的寡核苷酸(本文中亦稱為核苷酸添加構築體)及/或允許雜交、變性、鏈延伸反應、接合及分解中之一或多者之試劑的組合物。在一些實施例中，不同組合物或不同核苷酸添加構築體可在任意一個反覆期間沈積在支撐物上之不同位址，以便產生預定寡核苷酸序列之陣列(具有不同預定寡核苷酸序列之支撐物的不同特徵)。沈積組合物之一種尤其適用之方式為藉由自與支撐表面隔開之脈衝噴射裝置沈積一或多個液滴、每一液滴含有所需試劑(例如核苷酸添加構築體)，至支撐表面或建構於支撐表面中之特徵上。

為使得由次單位合成聚合物之化學方法自動化成為可能，常常採用在上面錨定生長分子鏈之固相。聚合物可在合成完成後分裂開，其可藉由斷裂實際聚合物與固相之間適合之連接基團來實現。關於自動化，該方法可直接採用基板表面或該方法可採用具有呈活化粒子形式之固相的基板表面，該等固相封裝在基板中之管柱或微通道中，例如受控微孔玻璃(CPG)。基板表面有時可攜帶一種具有預定序列之可特定移除類型之寡核苷酸。個別合成試劑可接著以可控方式添加。所合成分子之數量可藉由各種因素控制，包括(但不限於)專用基板表面之尺寸、支撐材料之量、反應

批次之尺寸、可用於合成之官能化基板面積、官能化程度或合成反應之持續時間。

因此，本發明之各種實施例係關於容納組合物(通常為寡核苷酸)之庫之基板的製造及使用。具有解析特徵之基板，當其具有多個區域之不同部分(例如不同聚核苷酸序列)，使得在基板上特定預定位置(亦即「位址」)之區域(亦即基板之「特徵」或「樣點」)將偵測特定目標或目標類別(但特徵可偶然偵測到該位置之非目標)時，為「可定址的」。基板特徵通常(但無需)由介入空間分開。在一些情況下，特徵可建構於基板中且可形成一維、二維或三維微流體幾何形狀。「基板佈局」係指特徵之一或多個特性，諸如基板上之特徵定位、一或多個特徵維度及部分在給定位置之指示。

其他分子之合成

本發明之方法及組合物可用以合成所關注之其他類型的分子。在所選柵格區域之肽合成為一種此類情況。在陣列表面上用於肽之逐步生長的各種適合之化學方法為此項技術中已知。以全文引用之方式併入本文中之美國專利第5,449,754號中所述之肽合成技術可與本發明一起使用。本文所述之本發明之方法及組合物亦發現在藥物、蛋白質抑制劑之化學合成或需要快速合成複數個化合物之任何化學合成中之用途。

基因組裝

在各種實施例中，本發明係關於使用在基板表面上或者收容適用於寡核苷酸合成或點樣之表面(例如珠粒)之基板上合成或點樣之重疊較短寡核苷酸之組裝製備聚核苷酸序列(亦稱為「基因」)。較短寡核苷酸可使用黏接寡核苷酸與連續組裝之寡核苷酸的互補區，例如使用缺少股置換活性

之聚合酶、接合酶、點擊化學方法或此項技術中已知的任何其他適合之組裝方法，一起拼接在相同股上。以此方式可在相對股之連續寡核苷酸之間複製黏接核苷酸之序列。在一些情況下，相同股之連續寡核苷酸可在不引入來自黏接寡核苷酸之序列元件的情況下縫合在一起，例如使用接合酶、點擊化學方法或此項技術中已知的任何其他適合之組裝化學方法。在一些情況下，較長聚核苷酸可經由多輪涉及較短聚核苷酸/寡核苷酸之組裝以階層方式合成。

基因或基因組可如病毒基因組(7.5 kb；Cello等人, Science, 2002, 297, 1016)、噬菌體基因組(5.4 kb；Smith等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 15440)及32 kb大之基因簇(Kodumal等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, 15573)中所述，藉由組裝大聚核苷酸由寡核苷酸重新合成，該等文獻均以全文引用之方式併入本文中。長的合成DNA序列庫可按照由Venter及同事在細菌(生殖支原體(Mycoplasma genitalium))之582 kb基因組組裝中所述之方法(Gibson等人, Science, 2008, 319, 1215)來製造，其以全文引用之方式併入本文中。此外，大DNA生物分子可用寡核苷酸構築，如15 kb核酸之情況所述(Tian等人, Nature, 2004, 432, 1050；以全文引用之方式併入本文中)。本發明之方法及組合物涵蓋使用本文所述或此項技術中已知之基因組裝方法重新合成之聚核苷酸序列的大庫。此類序列之合成通常在本文別處所進一步詳述之基板的適合區域上以高密度並行進行。另外，此等大庫可在極低錯誤率下合成，在本文別處進一步詳述。

基因可由彙集之大量合成寡核苷酸來組裝。舉例而言，可如Tian等人(Tian等人 Nature, 432:1050, 2004)所述應用使用一池600種不同寡核苷

酸之基因合成。組裝基因之長度可藉由使用較長寡核苷酸進一步延伸。對於甚至更大之基因及DNA片段，例如大於約0.5、1、1.5、2、3、4、5 kb或5 kb以上，可通常在階層式基因組裝方法內應用一輪以上合成。如本文所揭示之寡核苷酸之PCR組裝及合成可適合於串聯使用，如下所述。

可根據本發明之方法及組合物使用多種基因組裝方法，範圍介於諸如接合酶鏈反應(LCR)之方法(Chalmers及Curnow, Biotechniques, 30(2), 249-52, 2001；Wosnick等人, Gene, 60(1), 115-27, 1987)至PCR策略套組(Stemmer等人, 164, Gene, 49-53, 1995；Prodromou及L. H. Pearl, 5(8), Protein Engineering, 827-9, 1992；Sandhu等人, 12(1), BioTechniques, 14-6, 1992；Young及Dong, Nucleic Acids Research, 32(7), e59, 2004；Gao等人, Nucleic Acids Res., 31, e143, 2003；Xiong等人, Nucleic Acids Research, 32(12), e98, 2004) (圖11)。雖然大部分組裝方案以重疊合成之寡核苷酸池起始且以組裝基因之PCR擴增結束，但該兩點之間的路徑可非常不同。在LCR情況下，初始寡核苷酸群體具有磷酸化5'端，允許接合酶(例如Pfu DNA接合酶)將此等「建構嵌段」共價連接在一起以形成初始模板。然而，PCR組裝通常利用未磷酸化寡核苷酸，其進行重複PCR循環以延伸且形成全長模板。另外，LCR方法可能需要寡核苷酸濃度在μM範圍中，而單股及雙股PCR選項具有低得多的濃度需求(例如nM範圍)。

公開之合成嘗試使得所用寡核苷酸尺寸範圍介於20-70 bp，經由重疊部分(6-40 bp)之雜交組裝。由於許多因素由寡核苷酸之長度及組成來決定(Tm、二級結構等)，故此群體之尺寸及異質性可對組裝效率及組裝基因之品質具有較大影響。正確的最終DNA產物的百分比依賴於「建構嵌

段」寡核苷酸之品質及數目。較短寡核苷酸與較長寡核苷酸相比具有較低突變率，但需要較多寡核苷酸來構築DNA產物。此外，較短寡核苷酸之重疊減少導致黏接反應之T_m較低，其促進非特異性黏接且降低組裝方法之效率。本發明之方法及組合物藉由傳遞具有低錯誤率之長寡核苷酸解決此問題。

時變熱場係指微流體裝置之時間調控之加熱以允許PCR擴增或PCA反應發生。時變熱場可例如藉由將具有反應器(例如奈米反應器)之裝置基板置放在加熱塊頂部上而在外部施加，或例如以直接位於PCA及PCR室下的薄膜加熱器形式整合在微流體裝置內。溫度控制器可結合連接於加熱器元件或整合於反應室中之溫度感應器而改變加熱元件之溫度。計時器可改變施加至反應室之熱量的持續時間。

熱場之溫度可根據PCR或PCA反應之變性、黏接及延伸步驟而改變。通常，核酸在約95℃下變性2分鐘，隨後為在95℃下變性30秒，在40-60℃下黏接30秒及在約72℃下延伸30秒之30個或30個以上循環，及72℃持續10分鐘之最後一次延伸。所用持續時間及溫度可視寡核苷酸之組成、PCR引子、擴增產物尺寸、模板及所用試劑(例如聚合酶)而改變。

聚合酶為併入三磷酸核苷或三磷酸脫氧核苷以延伸PCR引子、寡核苷酸或DNA片段之3'羥基端的酶。對於有關聚合酶之一般論述，參見Watson, J. D.等人, (1987) Molecular Biology of the Gene, 第4版, W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif。適合之聚合酶包括(但不限於)KOD聚合酶；Pfu聚合酶；Taq聚合酶；大腸桿菌DNA聚合酶I、「克列諾(Klenow)」片段、T7聚合酶、T4聚合酶、T5聚合酶及反轉錄酶，其均為此項技術中已知的。具有校對能力之聚合酶，諸如Pfu及Pyrobest可用於

在高保真度下複製DNA。Pfu DNA聚合酶具有3'至5'核酸外切酶校對活性，因此其可校正核苷酸錯摻錯誤。在本發明之各種實施例中，核酸片段較佳藉由核酸片段之相互互補區段的重疊區之間的特異性雜交反應而接合在一起，由此獲得較長合成雙股核酸。用於建構較長核酸之個別序列區段的長度可為例如20-200、50-300、75-350或100-400個核苷酸建構嵌段。熟習此項技術者瞭解，序列區段長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如20-350或200-350)。

序列區段較佳以一種方式加以選擇，該方式使其至少部分重疊欲合成之互補核酸之反義股的序列區段，因此欲合成之核酸股可藉由個別序列區段之雜交而建構。在一個替代實施例中，序列區段較佳經選擇以使得欲合成之核酸的兩股上的序列區段完全重疊，且因此大體上完整雙股之製備現僅需要磷酸二酯主鏈之共價鍵聯。個別片段之間的互補區或重疊的長度可為例如10-50、10-100、12-25、20-80、15-20或15-25個核苷酸建構嵌段。熟習此項技術者瞭解，序列區段長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如25-100或10-25)。若兩個核酸片段之間的重疊或互補區具有高AT含量，例如大於50%、60%、65%或65%以上之AT含量，則結合常數與富含GC之序列相比較低。因此，出於熱力學原因，此等片段之間的雜交可具有比較低的效率。此可對2個或2個以上片段之組裝具有影響。可能的序列依賴性結果為具有正確目標序列之核酸雙股的產率降低。因此，組裝基因之序列區段可設計成在重疊區具有所需水準之GC含量，例如大於35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%或65%以上之GC含量。例示性基因組裝方法之較詳細論述可見於美國專利第8367335號，其以全文引用的方式併入本文中。

在各種實施例中，基於聚合酶鏈反應(PCR)及基於非聚合酶循環組裝(PCA)之策略可用於化學基因合成。此外，基於非PCA之化學基因合成使用不同策略及方法，包括酶促基因合成、黏接及接合反應、經由雜交基因之兩個基因的同時合成、鳥槍法接合及共接合、插入基因合成、經由DNA之一股的基因合成、模板引導之接合、接合酶鏈反應、微陣列介導之基因合成、Blue Heron固體支撐物技術、Sloning建構嵌段技術、RNA接合介導之基因組裝、基於PCR之熱力學平衡由內而外合成法(TBIO)(Gao等人, 2003)、組合雙重不對稱PCR(DA-PCR)之兩步驟全基因合成方法(Sandhu等人, 1992)、重疊延伸PCR(Young及Dong, 2004)、基於PCR之兩步驟DNA合成(PTDS)(Xiong等人, 2004b)、連續PCR方法(Xiong等人, 2005, 2006a)或此項技術中已知的任何其他適合之方法，可與本文所述之方法及組合物結合用於由較短寡核苷酸組裝較長聚核苷酸。

已使用本發明之方法及組合物化學合成之DNA序列可延伸成長聚核苷酸序列，例如大於500、750、1000、1250、1500、1750、2000、2500、3000、4000、5000、6000、7500、10000、20000、30000、40000、50000、75000、100000個鹼基對或更長之聚核苷酸序列。本發明之方法及組合物亦使得化學合成之聚核苷酸序列具有極低錯誤率，如本文別處所進一步描述。

在各種實施例中，聚合酶介導之組裝技術的變化形式統稱為聚合酶構築及擴增，用於聚核苷酸之化學合成。此項技術中已知用於定製基因合成之一些常用技術基於聚合酶循環組裝且可經由寡核苷酸池之組裝而實現較長聚核苷酸之重新合成。寡核苷酸池可以建構嵌段形式合成用於各種基因合成技術。池內寡核苷酸之序列、長度及精確分佈以及任何序列重疊可

根據所需聚核苷酸序列及所用組裝方法加以設計。所需全長DNA可例如藉由PCR之數個步驟，在變性、黏接及伸長重疊寡核苷酸之必需溫度條件下獲得。

PCR組裝(PCA)

PCR組裝使用聚合酶介導之鏈延伸與至少兩個具有可黏接互補末端之寡核苷酸之組合，使得聚核苷酸中之至少一者具有能夠藉由聚合酶(例如熱穩定聚合酶，諸如Taq聚合酶、VENT™聚合酶(New England Biolabs)、KOD(Novagen)及其類似物)實現聚核苷酸鏈伸長之游離3'-羥基。重疊寡核苷酸可混合在含有dNTP、聚合酶及緩衝液之標準PCR反應物中。寡核苷酸之重疊末端在黏接後形成雙股核酸序列區，其充當PCR反應中藉由聚合酶伸長之引子。伸長反應之產物充當受質用於形成較長雙股核酸序列，最終導致全長目標序列之合成。PCR條件可經最佳化以提高目標長DNA序列之產率。

各種基於PCR之方法可用以由寡核苷酸合成基因。此等方法包括(但不限於)熱力學平衡由內而外合成(TBIO)方法(Gao等人, Nucleic Acids Research, 31:e143, 2003)、連續PCR(Xiong等人, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004)、雙重不對稱PCR(DA-PCR)(Sandhu等人, Biotechniques, 12:14, 1992)、重疊延伸PCR(OE-PCR)(Young及Dong, Nucleic Acids Research, 32:e59, 2004；Prodromou及Pearl, Protein Eng., 5:827, 1992)及基於PCR之兩步驟DNA合成(PTDS)(Xiong等人, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004)，其均以全文引用之方式併入本文中且可適於在微流體裝置中組裝PCR模板。

DA-PCR為用於構築合成基因之一步驟方法。在一個實例中，例如

17-100個鹼基長之四個相鄰寡核苷酸與例如15-17個鹼基之重疊用作PCR反應中之引子。其他適合之寡核苷酸及重疊尺寸在本發明之界限內，如本文進一步所述。兩個內部引子之數量高度受限，且所得反應由於兩個側接引子之過量而導致總序列之兩個半部的不對稱單股擴增。在隨後的PCR循環中，此等雙重不對稱擴增片段彼此重疊，產生雙股全長產物。

基因序列之TBIO合成需要僅胺基端半部之有義股引子及僅羧基端半部之反義股引子。此外，TBIO引子可含有相同的溫度最佳化引子重疊區。TBIO方法涉及下一對外部引子與完整合成之內部片段的末端之間的互補。在下一輪雙向伸長發生之前完成給定外部引子對之TBIO雙向伸長。

連續PCR為單步驟PCR方法，其中一半有義引子對應於欲組裝之模板的一個半部，且反義引子對應於欲組裝之模板的後半部。在此方法下，使用外引子對之雙向擴增將直至使用內引子對擴增完成後才發生。

PDTS通常涉及兩個步驟。首先合成所關注之DNA的個別片段：在本發明之一些實施例中，混合10-12個具有約20 bp重疊之寡核苷酸，諸如約60個、80個、100個、125個、150個、175個、200個、250個、300個、350個或350個以上核苷酸長之寡核苷酸，且使用諸如pfu DNA之聚合酶進行PCR反應以產生較長DNA片段。且其次，合成所關注之DNA的整個序列：組合第一步驟之5-10個PCR產物且作為模板用於使用諸如pyrobest DNA聚合酶之聚合酶及兩個最外側寡核苷酸作為引子的第二PCR反應。

雖然使用短寡核苷酸之PCR組裝對於相對較短核酸作用良好，但可能對可在單個反應內組裝之寡核苷酸的最大數目存在限制。此可對雙股DNA產物施加尺寸限制。此問題之解決方案為串聯製造DNA。在此流程

中，多個較小DNA區段在單獨腔室中、在多個晶片中並行合成或串聯合成，且隨後作為PCA反應之前驅體一起引入以便組裝成「較大」DNA片段用於隨後PCR擴增。換言之，使用寡核苷酸之PCR組裝應產生用於PCR擴增之模板(第一輪模板)。許多如此產生之第一輪模板可充當前驅體用於PCA組裝比第一輪模板大的DNA片段，由此產生第二輪模板。依次地，第二輪模板可充當前驅體用於組裝第三輪模板，諸如此類。可重複該方法直至獲得所需DNA。

合成反應中所用之寡核苷酸通常為單股分子，用於組裝比寡核苷酸本身長的核酸。寡核苷酸可為例如20-200、50-300、75-350或100-400個核苷酸建構嵌段。熟習此項技術者瞭解，序列區段長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如20-350或200-350)。含有複數個寡核苷酸之PCA室係指產生對應於基因或DNA片段之模板所必需的寡核苷酸池。當合成反應及裝置串聯使用時，隨後一系列反應中之PCA室應含有DNA片段池代替起始寡核苷酸以便組裝成PCR模板。圖12顯示由重疊寡核苷酸池經由多個循環之反應變成逐漸較長之構築體的較長構築體的聚合酶循環組裝。

應瞭解，如本文所述之較長寡核苷酸可有利地用於多種基因組裝方法，以避免組裝錯誤及提高合成基因之品質(圖13)。欲組裝之序列中的同源重複序列或高GC區可引入與較小寡核苷酸之正確次序及雜交相關聯之錯誤。較長寡核苷酸可藉由減少欲排序及比對之寡核苷酸的數目，藉由使比對位點避開成問題的序列，諸如同源重複序列或高GC區，及/或藉由減少組裝所需基因需要的組裝循環的數目而避開此等問題。

可如圖14中所例示，階層式組合基因組裝方法來合成較大基因。因

此，可使用第一基因組裝方法(諸如PCA)組裝許多中間長度(例如約2 kb)之基因。第二基因組裝方法，例如吉布森組裝(Gibson Assembly)(Gibson等人, Science, 2008, 319, 1215)，可用以將中間長度之基因組合成較大基因，例如約5或10 kb。可分階段應用階層式組裝。活體外重組技術可用於將中間長度之基因卡匣組裝成愈來愈長的序列，例如大於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或1000 kb以上。

適用於重新組裝基因之寡核苷酸可在一或多個固體支撐物上合成。例示性固體支撐物包括例如載片、珠粒、晶片、粒子、股線、凝膠、薄片、管道、球體、容器、毛細管、襯墊、切片、膜、板、聚合物或微流體裝置。另外，固體支撐物可為生物的、非生物的、有機的、無機的或其組合。在實質上平坦的支撐物上，支撐物可以物理方式分成各個區域，例如用溝槽、凹槽、孔或化學障壁(例如疏水性塗層等)。支撐物亦可包含建構於表面中以物理方式分開的區域，視情況跨越表面之整個寬度。適用於改良之寡核苷酸合成的支撐物進一步描述於本文中。

在一個態樣中，寡核苷酸可提供於固體支撐物上供微流體裝置使用，例如作為PCA反應室之一部分。或者，可合成寡核苷酸且隨後引入微流體裝置中。

一般而言，完整基因序列按需要分解成可變或固定長度(N)寡核苷酸。可選擇適合之寡核苷酸長度，例如20-200、50-300、75-350或100-400個核苷酸建構嵌段。熟習此項技術者瞭解，序列區段長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如20-350或200-350)。子序列之間的重疊序列長度為約或小於約N/2，但可按組裝反應指示之需要加以選擇，例如

6-40 bp、10-20 bp及20-30 bp之重疊序列。熟習此項技術者瞭解，序列區段長度可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如20-40或6-30)。部分鹼基互補之量可視所用組裝方法而變化。對於各種重疊基因組裝方法，除了形成所得PCR模板末端之彼等末端，PCA寡核苷酸可在5'及3'末端處重疊。寡核苷酸間之鹼基對錯配可影響雜交，視錯配性質而定。在寡核苷酸之3'末端處或附近之錯配可抑制延伸。然而，重疊序列之G/C富集區可克服錯配，由此產生含有錯誤之模板。因此，可考慮到寡核苷酸設計中重疊序列之考慮因素、熔融溫度、交叉雜交之可能性及二級結構。

由PCR組裝反應產生之核酸序列可稱為模板且充當目標核酸以便藉由PCR重現互補股。通常，在組裝反應後，PCR組裝產物可能由於不完全組裝及/或連環體而可為具有可變尺寸之雙股DNA。在一些實施例中，第一輪模板由寡核苷酸組裝。在其他實施例中，第二輪模板由包含至少兩個第一輪模板之DNA片段組裝，該兩個模板為PCR反應產物，視情況經純化及/或錯誤過濾，由前兩輪獲得。第三輪模板由包含至少兩個第二輪模板之DNA片段組裝，其可類似地經錯誤過濾等。

基於非聚合酶循環組裝之策略，諸如黏接及接合反應(Climie及Santi, 1990；Smith等人, 1990；Kalman等人, 1990)、插入基因合成(IGS)(Ciccarelli等人, 1990)、經由一股之基因合成(Chen等人, 1990)、模板引導之接合(TDL)(Strizhov等人, 1996)、接合酶鏈反應(Au等人, 1998)或此項技術中已知的任何適合之組裝方法亦可用於聚核苷酸之化學合成。基於其他非聚合酶循環組裝之基因合成策略包括(但不限於)基於微陣列之基因合成技術(Zhou等人, 2004)、Blue Heron固體支撐物技術、Sloning建構嵌段技術(Ball, 2004；Schmidt, 2006；Bugl等人, 2007)及RNA介導之

DNA陣列的基因組裝(Wu等人, 2012)。

酶促基因合成

首先在1960年代於大腸桿菌及T4噬菌體感染之大腸桿菌細胞中發現之修復雙股DNA中之單股斷裂的酶(Meselson, 1964；Weiss及Richardson, 1967；Zimmerman等人, 1967)可用於接合化學合成之寡核苷酸，諸如脫氧核糖聚核苷酸，以形成連續雙螺旋結構(Gupta等人, 1968a)。在另一實例中，DNA聚合酶I (克列諾)可用於將寡核苷酸接合成較長聚核苷酸。寡核苷酸可另外經由接合，例如使用接合酶，諸如使用噬菌體T4聚核苷酸接合酶接合在一起。在一些情況下，寡核苷酸可經階層式接合，在每一步中形成愈來愈長的聚核苷酸。

黏接及接合反應

用於基因便捷合成之另一方法包含經由黏接及接合反應由許多寡核苷酸組裝聚核苷酸(Climie及Santi, 1990；Smith等人, 1990；Kalman等人, 1990)。首先，所需序列之兩股可經分配以具有短的黏性末端，使得相鄰對之互補寡核苷酸可黏接。合成之寡核苷酸可例如使用激酶磷酸化，且黏接，隨後接合成雙螺旋體。

鳥槍法接合及共接合

鳥槍接合方法包含由數個合成嵌段組裝完整基因(Eren及Swenson, 1989)。因此，基因可分數個部分次組裝，分別藉由用與相鄰對之單股互補的短單股酶促接合數對互補的化學合成寡核苷酸來構築。各部分之共接合可實現最終聚核苷酸之合成。

插入基因合成

插入基因合成(IGS)(Ciccarelli等人, 1990)可用於在含有單股DNA噬

菌體複製起點之質體內以逐步方式組裝DNA序列。IGS方法基於藉由寡核苷酸定向突變誘發在質體內連續靶向插入長DNA寡核苷酸。

經由一股之基因合成

經由一股之基因合成係指一種經由一股合成基因之方法(Chen等人; 1990)。目標基因之正股DNA可藉由在多個(例如兩個)末端互補寡核苷酸及多個(例如三個)短片段間互補寡核苷酸存在下，數個(例如六個)寡核苷酸之逐步或單步驟T4 DNA接合酶反應而組裝。與雙股或重疊方法相比，使用較少合成鹼基，可降低成本。

模板引導之接合

模板引導之接合係指一種藉由接合寡核苷酸模組、藉由與來源於野生型基因之單股DNA模板部分黏接來構築大合成基因的方法(Strizhov等人; 1996)。相比於需要合成兩股之其他技術，可合成僅包含一股之寡核苷酸。接合酶，諸如*Pfu* DNA接合酶，可用於進行熱循環以便組裝、選擇及接合全長寡核苷酸以及線性擴增模板引導之接合(TDL)產物。由於此方法依賴於同源模板，故其適合於合成與現有聚核苷酸分子具有相似性之僅有限數目之序列。

接合酶鏈反應

接合酶鏈反應(LCR)可為合成聚核苷酸所用之方法(Au等人; 1998)。片段可由數個寡核苷酸經由使用接合酶，例如*Pfu* DNA接合酶接合來組裝。在LCR後，全長基因可用藉由變性及使用外部兩個寡核苷酸延伸而共有重疊序列之片段混合物來擴增。

微陣列介導之基因合成

微陣列介導之基因合成基於將數萬特異性探針固定於小固體表面上

之能力作為一般構思(Lockhart及Barlow, 2001)。為產生陣列，DNA可直接合成於固體支撐物上(Lipshutz等人, 1999；Hughes等人, 2001)或可以預先合成之形式沈積於表面上，例如使用插腳或噴墨印刷機(Goldmann及Gonzalez, 2000)。所獲得之寡核苷酸可在熱循環條件下接合使用以產生數百個鹼基對之DNA構築體。另一用於精確多重基因合成之基於微晶片之技術，亦即經修飾之陣列介導在基因合成技術(Tian等人, 2004)類似於晶片溶離之DNA的擴增及組裝AACED)，亦即一種開發用於高產量基因合成之方法(Richmond等人, 2004)。數池之數千個『構築』寡核苷酸及加標籤的互補『選擇』寡核苷酸可在光可程式化微流體晶片上合成、剝離、接合擴增及藉由雜交選擇以減少合成錯誤(Tian等人, 2004)。

Blue Heron技術

由Blue Heron Biotechnology開發之Blue Heron技術基於一種基於GeneMaker平台且能夠實現自動化之固相支撐物策略(Parker及Mulligan, 2003；Mulligan及Tabone, 2003；Mulligan等人, 2007)。GeneMaker方案可一般包含使用者序列資料輸入、設計適合於輸入序列組裝之寡核苷酸的算法、寡核苷酸合成及雜交成雙螺旋體、經由在固體支撐物基質上之管柱內部自動化連續添加之基於自動化接合之固相組裝、及/或選殖及序列核對。Blue Heron技術依賴於連續添加建構嵌段以降低基於建構嵌段非連續池之其他基因組裝方法(諸如PCR方法)出現之錯誤。

本發明之各種實施例如Blue Heron技術之實施中所例示利用連續及階層式組裝方法。

Sloning建構嵌段技術

Sloning建構嵌段技術(Slonomics™; Sloning Biotechnology GmbH,

Puchheim, Germany)為另一使用基於接合之策略用於化學基因合成的方法(Adis International, 2006)。Sloning合成方法由一系列並行反覆及標準化反應步驟(吸液、混合、培育、洗滌)組成(Schatz及O'Connell, 2003；Schatz等人, 2004；Schatz, 2006)。相比於接合為給定基因構築體專門設計及合成之寡核苷酸，Sloning技術使用可在一系列標準化、完全自動化、有成本效益的反應步驟下組合形成任何所需序列之標準化建構嵌段庫(Schatz及O'Connell, 2003；Schatz, 2006)。

Golden Gate組裝

Golden-gate方法(參見例如Engler等人 (2008) *PLoS ONE*, 3(11): e3647；Engler等人 (2009) PLoS ONE 4(5): e5553)提供標準化、多部分DNA組裝。Golden-gate方法可使用IIs型核酸內切酶，其識別位點在其切割位點遠端。雖然存在若干不同的IIs型核酸內切酶以供選擇，但一個實例使用BsaI(等效於Eco31I)。Golden-gate方法可藉由不時使用單一IIs型核酸內切酶而為有利的。Golden-gate方法進一步描述於美國專利公開案2012/0258487中，其以全文引用之方式併入本文中。

在一些情況下，用於基因組裝之方法及組合物可涉及專門合成之建構嵌段與預先合成之建構嵌段的組合。可儲存預先合成之寡核苷酸庫且所需目標核酸之組裝方法可經最佳化以最大化使用預先合成之寡核苷酸，使新合成之需求降至最低。專門合成之寡核苷酸可填充部分目標核酸，因為其未覆蓋預先合成之寡核苷酸庫。

RNA介導之基因組裝

在各種實施例中，RNA介導之基因組裝用於由DNA元件組裝RNA轉錄物，該等DNA元件視情況固定於表面形成固定之DNA陣列。DNA元件

經設計以包括朝向5'末端之RNA聚合酶(RNAP)啟動子序列，諸如T&RNA聚合酶啟動子序列。編碼啟動子序列(諸如T7 RNAP啟動子序列)之寡核苷酸雜交至DNA元件可產生雙股啟動子。添加RNAP可影響自此等視情況表面結合之啟動子轉錄產生許多RNA複本。此等擴增之RNA分子可經設計以允許自組裝產生較長RNA。簡言之，DNA元件可經設計以編碼「區段序列」，其為所需全長RNA轉錄物之區段；及「夾板序列」，其為充當模板以引導RNA區段正確組裝之互補RNA。編碼RNA區段或夾板之DNA元件可經選擇以使在組裝聚核苷酸之合成期間的一或多個反應最佳化。舉例而言，可構築DNA元件使得每一RNA轉錄物之5'末端對應於GG二核苷酸，其被認為影響由T7RNA聚合酶(T7 RNAP)顯現之較高轉錄效率。繼而可避免在5'端之GGG三核苷酸序列，以避免產生聚G轉錄物梯，其中G殘基之數目可在1-3範圍內變化，歸因於在GTP偶合期間酶之「滑移」。組裝可經由區段與夾板之RNA:RNA雜交而受影響。切口可以化學方式或使用此項技術中已知的適合酶酶促密封。在一個實例中，RNA區段序列組裝成全長RNA轉錄物包括用T4 RNA接合酶2接合。三磷酸化轉錄物，諸如由T7 RNA聚合酶產生之彼等三磷酸化轉錄物，可在接合之前「修整」成其單磷酸化類似物。修整可藉由用RNA 5'焦磷酸水解酶處理轉錄物池而自每一RNA之5'末端移除焦磷酸酯基來實現。轉錄物在合成後可藉由反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)複製產生對應基因。組裝之RNA序列或其DNA等效物可使用適合之核酸擴增方法，包括本文別處所述之彼等核酸擴增方法來擴增。該方法進一步描述於Wu等人(Cheng-Hsien Wu, Matthew R. Lockett及Lloyd M. Smith, RNA-Mediated Gene Assembly from DNA Arrays, 2012, Angew. Chem. Int. Ed. 51, 4628-4632)，其以全

文引用的方式併入本文中。

DNA之非酶促化學接合

其他方法包括例如使用溴化氰作為縮合劑之DNA之非酶促化學接合，如關於183 bp生物學活性微基因之合成所述(Shabarova等人, 1991)。

在一些實施例中，寡核苷酸之組裝包含使用點擊化學方法。使用點擊化學方法連接各種分子之適合方法為此項技術中已知(關於寡核苷酸之點擊化學方法連接，參見例如El-Sagheer等人(PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011)。點擊化學方法可在Cu1存在下進行。

錯誤率及校正

當前基因合成技術之關鍵侷限性為方法之低序列保真度：由化學合成DNA形成之基因純系常常含有序列錯誤。此等錯誤可在方法之許多階段引入：在組分寡核苷酸之化學合成期間，在雙股寡核苷酸之組裝期間，及在DNA之操控及分離期間或在選殖方法期間發生的化學損壞。

產生化學合成DNA片段之已知方法具有極高序列錯誤率，例如平均每200至500 bp。本文所述之方法允許初始重新合成具有極低錯誤率之寡核苷酸及較長聚核苷酸。寡核苷酸中之常見突變包含可來自封端、氧化及/或去阻斷失敗之缺失。其他顯著副反應包括藉由氨修飾鳥苷(G)以得到2,6-二胺基嘌呤，其作為腺苷(A)編碼。去胺亦可能使得胞苷(C)形成尿苷(U)及腺苷形成肌苷(I)。

在不受理論束縛的情況下，通常在使用胺基磷酸酯方法合成寡核苷酸期間產生之鹼基修飾的非限制性實例包括脫氧鳥苷之O6-氧之轉胺作用以形成2,6-二胺基嘌呤殘基、脫氧胞苷之N4-胺之去胺作用以形成尿苷殘基(Eadie, J. S.及Davidson, D. S., Nucleic Acids Res. 15:8333, 1987)、

N6-苯甲醯基脫氧腺苷之去嘌呤作用產生無嘌呤位點(Shaller, H.及Khorana, H. G., J. Am. Chem. Soc. 85:3828, 1963；Matteucci, M. D.及Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981)及脫氧鳥苷上N2-異丁醯胺保護基的不完全移除。此等副產物中之每一者可造成經選殖之合成聚核苷酸中之序列錯誤。

此外，常見寡核苷酸合成方法易於形成小於所需寡核苷酸全長之截頭產物。寡核苷酸合成之固相方法涉及建構通常經由3'-羥基錨定於固體支撐物且藉由使建構嵌段偶合至5'末端而伸長之寡聚物鏈。給定鏈伸長循環中每一偶合步驟之產率一般應<100%。對於長度n之寡核苷酸，存在n-1個鍵聯且最大產率估計應通常由[偶合效率]$^{n-1}$決定。對於25聚體，假定偶合效率為98%，經計算之全長產物的最大產率應為約61%。最終產物因而將含有遞減量之n-1、n-2、n-3等失敗序列。

另一類合成失敗為形成比所需寡核苷酸全長更長的「n+」產物。在不受理論束縛的情況下，此等產物可來源於生長寡核苷酸之分支，其中胺基磷酸酯單體經由鹼基，尤其腺苷之N-6及鳥苷之O-6反應。n+產物之另一來源為自固體支撐物上不合需要之反應性位點起始及傳播。若5'-三苯甲基保護基在偶合步驟期間無意脫除保護基，則亦可形成n+產物。此5'-羥基之過早暴露允許胺基磷酸酯之雙倍加成。此類型寡核苷酸合成方法之合成失敗亦可造成合成基因中之序列錯誤。在各種實施例中，本發明之方法及組合物允許在寡核苷酸之重新合成期間經由精確控制如本文別處所進一步詳述之反應參數而減少錯誤。

其他類型之錯誤可在寡核苷酸組裝成較長構築體期間，在基於PCR以及基於非PCR之組裝方法期間引入。舉例而言，合成雙股寡核苷酸接合

至其他合成雙股寡核苷酸以形成較大合成雙股寡核苷酸可易於出錯。舉例而言，T4 DNA接合酶展現不佳保真度，用3'及5' A/A或T/T錯配(Wu, D. Y.及Wallace, R. B., Gene 76:245-54, 1989)、5' G/T錯配(Harada, K.及Orgel, L. Nucleic Acids Res. 21:2287-91, 1993)或3' C/A、C/T、T/G、T/T、T/C、A/C、G/G或G/T錯配(Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. 及Hood, L., Science 241:1077-80, 1988)密封切口。

錯誤率亦限制用於產生基因變體庫之基因合成之值。在1/300之錯誤率下，1500個鹼基對基因中約0.7%之純系應為正確的。由於寡核苷酸合成之大部分錯誤導致框移突變，故此類庫中超過99%之純系將不產生全長蛋白質。使錯誤率降低75%將使正確的純系部分增加40倍。本發明之方法及組合物均由於改良合成品質及錯誤校正方法之適用性而使得能夠以大量並行及具有時效性的方式快速重新合成錯誤率低於通常所觀察之基因合成方法的大寡核苷酸及基因庫。因此，可在整個庫或整個庫之超過80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%、99.98%、99.99%或99.99%以上的鹼基插入、缺失、取代或總錯誤率低於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或1/1000000以下的情況下合成庫。本發明之方法及組合物另外關於具有低錯誤率之大合成寡核苷酸及基因庫，

其與關於相比預定/預選序列之無錯誤序列的庫之至少一個子集中至少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%或99.99%以上之寡核苷酸或基因相關聯。在一些實施例中，庫內經分離之體積中至少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%或99.99%以上之任何相關寡核苷酸或基因具有相同序列。在一些實施例中，具有超過95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或99.9%以上之相似性或一致性的至少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%或99.99%以上之任何相關寡核苷酸或基因具有相同序列。在一些實施例中，與寡核苷酸或基因上之指定基因座相關的錯誤率經最佳化。因此，作為大庫之一部分的一或多種寡核苷酸或基因之給定基因座或複數個所選基因座可各自具有小於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或1/1000000以下之錯誤率。在各種實施例中，此類錯誤經最佳化之基因座可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、

18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、100000、500000、1000000、2000000、3000000個或3000000個以上基因座。錯誤經最佳化之基因座可分佈於至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、100000、500000、1000000、2000000、3000000個或3000000個以上寡核苷酸或基因。

錯誤率可在存在或不存在錯誤校正的情況下實現。錯誤率可在整個庫或整個庫之超過80%、85%、90%、93%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.8%、99.9%、99.95%、99.98%、99.99%或99.99%以上得以實現。

庫可包含超過100、200、300、400、500、600、750、1000、15000、20000、30000、40000、50000、60000、75000、100000、200000、300000、400000、500000、600000、750000、1000000、2000000、3000000、4000000、5000000個或5000000個以上不同寡核苷酸或基因。不同寡核苷酸或基因可與預定/預選序列相關。庫可包含超過500 bp、600 bp、700 bp、800 bp、900 bp、1000 bp、1250 bp、1500 bp、1750 bp、2000 bp、2500 bp、3000 bp、4000 bp、5000 bp、6000 bp、7000 bp、8000 bp、9000 bp、10 kb、20 kb、30 kb、40 kb、50 kb、60 kb、80 kb、90 kb、100 kb長或更長之寡核苷酸或基因。應瞭

解，庫可包含複數個不同子區段，諸如2、3、4、5、6、7、8、9、10個或10個以上子區段，其由不同錯誤率及/或構築體尺寸所決定。本發明之組合物及方法另外允許在短時間範圍內構築以上所提及之具有上述低錯誤率之寡核苷酸或基因之大合成庫，諸如在不到三個月、兩個月、一個月、三週、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2天或2天以下。以上所提及之庫的基因可藉由在本文別處所進一步詳細描述或另外此項技術中已知的適合之基因組裝方法組裝重新合成之寡核苷酸來合成。

用於移除合成基因中含有錯誤之序列的若干方法此項技術中已知。DNA錯配結合蛋白MutS(來自水生棲熱菌(*Thermus aquaticus*))可用以使用不同策略自合成基因移除失敗產物(Schofield及Hsieh, 2003；Carr等人, 2004；Binkowski等人, 2005)。一些其他策略(Pogulis等人, 1996；Ling及Robinson, 1997；An等人, 2005；Peng等人, 2006b)使用藉由重疊延伸PCR之定點突變誘發校正錯誤，且可與兩輪或兩輪以上選殖及定序以及寡核苷酸之額外合成偶合。在基因合成後之功能性選擇及鑑別為另一方法(Xiong等人, 2004b；Smith等人, 2003)。另一錯誤校正的方法使用SURVEYOR核酸內切酶(Transgenomic)，亦即一種錯配特異性DNA核酸內切酶，以掃描異雙螺旋DNA中已知及未知的突變及多形現象。SURVEYOR技術基於來自芹菜之錯配特異性DNA核酸內切酶Surveyor核酸酶，其為植物DNA核酸內切酶之CEL核酸酶家族的成員(Qiu等人, 2004)。Surveyor核酸酶以高特異性在DNA兩股中任何鹼基取代錯配及其他畸變位點之3'側裂解，包括全部鹼基取代及多至至少12個核苷酸之插入/缺失。可識別插入/缺失錯配及全部鹼基取代錯配，具有基於錯配序列之不同裂解效率。在一個實例中，Surveyor核酸酶技術可在涉及以下四個步

驟之方法中用於錯配偵測：(i)具有突變體/變化形式及野生型/所需序列之所需聚核苷酸目標的視情況聚核苷酸擴增，例如PCR；(ii)雜交所得包含錯配之異雙螺旋；(iii)用Surveyor核酸酶處理異雙螺旋以在錯配位點裂解；及(iv)使用所選偵測/分離平台視情況分析經消化之聚核苷酸產物(圖15-16)。由異雙螺旋之處理產生之裂解產物可在裂解位點之錯誤例如藉由核酸外切酶消除後進行PCA，以產生錯誤殆盡之產物(圖15)。錯配鹼基可實質上或在一些情況下完全移除以產生無錯誤股。在一些實施例中，裂解股可再黏接至聚核苷酸池中之目標且延伸。由於在初始黏接及異雙螺旋裂解移除錯配後含有錯誤之聚核苷酸的頻率極低，故大部分裂解股將黏接至具有在初始錯配之位點處無錯誤之序列的目標。經由沿著目標延伸，可再合成無初始錯配之聚核苷酸。基因組裝之各種實例併入錯誤校正。舉例而言，基於PCR之精確合成(PAS)方案可併入：設計基因及寡核苷酸、純化寡核苷酸、第一PCR以合成區段、第二PCR以組裝全長基因、及定序與錯誤校正(Xiong等人, 2006)。或者，可對樣品進行PCR，其中裂解產物不能夠參與，由此稀釋樣品中錯誤之豐度(圖16)。

在某些實施例中，本發明提供自含有極佳匹配之合成DNA片段的溶液選擇性移除在化學合成DNA之過程期間產生的具有錯配、凸出及小迴路、化學改變之鹼基及其他異雙螺旋的雙股寡核苷酸(諸如DNA分子)的方法。該等方法分離直接於異雙螺旋DNA上形成，或經由包含併入之核苷酸類似物之親和力系統(例如基於按照將生物素分子或生物素類似物引入含有異雙螺旋之DNA且隨後由蛋白質之抗生素蛋白家族之任何成員(包括抗生蛋白鏈菌素)結合形成之抗生素蛋白-生物素-DNA複合物的親和力系統)形成之特異性蛋白質-DNA複合物。抗生素蛋白可固定於固體支撐物

上。

該方法之中心為特異性識別及結合於雙股寡核苷酸(例如DNA)分子內錯配或不成對的鹼基且在異雙螺旋之位點處或附近保持締合，在異雙螺旋位點處或附近形成單股或雙股斷裂或能夠引發股轉移轉位事件的酶。自DNA分子之合成溶液移除錯配、錯誤配對及化學改變之異雙螺旋DNA分子導致與預期合成DNA序列不同的DNA分子的濃度降低。

錯配識別蛋白質通常結合於錯配處或附近。用於基於錯配識別蛋白質之錯誤校正的試劑可包含以下蛋白質：核酸內切酶、限制酶、核糖核酸酶、錯配修復酶、解離酶、解螺旋酶、接合酶、特異性針對錯配之抗體及其變體。酶可選自例如T4核酸內切酶7、T7核酸內切酶1、S1、綠豆核酸內切酶、MutY、MutS、MutH、MutL、裂解酶及HINF1。在本發明之某些實施例中，錯配識別蛋白質在錯配位點附近裂解錯配DNA之至少一股。

就識別及裂解異雙螺旋DNA形成單股切口之蛋白質而言，例如CELI核酸內切酶，所得切口可用作DNA聚合酶之受質以併入適合於親和力搭配之經修飾之核苷酸，例如含有生物素部分或其類似物之核苷酸。存在許多識別錯配DNA且產生單股切口之蛋白質的實例，包括解離酶、核酸內切酶、醣苷酶及具有核酸內切酶活性之特殊MutS樣蛋白質。在一些情況下，在進一步處理後於異雙螺旋DNA分子中形成切口，例如胸腺嘧啶DNA醣苷酶可用於識別錯配DNA且水解DNA中之脫氧核糖與一個鹼基之間的鍵，產生無鹼基位點而無需裂解DNA之糖磷酸酯主鏈。無鹼基位點可藉由AP核酸內切酶轉化成適合於DNA聚合酶延伸之切口受質。蛋白質-異雙螺旋DNA複合物可因此直接在MutS蛋白質之實例中形成，或按照將

核苷酸類似物(例如生物素或其類似物)併入含有異雙螺旋之股且隨後使生物素或生物素類似物與抗生蛋白鏈菌素或抗生素蛋白結合間接形成。

其他錯誤校正方法可依賴於轉座酶(諸如MuA轉座酶)經由股轉移反應將含有預裂解版本之轉座酶DNA結合位點的標記之DNA (例如生物素或生物素類似物標記之DNA)活體外優先插入錯配DNA之位點或附近。活體外MuA轉座酶引導之股轉移為熟習此項技術者已知且熟悉轉座酶活性特異性針對錯配DNA。在此方法中，預裂解之MuA結合位點DNA可在分子之5'末端經生物素標記，使得具有抗生蛋白鏈菌素或抗生素蛋白之蛋白質-生物素-DNA複合物能夠在股轉移至含有異雙螺旋之DNA中後形成。

蛋白質-DNA複合物之活體外分離可藉由使含有蛋白質-DNA複合物之溶液與具有結合蛋白質之高親和力及能力及結合DNA之低親和力的固體基質一起培育來實現。在一些情況下，此類基質可嵌入與本文所述之本發明之各種實施例有關的微流體裝置內。

若干大類的酶優先分解含有錯配、缺失或受損鹼基之異雙螺旋聚核苷酸，諸如DNA受質。通常，此等酶用以將其受損或錯配之受質轉化成切口或單鹼基對空隙(在一些情況下，藉助於AP核酸內切酶將無鹼基位點轉化成切口)。DNA醣苷酶、錯配核酸內切酶及MutSLH錯配修復蛋白質因其效用尤其適用於修飾含有錯誤之合成片段。本發明之方法及組合物可依賴於此等切口或小空隙鑑別含有錯誤之DNA分子且將其自選殖過程移除。

技術之組合可用於移除經處理之含有錯誤的聚核苷酸。DNA醣苷酶為一類移除錯配鹼基且在一些情況下，在所得無嘌呤/無嘧啶(AP)位點裂解之酶。胸腺嘧啶DNA醣苷酶(TDG)可用於自複合物混合物富集含有錯配

或極佳匹配之DNA群體(X. Pan及S. Weissman,「An approach for global scanning of single nucleotide variations」 2002 PNAS 99:9346-9351)。DNA醣苷酶可用於水解DNA中脫氧核糖與一個鹼基之間的鍵，產生無鹼基位點而無需裂解DNA之糖磷酸酯主鏈。全部四組單鹼基錯配及一些其他錯配可由兩種TDG之混合物水解。此外，酶在不存在鎂的情況下對無鹼基位點的高親和力可用以將DNA分子分成異雙螺旋富含或殆盡之群體。已鑑別出極大數目之DNA醣苷酶，且非限制性實例可見於美國專利公開案2006/0134638，其以全文引用之方式併入本文中。DNA醣苷酶通常作用於非天然、受損或錯配鹼基之子集，移除該等鹼基且保留受質用於隨後修復。作為一個類別，DNA醣苷酶對應自DNA移除之化學受質具有廣泛、獨特及重疊的特異性。醣苷酶處理可尤其適用於將鹼基取代之錯誤率降低至低水準。保留AP位點之醣苷酶與諸如大腸桿菌核酸內切酶IV之AP核酸內切酶或核酸外切酶III組合以在DNA中產生切口。

在錯配或受損DNA之區域將DNA切口之錯配核酸內切酶的非限制性實例包括T7核酸內切酶I、大腸桿菌核酸內切酶V、T4核酸內切酶VII、綠豆核酸酶、細胞、大腸桿菌核酸內切酶IV及UVDE。

MutSLH複合物自PCR片段移除大部分錯誤之用途由Smith等人(J. Smith 及 P. Modrich,「Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products.」 1997, PNAS 94:6847-6850)描述，其以全文引用之方式併入本文中。在不存在DAM甲基化的情況下，MutSLH複合物可用於催化在(GATC)位點之雙股裂解。PCR產物可在ATP存在下用MutSLH處理。

關於合成聚核苷酸中之錯誤校正的較詳細的揭示內容可見於美國專

利公開案2006/0134638及美國專利第6664112號，其均全文併入本文中。

根據本發明之方法及組合物用於合成聚核苷酸之錯誤校正的酶、結合搭配物及其他試劑可固定於本文所述之表面(諸如經塗佈之表面或官能化表面)、支撐物及基板上。反應可在一或多種組分固定之情況下就地進行。在適當表面上利用此類組分富集具有較少錯誤或無錯誤之聚核苷酸的純化流程理解為在本發明之界限內。

最終，基因組裝之策略依賴於高品質寡核苷酸實現具有低錯誤率之聚核苷酸的重新合成。本文所述之方法及組合物允許在各種實施例中合成此類高品質寡核苷酸。

核酸之擴增

在一些實施例中，擴增本文所述之核酸。擴增可藉由此項技術中已知的任何方式來進行。在一些情況下，核酸藉由聚合酶鏈反應(PCR)加以擴增。各種PCR方法為此項技術中已知，如例如美國專利第5,928,907號及第6,015,674號中所述，其完整揭示內容出於任何目的以引用的方式併入本文中。核酸擴增之其他方法包括例如接合酶鏈反應、寡核苷酸接合分析及雜交分析。此等及其他方法更詳細地描述於美國專利第5,928,907號及第6,015,674號中。即時光學偵測系統為此項技術中已知，亦如例如併入上文中之美國專利第5,928,907號及第6,015,674中所更詳細地描述。本文可使用之其他擴增方法包括美國專利第5,242,794號；第5,494,810號；第4,988,617號及第6,582,938號中所述之彼等擴增方法，其均全文併入本文中。

在本發明之一些態樣中，使用核酸或聚核苷酸之指數擴增。此等方法常常視催化形成核酸或聚核苷酸分子或其互補序列之多個複本的產物而

定。擴增產物有時稱為「擴增子」。用於DNA之特異性雙股序列之酶促擴增的一種此類方法為聚合酶鏈反應(PCR)。此活體外擴增程序基於變性、寡核苷酸引子黏接及藉由嗜熱性模板依賴性聚核苷酸聚合酶之引子延伸的重複循環，導致由引子側接之聚核苷酸分析物之所需序列的複本指數增加。黏接至DNA相對股之兩個不同PCR引子經安置以使得一個引子之聚合酶催化之延伸產物可充當另一引子之模板股，導致離散雙股片段之積聚，該片段之長度由寡核苷酸引子之5'末端之間的距離界定。本發明提供之方法中可使用的其他擴增技術包括例如AFLP(擴增片段長度多態性)PCR(參見例如：Vos等人 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-14)、對偶基因特異性PCR(參見例如Saiki R K, Bugawan T L, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes Nature 324: 163-166)、Alu PCR、組裝PCR (參見例如Stemmer W P, Crameri A, Ha K D, Brennan T M, Heyneker H L (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides Gene 164: 49-53)、不對稱PCR (參見例如Saiki R K 同上)、菌落PCR、解螺旋酶依賴性PCR (參見例如Myriam Vincent, Yan Xu及Huimin Kong (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification EMBO reports 5 (8): 795-800)、熱起始PCR、反向PCR (參見例如Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetics. 1988 November; 120(3):621-3)、就地PCR、序列間特異性PCR或IS SR PCR、數位PCR、指數後線性PCR或Late PCR (參見例如Pierce K E and Wangh L T (2007). Linear-after-the-exponential

polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells Methods Mol. Med. 132: 65-85)、長PCR、巢式PCR、即時PCR、雙重PCR、多重PCR、定量PCR、定量螢光PCR (QF-PCR)、多重螢光PCR (MF-PCR)、限制性片段長度多態性PCR (PCR-RFLP)、PCK-RFLPIRT-PCR-IRFLP、聚合酶群落PCR、就地圓周開捲擴增(RCA)、橋式PCR、皮滴定PCR及乳液PCR或單細胞PCR。其他適合之擴增方法包括轉錄擴增、自我持續序列複製、目標聚核苷酸序列之選擇性擴增、共同序列引子聚合酶鏈反應(CP-PCR)、任意引子聚合酶鏈反應(AP-PCR)及簡併寡核苷酸引子PCR (DOP-PCR)。用於擴增之另一方法涉及使用單一寡核苷酸引子擴增單股聚核苷酸。欲擴增之單股聚核苷酸含有彼此實質上或完全互補之兩個非鄰接序列，且因此能夠雜交在一起以形成莖環結構。此單股聚核苷酸已可為聚核苷酸分析物之一部分或可由於聚核苷酸分析物之存在而形成。

用於達成核酸擴增結果之另一方法稱為接合酶鏈反應(LCR)。此方法使用接合酶接合數對預先形成之核酸探針。探針與核酸分析物(若存在)之每一互補股雜交，且採用接合酶使各對探針結合在一起，產生可在下一循環中用以再反覆特定核酸序列之兩個模板。

用於達成核酸擴增之另一方法為基於核酸序列之擴增(NASBA)。此方法為啟動子引導之酶促方法，活體外誘發特異性核酸之連續、均勻及等溫擴增，以提供該核酸之RNA複本。用於進行NASBA之試劑包括具有包含啟動子之5'尾的第一DNA引子、第二DNA引子、反轉錄酶、RNA酶-H、T7 RNA聚合酶、NTP及dNTP。

用於擴增一組特定核酸之另一方法為Q-β-複製酶方法，其依賴於Q-

β-複製酶指數擴增其RNA基板之能力。用於進行此類擴增之試劑包括「midi變異RNA」(可擴增雜交探針)、NTP及Q-β-複製酶。

用於擴增核酸之另一方法稱為3SR且類似於NASBA，除了RNA酶-H活性存在於反轉錄酶中。藉由3SR擴增為一種RNA特異性目標方法，其中RNA在使啟動子引導之RNA聚合酶、反轉錄酶及RNA酶H與目標RNA組合之等溫方法中擴增。參見例如Fahy等人 PCR Methods Appl. 1:25-33 (1991)。

用於擴增核酸之另一方法為由Gen-Probe所用之轉錄介導之擴增(TMA)。該方法在自我持續序列複製中利用兩種酶之方面類似於NASBA。參見美國專利第5,299,491號，其以引用的方式併入本文中。

用於擴增核酸之另一方法為股置換擴增(SDA)(Westin等人 2000, Nature Biotechnology, 18, 199-202；Walker等人 1992, Nucleic Acids Research, 20, 7, 1691-1696)，其為基於諸如HincII或BsoBI之限制性核酸內切酶將其識別位點之半硫代磷酸酯形式之未經修飾股切口的能力及諸如克列諾胞外負聚合酶或Bst聚合酶之缺乏核酸外切酶的DNA聚合酶在切口處延伸3'-末端且將下游DNA股移位之能力的等溫擴增技術。指數擴增由有義及反義反應偶合產生，其中自有義反應移位之股充當反義反應之目標且反之亦然。

用於擴增核酸之另一方法為圓周開捲擴增(RCA)(Lizardi等人 1998, Nature Genetics, 19:225-232)。RCA可用於擴增呈環形式之核酸的單股分子。在其最簡單的形式中，RCA涉及單個引子與環狀核酸之雜交。藉由具有股置換活性之DNA聚合酶延伸引子導致產生級聯成單個DNA股之環狀核酸的多個複本。

在本發明之一些實施例中，RCA與接合偶合。舉例而言，單個寡核苷酸可用於接合及用作RCA之環狀模板。此類型之聚核苷酸可稱為「鎖式探針」或「RCA探針」。對於鎖式探針，寡核苷酸之兩端含有與所關注之核酸序列內之結構域互補的序列。鎖式探針之第一末端實質上與所關注之核酸序列上的第一結構域互補，且鎖式探針之第二末端實質上與鄰近第一結構域之第二結構域互補。寡核苷酸與目標核酸之雜交導致雜交複合物之形成。鎖式探針之末端的接合導致含有環狀聚核苷酸之經修飾之雜交複合物的形成。在一些情況下，在接合之前，聚合酶可藉由延伸鎖式探針之一個末端而填充空隙。由此形成之環狀聚核苷酸可充當RCA之模板，在添加聚合酶之情況下，導致擴增產物核酸之形成。本文所述之本發明之方法可產生在5'-及3'-末端具有界定序列之擴增產物。此類擴增產物可用作鎖式探針。

本發明之一些態樣利用核酸或聚核苷酸之線性擴增。線性擴增一般係指涉及形成核酸或聚核苷酸分子(通常為核酸或聚核苷酸分析物)之僅一股之互補序列之一或多個複本的方法。因此，線性擴增與指數擴增之間的主要差異在於：在後一方法中，產物充當受質用於形成較多產物，而在前一方法中，起始序列為用於形成產物之受質，但反應產物(亦即起始模板之複製品)並非用於產生產物之受質。在線性擴增中，所形成之產物的量作為時間之線性函數來增加，與所形成之產物的量為時間之指數函數的指數擴增相對。

在一些實施例中，擴增方法可為固相擴增、聚合酶群落擴增、菌落擴增、乳液PCR、珠粒RCA、表面RCA、表面SDA等，如熟習此項技術者所公認。在一些實施例中，可使用導致溶液中之游離DNA分子或僅由

DNA分子之一個末端繫栓至適合基質之DNA分子擴增的擴增方法。可使用依賴於兩個PCR引子附接至表面之橋式PCR的方法(參見例如WO 2000/018957及Adessi等人, Nucleic Acids Research (2000): 28(20): E87)。在一些情況下，本發明之方法可形成「聚合酶群落技術(polymerase colony technology或polony)」，其係指維持相同擴增子之空間叢集的多重擴增(參見哈佛分子技術小組及理柏計算遺傳學中心網站(Harvard Molecular Technology Group and Lipper Center for Computational Genetics website))。此等包括例如就地聚合酶群落(Mitra及Church, Nucleic Acid Research 27, e34, 1999年12月15日)、就地圓周開捲擴增(RCA) (Lizardi等人, Nature Genetics 19, 225, 1998年7月)、橋式PCR(美國專利第5,641,658號)、皮滴定PCR(Leamon等人, Electrophoresis 24, 3769, 2003年11月)及乳液PCR (Dressman等人, PNAS 100, 8817, 2003年7月22日)。本發明之方法提供用於產生及使用聚合酶群落之新方法。

擴增可經由增加目標序列複本數之任何方法來實現，例如PCR。對藉由PCR擴增目標序列有利的條件為此項技術中已知，可在方法之多個步驟中經最佳化，且視反應要素之特徵而定，諸如目標類型、目標濃度、欲擴增之序列長度、目標及/或一或多種引子之序列、引子長度、引子濃度、所用聚合酶、反應體積、一或多種要素與一或多種其他要素之比率及其他，其中一些或全部可經改變。一般，PCR涉及以下步驟：欲擴增目標之變性(若雙股)、一或多種引子與目標之雜交及藉由DNA聚合酶延伸引子，重複(或「循環」)該等步驟以便擴增目標序列。此方法中之步驟可出於各種結果而經最佳化，諸如增加產率、減少混充產物之形成及/或增加

或降低引子黏接之特異性。最佳化方法為此項技術中所熟知且包括對擴增反應中之要素的類型或量及/或方法中給定步驟之條件(諸如具體步驟之溫度、具體步驟之持續時間及/或循環數目)進行調節。在一些實施例中，擴增反應包含至少5、10、15、20、25、30、35、50個或50個以上循環。在一些實施例中，擴增反應包含不超過5、10、15、20、25、35、50個或50個以上循環。循環可含有任意數目之步驟，諸如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或10個以上步驟。步驟可包含適合於達成給定步驟之目的的任何溫度或溫度梯度，包括(但不限於)3'末端延伸(例如轉接子填充)、引子黏接、引子延伸及股變性。步驟可具有任何持續時間，包括(但不限於)約、小於約或大於約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秒或600秒以上，包括無限直至手動中斷為止。包含不同步驟之任何數目的循環可按任何次序組合。在一些實施例中，包含不同步驟之不同循環經組合以使得組合中之循環總數為約、小於約或大於約5、10、15、20、25、30、35、50個或50個以上循環。擴增可在多反應程序期間的任何點使用本發明之方法及組合物來進行，例如在彙集來自獨立反應體積之定序庫之前或之後，且可用於擴增本文所述之任何適合之目標分子。

接合反應

在一些實施例中，寡核苷酸可接合或連接於轉接子或條碼。連接劑可為接合酶。在一些實施例中，接合酶為T4 DNA接合酶，使用熟知程序(Maniatis, T. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982))。亦可使用其他DNA接合酶。關於接合，可使用其他接合酶，諸如來源於嗜熱性生物體之彼等接合酶，因此允許在較高溫度下接合，允許

使用可在正常容許黏接此類寡核苷酸之較高溫度下同時黏接及接合之較長寡核苷酸(特異性增加)。

關於兩個聚核苷酸，如本文所用之術語「接合(joining及ligation)」係指兩個單獨的聚核苷酸共價附接以產生具有鄰接主鏈之單個較大聚核苷酸。用於接合兩個聚核苷酸之方法為此項技術中已知，且包括(但不限於)酶促及非酶促(例如化學)方法。非酶促接合反應之實例包括美國專利第5,780,613號及第5,476,930號中所述之非酶促接合技術，該等專利以引用的方式併入本文中。在一些實施例中，轉接子寡核苷酸藉由接合酶(例如DNA接合酶或RNA接合酶)接合於目標聚核苷酸。各具有表徵反應條件之多種接合酶為此項技術中已知，且包括(但不限於) NAD^+依賴性接合酶，包括tRNA接合酶、Taq DNA接合酶、絲狀棲熱菌(*Thermus filiformis*) DNA接合酶、大腸桿菌DNA接合酶、Tth DNA接合酶、水生棲熱菌(*Thermus scotoductus*) DNA接合酶(I及II)、熱穩定接合酶、Ampligase熱穩定DNA接合酶VanC型接合酶、9°N DNA接合酶、Tsp DNA接合酶及藉由生物勘探發現之新穎接合酶；ATP依賴性接合酶，包括T4 RNA接合酶、T4 DNA接合酶、T3 DNA接合酶、T7 DNA接合酶、Pfu DNA接合酶、DNA接合酶1、DNA接合酶III、DNA接合酶IV及藉由生物勘探發現之新穎接合酶；及野生型、突變同功異型物及其基因工程改造變體。可在具有可雜交序列(諸如互補突出物)之聚核苷酸之間接合。亦可在兩個鈍端之間接合。一般而言，在接合反應中採用5'磷酸酯。5'磷酸酯可由目標聚核苷酸、轉接子寡核苷酸或兩者提供。5'磷酸酯可按需要添加至欲接合之聚核苷酸或自欲接合之聚核苷酸移除。添加或移除5'磷酸酯之方法為此項技術中已知，且包括(但不限於)酶促及化學方法。適用於添加及/或移除5'

磷酸酯之酶包括激酶、磷酸酶及聚合酶。在一些實施例中，在接合反應中接合之兩個末端(例如轉接子末端及目標聚核苷酸末端)均提供5'磷酸酯，使得在接合兩個末端時製得兩個共價鍵。在一些實施例中，在接合反應中接合之兩個末端中之僅一者(例如轉接子末端及目標聚核苷酸末端中之僅一者)提供5'磷酸酯，使得在接合兩個末端時製得僅一個共價鍵。在一些實施例中，在目標聚核苷酸之一個或兩個末端處之僅一股接合於轉接子寡核苷酸。在一些實施例中，在目標聚核苷酸之一個或兩個末端處之兩股均接合於轉接子寡核苷酸。在一些實施例中，3'磷酸酯在接合之前移除。在一些實施例中，轉接子寡核苷酸添加至目標聚核苷酸之兩個末端，其中在每一末端處之一股或兩股接合於一或多個轉接子寡核苷酸。當在兩個末端處之兩股均接合於轉接子寡核苷酸時，接合後可為保留5'突出物之裂解反應，該5'突出物可充當延伸對應3'末端之模板，該3'末端可能或可能不包括來源於轉接子寡核苷酸之一或多個核苷酸。在一些實施例中，目標聚核苷酸在一個末端接合於第一轉接子寡核苷酸且在另一末端接合於第二轉接子寡核苷酸。在一些實施例中，目標聚核苷酸及與其接合之轉接子包含鈍端。在一些實施例中，使用包含每一樣品之至少一個條碼序列的不同第一轉接子寡核苷酸為每一樣品進行單獨的接合反應，使得無條碼序列接合於超過一種樣品之目標聚核苷酸。具有轉接子/引子寡核苷酸與其接合之目標聚核苷酸視為由接合之轉接子「加標籤」。

在一些實施例中，本文所述之核酸使用點擊化學方法連接。使用點擊化學方法連接各種分子之適合方法為此項技術中已知(關於寡核苷酸之點擊化學方法鍵聯，參見例如El-Sagheer等人 (PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011)。點擊化學方法可在Cu1存在下進行。

條碼

條碼為通常已知的核酸序列，允許鑑別出締合有條碼之聚核苷酸的一些特徵。在一些實施例中，條碼包含當接合於目標聚核苷酸時充當衍生目標聚核苷酸之樣品之識別符的核酸序列。

條碼可設計為適合之長度以允許足夠程度之鑑別，例如至少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個或55個以上核苷酸長。多個條碼，諸如2、3、4、5、6、7、8、9、10個或10個以上條碼，可用於相同分子，視情況由非條碼序列分開。在一些實施例中，條碼長度短於10、9、8、7、6、5或4個核苷酸。在一些實施例中，與一些聚核苷酸締合之條碼具有與其他聚核苷酸締合之條碼不同的長度。一般，條碼具有足夠長度且包含足夠不同的序列，以允許基於與樣品締合之條碼鑑別樣品。在一些實施例中，條碼及與其締合之樣品來源可在條碼序列中突變、插入或缺失一或多個核苷酸後準確鑑別出，諸如突變、插入或缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個或10個以上核苷酸。在一些實施例中，複數個條碼中之每一條碼在至少三個核苷酸位置(諸如至少3、4、5、6、7、8、9、10個或10個以上位置)處不同於該複數個條碼中之每一其他條碼。

定序

本文所述之重新合成之寡核苷酸及較長聚核苷酸產物可在進行程序(諸如多反應程序)之後續步驟之前進行品質控制。可應用品質控制，同時保持個別產物在單獨體積中，諸如在如本文所述之基板的解析特徵上。可

將一部分等分用於品質控制，而劃分每一產物之其餘體積仍可單獨獲得。

圖17圖示包含下一代定序之實例品質控制程序。靶向特異性產物之基因特異性鎖式探針經設計以覆蓋所測試之產物的重疊序列區段。特異性針對基因產物之個別鎖式探針的末端可經設計以可雜交至沿著基因產物分散之區域以便在定序期間恰當覆蓋。特異性針對相同基因產物之全部探針可包含與基因產物締合之條碼序列。適合之聚合酶及/或接合酶可用於在鎖式探針的末端之間沿著基因產物目標進行填充。在一些情況下，鎖式探針將形成環狀單股DNA。通常，線性基因產物可例如在等分一部分基因產物體積後經消化。或者，一部分基因產物體積可在添加鎖式探針之前等分。攜帶基因產物區段之鎖式探針可例如使用PCR擴增。可在擴增期間靶向鎖式探針上之通用或特異性引子結合區。定序引子結合區可最初存在於鎖式探針中或可在後續步驟期間，例如在擴增之前、期間或之後藉由利用定序轉接子添加。

在各種實施例中，基因產物特異性鎖式探針將在初始定序庫步驟後彙集。在彼等情況下，基因產物特異性條碼可用以追溯序列資訊回至個別基因產物。藉由本文所述或另外此項技術中已知之任何適合之方式獲得的定序資訊可例如藉由格化儲存於基於條碼資訊之個別序列池中而去卷積。可採用此項技術中已知的適合比對及序列確認算法完成品質控制。可藉由序列基因座、基因產物、庫或庫之子區段來分析錯誤率及位置。錯誤分析可告知請求者接受或拒絕產物用於後續步驟或用於傳遞。

在任何實施例中，寡核苷酸之偵測或定量分析可藉由定序來實現。次單位或整個合成寡核苷酸可經由全部寡核苷酸之完整定序來偵測，藉由此項技術中已知之任何適合方法，例如Illumina HiSeq 2500，包括本文所

述之定序方法。

定序可經由此項技術中所熟知之典型桑格定序方法來實現。定序亦可使用高產量系統來實現，其中一些允許在經定序核苷酸併入生長股後立即偵測該經定序核苷酸，亦即在紅色時間或實質上即時偵測序列。在一些情況下，高產量定序每小時讀取至少1,000個、至少5,000個、至少10,000個、至少20,000個、至少30,000個、至少40,000個、至少50,000個、至少100,000個或至少500,000個序列；每次讀取產生至少50個、至少60個、至少70個、至少80個、至少90個、至少100個、至少120個或至少150個鹼基。

在一些實施例中，高產量定序涉及使用Illumina基因組分析儀IIX、MiSeq個人定序器或HiSeq系統(諸如使用HiSeq 2500、HiSeq 1500、HiSeq 2000或HiSeq 1000之彼等系統)可用的技術。此等機器使用可逆的基於終止子、藉由合成化學方法之定序。此等機器可在八天讀取2千億DNA或更多。可採用較小系統進行在3、2、1天或更少時間內之運轉。可使用短合成循環將獲得定序結果所耗費的時間減至最少。

在一些實施例中，高產量定序涉及使用ABI Solid系統可用的技術。此基因分析平台能夠實現連接於珠粒之選殖擴增DNA片段的大量並行定序。該定序方法論基於與染料標記之寡核苷酸的連續接合。

下一代定序可包含離子半導體定序(例如使用來自Life Technologies (Ion Torrent)之技術)。離子半導體定序可利用當核苷酸併入DNA股中時可釋放離子的事實。為進行離子半導體定序，可形成高密度陣列之微機械化孔。每一孔可容納單個DNA模板。孔下方可為離子敏感層，且離子敏感層下方可為離子感應器。當核苷酸添加至DNA時，可釋放H+，其可隨

著pH值變化加以量測。H+離子可藉由半導體感應器轉化成電壓且記錄。陣列晶片可用一種接一種核苷酸依序淹沒。可不需要掃描、光或相機。在一些情況下，使用IONPROTON™定序器對核酸進行定序。在一些情況下，使用IONPGM™定序器。Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)可兩小時讀取1千萬次。

在一些實施例中，高產量定序涉及使用Helicos BioSciences Corporation (Cambridge, Massachusetts)可用的技術，諸如藉由合成之單分子定序(SMSS)方法。SMSS因為其允許至多24小時定序整個人類基因組而為獨特的。最後，SMSS為強大的，因為如同MIP技術，其在雜交之前不需要預先擴增步驟。實際上，SMSS不需要任何擴增。SMSS部分描述於美國公開申請案第2006002471 I號；第20060024678號；第20060012793號；第20060012784號；及第20050100932號中。

在一些實施例中，高產量定序涉及使用454 Lifesciences,Inc. (Branford, Connecticut)可用的技術，諸如Pico Titer Plate裝置，其包括發射欲由儀器中之CCD相機記錄的由定序反應產生的化學發光信號的光纖板。此光纖之使用允許4.5小時偵測最少2千萬個鹼基對。

使用珠粒擴增繼之以光纖偵測之方法描述於Marguiles, M., 等人「Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors」, Nature, doi: 10.1038/nature03959以及美國公開申請案第20020012930號；第20030058629號；第20030100102號；第20030148344號；第20040248161號；第20050079510號；第20050124022號及第20060078909號中。

在一些實施例中，使用Clonal Single Molecule Array (Solexa, Inc.)

或利用可逆終止子化學方法之合成定序(SBS)進行高產量定序。此等技術部分描述於美國專利第6,969,488號；第6,897,023號；第6,833,246號；第6,787,308號；及美國公開申請案第20040106130號；第20030064398號；第20030022207號；及Constans, A., The Scientist 2003, 17(13):36中。寡核苷酸之高產量定序可使用此項技術中已知的任何適合之定序方法來實現，諸如由Pacific Biosciences、Complete Genomics、Genia Technologies、Halcyon Molecular、Oxford Nanopore Technologies及其類似公司商品化之彼等定序方法。其他高產量定序系統包括Venter, J., 等人 Science 16 2001年2月；Adams, M.等人, Science 24 2000年3月；及M. J, Levene, 等人 Science 299:682-686, 2003年1月以及美國公開申請案第20030044781號及第2006/0078937號中所揭示之彼等定序系統。全部此類系統涉及經由在寡核苷酸分子上量測之聚合反應藉由暫時添加鹼基來定序具有複數個鹼基之目標寡核苷酸分子，亦即，即時追蹤核酸聚合酶在欲測序之模板寡核苷酸分子上之活性。序列可接著藉由鑑定在鹼基添加物定序之每一步驟藉由核酸聚合酶之催化活性併入目標寡核苷酸之生長互補股中的鹼基來推導。在目標寡核苷酸分子複合物上之聚合酶提供在適合於沿著目標寡核苷酸分子移動且在活性位點延伸寡核苷酸引子之位置。在活性位點附近提供複數個標記類型之核苷酸類似物，每一可辨識類型之核苷酸類似物與目標寡核苷酸序列之不同核苷酸互補。生長寡核苷酸股藉由使用聚合酶在活性位點添加核苷酸類似物至寡核苷酸股來延伸，其中所添加之核苷酸類似物在活性位點與目標寡核苷酸之核苷酸互補。鑑別出由於聚合步驟添加至寡核苷酸引子之核苷酸類似物。重複提供標記之核苷酸類似物、聚合生長寡核苷酸股及鑑定所添加之核苷酸類似物的步驟，以便寡核

苷酸股進一步延伸及測定目標寡核苷酸之序列。

下一代定序技術可包含Pacific Biosciences之即時(SMRT™)技術。在SMRT中，四種DNA鹼基中之每一者可附接至四種不同螢光染料中之一者。此等染料可為磷酸基連接的。單個DNA聚合酶可與單分子模板單股DNA一起固定在零模式波導(ZMW)底部。ZMW可為能夠相對於可在ZMW外迅速擴散(以微秒為單位)之螢光核苷酸背景觀測單核苷酸藉由DNA聚合酶併入之限制結構。核苷酸併入生長股可耗時若干毫秒。在此期間，可激發螢光標記且產生螢光信號，且可裂解掉螢光標籤。ZMW可由下經照射。來自激發束之衰減光可穿透各ZMW之下部20-30 nm。可形成具有20仄升(10"公升)偵測極限之顯微鏡。微小偵測體積可在減少背景雜訊方面提供1000倍改良。偵測染料之對應螢光可指示併入何種鹼基。可重複該過程。

在一些情況下，下一代定序為奈米孔定序{參見例如Soni GV及Meller A. (2007) Clin Chem 53: 1996-2001)。奈米孔可為約一奈米直徑之小洞。將奈米孔浸沒於導電流體中且在其兩端施加電勢可由於離子傳導穿過奈米孔而產生微弱電流。電流流量可對奈米孔之尺寸敏感。隨著DNA分子通過奈米孔，DNA分子上之每一核苷酸可以不同程度阻塞奈米孔。因此，隨著DNA分子通過奈米孔通過奈米孔之電流變化可表示DNA序列之讀數。奈米孔定序技術可來自Oxford Nanopore Technologies；例如GridlON系統。單個奈米孔可插入遍及微孔頂部之聚合物膜中。每一微孔可具有用於單獨感應之電極。微孔可製造於陣列晶片中，每一晶片具有100,000個或100,000個以上微孔(例如超過200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000或1,000,000)。可使用

儀器(或節點)分析晶片。可即時分析資料。可一次操作一或多個儀器。奈米孔可為蛋白質奈米孔，例如蛋白質α-溶血素，亦即一種七聚蛋白質孔。奈米孔可為製得之固態奈米孔，例如在合成膜(例如SiNx或SiO2)中形成之奈米尺寸之洞。奈米孔可為雜交孔(例如蛋白質孔整合於固態膜中)。奈米孔可為具有整合感應器之奈米孔(例如隧道電極偵測器、電容偵測器或基於石墨薄膜之奈米間隙或邊緣態偵測器(參見例如Garaj等人. (2010) Nature 第67卷, doi: 10.1038/nature09379))。奈米孔可經官能化用於分析特定類型之分子(例如DNA、RNA或蛋白質)。奈米孔定序可包含「股定序」，其中完整DNA聚合物可通過蛋白質奈米孔，隨著DNA易位孔隙即時定序。酶可分離雙股DNA之股且使股饋入穿過奈米孔。DNA可在一個末端具有髮夾，且系統可讀取兩股。在一些情況下，奈米孔定序為「核酸外切酶定序」，其中個別核苷酸可藉由進行性核酸外切酶自DNA股裂解，且核苷酸可通過蛋白質奈米孔。核苷酸可暫時結合於孔隙中之分子(例如環葡聚糖)。電流之特徵性中斷可用於鑑別鹼基。

可使用來自GENIA之奈米孔定序技術。經工程改造之蛋白質孔可嵌入脂質雙層膜中。「主動控制」技術可用於實現高效奈米孔膜組裝及控制DNA移動穿過通道。在一些情況下，奈米孔定序技術來自NABsys。基因組DNA可分成平均約100 kb長之股片段。100kb片段可製成單股且隨後與6聚體探針雜交。可驅使具有探針之基因組片段穿過奈米孔，其可形成電流對比時間之追蹤。電流追蹤可提供探針在每一基因組片段上之位置。基因組片段可經排列以形成基因組之探針圖譜。針對探針庫可並行進行該方法。可產生每一探針之基因組長度探針圖譜。錯誤可用稱為「移動窗雜交定序(mwSBH)」之方法解決。在一些情況下，奈米孔定序技術來自

IBM/Roche。電子束可用於在微晶片中製造奈米孔尺寸之開口。電場可用於牽拉或旋擰DNA穿過奈米孔。奈米孔中之DNA電晶體裝置可包含金屬及介電質之交替奈米尺寸層。DNA主鏈中之離散電荷可藉由DNA奈米孔內部之電場而捕獲。關閉及打開閘電壓可允許讀取DNA序列。

下一代定序可包含DNA奈米球定序(如例如藉由Complete Genomics所進行；參見例如Drmanac等人 (2010) Science 327: 78-81)。DNA可經分離、片段化及尺寸選擇。舉例而言，DNA可(例如藉由音波處理)分成平均長度約500 bp之片段。轉接子(Adl)可附接至片段末端。轉接子可用於雜交至定序反應之錨具。具有轉接子結合於每一末端之DNA可經PCR擴增。轉接子序列可經修飾以便互補單股末端彼此結合形成環狀DNA。DNA可經甲基化以保護其避免由用於後續步驟之IIS型限制酶裂解。轉接子(例如右轉接子)可具有限制性識別位點，且限制性識別位點可保持非甲基化。轉接子中之非甲基化限制性識別位點可由限制酶(例如Acul)識別，且DNA可由Acul裂解13 bp至右轉接子右側以形成線性雙股DNA。第二輪右轉接子及左轉接子(Ad2)可接合於線性DNA之任一末端上，且結合兩個轉接子之全部DNA可經PCR擴增(例如藉由PCR)。Ad2序列可經修飾以允許其彼此結合且形成環狀DNA。DNA可經甲基化，但左Adl轉接子上之限制酶識別位點可保持非甲基化。可應用限制酶(例如Acul)，且DNA可裂解13 bp至Adl左側以形成線性DNA片段。第三輪右轉接子及左轉接子(Ad3)可接合至線性DNA之右側及左側，且所得片段可經PCR擴增。轉接子可經修飾以使其可彼此結合且形成環狀DNA。可添加III型限制酶(例如EcoP15)；EcoP15可裂解DNA 26 bp至Ad3左側及26 bp至Ad2右側。此裂解可移除大區段DNA且再次使DNA線性化。第四輪右轉接子及左轉接子

(Ad4)可接合至DNA，DNA可經擴增(例如藉由PCR)，且經修飾以使其彼此結合且形成完成環狀DNA模板。

圓周開捲複製(例如使用Phi 29 DNA聚合酶)可用於擴增小片段DNA。四個轉接子序列可含有可雜交之迴文序列，且單股可自身摺疊以形成平均直徑可為大致200-300奈米之DNA奈米球(DNB™)。DNA奈米球可附接(例如藉由吸附)至微陣列(定序流槽)。流槽可為用二氧化矽、鈦及六甲基二矽氮烷(HMDS)及光阻材料塗佈之矽晶圓。定序可藉由接合螢光探針至DNA之解鏈式定序來進行。詢問位置之螢光顏色可藉由高解析度相機來目測。可測定轉接子序列之間的核苷酸序列一致性。

噴墨沈積物

在一些實施例中，本發明之方法及組合物利用沈積、定位或置放組合物在支撐物表面上或支撐物表面中之特定位置。沈積可包含使一種組合物與另一種接觸。沈積可為手動或自動的，例如沈積可藉由自動化機器人裝置來實現。脈衝噴射或噴墨可用於將流體組合物之液滴施配於支撐物上。脈衝噴射通常藉由傳遞脈衝壓力(諸如藉由壓電或熱電元件)至靠近出口或孔口之液體來操作，使得液滴可由其施配。

試劑液體可使用此項技術中已知的各種方法或系統沈積至本文別處所進一步詳述之基板的解析基因座。流體之微液滴可以次微米級精度傳遞至本發明中所述之基板上或基板內的表面或解析基因座。可採用市售的使用噴墨技術作為下文流體體積之微施配方法的施配設備。使用噴墨技術產生之液滴為高度可再現的且可經控制以使得液滴可根據數位儲存影像資料在特定時間置放於特定位置。需給式噴墨裝置之典型液滴直徑可為30-100 μm，其轉換成14-520 pl之液滴體積。需給式噴墨裝置之液滴形成速率可

為每秒2000-5000個液滴。需給式噴墨微施配可在適合之解析度及輸送量下用以為本文別處所進一步詳述之具有高密度解析基因座的基板服務。沈積或傳遞試劑之方法及系統進一步詳述於美國專利第5,843,767號及第6,893,816號中，其均以全文引用之方式併入。

用於沈積或傳遞試劑至解析基因座之系統可包含一或多個子系統，其包括(但不限於)：微噴射施配頭、流體傳遞系統或噴墨泵、X-Y定位系統、視覺系統或系統控制器。微噴射施配頭可為複數個MicroJet裝置(例如8個MicroJet裝置)及所需驅動電子之總成。系統複雜度可藉由使用單通道之驅動電子降至最低以多路複用8或10個施配裝置。每一個別裝置之驅動波形要求可自系統控制器下載。驅動電子可使用此項技術中已知的習知方法來構築。流體傳遞系統或噴墨泵可為經修飾以充當多試劑輸入系統之Beckman Biomec。在其與MicroJet施配頭之間可為由系統控制器控制的電磁閥系統。其提供加壓沖洗流體及空氣淨化來自系統之試劑且抽真空以將試劑載入系統中。X-Y定位系統可為任何市售之具有控制器的精密X-Y定位系統。定位系統可經尺寸設定以容納複數個感應器。視覺系統可用於相對於定位系統校準每一MicroJet裝置之「著陸區」。校準可在每一試劑負載循環後進行。另外，當感應器托盤經由基準標誌首先負載於感應器上時，視覺系統可將每一施配位點定位於每一感測器上。可使用基於軟體之系統或基於硬體之視覺系統。系統控制器可為用作整體系統控制器之標準電腦系統。視覺系統影像俘獲及加工亦位於系統控制器上。用於沈積或傳遞試劑至解析基因座之系統進一步詳述於PCT公開案第WO2000039344號中，其以全文引用之方式併入本文中。

圖18圖示噴墨總成之實例。在一些實施例中，噴墨總成可包含至少

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個噴墨頭。噴墨頭可各沈積不同密碼子(三核苷酸)建構嵌段。在一個例示性實施例中，噴墨頭可具有在254 μm中心之含256個噴嘴的矽孔板及100 μm飛行高度。每一頭可進入橫越的每一孔。噴墨總成可具有約100 mm/s之掃描速度及在行進(x,y)平面約2 μm之精確度。在一些情況下，噴墨總成在晶圓上方之掃描高度可為約100 μm，平度偏擺約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20 μm。在一些情況下，噴墨總成可包含使噴墨機與夾在真空夾盤上之基板(例如矽晶圓)對準之視覺系統，在一些情況下，作為流槽總成之一部分。

在一些情況下，本文所述之沈積試劑至複數個解析基因座之方法及系統可包含經由噴墨泵施用至少一個微滴之第一試劑至該複數個基因座之第一基因座及經由噴墨泵施用至少一個微滴之第二試劑至該複數個解析基因座之第二基因座。在一些實施例中，第二基因座可鄰近於第一基因座，且第一及第二試劑可為不同的。第一及第二基因座可位於製造於支撐表面中之微結構上且該等微結構可包含至少一個通道。在一些情況下，至少一個通道超過100 μm深。在一些實施例中，第一及第二試劑可為相同的。在一些情況下，微結構包含一個大的微通道及流體連接至第一微通道之一或多個微通道。大的初始微通道最初接受沈積液體，通常減少去往及來自相鄰微結構之試劑的任何交叉污染。液滴之內含物可隨後流動至一或多個較小微通道中，其可代管適用於本文所述之反應(諸如寡核苷酸合成)之表面。

至少一個通道之深度可為約、至少約或小於約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、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000 μm。在一些實施例中，至少一個通道之深度可為約50-100、50-150、50-200、100-200、100-300、20-300或20-100 μm。在一些實施例中，至少一個通道可超過100 μm深。

試劑之每一液滴可具有適合之體積，使得可穿越微通道之深度而不損失動量。適合之體積可包含所需量之用於寡核苷酸合成之試劑。舉例而言(但不限於)，包含試劑之每一液滴的體積可為約或至少約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 pl、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、75、100、200、500 nl或500 nl以上。在各種實施例中，調節系統以使得尾隨沈積液滴之任何衛星滴小至足以使交叉污染降至最低。在噴墨機之情況下，可使得印刷頭足夠接近基板，例如在100 μm內，使得沈積液滴及其衛星滴在氣霧劑移動之前實質上在基板之通道內。衛星滴之直徑可小於0.5、1、1.5或2 μm。在各種實施例中，參與氣霧劑移動之衛星滴之體積份小於沈積液滴之5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%或0.01%以下。

如本文別處所述，微結構可包含多個彼此流體連通之通道。在一些

情況下，微結構可包含至少三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個流體連通之通道。通道可具有不同維度，例如寬度或長度，如本文別處所進一步詳述。在一些實施例中，微結構之流體連接通道可包含兩個或兩個以上具有相同寬度、長度及/或其他維度之通道。

流體之微滴可以高精確度傳遞至如本文別處所述之基板內的表面或解析基因座而使得交叉污染最少。在一些情況下，第一基因座可接受小於0.1%之意欲沈積至第二基因座之第二試劑，且類似地，第二基因座可接受小於0.1%之第一試劑。在一些情況下，第一基因座可接受小於約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%或0.01%之第二試劑。第二基因座可接受小於約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%或0.01%之第一試劑。

在一些情況下，試劑可以液滴形式傳遞，該等液滴之直徑為約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或200 μm。試劑之液滴之直徑可為至少約2 μm。試劑可以液滴形式傳遞，該等液滴之直徑小於約5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200 μm。試劑可以液滴形式傳遞，該等液滴之直徑為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或50-60 μm。

試劑之液滴可以每秒約或至少約1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500或5000個液滴之速率沈積。

軟著陸

本文亦描述用於沈積液滴至複數個微孔之系統及方法。在一個態樣中，液滴可沈積至包含具有複數個微孔之第一表面的微流體系統的微孔中。液滴可具有適合之雷諾數，諸如約1-1000、1-2000、1-3000、0.5-1000、0.5-2000、0.5-3000、0.5-4000、0.5-5000、1-500、2-500、1-100、2-100、5-100、1-50、2-50、5-50或10-50，使得在到達微孔底部後液體之反跳減至最少。熟習此項技術者瞭解，雷諾數可處於由任何此等值限定的任何範圍內(例如約0.5至約500)。在流體系統中精確估算雷諾數之適合方法描述於Clift等人(Clift, Roland, John R. Grace及Martin E. Weber, Bubbles, Drops and Particles, 2005. Dover Publications)及Happel等人(Happel, John及Howard Brenner, 1965. Prentice-Hall)中，其均以全文引用之方式併入本文中。

複數個微孔之密度可為每平方毫米超過1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、30個、40個、50個、75個、100個、200個、300個、400個、500個、1000個或1000個以上。按照本文所述之方法，液滴可平滑地流經微孔且柔和地著陸在微孔底部。

可使用此項技術中已知的任何方法及系統沈積液滴。在一些實施例中，微流體系統可另外包含噴墨泵。噴墨泵可用於沈積液滴至複數個微孔中之一者。液體沈積系統之各種實施例描述在本說明書別處。

在一些情況下，基板子區域內之微孔可呈不同寬度、相同寬度或相同或不同寬度之組合。微孔可具有任何不同的寬度。舉例而言(但不限於)，微孔之寬度可為約、寬於約或窄於約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或100 μm。

微孔可具有任何不同的長度。舉例而言(但不限於)，微孔之長度可為約、長於約或短於約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或1000 μm。

微孔可流體連接至至少一個微通道。微孔之表面積與長度之比率或周長可為約、至少約或小於約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或100 μm。

液滴可具有適用於本文所述之方法的體積。在一些實施例中，液滴之體積可小於約0.5微升(μl)、小於約1 μl、小於約1.5 μl、小於約2 μl、小於約2.5 μl、小於約3 μl、小於約3.5 μl、小於約4 μl、小於約4.5 μl、小於約5 μl、小於約5.5 μl、小於約6 μl、小於約6.5 μl、小於約7 μl、小於約7.5 μl、小於約8 μl、小於約8.5 μl、小於約9 μl、小於約9.5 μl、小於約10 μl、小於約11 μl、小於約12 μl、小於約13 μl、小於約14 μl、小於約15 μl、小於約16 μl、小於約17 μl、小於約18 μl、小於約19 μl、小於約20 μl、小於約25 μl、小於約30 μl、小於約35 μl、小於約40 μl、小於約45 μl、小於約50 μl、小於約55 μl、小於約60 μl、小於約65 μl、小

於約70 μl、小於約75 μl、小於約80 μl、小於約85 μl、小於約90 μl、小於約95 μl或小於約100 μl。在一些實施例中，液滴之體積可為約0.5微升(μl)、約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或約100 μl。

在一些情況下，微通道可用增加表面能之部分(諸如化學惰性部分)塗佈。適合之化學惰性部分或化學反應性部分的類型描述在本說明書別處。

液滴之雷諾數可處於允許液體平滑地流經如本文所述之微孔及/或微通道的雷諾數範圍內。在一些實施例中，液滴之雷諾數可小於約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000。在一些實施例中，液滴之雷諾數可大於約0.1、0.5、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000。在一些情況下，液滴可於層流或近層流中流經微孔。

液滴可以至少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/s或100 m/s以上之速度施用或沈積。

可程式化分裂

如本文所述之系統可包含複數個解析基因座及可一起密封形成複數

個解析反應器之複數個解析反應器蓋。複數個解析反應器可含有試劑。密封可為可逆或疏鬆的，且複數個解析反應器蓋可自複數個解析基因座剝離。在自包含複數個解析基因座之第一表面剝離後，反應器蓋可保留至少一部分試劑。藉由控制反應器蓋自複數個解析基因座之剝離，可控制液體或試劑之分配。在本發明之一個態樣中，本文描述一種分配方法。該方法可包含使在第一複數個解析基因座包含液體之第一表面與包含第二複數個解析基因座(諸如反應器蓋)而表面接觸，其中該第一表面可包含與該液體之第一表面張力，該第二表面可包含與該液體之第二表面張力；及確定剝離速度以使得該液體之所需部分可自該第一複數個解析基因座轉移至該第二複數個解析基因座。在此經計算之速度下使第二表面自第一表面分離後，反應器內含物之所需部分可保留在反應器中。包含第一複數個解析基因座之第一表面可包含用寡核苷酸塗佈之複數個解析基因座。包含第二複數個解析基因座之第二表面可為包含複數個反應器蓋之覆蓋元件。在一些情況下，該方法可另外包含使第三表面與第三複數個解析基因座接觸。本文描述各種態樣或實施例。

保留在第二表面中之液體可藉由此項技術中已知之任何方法來容納。在一些情況下，第一或第二表面可包含容納至少一部分液體之微通道。在一些情況下，第一或第二表面可包含容納至少一部分液體之奈米反應器。在一些情況下，液體可由於第一與第二表面之間的表面張力差異而保留。在不受理論束縛的情況下，對於基於水之液體，較大部分之液體可保留於具有較高表面能或較小疏水性之表面上。

可分配液體使得試劑之所需部分可在剝離後保留於第一或第二表面上。舉例而言(但不限於)，所需部分可為約、至少約或大於約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%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

並行微流體混合方法

在本發明之另一態樣中，本文描述混合液體之方法。該方法可包含提供包含在上面製造之複數個微結構的第一基板；提供包含複數個解析反應器蓋之第二基板；使第一及第二基板對準以使得複數個第一反應器蓋可經配置以接受來自該第一基板之n個微結構之液體；及將來自該n個微結構之液體傳遞至該第一反應器蓋中，由此混合來自該n個微結構之液體形成混合物。本文描述各種實施例及變化形式。

解析反應器蓋之密度可為提供第一基板之微結構與第二基板之反應器蓋之所需對準的任何適合之密度。在一些情況下，解析反應器蓋之密度可為每平方毫米至少1個。在一些情況下，解析反應器之密度可為每1 mm^2約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個或約2000個位點。在一些實施例中，解析反應器之密度可為每1 mm^2至少約1個、至少約2個、至少約3個、至少約4個、至少約5個、至少約6個、至少約7個、至少約8個、至少約9個、至少約10個、至少約20個、至少約30個、至少約40個、至少約50個、至少約75個、至少約100個、至少約200個、至少約300個、至少約400個、至少約500個、至少約600個、至少約700個、至少約800個、至少約900個、至少約1000個、至少約1500個、至少

約2000個或至少約3000個位點。

微結構可在根據本發明之方法及組合物可實行的任何密度下。在一些情況下，微結構之密度可為每1 mm^2約、至少約或小於約1個、約2個、約3個、約4個、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約15個、約20個、約25個、約30個、約35個、約40個、約50個、約75個、約100個、約200個、約300個、約400個、約500個、約600個、約700個、約800個、約900個、約1000個、約1500個、約2000個或約3000個位點。在一些實施例中，微結構之密度可為每1 mm^2至少100個。在一些情況下，微結構可具有約與解析反應器之密度相同的表面密度。

在一些情況下，在使第一及第二基板對準以使得複數個第一反應器蓋經配置以接受來自第一基板之n個微結構的液體後，第一及第二基板之間可存在間隙，例如小於約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或200 μm之間隙。

在一些情況下，在使第一及第二基板對準以使得複數個第一反應器蓋經配置以接受來自第一基板之n個微結構的液體後，混合物或液體可部分展佈於第一及第二基板之間的間隙中。部分展佈於間隙中之液體或混合物可形成毛細管破裂閥。混合方法可另外包含藉由使第一及第二基板更靠近在一起來密封間隙。在一些情況下，第一及第二基板可呈直接物理接觸。

複數個微結構及反應器蓋可具有如本文別處進一步詳述之任何適合的設計或維度。至少一個通道可具有呈環形形狀之截面積且可包含約、至

少約、小於約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或100μm之截面積半徑。

在一些情況下，通道可用增加對應於小於90°之水接觸角之表面能的部分(諸如化學惰性部分)塗佈。表面之表面能或疏水性可藉由量測水接觸角加以評估或量測。小於90°之水接觸角可以相對親水的方式使固體表面官能化。大於90°之水接觸角可以相對疏水的方式使固體表面官能化。具有低表面能之高度疏水性表面可具有大於120°之水接觸角。在一些情況下，如本文所述之通道或兩個通道中之一者的表面可經官能化或經改質以呈疏水性、具有低表面能或具有如在未彎曲表面上量測可大於約90°、95°、100°、105°、110°、115°、120°、125°、130°、135°、140°、145°或150°之水接觸角。在一些情況下，本發明中如本文所述之通道或兩個通道中之一者的表面可經官能化或經改質以呈親水性、具有高表面能或具有如在未彎曲表面上量測可小於約90°、85°、80°、75°、70°、65°、60°、55°、50°、45°、40°、35°、30°、25°、20°、15°或10°之水接觸角。通道或兩個通道中之一者的表面可經官能化或經改質以較親水或疏水。在一些情況下，第一及第二基板之表面可包含在給定液體(諸如水)下之不同表面能。在一些情況下，第一及第二基板之表面可包含約5°、10°、20°、30°、40°、50°、60°、70°、80°、90°之差示水接觸角。用於使表面官能化之其他方法描述於美國專利第6,028,189號中，其以全文引用的方式併入本文中。

在一些實施例中，可藉由壓力進行傳遞。將來自n個微結構中之液體

傳遞至第一反應器蓋中可導致來自n個微結構之液體混合且形成混合物。

在一些情況下，總混合液體之體積可大於反應器蓋之體積。反應器蓋表面(諸如輪緣表面)之全部或一部分可使用在本文別處進一步詳述及另外此項技術中已知之適合表面改質方法來改質。在一些情況下，表面不規則性經工程改造。化學表面改質及不規則性可用以調整輪緣之水接觸角。類似表面處理亦可施用於與反應器蓋緊密接近形成密封件(例如可逆密封件)之基板的表面上。毛細管破裂閥可用於兩個表面之間，如在本文別處所進一步詳述。表面處理可用於精確控制包含毛細管破裂閥之此類密封件。

在一些情況下，自第一表面剝離覆蓋元件及自第二表面剝離覆蓋元件可在不同速度下進行。在自對應表面剝離覆蓋元件後所保留之試劑部分的量可由速度或覆蓋元件及對應表面之表面能來控制。覆蓋元件與對應表面之表面能或疏水性的差異可為控制在剝離後所保留之試劑部分的參數。第一及第二反應之體積可為不同的。

下游應用

本發明之方法及組合物可用於核酸雜交研究，諸如基因表現分析、基因分型、異雙螺旋分析、基於雜交之核酸定序測定、DNA、RNA、肽、蛋白質或其他寡聚或非寡聚分子之合成、用於候選藥物評估之組合庫。

根據本發明合成之DNA及RNA可用於任何應用，包括例如用於諸如基因表現分析、藉由雜交(競爭性雜交及異雙螺旋分析)之基因分型、雜交定序之雜交方法的探針、用於南方墨點分析之探針(經標記之引子)、用於陣列(微陣列或過濾陣列)雜交之探針、可與能量傳遞染料一起用於偵測基

因分型或表現分析中之雜交的「鎖式」探針及其他類型之探針。根據本發明製備之DNA及RNA亦可用於基於酶之反應，諸如聚合酶鏈反應(PCR)，用作PCR之引子，用作PCR、對偶基因特異性PCR(基因分型/單倍型分析)技術、即時PCR、定量PCR、反轉錄酶PCR及其他PCR技術之模板。DNA及RNA可用於各種接合技術，包括基於接合之基因分型、寡核苷酸接合分析(OLA)、基於接合之擴增、用於選殖實驗之轉接子序列的接合、桑格雙脫氧定序(引子、經標記之引子)、高產量定序(使用電泳分離或其他分離方法)、引子延伸、微定序及單鹼基延伸(SBE)。根據本發明產生之DNA及RNA可用於突變誘發研究(使用寡核苷酸將突變引入已知序列中)、反轉錄(製造RNA轉錄物之cDNA複本)、基因合成、引入限制性位點(一種形式之突變誘發)、蛋白質-DNA結合研究及類似實驗。藉由本發明之方法產生之DNA及RNA的各種其他用途應為熟習此項技術者所知曉，且此類用途亦視為在本發明之範疇內。

電腦系統

在各種實施例中，本發明之方法及系統可另外包含電腦系統上之軟體程式及其用途。因此，關於施配/抽真空/再填充功能同步之電腦化控制，諸如協調及同步印刷頭移動、施配動作及真空致動，在本發明之範圍內。電腦系統可經程式化以在使用者指定的鹼基序列與傳遞正確試劑至基板指定區域之施配器頭的位置之間形成連接。

圖19所示之電腦系統1900可理解為可讀取來自媒體1911及/或網路端口1905之邏輯設備，其可視情況連接至具有固定媒體1912之伺服器1909。諸如圖19所示之系統可包括CPU 1901、磁碟機1903、視情況選用之輸入裝置(諸如鍵盤1915及/或滑鼠1916)及視情況選用之監視器1907。

資料通信可在本端或遠端位置經由伺服器之指定通信媒體來實現。通信媒體可包括傳輸及/或接收資料之任何構件。舉例而言，通信媒體可為網路連接、無線連接或網際網路連接。此類連接可提供在全球資訊網之通信。設想與本發明相關之資料可在此類網路或連接上傳輸以便合作對象1922接收及/或審查，如圖19所示。

圖20為圖示可結合本發明之例示性實施例使用之電腦系統2000的第一實例架構的方塊圖。如圖20所描繪，實例電腦系統可包括處理器2002用於處理指令。處理器之非限制性實例包括：Intel XeonTM處理器、AMD OpteronTM處理器、Samsung 32位元RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0TM處理器、ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100TM處理器、ARM Cortex-A8 Apple A4TM處理器、Marvell PXA 930TM處理器或功能上等效的處理器。多個執行緒可用於並行處理。在一些實施例中，亦可使用多個處理器或具有多個核心之處理器，無論在單個電腦系統中、在叢集中或分佈遍及包含複數個電腦、行動電話及/或個人資料助理裝置之網路上的系統。

如圖20所示，高速快取記憶體2004可連接至或併入處理器2002以為處理器2002最近已使用或頻繁使用之指令或資料提供高速記憶體。處理器2002藉由處理器匯流排2008連接至北橋2006。北橋2006藉由記憶體匯流排2012連接至隨機存取記憶體(RAM)且藉由處理器2002管理RAM 2010之存取。北橋2006亦藉由晶片組匯流排2016連接至南橋2014。南橋2014繼而連接至周邊匯流排2018。周邊匯流排可為例如PCI、PCI-X、PCI Express或其他周邊匯流排。北橋及南橋常常稱為處理器晶片組且管理處理器、RAM及周邊匯流排2018上之周邊組件之間的資料傳送。在一些替

代性架構中，北橋之功能可併入處理器中代替使用單獨的北橋晶片。

在一些實施例中，系統2000可包括附接至周邊匯流排2018之加速器卡2022。加速器可包括現場可程式化閘陣列(FPGA)或用於加速某些處理之其他硬體。舉例而言，加速器可用於自適應資料重構或評估用於擴展集合處理之代數表達式。

軟體及資料儲存於外部儲存器2024中且可加載至RAM 2010及/或快取記憶體2004以便處理器使用。根據本發明之例示性實施例，系統2000包括用於管理系統資源之操作系統；操作系統之非限制性實例包括：Linux、WindowsTM、MACOSTM、BlackBerry OSTM、iOSTM及其他功能上等效的操作系統，以及在操作系統頂端運行用於管理資料儲存及最佳化之應用軟體。

在此實例中，系統2000亦包括連接至周邊匯流排之網路介面卡(NIC)2020及2021，用於向諸如網路附接儲存(NAS)之外部儲存器及可用於分佈式並行處理之其他電腦系統提供網路介面。

圖21為展示具有複數個電腦系統2102a及2102b、複數個行動電話及個人資料助理2102c及網路附接儲存(NAS) 2104a及2104b之網路2100的圖式。在實例實施例中，系統2102a、2102b及2102c可管理資料儲存且使網路附接儲存(NAS) 2104a及2104b中儲存之資料的資料存取最佳化。數學模型可用於資料且使用遍及電腦系統2102a及2102b、行動電話及個人資料助理系統2102c之分佈式並行處理加以評估。電腦系統2102a及2102b、行動電話及個人資料助理系統2102c亦可為網路附接儲存(NAS) 2104a及2104b中儲存之資料的自適應資料重構提供並行處理。圖21僅圖示一個實例，且廣泛多種其他電腦架構及系統可與本發明之各種實施例結

合使用。舉例而言，刀鋒伺服器可用於提供並行處理。處理器刀鋒可經由後平面連接以提供並行處理。儲存器亦可經由單獨的網路介面連接至後平面或作為網路附接儲存(NAS)。

在一些實例實施例中，處理器可維持單獨的記憶體空間且經由網路介面、後平面或其他連接器傳輸資料以便由其他處理器並行處理。在其他實施例中，一些或全部處理器可使用共用虛擬位址記憶體空間。

圖22為根據一個實例實施例，使用共用虛擬位址記憶體空間之多處理器電腦系統2200的方塊圖。該系統包括可接入共用記憶體子系統2204之複數個處理器2202a-f。該系統在記憶體子系統2204中併入複數個可程式化硬體記憶體算法處理器(MAP) 2206a-f。各MAP 2206a-f可包含記憶體2208a-f及一或多個現場可程式化閘陣列(FPGA) 2210a-f。MAP提供可組態功能單元，且具體算法或部分算法可提供給FPGAs 2210a-f以便與相應處理器緊密配合處理。舉例而言，在實例實施例中，MAP可用於評估關於資料模型之代數表達式及進行自適應資料重構。在此實例中，每一MAP可由全部處理器全域接入用於此等目的。在一個組態中，每一MAP可使用直接記憶體存取(DMA)以接入關聯記憶體2208a-f，使其獨立於及與相應微處理器2202a-f異步地執行任務。在此組態中，MAP可將結果直接饋入另一MAP用於管線操作及算法之並行執行。

以上電腦架構及系統僅為實例，且廣泛多種其他電腦、行動電話及個人資料助理架構及系統可與例示性實施例結合使用，包括使用一般處理器、共處理器、FPGA及其他可程式化邏輯裝置、系統單晶片(SOC)、特殊應用積體電路(ASIC)及其他處理及邏輯元件之任何組合的系統。在一些實施例中，全部或部分電腦系統可建構於軟體或硬體中。任何多種資料

儲存媒體可與例示性實施例結合使用，包括隨機存取記憶體、硬碟機、快閃記憶體、磁帶驅動器、磁碟陣列、網路附接儲存(NAS)及其他本端或分佈式資料儲存裝置及系統。

在實例實施例中，電腦系統可使用在以上或其他電腦架構及系統中之任一者上執行的軟體模組建構。在其他實施例中，系統之功能可部分或完全建構於韌體、可程式化邏輯裝置(諸如圖22中所提及之現場可程式化閘陣列(FPGA))、系統單晶片(SOC)、特殊應用積體電路(ASIC)或其他處理及邏輯元件。舉例而言，集合處理器及優化器可經由使用硬體加速器卡，諸如圖20所示之加速器卡122，在硬體加速下建構。

實例1：矽晶圓形成微孔之前端處理

使用圖23所示之前端處理方法蝕刻矽晶圓以形成包含複數個微孔之例示性基板。以在基板兩個表面上具有氧化物層之SOI基板起始，在基板操作側之較佳位置上使用光刻方法塗佈光阻層。在光阻塗佈後，在操作側進行DRIE直至達到晶圓中間之氧化物層。接著，剝除掉光阻塗層，暴露下方的氧化物層。類似地，在適合之直徑下，在基板裝置側之較佳位置使用光刻方法塗佈第二層光阻。在第二層光阻塗佈後，再次於矽晶圓裝置側進行DRIE，直至達到矽晶圓中間之氧化物層。接著，剝除掉晶圓中間之光阻及氧化物層。最後，將氧化物塗佈於晶圓之全部表面上，形成具有複數個微結構之矽晶圓，每一微結構包含較大微孔及流體連接至該微孔之一或多個微通道。

實例2：矽晶圓之後端處理以使微孔之所選表面官能化

使用圖24所示之後端處理方法進一步處理具有經蝕刻微孔之矽晶圓以使微孔之所選部分官能化。為使用增加表面能之主動官能化劑塗佈微孔

內之僅較小微孔之表面，使用實例1之產物作為起始物質。使用如本文所述之噴墨印刷機將光阻液滴沈積於微通道中。將光阻液滴展佈於流體連接至微孔之微通道中。在光阻沈積後，進行氧電漿蝕刻以回蝕過量光阻，保留更平滑的光阻表面，如圖24所示。化學惰性部分層塗佈於矽晶圓之全部暴露表面上以形成具有低表面能之被動官能化層。然後，剝除掉光阻，暴露與微孔流體連通之較小微通道的表面。在移除光阻後，將主動官能化劑層塗佈於較小微通道之表面，以增加微孔表面之表面能及/或為寡核苷酸生長提供表面化學反應。先前官能化之表面仍實質上不受表面官能化之第二次施用影響。因此，在固體基板上製造各與具有第二表面官能化之一或多個微通道流體連通的具有第一表面官能化之複數個微孔。

實例3：微流體裝置

如圖25D所示，根據本發明之方法及組合物製造包含實質上平坦的基板部分的微流體裝置。基板之截面展示於圖25E中。基板包含108個叢集，其中每一叢集包含109個流體連接分組。每一分組包含5個延伸自第一通道之第二通道。圖25A為包含109個分組之每一叢集的裝置視圖。圖25C為圖25A之叢集的操作視圖。圖25B為圖25A之截面視圖，展示一列11個分組。圖25F為圖25D所示之基板的另一視圖，其中標記之位置為可視的。圖25G為圖25A之擴展視圖，指示叢集之109個分組。

如圖25A及25C所示，109個分組排列在偏移列中以形成環狀圖案叢集，其中個別區域彼此不重疊。個別分組形成環。如由2503表示，三列此等分組之間的距離為0.254 mm。如由2506所示，一列分組中之兩個分組之間的距離為0.0978 mm。分組中第一通道之截面，如由2504所示，為0.075 mm。分組中各第二通道之截面，如由2505所示，為0.020 mm。分

組中第一通道之長度，如由2502所示，為0.400 mm。分組中各第二通道之長度，如由2501所示，為0.030 mm。

圖25A及25C中所示之109個分組之叢集以適合於置放在單個反應孔中之構形排列，該反應孔可鄰近於圖25A及25C中之叢集置放。圖25 D中之其餘叢集以一定方式類似地排列，該方式有助於傳遞至許多反應孔中，諸如圖26及實例4中所述之奈米反應器板。基板包含108個反應孔，提供11,772個分組。

基板沿著一個維度之寬度如由2508所指示，為32.000 mm。基板沿著另一維度之寬度如由2519所指示，為32.000 mm。

如圖25D中所示之實質上平坦的基板部分包含108個叢集之分組。叢集成列排列形成正方形。在一個維度中叢集中心距原點之最遠距離如由2518所指示，為24.467 mm。在另一維度中叢集中心距原點之最遠距離如由2509所指示，為23.620 mm。在一個維度中叢集中心距原點之最近距離如由2517所示，為7.533。在另一維度中叢集中心距原點之最近距離如由2512所示，為8.380。同一列中兩個叢集中心之間的距離如由2507及2522所示為1.69334 mm。

基板包含3個基準標誌以有助於微流體裝置與系統之其他組件對準。第一基準標誌位於原點附近，其中該基準標誌比任何一個叢集更接近原點。第一基準標誌位於在一個維度中距原點5.840 mm (2516)及在另一維度中距原點6.687 mm (2513)。第一基準標誌位於在一個維度中距叢集1.69334 mm (2515)及在另一維度中距同一叢集1.69344 mm (2514)。兩個其他基準標誌各位於距基板邊緣0.500 mm (2510及2520)及距原點16.000 mm (2511及2521)。

基板之截面展示於圖25E中，其中如由2523所指示之分組的總長度為0.430 mm。

基板之另一視圖展示於圖25F中，展示108個叢集之排列及標記之位置。標記位於距基板邊緣1.5 mm (2603)。如自原點所量測，標記位於4.0 mm (2602)至9.0 mm (2601)之距離處。

實例4：奈米反應器.

如圖26B及26C中所示，根據本發明之方法及組合物製造奈米反應器。奈米反應器之截面展示於圖26A中。奈米反應器包含108個孔。圖26D為奈米反應器之操作視圖。圖26E為圖26B所示之奈米反應器的另一視圖，其中標記之位置為可視的。

如圖26B中所示，108個孔成列排列形成正方形圖案，其中個別孔在奈米反應器基底上突起。如由2711所示，一列孔中之兩個孔中心之間的距離為1.69334 mm。孔內部之截面如由2721所示，為1.15 mm。包括孔輪緣之孔截面如由2720所示，為1.450 mm。奈米反應器中孔之高度如由2702所示，為0.450 mm。奈米反應器之總高度如由2701所示，為0.725 mm。

圖26B中之孔以一定方式排列，該方式有助於自如圖26所例示之具有108個孔的微流體裝置傳遞至奈米反應器之108個反應孔中。

奈米反應器沿著一個維度之寬度如由2703所指示，為24.000 mm。奈米反應器沿著另一維度之寬度如由2704所指示，為24.000 mm。

如圖26B中所示之奈米反應器包含108個孔。孔成列排列形成正方形。在一個維度中孔中心距原點之最遠距離如由2706所指示，為20.467 mm。在另一維度中孔中心距原點之最遠距離如由2705所指示，為19.620

mm。在一個維度中孔中心距原點之最近距離如由2710所示，為3.533 mm。在另一維度中孔中心距原點之最近距離如由2709所示，為4.380 mm。同一列中兩個孔中心之間的距離如由2711及2712所示為1.69334 mm。在一個維度中孔中心距奈米反應器邊緣之距離如由2707所示，為3.387 mm。在另一維度中孔中心距奈米反應器邊緣之距離如由2708所示，為2.540 mm。

奈米反應器在裝置面包含3個基準標誌以有助於奈米反應器與系統之其他組件(例如，如實例3中所述之微流體裝置)對準。第一基準標誌位於原點附近，其中該基準標誌比任何一個孔更接近原點。第一基準標誌位於在一個維度中距原點1.840 mm (2717)及在另一維度中距原點2.687 mm (2716)。第一基準標誌位於在一個維度中距孔1.6933 mm (2719)及在另一維度中距同一孔1.6934 mm (2718)。兩個其他基準標誌各位於距奈米反應器之邊緣0.500 mm (2714及2715)及距原點12.000 mm (2713)。

奈米反應器在操作面包含4個基準標誌，如圖26D中所示。在一個維度中距奈米反應器之中心或基準標誌及最近角之距離為1.000 mm (2722及2723)。在一個維度中基準標誌之長度為1.000 mm (2724及2725)。基準標誌之寬度如由2726所示，為0.050 mm。

奈米反應器之另一視圖展示於圖26E中，展示108個孔之排列及標記之位置。標記位於距奈米反應器之邊緣1.5 mm (2728)。標記位於距奈米反應器之角1.0 mm (2727)。標記為9.0 mm (2726)長。

實例5：寡核苷酸合成裝置之製造

使用如圖28所示之前端處理方法蝕刻具有約30 μm厚的裝置層及約400 μm厚的操作層包夾二氧化矽電絕緣體層之絕緣體上矽(SOI)晶圓，以

形成實例3中所述之包含複數個具有三維微流體連接之特徵的例示性基板。圖27詳細圖示該裝置之設計特徵。SOI晶圓經氧化以使其在兩個表面經熱氧化物覆蓋(圖28A)。將光刻應用於裝置側以形成如圖28B所示之光阻遮罩(紅色)。深反應性離子蝕刻(DRIE)步驟用於蝕刻垂直側壁至約30 um之深度，直至位置處之SOI氧化物層(圖28C)不含光阻。使用此項技術中已知的標準抗蝕劑剝除方法剝除光阻。

在操作側重複光刻、DRIE及光阻剝除(圖28E-G)以產生根據實例3中所述之裝置的所需圖案。使用濕式蝕刻方法移除內埋氧化物(BOX)(圖28G)。藉由熱氧化移除可能已沈積於微流體特徵之側壁上的污染性氟聚合物。使用濕式蝕刻方法剝除熱氧化物。

對經蝕刻之SOI晶圓進行如圖29所述之加工步驟。

首先，藉由使用強清潔性溶液之濕洗步驟，繼之以乾燥O_2電漿暴露來清潔晶圓。晶片之裝置層(在圖29B之頂部上)在藉由毛細作用進入約20 μm寬之裝置層通道所支配之製程中用光阻塗佈。使用光刻將光阻圖案化以曝露希望為被動的區域(無未來的寡核苷酸合成)。此製程藉由使抗蝕劑經由具有所關注之圖案之二元遮罩曝露於光來起作用。在曝露後，在顯影劑溶液中移除曝露區之抗蝕劑。(圖29C)。

無光阻之表面藉由化學氣相沈積(CVD)暴露於氟矽烷氣體。此導致碳氟化合物沈積在無光阻之表面上。在替代性應用中，烴矽烷用於此步驟。矽烷化表面對在表面上形成單層之額外矽烷層無反應。光阻接著溶解於有機溶劑中，在表面上保留氟化及暴露光阻下方的矽/二氧化矽。進行主動官能化之最終步驟以製備用於寡核苷酸生長之表面(圖29F)。

藉由使用N-(3-三乙氧基矽烷基丙基-4-羥基丁醯胺於乙醇及乙酸中之

1%溶液的濕式製程4小時，隨後將晶片置放於150℃下之熱板上14小時而在表面上實現羥基之控制表面密度(圖30)。在替代性應用中，藉由將矽烷以氣態傳遞至表面且施加約200 mTor之控制沈積壓力及約150℃之控制溫度來進行CVD製程。CVD製程允許就地電漿清潔且較適合產生高度有序之自組裝單層(SAM)。

圖31展示根據以上方法製造之裝置的影像。

實例6.奈米反應器裝置之製造

製造如圖32所述之具有奈米孔的奈米反應器晶片。適合尺寸之矽晶圓經氧化以使其在兩個表面上經熱氧化物覆蓋(圖33A)。

將光刻應用於背側以形成如圖33B所示之光阻遮罩(紅色)。在熱氧化物層以外不含光阻的位置蝕刻背側，形成淺孔(圖33C)。使用此項技術中已知的標準抗蝕劑剝除方法剝除光阻(圖33D)。

根據圖33E之圖案在前側重複光刻步驟。深反應性離子蝕刻(DRIE)步驟使用定時蝕刻用於蝕刻垂直側壁至約450 μm之深度。在其他情況下，使用SOI晶圓且操作層向下蝕刻至BOX，其中該BOX可充當蝕刻終止物。(圖33F)。剝除前側上之光阻(圖33G)，根據圖32中所述之裝置產生所需圖案。藉由熱氧化移除可能已沈積於微流體特徵側壁上之污染性氟聚合物，且使用濕式蝕刻方法剝除熱氧化(圖33H)。

接著，藉由使用強清潔性溶液之濕洗步驟，繼之以乾燥O_2電漿暴露來清潔晶圓(圖34A)。隨後使用微滴沈積系統將抗蝕劑沈積於個別孔中(頂部，圖34B)。無抗蝕劑之表面藉由化學氣相沈積(CVD；圖34C)暴露於氟矽烷氣體。此導致碳氟化合物沈積在無抗蝕劑之表面上。在替代性應用中，烴矽烷或其他類型之矽烷用於此步驟。矽烷化表面對在表面上形成單

層之額外矽烷層無反應。抗蝕劑接著溶解於有機溶劑中，在表面上保留氟化及暴露抗蝕劑下方的矽表面。

圖35 A-B圖示如所述製造之奈米反應器裝置的奈米孔。

實例7-在2D寡核苷酸合成裝置上合成50聚體序列

將二維寡核苷酸合成裝置組裝成流槽，其連接至流槽(Applied Biosystems(ABI394 DNA合成器")。二維寡核苷酸合成裝置經N-(3-三乙氧基矽烷基丙基)-4-羥基丁醯胺(Gelest, shop.gelest.com/Product.aspx?catnum=SIT8189.5&Index=0&TotalCount=1)均一官能化，用於使用本文所述之寡核苷酸合成方法合成50 bp之例示性寡核苷酸(「50聚體寡核苷酸」)。

50聚體之序列如SEQ ID NO.: 1中所述。

5'AGACAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGA CTTCGGCAT##TTTTTTTTTT3' (SEQ ID NO.: 1)，其中#表示胸苷-琥珀醯己醯胺CED胺基磷酸酯(來自ChemGenes之CLP-2244)，其為能夠在脫除保護基期間自表面釋放寡核苷酸之可裂解連接基團。

根據表3中之方案，使用標準DNA合成化學方法(偶合、封端、氧化及去阻斷)及ABI合成器進行合成。

表3：

表3

通用DNA合成製程名稱	**製程步驟**	時間(秒)
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	23
	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4
DNA鹼基添加(胺基磷酸酯+活化劑流)	活化劑歧管沖洗	2
	活化劑至流槽	6
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	6

	活化劑至流槽	0.5
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	5
	活化劑至流槽	0.5
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	5
	活化劑至流槽	0.5
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	5
	培育25秒	25
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15
	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4
DNA鹼基添加(胺基磷酸酯+活化劑流)	活化劑歧管沖洗	2
	活化劑至流槽	5
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	18
	培育25秒	25
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15
	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4
封端(CapA+B，1:1，流)	CapA+B至流槽	15
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15
	乙腈系統沖洗	4
氧化(氧化劑流)	氧化劑至流槽	18
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4
	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15
	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15
	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	23
	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4
去阻斷(去阻斷劑流)	去阻斷劑至流槽	36
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4
	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	18

	N2系統沖洗	4.13
	乙腈系統沖洗	4.13
	乙腈至流槽	15

胺基磷酸酯/活化劑組合類似於主體試劑之傳遞而經由流槽傳遞。由於環境用試劑保持「濕潤」整個時間，故不進行乾燥步驟。

流動限制器自ABI 394合成器移除以使得流動能夠更快。在無流動限制器的情況下，醯胺酯(0.1M於ACN中)、活化劑(含0.25M苯甲醯基硫基四唑(「BTT」，來自GlenResearch之30-3070-xx)之ACN)及Ox (含0.02M I2之20%吡啶、10%水及70% THF)之流動速率大致為~100微升/秒，乙腈(「ACN」)及封端試劑(CapA及CapB之1:1混合，其中CapA為含乙酸酐之THF/吡啶及CapB為含16% 1-甲基咪唑之THF)之流動速率大致為~200微升/秒，及去阻斷劑(含3%二氯乙酸之甲苯)之流動速率大致為~300微升/秒(相比於在流動限制器存在下全部試劑~50微升/秒)。

觀測完全排出氧化劑之時間，相應地調節化學流動時間之時序且在不同化學試劑之間引入額外ACN洗滌。

在寡核苷酸合成後，在氣態氨中在75 psi下脫除晶片之保護基隔夜。將5滴水施用於表面以回收寡核苷酸(圖45A)。接著在BioAnalyzer小RNA晶片上分析回收之寡核苷酸(圖45B)。

實例8：在ABI 2D寡核苷酸合成裝置上合成100聚體序列

如實例7中所述用於合成50聚體序列之相同方法用於在兩種不同矽晶片上合成100聚體寡核苷酸(「100聚體寡核苷酸」；5' CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTGCTGT CCACCAGTCATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAAC CCCGCAT##TTTTTTTTTTT3'，其中#表示胸苷-琥珀醯己醯胺CED胺基磷酸酯(來自ChemGenes之CLP-2244)；SEQ ID NO.: 2)，第一矽晶片經N-

(3-三乙氧基矽烷基丙基)-4-羥基丁醯胺均一官能化且第二矽晶片經5/95混合之11-乙醯氧基十一烷基三乙氧基矽烷及正癸基三乙氧基矽烷官能化，且在BioAnalyzer儀器上分析自表面提取之寡核苷酸(圖46)。

兩個晶片之全部十種樣品使用正向引子(5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'；SEQ ID NO.: 3)及反向引子(5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'；SEQ ID NO.: 4)在50 μL PCR混合物(25 μL NEB Q5 mastermix、2.5 μL 10 μM正向引子、2.5 μL 10 μM反向引子、1 μL自表面提取之寡核苷酸及補足至50 μL之水)中，使用以下熱循環程式進一步PCR擴增：

98℃, 30秒

98℃, 10秒；63℃, 10秒；72℃, 10秒；重複12個循環

72℃, 2分鐘

PCR產物亦在BioAnalyzer上操作(圖47)，在100聚體位置處顯示尖峰。

接下來，選殖PCR擴增樣品且進行桑格定序。表4概述取自於晶片1之樣點1-5之樣品及取自於晶片2之樣點6-10之樣品的桑格定序結果。

表4：

樣點	錯誤率	循環效率
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%

因此，在具有不同表面化學反應之兩種晶片上重複合成寡核苷酸之

高品質及均一性。總體而言，89%(對應於262個定序100聚體之233個)為無錯誤之完美序列。

圖48及49分別展示取自於樣點8及7之樣品的比對圖譜，其中「×」表示單鹼基缺失，「星號」表示單鹼基突變，且「+」表示桑格定序中之低品質樣點。圖48中之比對序列共同表示約97%之錯誤率，其中29次讀取中之28次對應於完美序列。圖49中之比對序列共同表示約81%之錯誤率，其中27次讀取中之22次對應於完美序列。

最後，表5彙總由樣點1-10之寡核苷酸樣品獲得之序列的關鍵錯誤特徵。

表5：

樣品ID/樣點編號	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
總序列	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
定序品質	28中之25	27中之27	30中之26	23中之21	26中之25	30中之29	31中之27	31中之29	29中之28	28中之25
寡核苷酸品質	25中之23	27中之25	26中之22	21中之18	25中之24	29中之25	27中之22	29中之28	28中之26	25中之20
ROI匹配數	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
ROI突變	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
ROI多鹼基缺失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI小插入	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI單鹼基缺失	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大缺失計數	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
突變：G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
突變：T>C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ROI錯誤計數	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1
ROI錯誤率	錯誤率：~1/834	錯誤率：~1/1350	錯誤率：~1/1282	錯誤率：~1/708	錯誤率：~1/2500	錯誤率：~1/2667	錯誤率：~1/876	錯誤率：~1/2900	錯誤率：~1/1400	錯誤率：~1/2349
ROI減引子錯誤率	MP錯誤率：~1/763	MP錯誤率：~1/824	MP錯誤率：~1/780	MP錯誤率：~1/429	MP錯誤率：~1/1525	MP錯誤率：~1/1615	MP錯誤率：~1/531	MP錯誤率：~1/1769	MP錯誤率：~1/854	MP錯誤率：~1/1451

實例9：在3D寡核苷酸合成裝置上合成100聚體序列

將如實例3中所述在用於合成之活性區域經5/95混合之11-乙醯氧基十一烷基三乙氧基矽烷及正癸基三乙氧基矽烷差異性官能化之三維寡核苷酸合成裝置組裝成流槽，以便使用本文所述之寡核苷酸合成方法合成實例8之100聚體寡核苷酸。根據表3中之方案，使用如實例7中所述之標準DNA合成化學方法(偶合、封端、氧化及去阻斷)進行合成。在氣態氨中在75 psi下脫除晶片之保護基隔夜且將寡核苷酸溶離於500 μL水中。在蒸發後，將全部寡核苷酸再懸浮於20 μL水中用於下游分析。在BioAnalzyer儀

器上分析再懸浮樣品(圖50A)。

再懸浮樣品亦使用正向引子(5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'；SEQ ID NO.: 5)及反向引子(5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'；SEQ ID NO.: 6)在包括25 μL NEB Q5 mastermix、2.5 μL 10 μM正向引子、2.5 μL 10 μM反向引子、1 μL自表面提取之寡核苷酸及補足至50 μL之水的50 μL PCR混合物中，根據以下熱循環程式進行PCR擴增：

1個循環：98℃, 30秒

12個循環：98℃, 10秒；63℃, 10秒；72℃, 10秒

1個循環：72℃, 2分鐘

PCR產物亦在BioAnalyzer上操作(圖50B)，在100聚體位置處展示尖峰。

PCR產物之定序結果展示29個序列中之23個為完美的且錯誤率為約1/600bp，如圖51之比對圖譜所示，其中「×」表示單鹼基缺失，「星號」表示單鹼基突變且「+」表示桑格定序中之低品質樣點。

實例10：在三維微流體寡核苷酸合成裝置上之並行寡核苷酸合成

實例7之合成方案使用室內裝備修改以便在實例9之三維微流體裝置上進行並行寡核苷酸合成。

表6說明兩個方案之並排比較。

表6：

	實例7方案		**扭轉內部合成器方案**	
通用DNA合成製程名稱	**實例7製程步驟**	時間(秒)	**扭轉製程步驟**	時間(秒)
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4	NA	
	乙腈至流槽	23		
	N2系統沖洗	4		
	乙腈系統沖洗	4		
DNA鹼基添加(胺基磷酸酯+活化劑流)	活化劑歧管沖洗	2	印刷頭在晶片活性位點上直接印刷1:1之活	120
	活化劑至流槽	6		

	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	6	化劑+胺基磷酸酯	
	活化劑至流槽	0.5		
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	5		
	活化劑至流槽	0.5		
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	5		
	活化劑至流槽	0.5		
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	5		
	培育25秒	25		
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4		
	乙腈至流槽	15		
	N2系統沖洗	4		
	乙腈系統沖洗	4		
DNA鹼基添加(胺基磷酸酯+活化劑流)	活化劑歧管沖洗	2		
	活化劑至流槽	5		
	活化劑 + 胺基磷酸酯至流槽	18		
	培育25秒	25		
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15	乙腈至流槽	15
	N2系統沖洗	4	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
封端(CapA+B，1:1，流)	CapA+B至流槽	15	CapA+B至流槽	15
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15	乙腈至流槽	15
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
氧化(氧化劑流)	氧化劑至流槽	18	氧化劑至流槽	18
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	N2系統沖洗	4	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15	乙腈至流槽	15
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15	乙腈至流槽	15
	N2系統沖洗	4	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	23	乙腈至流槽	23
	N2系統沖洗	4	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
去阻斷(去阻斷劑流)	去阻斷劑至流槽	36	去阻斷劑至流槽	36
洗滌(乙腈洗滌流)	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4

	N2系統沖洗	4	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	18	乙腈至流槽	18
	N2系統沖洗	4	N2系統沖洗	4
	乙腈系統沖洗	4	乙腈系統沖洗	4
	乙腈至流槽	15	乙腈至流槽	15
流槽乾燥 (對扭轉合成器而言特定的)	NA		N2系統沖洗	4
			N2至流槽	19.5
			N2系統沖洗	4
			在流槽上抽真空乾燥	10
			N2系統沖洗	4
			N2至流槽	19.5

乙腈(ACN)通過在線脫氣器(型號403-0202 -1；Random Technologies)，該在線脫氣器使液體沿著極疏水性膜一側通過，其先前展示在範圍介於50-400微升/秒之流動速率下起作用且在不受理論束縛的情況下，可能藉由將在流量槽上形成之氣泡溶解於未飽和溶劑中來消除氣泡。

試劑在流槽中用不同試劑更換如下：

1) 起始試劑流動至流槽。

2) 藉由將閥設置成用新試劑將先前試劑「推」出傳遞管線來充裝。此閥狀態保持3.75秒。

3) 2D閥狀態：將閥設置成用新試劑置換駐留於流槽表面上之先前試劑。此發生在步驟2已活動3.75秒時。步驟2及3同時活動0.25秒，之後關閉充裝閥狀態。

4) 3D閥狀態：該等閥切換以允許試劑流經流槽中之三維微流體矽特徵，其在步驟3中之2D閥狀態已流動0.75秒後開始。

5) 試劑之流動：2D閥狀態及3D閥狀態保持打開一段指定時間以允許足夠劑量之試劑到達晶片之矽表面。

因此，在試劑交換之5秒循環期間，藉由在跨越0-4秒之初始時段期

間充裝、藉由在跨越3.75-5秒之時段期間打開2D閥狀態及藉由在跨越4.5-5秒之時段期間打開3D閥狀態而進行流體傳遞。

使用噴墨印刷步驟傳遞胺基磷酸酯/活化劑組合。傳遞可為1:1滴上滴沈積於矽表面上。液滴尺寸可為約10 pL。在一些實施例中，液滴尺寸為至少或至少約0.1、1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500皮升或500皮升以上。在一些實施例中，液滴尺寸為至多或至多約500、400、300、250、200、150、100、75、50、25、20、15、10、5、4、3、2、1、0.1皮升或0.1皮升以下。液滴尺寸可為0.1-50、1-150或5-75皮升。液滴尺寸可處於由任何此等值限定的範圍內，例如2-50皮升。

在主體試劑排序後，乾燥步驟製備用於印刷步驟之矽表面。為實現有助於印刷試劑反應之乾燥條件，流槽用約5 PSI之N_2氣體沖洗約19.5秒，在流槽腔室抽小型真空10秒，且再用N2氣體再沖洗流槽19.5秒。全部試劑在約200-400微升/秒下流動。

可在內部系統中使用不同壓力控制流動速率。流動速率為市售合成器之限制性態樣中之一者。在內部機器裝備中，流動速率可匹配至其在實例7中之值或按需要增加或降低之流動速率以改良合成製程。一般而言，當與較慢流動速率相比時，流動較快呈現優勢，因為其允許使氣泡更有效地移位且允許在給定時間間隔期間更換更多新鮮試劑至表面。

實例10：基於墨點法之寡核苷酸自寡核苷酸合成裝置至奈米反應器裝置之轉移

如實例9中所述在3-D寡核苷酸合成裝置上合成50聚體寡核苷酸。未施用主動官能化。圖53 A-B圖示寡核苷酸合成裝置之裝置側上之叢集中的

寡核苷酸合成通道分佈，且圖53C圖示表面官能化。藉由在75 psi下之氣態氨腔室中處理14小時而使寡核苷酸自表面釋放。

根據實例4製造之具有親水性內壁及疏水性上唇板之奈米反應器裝置之孔(圖54)首先用PCA適合之緩衝液填充作為陰性對照(5×Q5緩衝液；New England Biolabs)。用移液管手工移取200-300 nL等分試樣饋入BioAnalyzer中以展示個別奈米反應器中不存在任何污染性核酸(圖55)。

奈米反應器接著用約650 nL PCA緩衝液填充，形成略微凸出之彎液面(圖53)。奈米反應器裝置與寡核苷酸裝置配合以用PCA緩衝液在約5毫米/秒之速率下淹沒寡核苷酸合成通道(「旋轉器」)。在其他情況下，使兩個裝置配合之罩蓋速度可如本文所述加以改變以尤其實現裝置之間大體上高效的液體轉移，導致所需體積液體之受控等分或控制蒸發。寡核苷酸裝置與奈米反應器在兩個裝置之間約50 μm之間隙保持配合約10分鐘，允許寡核苷酸擴散至溶液中(圖57)。在一些情況下，總成或寡核苷酸合成裝置可單獨振動或震盪以促進較快擴散。長於10分鐘，諸如至少或至少約11、12、13、14、15、20、25分鐘或25分鐘以上之擴散時間亦可用於促成較高產率。奈米反應器裝置以約5毫米/秒之速率自寡核苷酸裝置剝離，捕獲個別奈米反應器中所釋放之寡核苷酸。在其他情況下，使兩個裝置配合之拆開速度可如本文所述加以改變以尤其實現裝置之間大體上高效的液體轉移，導致所需體積液體之受控等分。觀察到微小量之液體遺留於寡核苷酸裝置。

約300 nL樣品用移液管移取自奈米反應器裝置中之若干個別奈米反應器且稀釋成1 μL之體積，建立4.3×稀釋。經稀釋之樣品在BioAnalyzer中單獨操作，確定寡核苷酸釋放於奈米反應器中(圖55)。

使用手動注射器獲取額外樣品作為陽性對照。Tygon管道用於與寡核苷酸合成裝置一起形成面密封件。用500 μL水填充之注射器用於使液體向下沖洗穿過一整個叢集以及操作側之部分相鄰叢集。沖洗液體收集在裝置側之1.5 ml Eppendorf管中。樣品真空乾燥且隨後再懸浮於10 μL水中。樣品接著在BioAnalyzer中類似地分析。當解釋稀釋率時，使用陽性對照方法及奈米反應器墨點法釋放可比濃度之寡核苷酸。

實例11：基於注射自寡核苷酸合成裝置轉移寡核苷酸至奈米反應器

在如實例9中所述之3-D寡核苷酸合成裝置上合成50聚體寡核苷酸。寡核苷酸藉由在約75 psi之氨氣室中處理約14小時而自表面釋放。或者，可使用20-120 psi之壓力1-48小時或更長時間以便釋放寡核苷酸。溫度為室溫。在一些情況下，可藉由升高溫度至例如至少或至少約25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或65℃以上來提高脫除保護基速率。氣態甲胺亦可用於在室溫下或在至少或至少約25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或65℃以上之高溫下脫除保護基。在甲胺中脫除保護基通常比在氣態氨中進行得更快。

將寡核苷酸合成裝置組裝成具有單個入口及單個出口之赫爾-肖型流槽。使用經由tygon管道連接至流槽且手動控制之注射器產生流動(圖57)。圖56圖示流槽中流體學之示意圖。流體迴路用於使流體自操作側流動至第一通道(或通孔)中且流體另外引入第二通道，例如形成包含寡核苷酸合成位點之旋轉器圖案的彼等通道。流體由單個點入口傳遞且由單個點出口收集(圖56B。在其他情況下，線來源口及線槽可用於使流體通過(圖56A)。在不受理論束縛的情況下，點來源口/槽組合預期形成均勻氣鋒，可較有效使全部液體自赫爾-肖型流槽排出。在自流槽清除液體後，僅在

操作側之通孔及例如裝置側之旋轉器圖案中之第二通道或寡核苷酸合成通道中含有液體。此體積估計為每一叢集之通孔或第一通道300 nL。此類流體包容可有助於在寡核苷酸合成裝置之裝置層表面上形成均一座滴。

對於此步驟，選擇適合之釋放緩衝液，諸如PCA可相容緩衝液，以將釋放之寡核苷酸溶解於溶液中。在填充通孔及第二通道後，使用約500-1000Pa將液體自寡核苷酸合成晶片之操作表面的赫爾-肖型流槽沖洗出，使液體僅保留在裝置之停滯區(操作及旋轉器)中，其估計為每一組裝叢集300 nL(圖56C)。阻斷單點出口且使加壓空氣在約3000-5000 Pa下在操作層表面上吹過，以將液滴噴射於裝置層表面上(圖56D)。推動足夠釋放緩衝液穿過流槽以在寡核苷酸合成裝置之裝置側表面上形成自第二通道(或寡核苷酸合成通道)出現之座滴。座滴尺寸可為約300-400 nL，但可根據寡核苷酸合成叢集及/或奈米反應器之具體維度以及根據寡核苷酸之所需濃度而變為適合尺寸。舉例而言，可形成約500 nL之座滴尺寸。座滴形成視情況用顯微鏡監控以確保在寡核苷酸合成裝置上液滴形成完整。在一些情況下，形成座滴之液體可由組分混合物來製備，以便於裝置層上實現所需接觸角。因此，溶液可補充有諸如清潔劑之組分，例如聚山梨醇酯20(聚氧乙烯(20)脫水山梨糖醇單月桂酸酯，亦稱Tween-20)。

或者，將適量釋放緩衝液沈積於操作側之個別孔/第一通道中且例如藉由施加來自操作側之壓力，藉由於操作側上形成赫爾-肖型流槽而推動穿過寡核苷酸合成通道。奈米反應器裝置在適合之速率(例如約1-10 mm/s)及距離(例如約50 μm)下抵靠著寡核苷酸合成裝置之裝置側經單蓋。可在液滴形成後快速進行單蓋以避免蒸發。在兩個裝置(奈米反應器及寡核苷酸合成反應器)經單蓋後，蒸發亦最小。

實例12：在奈米反應器中由自寡核苷酸合成裝置側轉移之反應混合物使用PCA之基因組裝

如表7中所述，使用表8之SEQ ID NO.: 7-66製備PCA反應混合物以組裝3075 bp LacZ基因(SEQ ID NO.: 67；表8)。

表7：

PCA	1 (×100 μl)	最終濃度
H2O	62.00	
5×Q5緩衝液	20.00	1×
10 mM dNTP	1.00	100 μM
BSA 20 mg/ml	5.00	1mg/ml
寡核苷酸混合物各50 nM	10.00	5nM
Q5聚合酶2U/ μl	2.00	2u/50 μl

表8：

序列名稱	序列
Oligo_1, SEQ ID NO.: 7	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGG3'
Oligo_2, SEQ ID NO.: 8	5'GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'
Oligo_3, SEQ ID NO.: 9	5'CCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC3'
Oligo_4, SEQ ID NO.: 10	5'CGGCACCGCTTCTGGTGCCGGAAACCAGGCAAAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3'
Oligo_5, SEQ ID NO.: 11	5'CACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCCTC3'
Oligo_6, SEQ ID NO.: 12	5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGG3'
Oligo_7, SEQ ID NO.: 13	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTG3'
Oligo_8, SEQ ID NO.: 14	5'GTCTGGCCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAACATTAAATGTGAGCGAGTAACAACCCGTCGGATTCTCCGTG3'
Oligo_9, SEQ ID NO.: 15	5'GCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG3'
Oligo_10, SEQ ID NO.: 16	5'CAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACTGTCCTGGCCGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACG3'

Oligo_11, SEQ ID NO.: 17	5'CGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATT TTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGAT GGTGCTG3'
Oligo_12, SEQ ID NO.: 18	5'GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAG ATAACTGCCGTCACTCCAGCGCAGCACCATCAC CGCGAG3'
Oligo_13, SEQ ID NO.: 19	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGT GACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAA ATCAGCGATTTC3'
Oligo_14, SEQ ID NO.: 20	5'CTCCAGTACAGCGCGGCTGAAATCATCATTAA AGCGAGTGGCAACATGGAAATCGCTGATTTGTG TAGTCGGTTTATG3'
Oligo_15, SEQ ID NO.: 21	5'ATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTT CAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGG GTAACAGTTT3'
Oligo_16, SEQ ID NO.: 22	5'AAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTTT CACCCTGCCATAAAGAAACTGTTACCCGTAGGT AGTCACG3'
Oligo_17, SEQ ID NO.: 23	5'GCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATC GATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACA CTACG3'
Oligo_18, SEQ ID NO.: 24	5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCCACAGT TTCGGGTTTTCGACGTTCAGACGTAGTGTGACG CGATCGGCA3'
Oligo_19, SEQ ID NO.: 25	5'GAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGG TGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTG ATTGAAGCAG3'
Oligo_20, SEQ ID NO.: 26	5'CAGCAGCAGACCATTTTCAATCCGCACCTCGC GGAAACCGACATCGCAGGCTTCTGCTTCAATCA GCGTGCCG3'
Oligo_21, SEQ ID NO.: 27	5'CGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGG CAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCA CGAGCATCA3'
Oligo_22, SEQ ID NO.: 28	5'GCAGGATATCCTGCACCATCGTCTGCTCATCCA TGACCTGACCATGCAGAGGATGATGCTCGTGAC GGTTAACGC3'
Oligo_23, SEQ ID NO.: 29	5'CAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAA GCAGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCA TTATCCGAAC3'
Oligo_24, SEQ ID NO.: 30	5'TCCACCACATACAGGCCGTAGCGGTCGCACAG CGTGTACCACAGCGGATGGTTCGGATAATGCGA ACAGCGCAC3'
Oligo_25, SEQ ID NO.: 31	5'GCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAAT ATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGT CTGACCGATG3'
Oligo_26, SEQ ID NO.: 32	5'GCACCATTCGCGTTACGCGTTCGCTCATCGCC GGTAGCCAGCGCGGATCATCGGTCAGACGATTC ATTGGCAC3'
Oligo_27, SEQ ID NO.: 33	5'CGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAA TCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAA TGAATCAG3'

Oligo_28, SEQ ID NO.: 34	5'GGATCGACAGATTTGATCCAGCGATACAGCGC GTCGTGATTAGCGCCGTGGCCTGATTCATTCCCC AGCGACCAGATG3'
Oligo_29, SEQ ID NO.: 35	5'GTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCG CCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACA CCACGGC3'
Oligo_30, SEQ ID NO.: 36	5'CGGGAAGGGCTGGTCTTCATCCACGCGCGCGT ACATCGGGCAAATAATATCGGTGGCCGTGGTGT CGGCTC3'
Oligo_31, SEQ ID NO.: 37	5'TGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCG AAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCT GGAGAGAC3'
Oligo_32, SEQ ID NO.: 38	5'CCAAGACTGTTACCCATCGCGTGGGCGTATTC GCAAAGGATCAGCGGGCGCGTCTCTCCAGGTA GCGAAAGCC3'
Oligo_33, SEQ ID NO.: 39	5'CGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTA AATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTT ACAGGGC3'
Oligo_34, SEQ ID NO.: 40	5'GCCGTTTTCATCATATTTAATCAGCGACTGATC CACCCAGTCCCAGACGAAGCCGCCCTGTAAAC GGGGATACTGACG3'
Oligo_35, SEQ ID NO.: 41	5'CAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAA CCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGA TACGCCGAACG3'
Oligo_36, SEQ ID NO.: 42	5'GCGGCGTGCGGTCGGCAAAGACCAGACCGTT CATACAGAACTGGCGATCGTTCGGCGTATCGCC AAA3'
Oligo_37, SEQ ID NO.: 43	5'CGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAA GCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGT TTATCCG3'
Oligo_38, SEQ ID NO.: 44	5'CTCGTTATCGCTATGACGGAACAGGTATTCGCT GGTCACTTCGATGGTTTGCCCGGATAAACGGAA CTGGAAAAACTGC3'
Oligo_39, SEQ ID NO.: 45	5'AATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTC CTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCG CTGGCAAGCG3'
Oligo_40, SEQ ID NO.: 46	5'GTTCAGGCAGTTCAATCAACTGTTTACCTTGT GGAGCGACATCCAGAGGCACTTCACCGCTTGC CAGCGGCTTACC3'
Oligo_41, SEQ ID NO.: 47	5'CAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACT ACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGC TCACAGTACGCGTA3'
Oligo_42, SEQ ID NO.: 48	5'GCGCTGATGTGCCCGGCTTCTGACCATGCGGT CGCGTTCGGTTGCACTACGCGTACTGTGAGCCA GAGTTG3'
Oligo_43, SEQ ID NO.: 49	5'CCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCG TCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCG CCGC3'
Oligo_44, SEQ ID NO.: 50	5'CCAGCTCGATGCAAAAATCCATTTCGCTGGTG GTCAGATGCGGGATGGCGTGGGACGCGGCGGG GAGCGTC3'

Oligo_45, SEQ ID NO.: 51	5'CGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATA AGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTC TTTCACAGATGTG3'
Oligo_46, SEQ ID NO.: 52	5'TGAACTGATCGCGCAGCGGCGTCAGCAGTTGT TTTTTATCGCCAATCCACATCTGTGAAAGAAAG CCTGACTGG3'
Oligo_47, SEQ ID NO.: 53	5'GCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGC TGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCC GCATTGAC3'
Oligo_48, SEQ ID NO.: 54	5'GGCCTGGTAATGGCCCGCCGCCTTCCAGCGTT CGACCCAGGCGTTAGGGTCAATGCGGGTCGCTT CACTTA3'
Oligo_49, SEQ ID NO.: 55	5'CGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTG CAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTG CTGAT3'
Oligo_50, SEQ ID NO.: 56	5'TCCGGCTGATAAATAAGGTTTTCCCCTGATGCT GCCACGCGTGAGCGGTCGTAATCAGCACCGCAT CAGCAAGTG3'
Oligo_51, SEQ ID NO.: 57	5'GGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCT ACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTA CCGTTGATGTTGA3'
Oligo_52, SEQ ID NO.: 58	5'GGCAGTTCAGGCCAATCCGCGCCGGATGCGGT GTATCGCTCGCCACTTCAACATCAACGGTAATC GCCATTTGAC3'
Oligo_53, SEQ ID NO.: 59	5'GCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAG GTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGG GCCGCAAG3'
Oligo_54, SEQ ID NO.: 60	5'GGCAGATCCCAGCGGTCAAAACAGGCGGCAG TAAGGCGGTCGGGATAGTTTTCTTGCGGCCCTA ATCCGAGC3'
Oligo_55, SEQ ID NO.: 61	5'GTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGAC ATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAAC GGTCTGC3'
Oligo_56, SEQ ID NO.: 62	5'GTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTCA ATTCGCGCGTCCCGCAGCGCAGACCGTTTTCGC TCGG3'
Oligo_57, SEQ ID NO.: 63	5'ACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATC AGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAAC CAGCCATC3'
Oligo_58, SEQ ID NO.: 64	5'GAAACCGTCGATATTCAGCCATGTGCCTTCTTC CGCGTGCAGCAGATGGCGATGGCTGGTTTCCAT CAGTTGCTG3'
Oligo_59, SEQ ID NO.: 65	5'CATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGA TTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTAT CGGCG3'
Oligo_60, SEQ ID NO.: 66	5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTA GCGACCGGCGCTCAGCTGGAATTCCGCCGATAC TGACGGGC3'
LacZ基因 - SEQ ID NO: 67	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTT TTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTT ACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCT

TTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGC
ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTG
AATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCA
CCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTG
CGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCC
CTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCC
CATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTC
AATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACG
GGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAA
GCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTT
TTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTG
CAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACA
GTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCAT
TTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGA
TGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGG
AAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTT
TCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTA
CACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCT
TTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGG
CTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACT
ACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTG
AAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTC
GGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTAT
GCCGATCGCGTCACACTACGTCTGAACGTCGAA
AACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAA
TCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGC
CGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCG
ATGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATG
GTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGA
TTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTC
TGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGG
TGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACT
TTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAACCA
TCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGG
CCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAAC
CCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGA
TGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACG
CGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCA
CCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGA
ATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTA
TCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCC
GGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCA
CGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTACGCGCG
CGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCC
GAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACC
TGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATA
CGCCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTT
CGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCC
CCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGT
GGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGG
CAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGG

CGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAA
CGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCC
AGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGT
TTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAACCATCGA
AGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGA
TAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGA
TGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTC
TGGATGTCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGATTG
AACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCC
GGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGCA
ACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGC
ACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCG
GAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGTC
CCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAAT
GGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTG
GCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACA
GATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGAC
GCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCT
GGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCC
GCATTGACCCTAACGCCTGGGTCGAACGCTGGA
AGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCG
TTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGAT
GCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAG
CATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAA
ACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCG
ATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACA
CCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAG
CTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCT
CGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCG
CCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCT
GCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTACGTCTTC
CCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCG
CGAATTGAATTATGGCCCACACCAGTGGCGCGG
CGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCA
ACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCT
GCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATAT
CGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGA
CTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCA
GCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGT
CTGGTGTCAAAAATAA3'

在寡核苷酸合成裝置之裝置側的旋轉器(寡核苷酸合成通道)的頂部上使用Mantis施配器(Formulatrix, MA)施配約400 nL之液滴。將奈米反應器晶片與寡核苷酸裝置手動配合以挑取具有PCA反應混合物之液滴。藉由在挑取後立即使奈米反應器自寡核苷酸合成裝置剝離而將液滴挑取於奈米反應器晶片之個別奈米反應器中(圖59)。

奈米反應器用熱封膜/帶蓋(Eppendorf, eshop.eppendorfna.com/products/Eppendorf_Heat_Sealing_PCR_Film_and_Foil)密封且置放於適當組態之使用熱循環儀套組(OpenPCR)構築之熱循環儀中。

在熱循環儀上使用以下溫度方案：

1個循環：98℃, 45秒

40個循環：98℃, 15秒；63℃, 45秒；72℃, 60秒；

1個循環：72℃, 5分鐘

1個循環：4℃, 保持

自如圖60中所示之個別孔1-10收集0.50 μl等分試樣且在塑膠管中，在PCR反應混合物(表9)中且根據以下熱循環儀程式，使用正向引子(F-引子；5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3'；SEQ ID NO: 68)及反向引子(R-引子；5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGG3'；SEQ ID NO: 69)擴增等分試樣：

熱循環儀：

1個循環：98℃, 30秒

30個循環：98℃, 7秒；63℃, 30秒；72℃, 90秒

1個循環：72℃, 5分鐘

1個循環：4℃, 維持

表9：

PCR	1 (×25 μl)	最終濃度
H2O	17.50	
5×Q5緩衝液	5.00	1×
10 mM dNTP	0.50	200 μM
F-引子20 μM	0.63	0.5 μM
R-引子20 μM	0.63	0.5 μM
BSA 20 mg/ml	0.00	

Q5聚合酶2U/μl	0.25	1u/50 μl
模板(PCA組裝)	0.50	1 μl/50 μl rxn

所得擴增產物在BioAnalyzer儀器(圖60BB，畫面1-10)以及在凝膠(圖60C)上操作，展示產物略大於3000 bp。使用在塑膠管中進行之PCA反應運行第11個PCR反應作為陽性對照(圖60B，畫面11及圖60C)。在無PCA模板的情況下運行第12個PCR反應作為陰性對照，展示無產物(圖60B，畫面12及圖60C)。

實例13：錯誤校正發展

表10

核酸	序列
組裝基因，SEQ ID NO.: 70	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATC3'
組裝寡核苷酸1, SEQ ID NO.: 71	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC 3'
組裝寡核苷酸2, SEQ ID NO.: 72	5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGGCCTCAGGAAGATCGCACTCCAGCCAGCTTTCCGGCACCGCTTCTGGTGCCGGAAACCAGGCAAAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3'

組裝寡核苷酸3, SEQ ID NO.: 73	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCG CCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCA CATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGC GAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTG CAACGG3'
組裝寡核苷酸4, SEQ ID NO.: 74	5' GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCG TCACTCCAGCGCAGCACCATCACCGCGAGGCGGTTTTCTCCG GCGCGTAAAAATGCGCTCAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGA CTGTCCTGGCCGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGA TGAAACG 3'
組裝寡核苷酸5, SEQ ID NO.: 75	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCG TTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTG CCACTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGC TGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGT AACAGTTT 3'
組裝寡核苷酸6, SEQ ID NO.: 76	5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCCACAGTTTCGGGTTTT CGACGTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCATAACCACCAC GCTCATCGATAATTTCACCGCCGAAAGGCGCGGTGCCGCTGG CGACCTGCGTTTCACCCTGCCATAAAGAAACTGTTACCCGTAG GTAGTCACG 3'

使用6種購買之寡核苷酸(在PCA期間各5 nM)(Ultramer；SEQ ID NO.: 71-76；表10)且在如下使用1×NEB Q5緩衝液及0.02U/μL熱起始高保真度聚合酶及100 μM dNTP之PCA反應中組裝約1kb基因(SEQ ID NO.: 70；表10)：

1個循環：98℃, 30秒

15個循環：98℃, 7秒；62℃ 30秒；72℃, 30秒

1個循環：72℃, 5分鐘

Ultramer寡核苷酸預期具有至少1/500個核苷酸之錯誤率，更可能至少1/200個核苷酸或200個以上核苷酸。

在如下PCR反應中使用正向引子(5' ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3' SEQ ID NO.: 77)及反向引子(5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCC3' SEQ ID NO.: 78)，使用1×NEB Q5緩衝液及0.02U/μL Q5熱起始高保真度聚合酶、200 μM dNTP及0.5 μM引子擴增組裝基因：

1個循環：98℃, 30秒

30個循環：98℃, 7秒；65℃ 30秒；72℃, 45秒

1個循環：72℃, 5分鐘

在BioAnalyzer中分析擴增之組裝基因(圖52A)且選殖。桑格定序來自~24個群落之Mini-prep。BioAnalyzer分析提供未校正基因之寬峰及拖尾，指示高錯誤率。定序指示1/789之錯誤率(資料未展示)。使用CorrectASE (Life Technologies, www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A14972) 根據製造商之說明書追蹤兩輪錯誤校正。在第一輪(圖60B)及第二輪(圖60C)後，在BioAnalyzer中類似地分析所得基因樣品且選殖。選取24個群落用於定序。在第一及第二輪錯誤校正後，定序結果分別指示1/5190 bp及1/6315 bp之錯誤率。

實例14：產生大數量之無引子單股寡核苷酸

試劑.除非另外說明，否則除phi29 DNA聚合酶之外的所有酶及緩衝劑均購自NEB。Phi29 DNA聚合酶購自Enzymatics。

產生寡核苷酸.藉由IDT合成具有所需寡核苷酸之反向互補序列的鎖式寡核苷酸(OS_1518)(表1)。亦合成額外鎖式寡核苷酸OS_1515、OS_1516、OS_1517、OS_1519以與在不同限制酶集合下起作用之轉接子/輔助寡核苷酸組合一起作用。藉由使5 μL鎖式寡核苷酸(200 nM)與5 μL T4 PNK緩衝液、0.5 μL ATP(100 mM)、2 μL T4 PNK(10U/μL)、1 μL BSA(100 μg/μL)、2 μL DTT(100 mM)及32.5 μL水混合，且使混合物在37℃下培育60分鐘，接著在65℃下培育20分鐘來使鎖式寡核苷酸磷酸化。藉由IDT合成具有鎖式寡核苷酸之互補序列的轉接子寡核苷酸(表1)。藉由IDT合成具有轉接子寡核苷酸互補序列之輔助寡核苷酸且經生物素標

記。

表1.寡核苷酸序列.

鎖式, SEQ ID NO.: 79	5'ATCTTTGAGTCTTCTGCTTGGTCAGACGAGTGCATGTGCGTGACAAATTGGCGCGAGGAGCTCGTGTCATTCACAACTGCTCTTAGGCTACTCAGGCATGGTGAGATGCTACGGTGGTTGATGGATACCTAGAT3'
轉接子, SEQ ID NO.: 80	5'CAGAAGACTCAAAGATATCTAGGTATCCATCAAC3'
輔助, SEQ ID NO.: 81	/5Biosg/GTTGATGGATACCTAGATATCTTTGAGTCTTCTG3'
下劃線 = 與轉接子寡核苷酸互補 波浪下劃線 = 限制性位點 /5Biosg/ = 生物素化位點	

雜交及接合. 將48 μL鎖式磷酸化反應混合物與1.5 μL轉接子寡核苷酸(2 μM)及0.5 μL T4接合酶組合。反應物在37℃下培育60分鐘，接著在65℃下培育20分鐘。將5 μL反應物樣品與5 μL 2×負載緩衝液混合且在15% TBE-尿素凝膠上分析(180 V，75 min)。

視情況選用之核酸外切酶處理進行如下。10 μL接合產物在37℃下用0.15 μL ExoI及ExoIII (NEB或Enzymatics)處理60分鐘，接著在95℃下維持20分鐘。在培育後，將0.3 μL轉接子寡核苷酸(2 μM)添加至各10 μL溶液中，加熱至95℃維持5分鐘，且緩慢冷卻。將5 μL反應物樣品與5 μL 2×負載緩衝液混合且在15% TBE-尿素凝膠上分析(180 V，75 min)。

圓周開捲擴增。藉由在冰上組合0.6 μL phi29 DNA聚合酶(低濃度，Enzymatics)、0.5 μL 10 mM dNTP、1 μL T4 PNK緩衝液、0.2 μL 100×BSA、0.5 μL 100 mM DTT及7.2 μL水來製備10 μL 2×RCA母體混合物。在一些情況下，PCR添加劑(諸如甜菜鹼，例如5M甜菜鹼)可用於減少擴增偏差。10 μL RCA母體混合物與10 μL接合產物(經或未經核酸外切酶處理)組合且在40℃下培育90分鐘或4小時。反應物接著在70℃下培育10分鐘以使phi29 DNA聚合酶去活化。0.1 μL反應物樣品與4.9 μL水及5

μL2×負載緩衝液混合，且在15% TBE-尿素凝膠上分析混合物(180 V，75 min)。

限制性核酸內切酶消化.使2 μL RCA產物樣品與2 μL 10×CutSmart、2 μL生物素標記之輔助寡核苷酸(20 μM)及12 μL水混合。將混合物加熱至98℃且緩慢冷卻至室溫。將各1 μL BciVI及MlyI添加至混合物，接著在37℃下培育1小時，隨後在80℃下培育20分鐘。1 μL反應物樣品與4 μL水及5 μL 2×負載緩衝液混合，且在15% TBE-尿素凝膠上分析混合物(180 V，75 min)。

視情況選用之純化步驟進行如下。保留1 μL限制性核酸內切酶消化樣品作為預先純化樣品。藉由劇烈渦流使NanoLink珠粒(Solulink)再懸浮。添加5 μL等分試樣之珠粒至1.5 mL管中。添加核酸結合及洗滌緩衝液或NABWB (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.05% Tween 20，pH 8.0)至管中達到250 μL之最終體積，且使管混合以再懸浮。將管置放於磁性台架上2分鐘，接著移除上清液。將管自磁體移除且用180 μL NABWB使珠粒再懸浮。將180 μL再懸浮珠粒添加至20 μL限制性核酸內切酶消化反應，且使混合物渦旋。將混合物在平台震盪器上在40℃下培育60分鐘，使得珠粒不會沈降。接著將管置放於磁體上2分鐘，且將包含經純化產物之上清液轉移至新管。使10 μL經純化產物之樣品與5 μL 2×負載緩衝液混合且在15% TBE-尿素凝膠上分析(180 V，75分鐘)。使用Qubit ssDNA套組量測經純化RCA產物之濃度。

替代性純化.在一些工作流程中，可使用(高效液相層析) HPLC純化經消化之寡核苷酸。

圖63描繪限制酶裂解之擴增產物的分離，其中各單股擴增產物已在

裂解之前在轉接子複製位點處與擴增產物互補之輔助寡核苷酸雜交。亦展示在不同組限制酶下，使用鎖式探針OS_1515、OS_1516、OS_1517、OS_1518、OS_1519擴增單股核酸相關的資料。

雖然已經在本文中展示及描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者應清楚，此類實施例僅借助於實例而提供。熟習此項技術者現將在不背離本發明之情況下想到許多變化、改變及取代。應理解，本文所述之本發明之實施例的各種替代方案均可用於實踐本發明。預期以下申請專利範圍界定本發明之範疇，且因此涵蓋此等申請專利範圍及其等效物之範疇內的方法及結構。

【符號說明】

1900:電腦系統

1901:CPU

1903:磁碟機

1905:網路端口

1907:監視器

1909:伺服器

1911:媒體

1912:固定媒體

1915:鍵盤

1916:滑鼠

1922:合作對象

2000:電腦系統

2002:處理器

2004:高速快取記憶體

2006:北橋

2008:處理器匯流排

2010:RAM

2012:記憶體匯流排

2014:南橋

2016:晶片組匯流排

2018:周邊匯流排

2020:網路介面卡(NIC)

2021:網路介面卡(NIC)

2022:加速器卡

2024:外部儲存器

2100:網路

2102a:電腦系統

2102b:電腦系統

2102c:個人資料助理

2104a:網路附接儲存(NAS)

2104b:網路附接儲存(NAS)

2202a-f:處理器

2204:記憶體子系統

2206a-f:可程式化硬體記憶體算法處理器(MAP)

2208a-f:記憶體

2210a-f:現場可程式化閘陣列(FPGA)

2501:分組中各第二通道之長度

2502:每一分組內第一通道之高度

2503:三列分組之間的距離

2504:分組中第一通道之截面

2505:分組中各第二通道之截面

2506:一列分組中之兩個分組之間的距離

2507:同一列中兩個叢集中心之間的距離

2508:基板沿著一個維度之寬度

2509:在另一維度中叢集中心距原點之最遠距離

2510:基準標誌距基板邊緣之距離

2511:基準標誌距原點之距離

2512:在另一維度中叢集中心距原點之最近距離

2513:第一基準標誌在另一維度中距原點之距離

2514:第一基準標誌在另一維度中距同一叢集之距離

2515:第一基準標誌在一個維度中距叢集之距離

2516:第一基準標誌在一個維度中距原點之距離

2517:在一個維度中叢集中心距原點之最近距離

2518:在一個維度中叢集中心距原點之最遠距離

2519:基板沿著另一維度之寬度

2520:基準標誌距基板邊緣之距離

2521:基準標誌距原點之距離

2522:同一列中兩個叢集中心之間的距離

2523:分組的總長度

2601:標記距原點之距離

2602:標記距原點之距離

2603:標記距基板邊緣之距離

2701:奈米反應器之總高度

2702:奈米反應器中孔之高度

2703:奈米反應器沿著一個維度之寬度

2704:奈米反應器沿著另一維度之寬度

2705:在另一維度中孔中心距原點之最遠距離

2706:在一個維度中孔中心距原點之最遠距離

2707:在一個維度中孔中心距奈米反應器邊緣之距離

2708:在另一維度中孔中心距奈米反應器邊緣之距離

2709:在另一維度中孔中心距原點之最近距離

2710:在一個維度中孔中心距原點之最近距離

2711:同一列中兩個孔中心之間的距離

2712:同一列中兩個孔中心之間的距離

2713:基準標誌距原點之距離

2714:基準標誌距奈米反應器之邊緣的距離

2715:基準標誌距奈米反應器之邊緣的距離

2716:第一基準標誌在另一維度中距原點之距離

2717:第一基準標誌在一個維度中距原點之距離

2718:第一基準標誌在另一維度中距孔之距離

2719:第一基準標誌在一個維度中距孔之距離

2720:包括孔輪緣之孔截面

2721:孔內部之截面

2722:在一個維度中距奈米反應器之中心或基準標誌之距離

2723:在一個維度中距奈米反應器之最近角之距離

2724:在一個維度中基準標誌之長度

2725:在一個維度中基準標誌之長度

2726:基準標誌之寬度

2727:標記距奈米反應器之角之距離

2728:標記距奈米反應器之邊緣之距離

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種合成寡核苷酸之方法，包含：

合成複數個寡核苷酸，其係以每小時至少10個核苷酸之速率延伸該等寡核苷酸之每一者，其中該等寡核苷酸之每一者具有預選序列，且其中該合成包含於延伸反應中以單鹼基延伸各個寡核苷酸。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中延伸該等寡核苷酸之每一者之速率為每小時至少20個核苷酸。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中延伸該等寡核苷酸之每一者之速率為每小時至少25個核苷酸。

【請求項4】

如請求項1之方法，其中該等複數個寡核苷酸並行合成。

【請求項5】

如請求項1之方法，其中合成至少20,000個寡核苷酸。

【請求項6】

如請求項1之方法，其中合成至少500,000個寡核苷酸。

【請求項7】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者之長度為至少25個核苷酸。

【請求項8】

如請求項1之方法，其中該等複數個寡核苷酸係於固體基板上合成。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中該固體基板包含矽、二氧化矽及氮化矽。

【請求項10】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者具有不同之預選序列。

【請求項11】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者包含100至200個核苷酸之長度且於小於5小時合成。

【請求項12】

如請求項1之方法，其中延伸該等寡核苷酸之每一者之速率為每小時至少12個核苷酸。

【請求項13】

如請求項1之方法，其中延伸該等寡核苷酸之每一者之速率為每小時至少15個核苷酸。

【請求項14】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者包含100至200個核苷酸之長度。

【請求項15】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者包含80至200個核苷酸之長度。

【請求項16】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者長度為至少100個核苷酸。

【請求項17】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者長度相同。

【請求項18】

如請求項1之方法，其中該等複數個寡核苷酸包含DNA。

【請求項19】

如請求項1之方法，其中該等複數個寡核苷酸包含RNA。

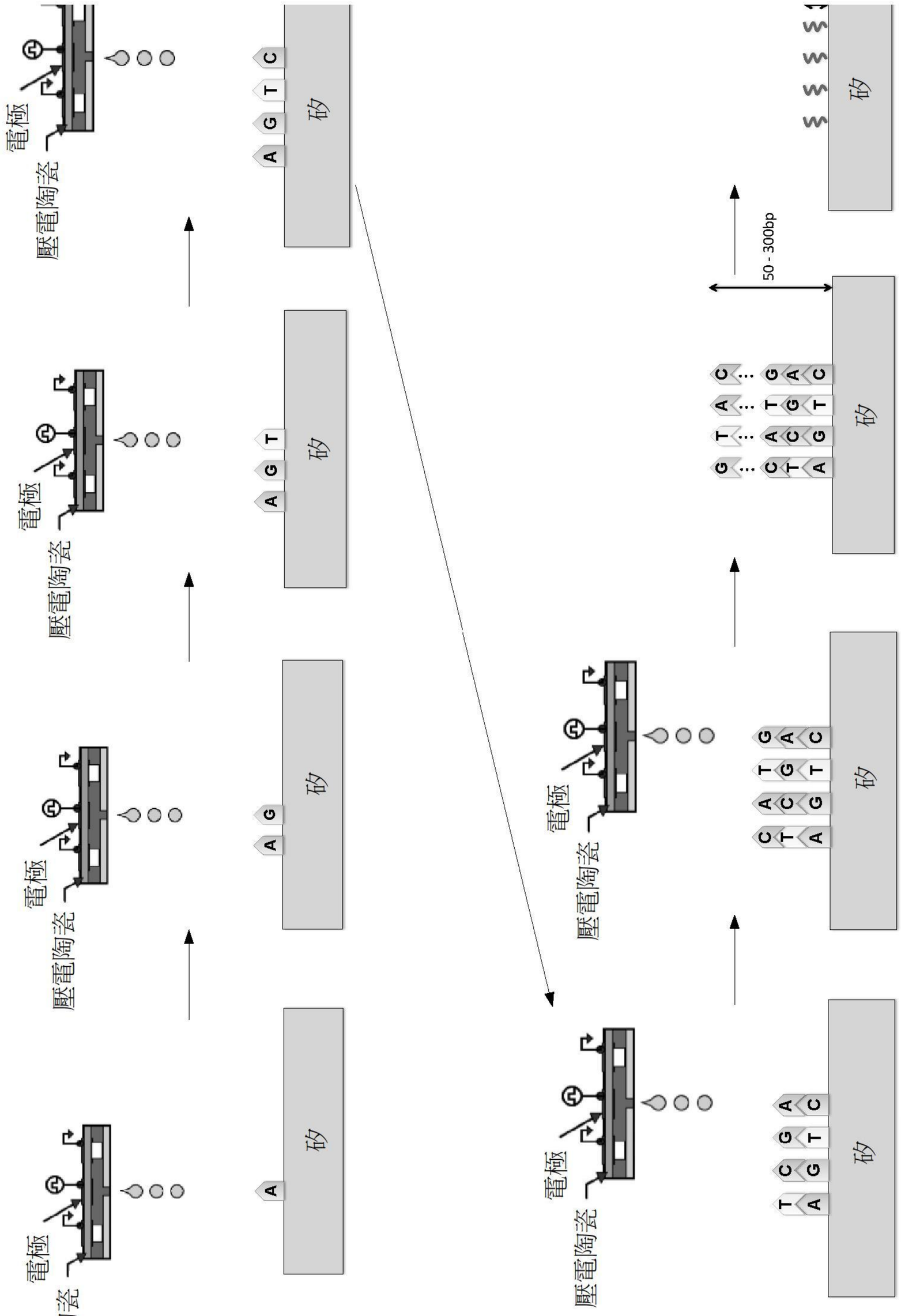
【請求項20】

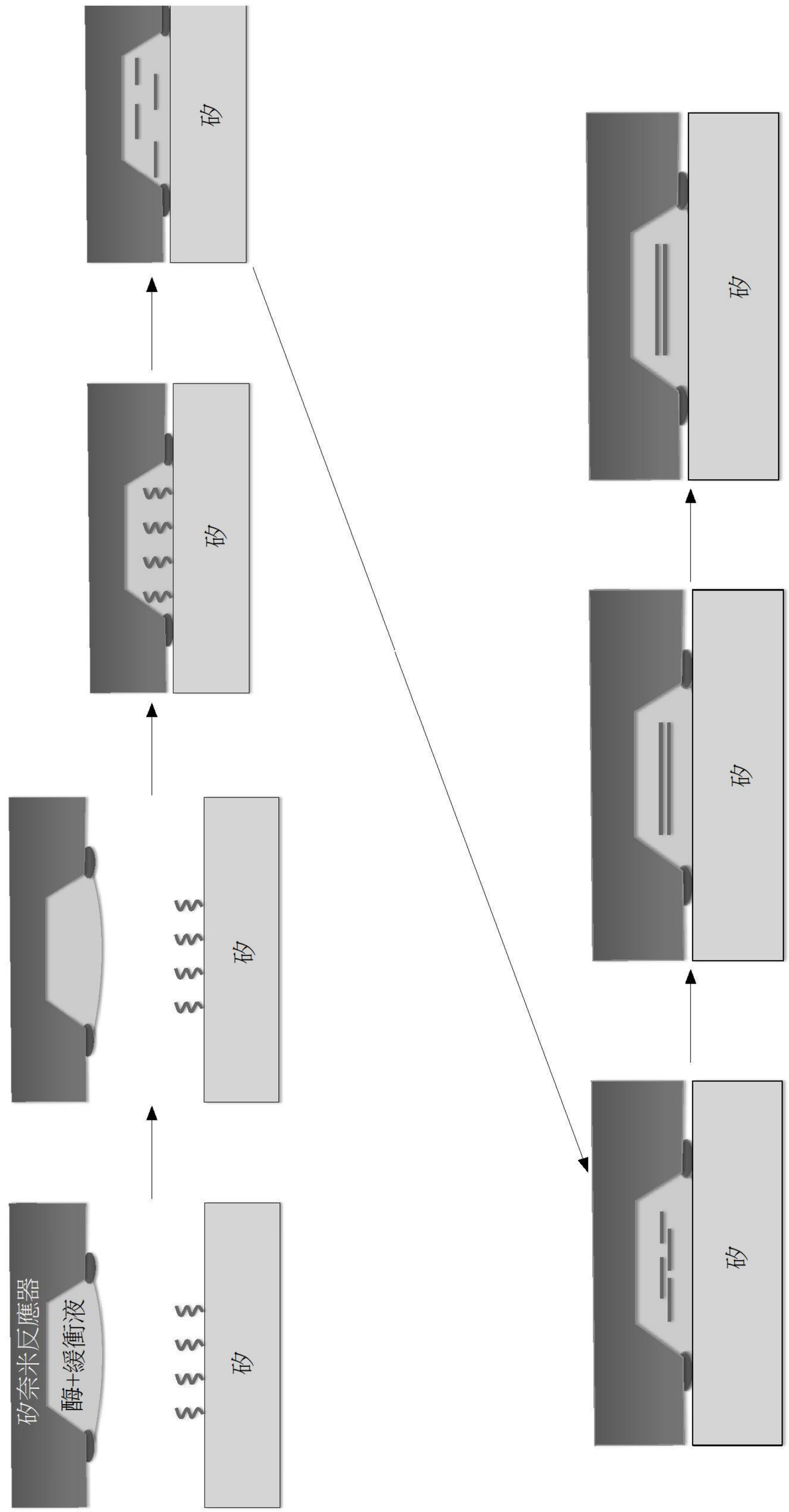
如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者包含100至300個核苷酸之長度。

【請求項21】

如請求項1之方法，其中該等寡核苷酸之每一者包含100至500個核苷酸之長度。

【發明圖式】

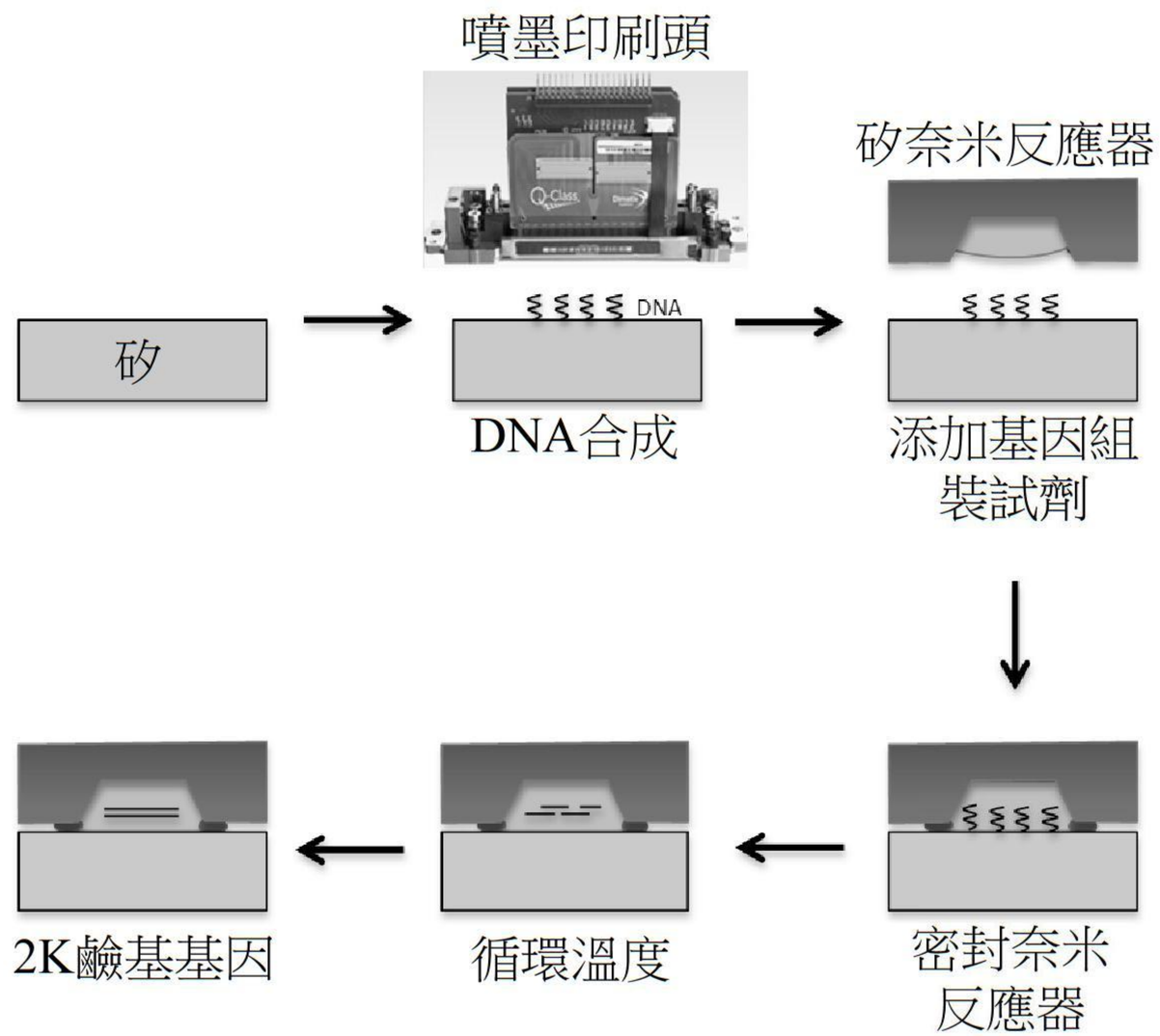

電極
壓電陶瓷
砂
A G T C
A G T
A G
A
50 - 300bp
G ... C
T ... A
T ... G
A ... C
C ... G
A T C
T G T
C A G
A C T
G A C
T G C
A T G
C A T
T C A
A G T
C T A
G A T
T C G
A G T
C A G
T C A
G T A
C A G
T C A
G A C
T G T
C A T
G A C
T C G
A G T



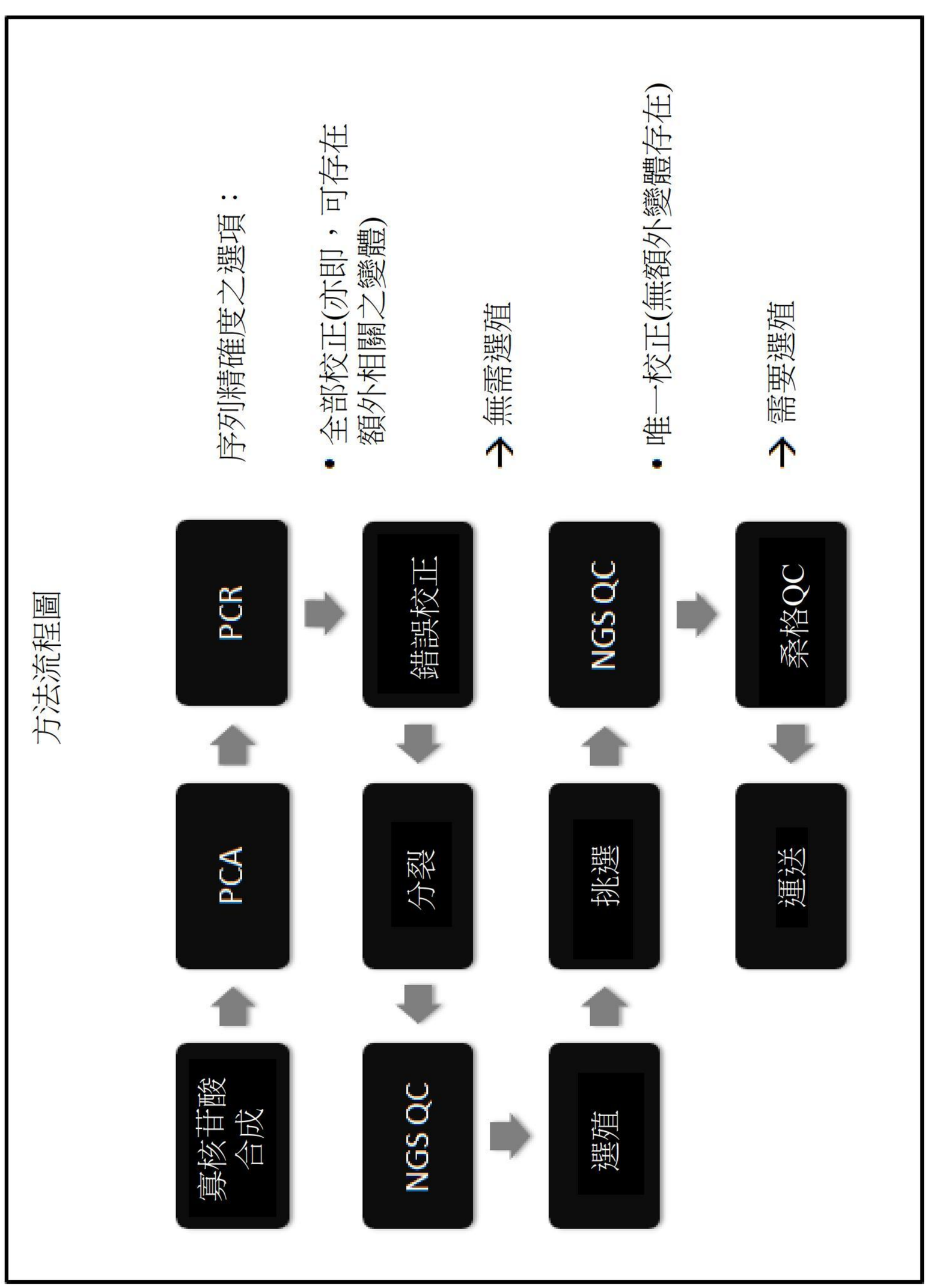
【圖1B】

基因印刷及奈米反應器技術

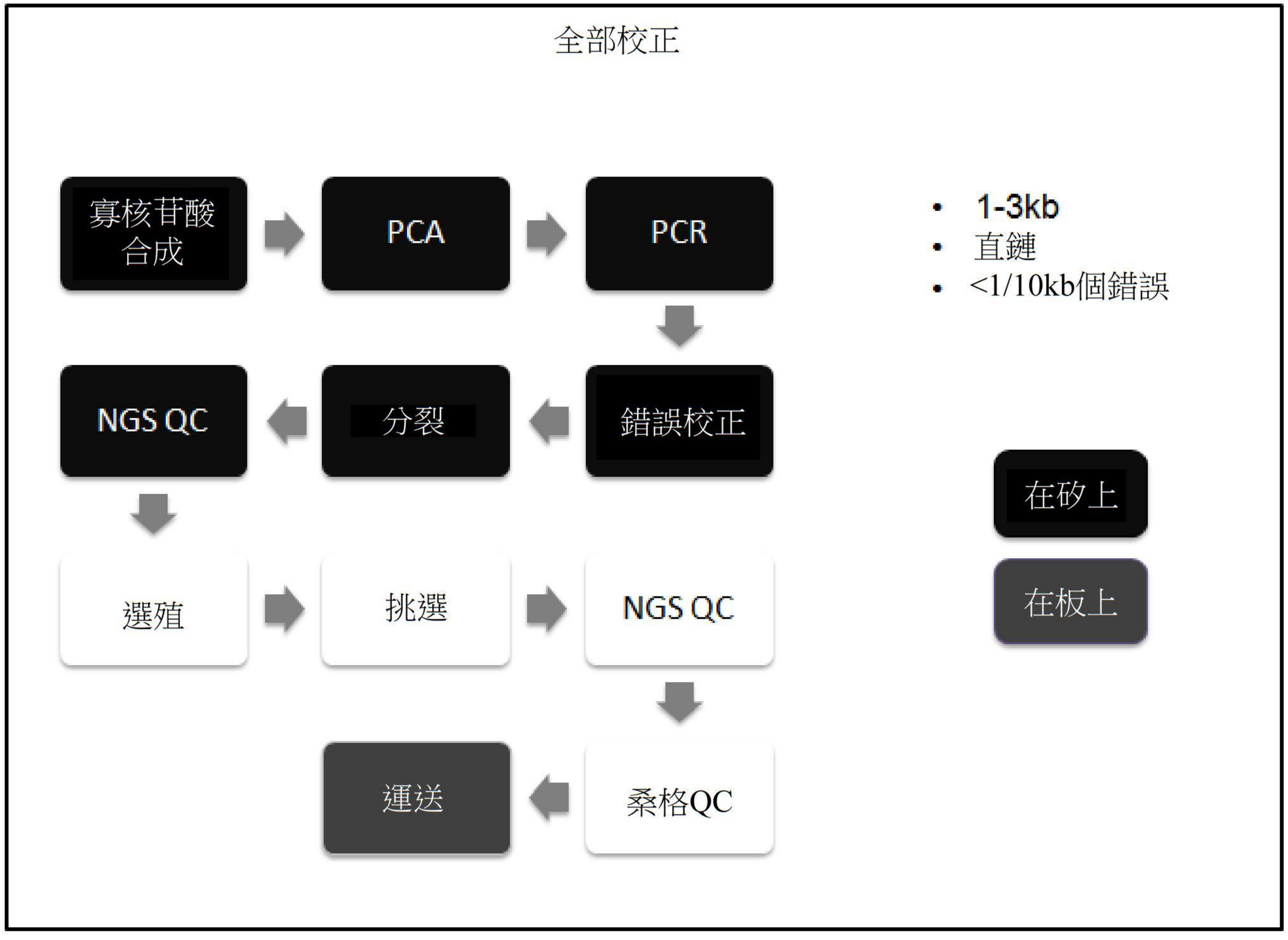
- 噴墨DNA印刷
  - 高產量
  - 低錯誤率
- 矽奈米反應器基因組裝
  - 精確控制
  - 少量試劑使用



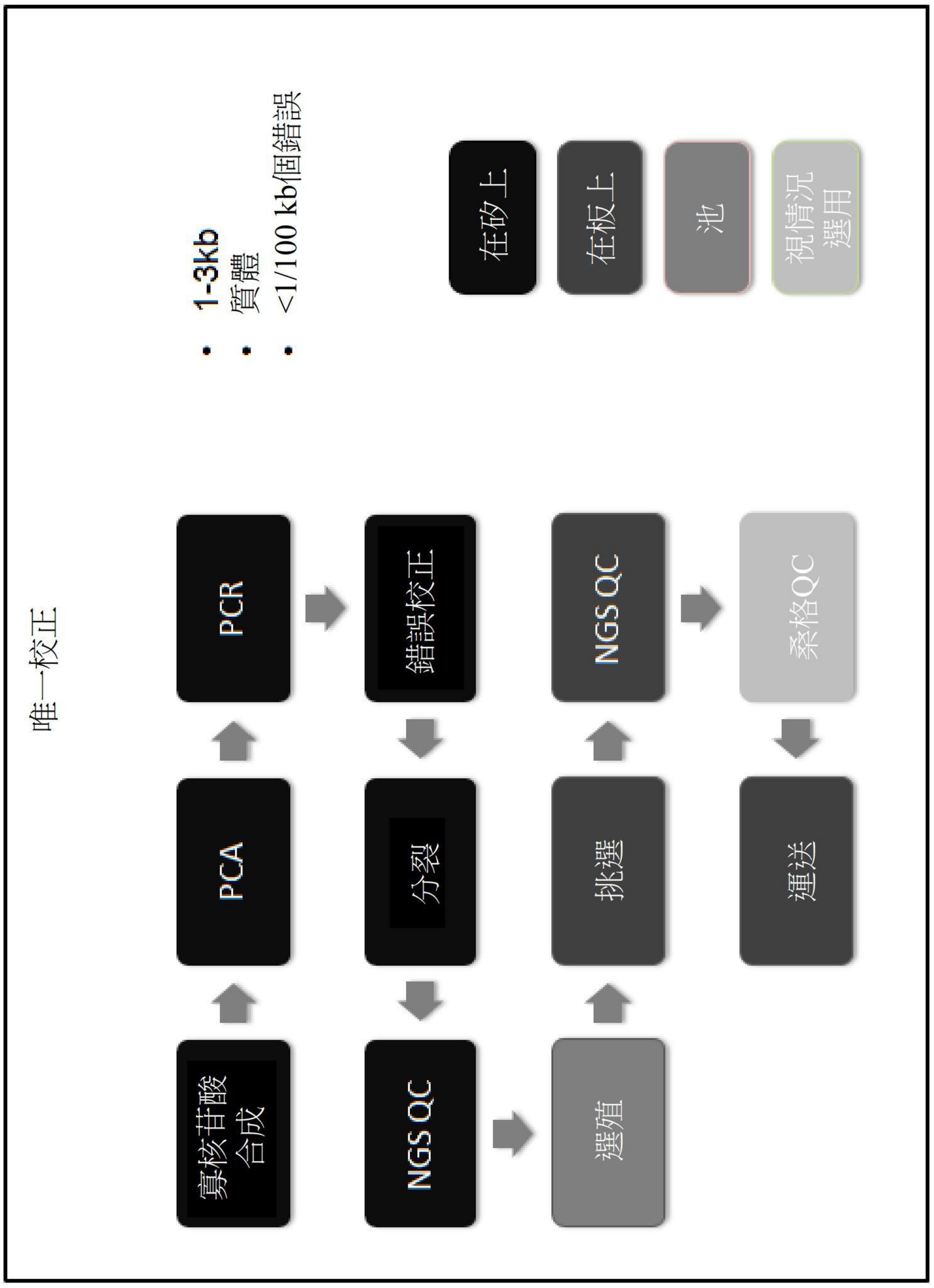
【圖1C】


方法流程圖
PCR
錯誤校正
NGS QC
桑格QC
PCA
分裂
挑選
運送
寡核苷酸合成
NGS QC
選殖
序列精確度之選項：
• 全部校正(亦即，可存在額外相關之變體)
→ 無需選殖
• 唯一校正(無額外變體存在)
→ 需要選殖

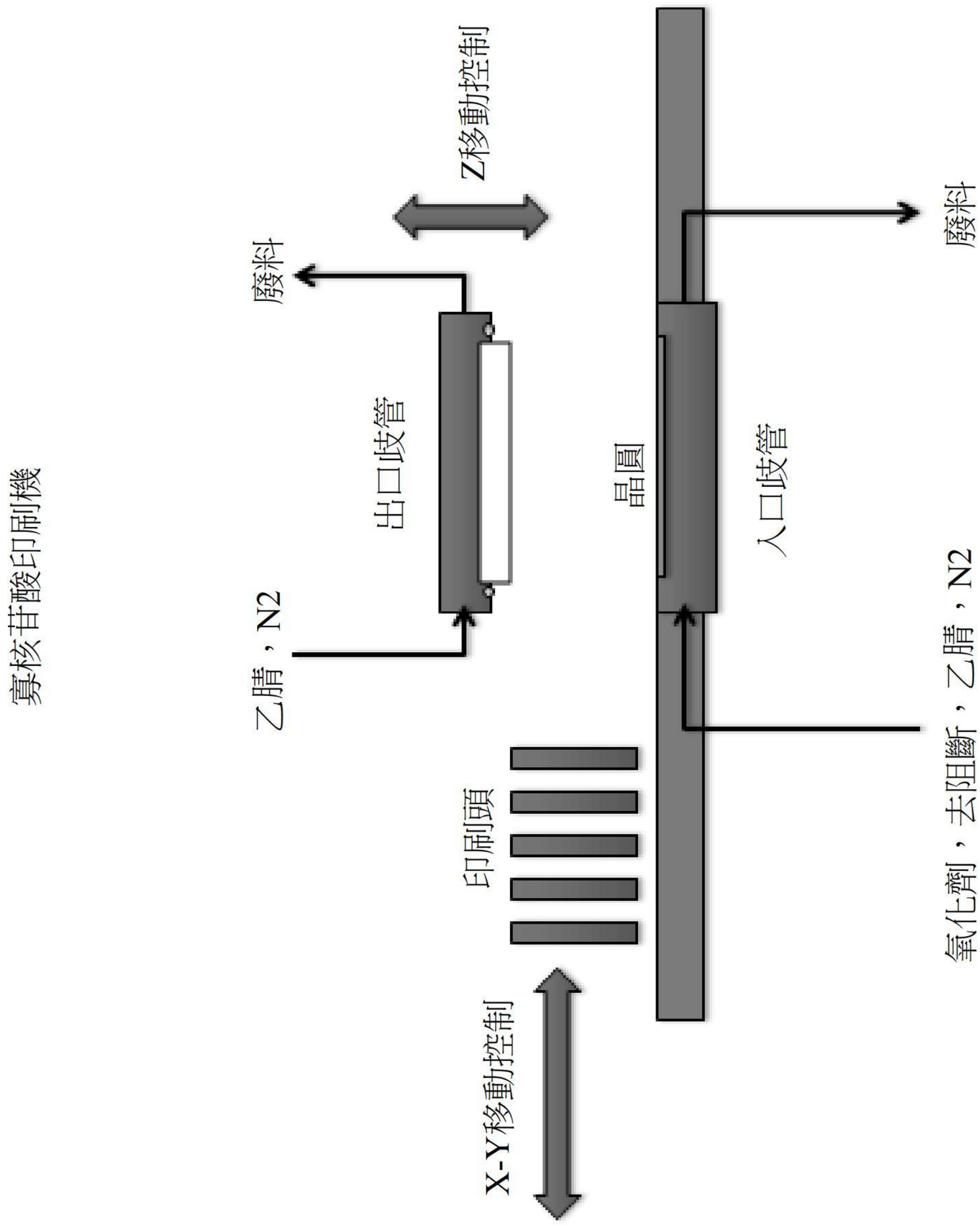
【圖2A】


全部校正
寡核苷酸合成
PCA
PCR
錯誤校正
分裂
NGS QC
選殖
挑選
NGS QC
桑格QC
運送
1-3kb
直鏈
<1/10kb個錯誤
在矽上
在板上

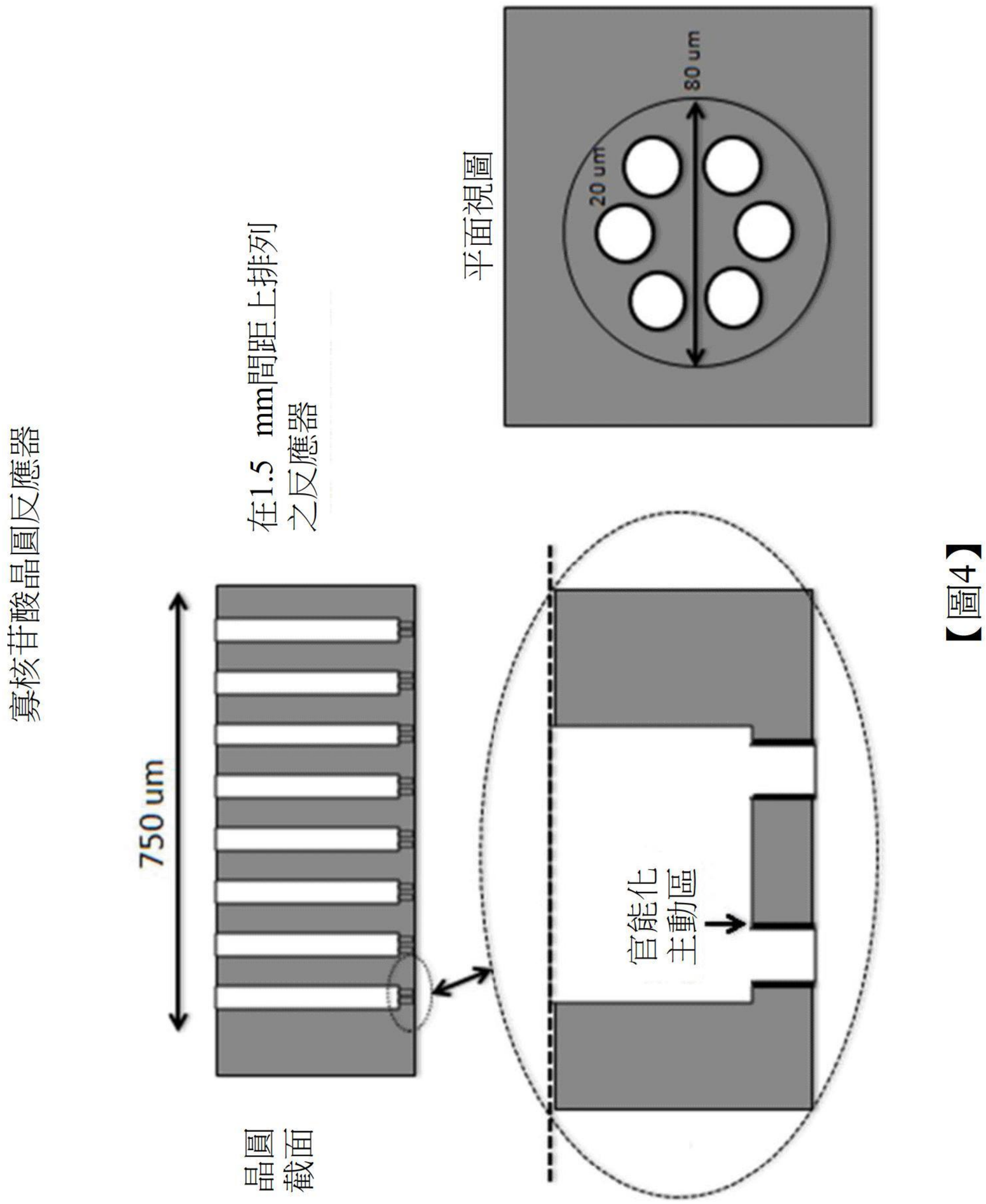
【圖2B】


唯一校正
PCR
錯誤校正
NGS QC
桑格QC
在矽上
在板上
池
視情況選用
寡核苷酸合成
PCA
分裂
NGS QC
選殖
挑選
運送
• 1-3kb
• 質體
• <1/100 kb個錯誤

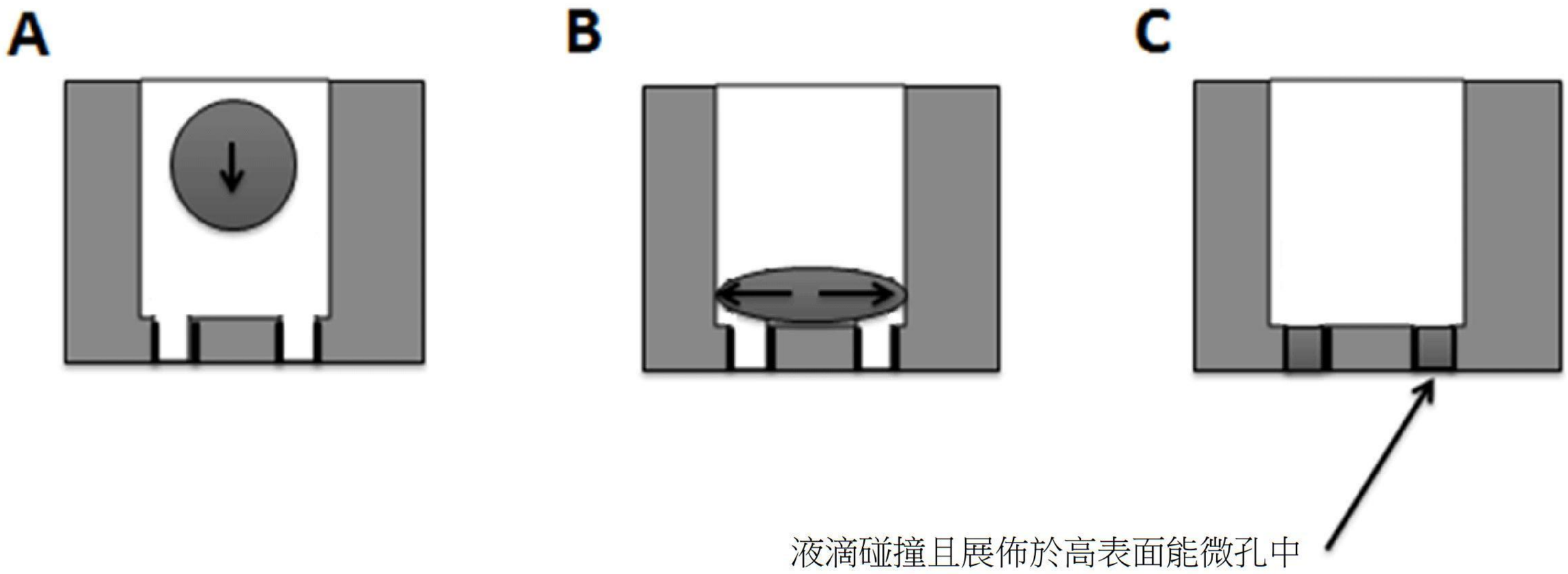
【圖2C】



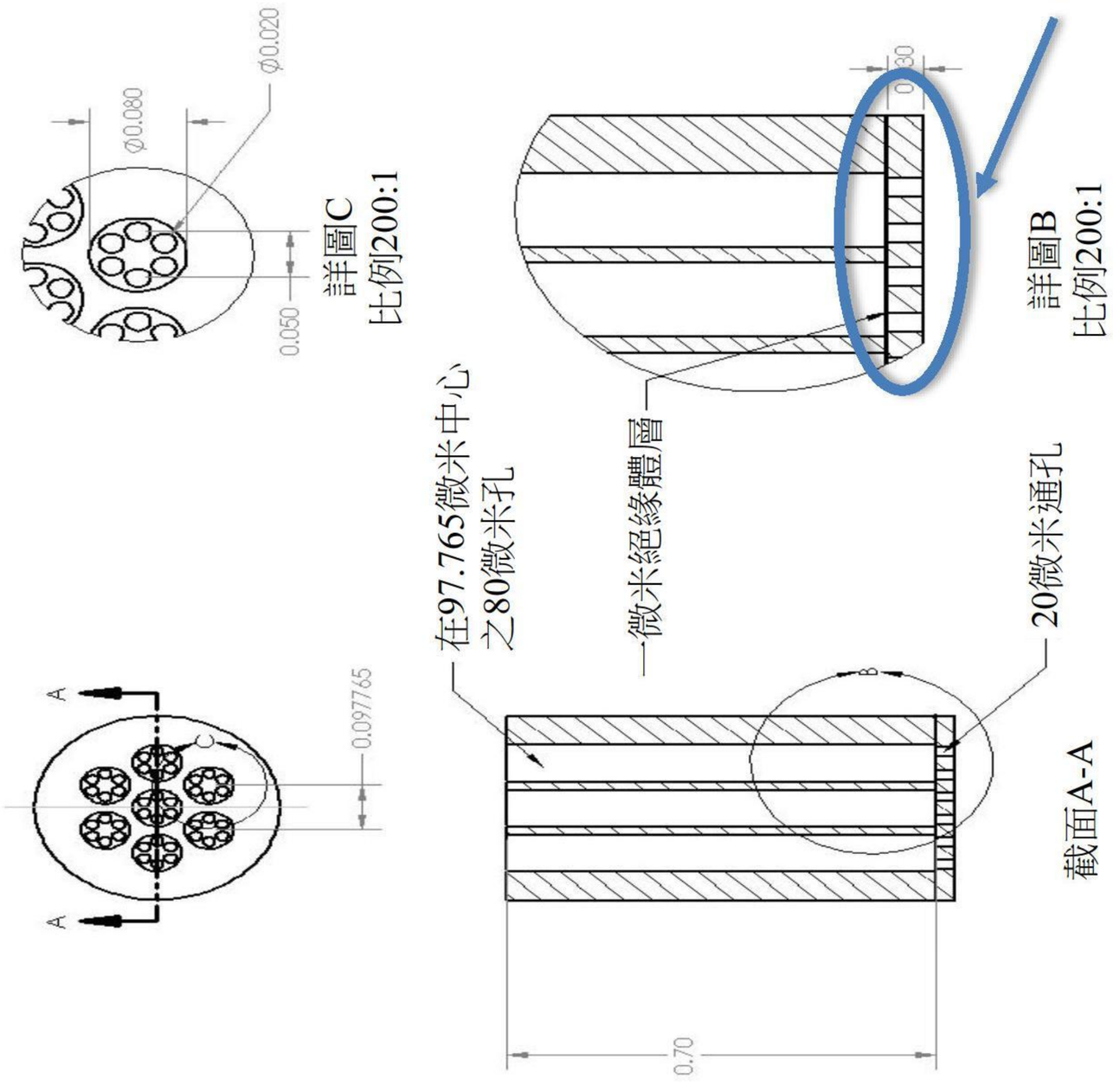
【圖3】


寡核苷酸晶圓反應器
在1.5 mm間距上排列
之反應器
平面視圖
20 um
80 um
750 um
晶圓
截面
官能化
主動區

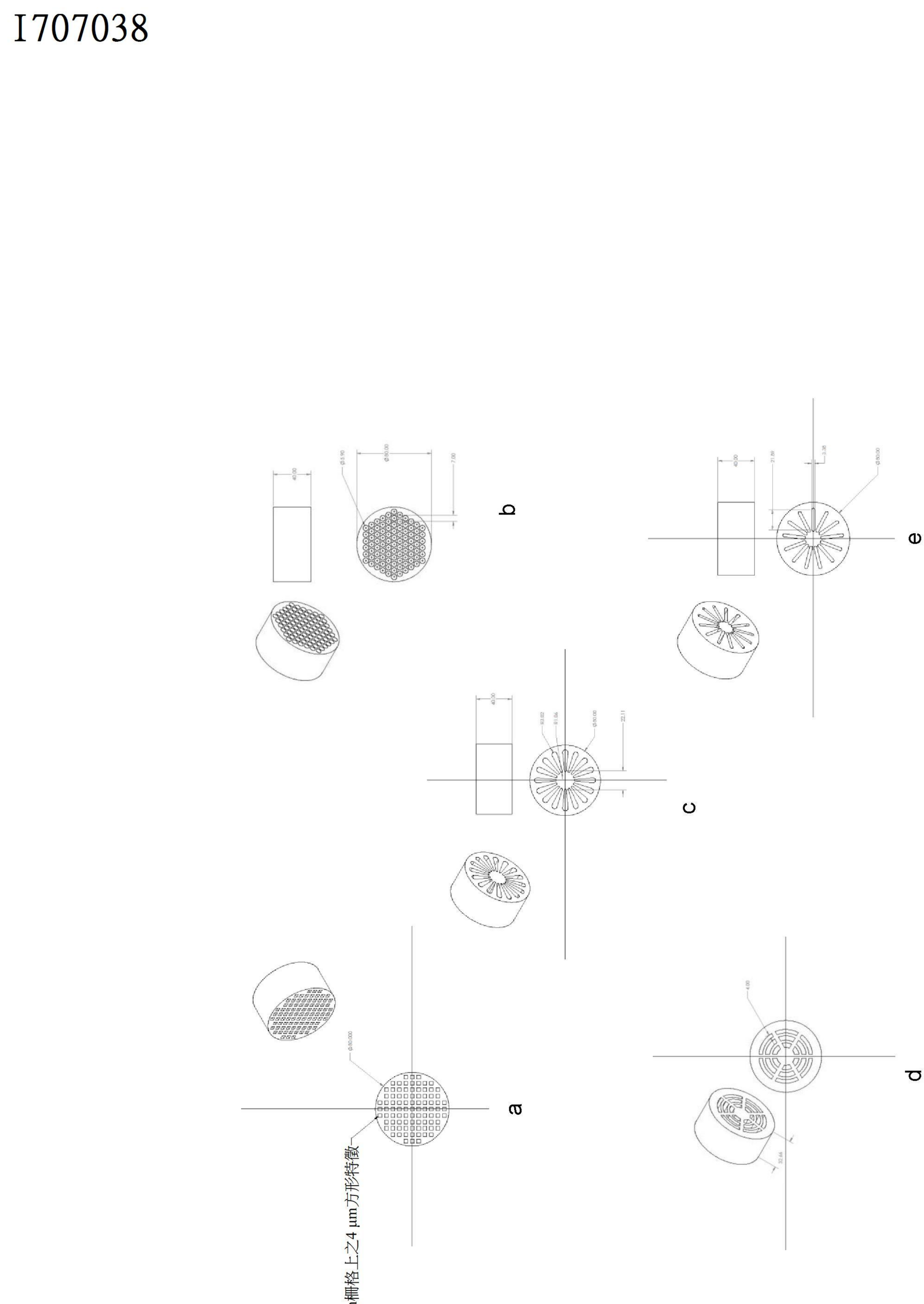
【圖4】



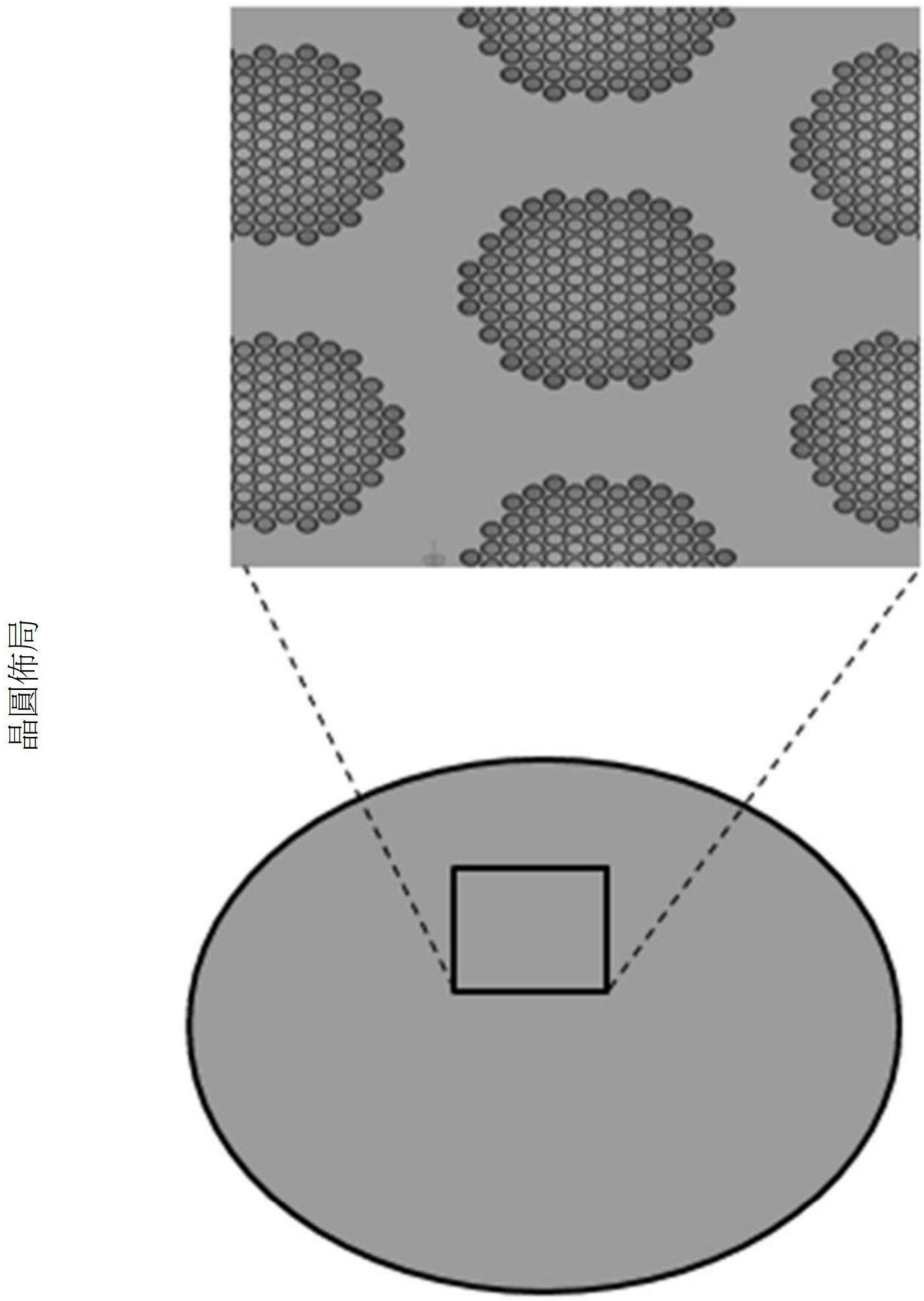
【圖5】


Φ0.020
Φ0.080
0.050
詳圖C
比例200:1
在97.765微米中心之80微米孔
微米絕緣體層
裝置層
0.30
詳圖B
比例200:1
裝置層
20微米通孔
0.70
截面A-A
A
A
C
B
0.097765

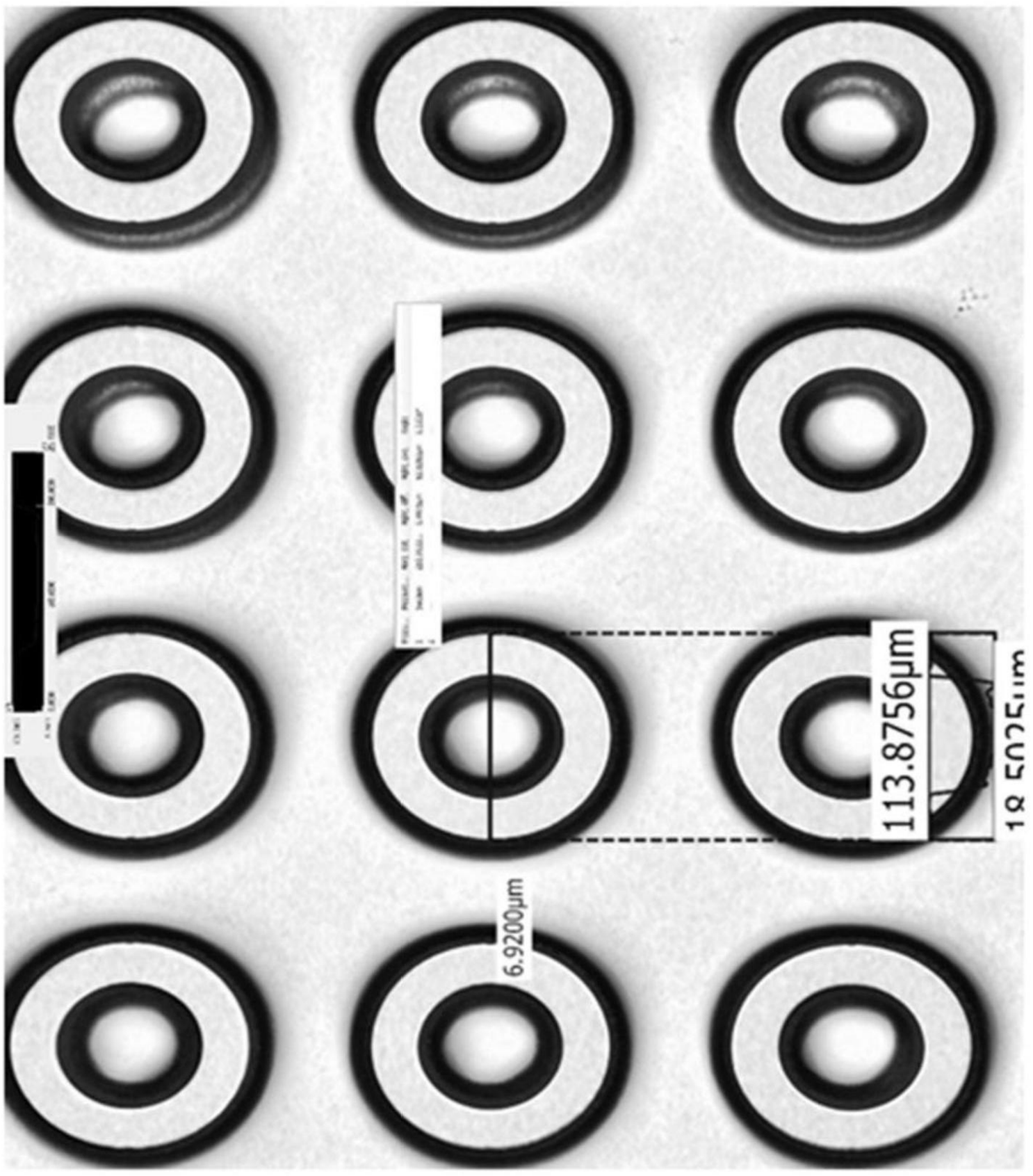
【圖6A】



【圖6B】

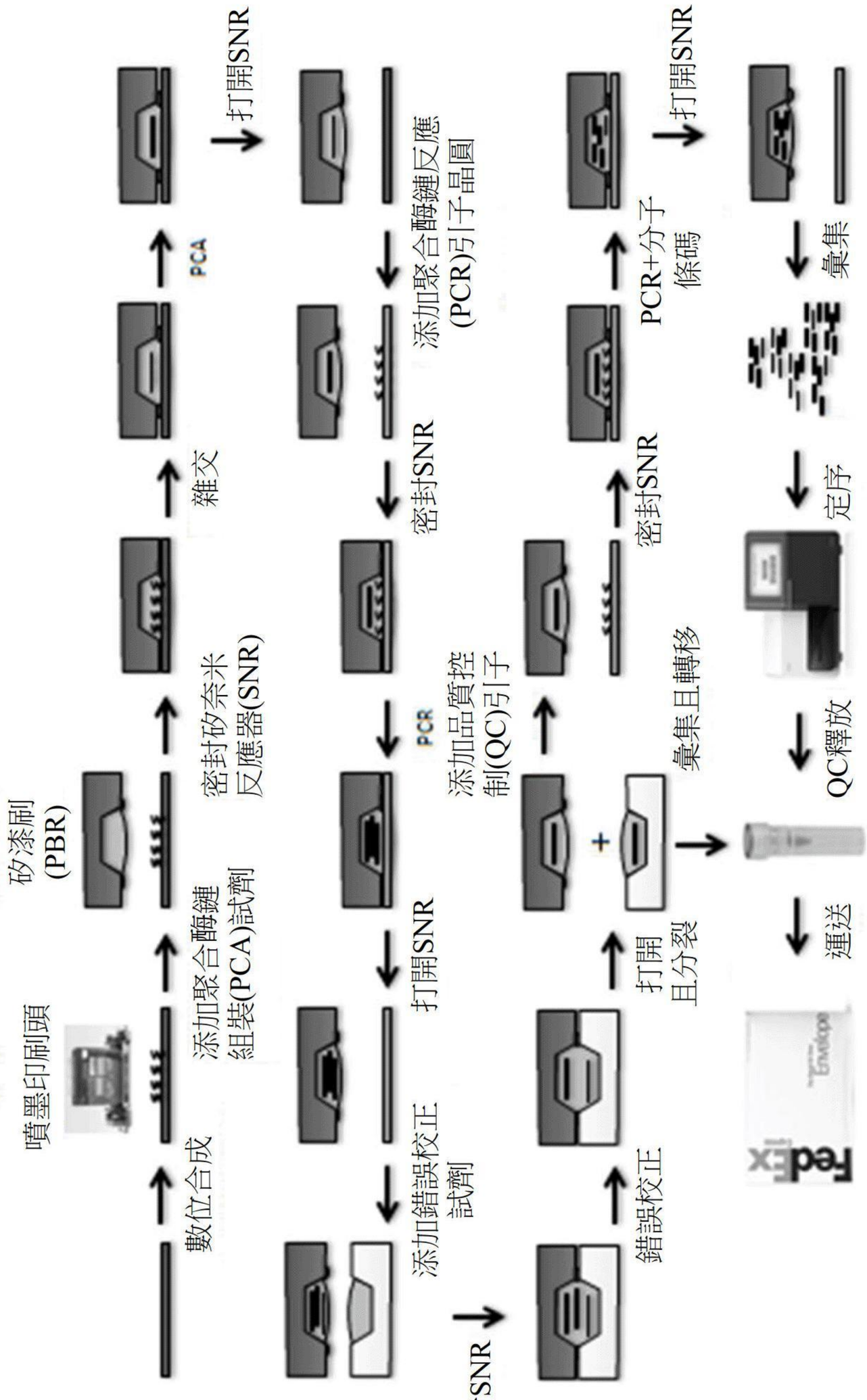


【圖6C】

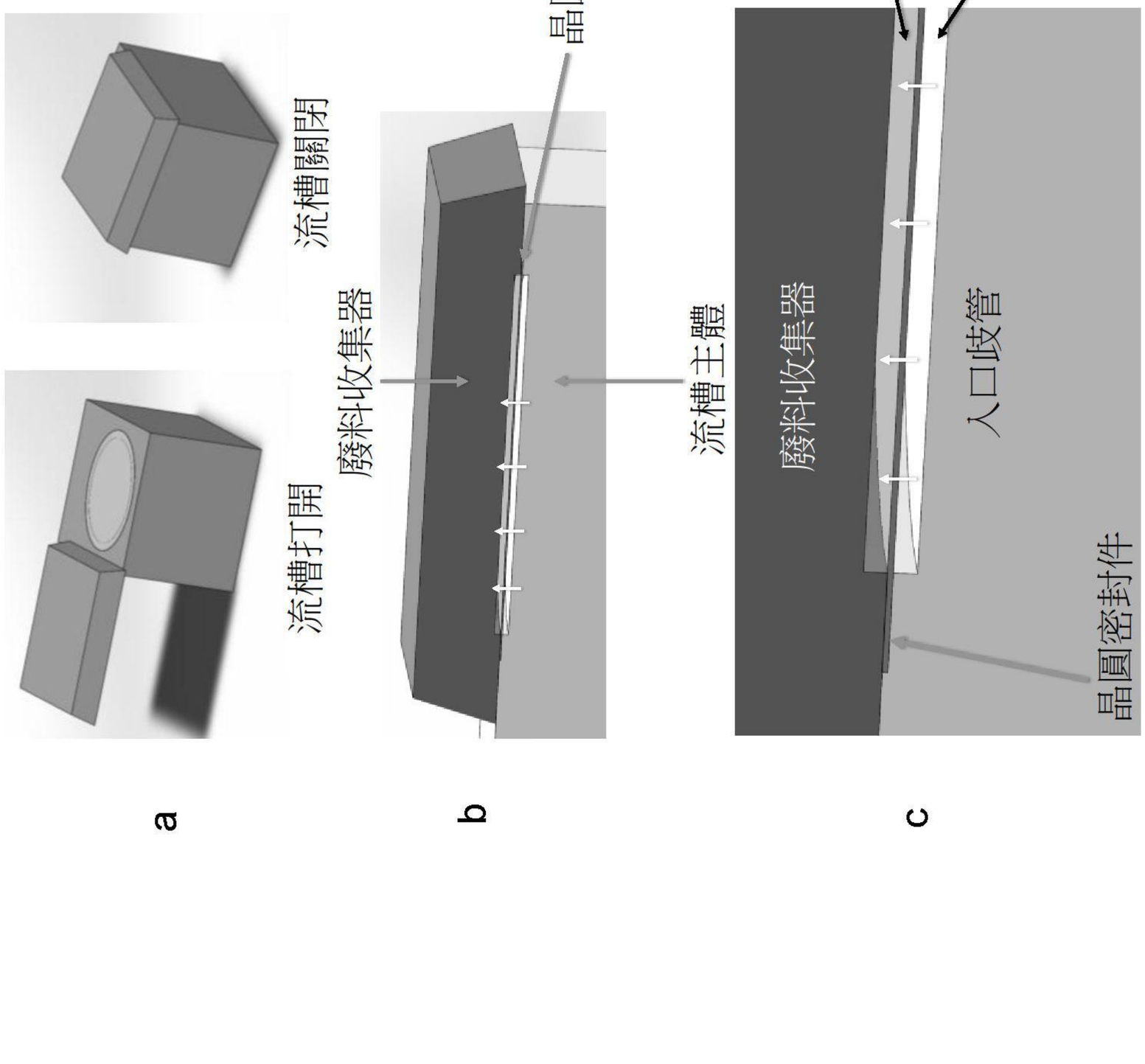


【圖7】

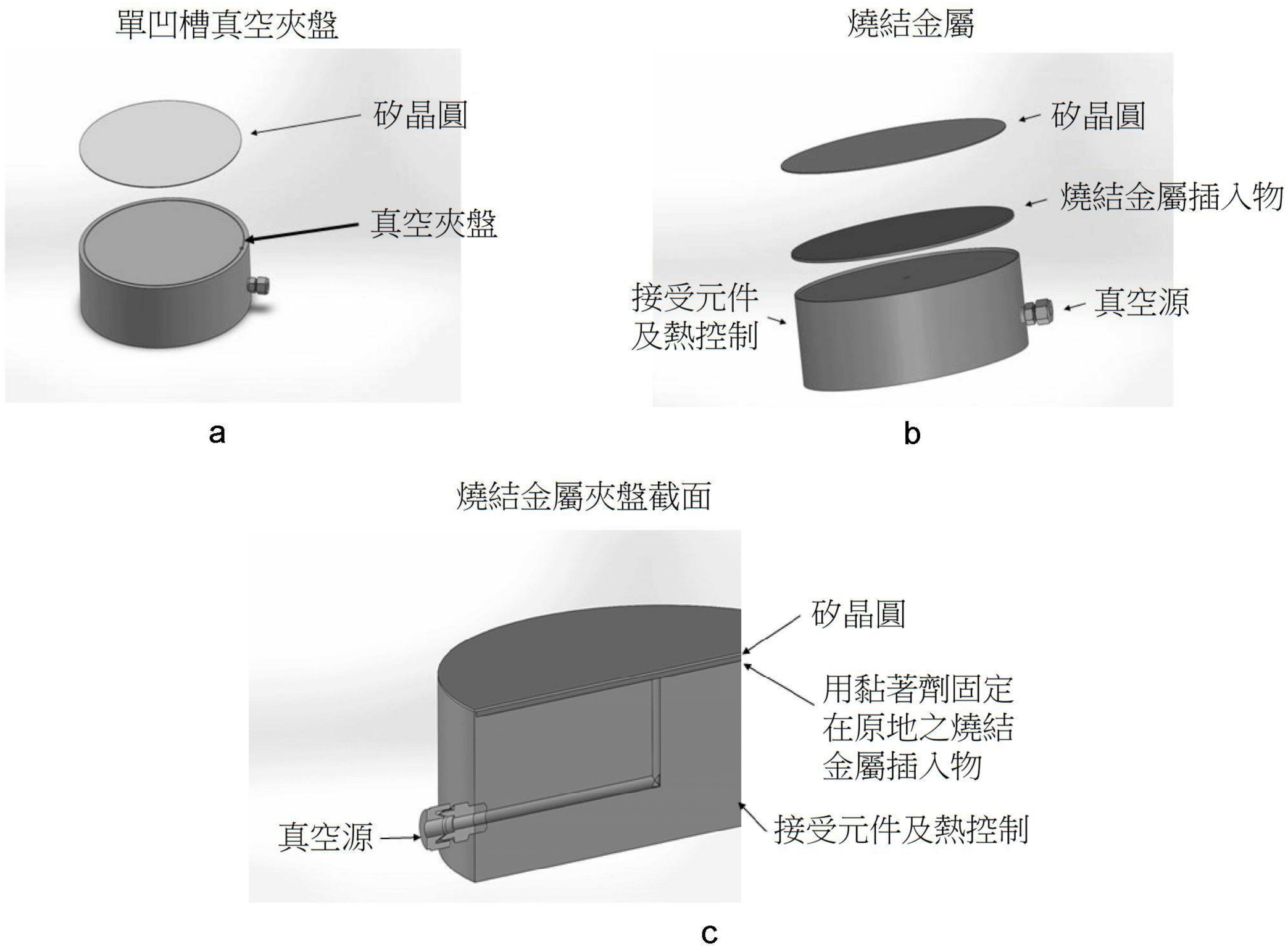
方法工作流程


噴墨印刷頭
砂漆刷(PBR)
數位合成
添加聚合酶鏈組裝(PCA)試劑
雜交
PCA
密封SNR
打開SNR
添加錯誤校正試劑
錯誤校正
密封SNR
打開且分裂
PCR+分子條碼
打開SNR
添加品質控制(QC)引子
PCR
密封SNR
添加聚合酶鏈反應(PCR)引子晶圓
打開SNR
QC釋放
定序
運送
彙集
彙集且轉移
密封SNR

【圖8】

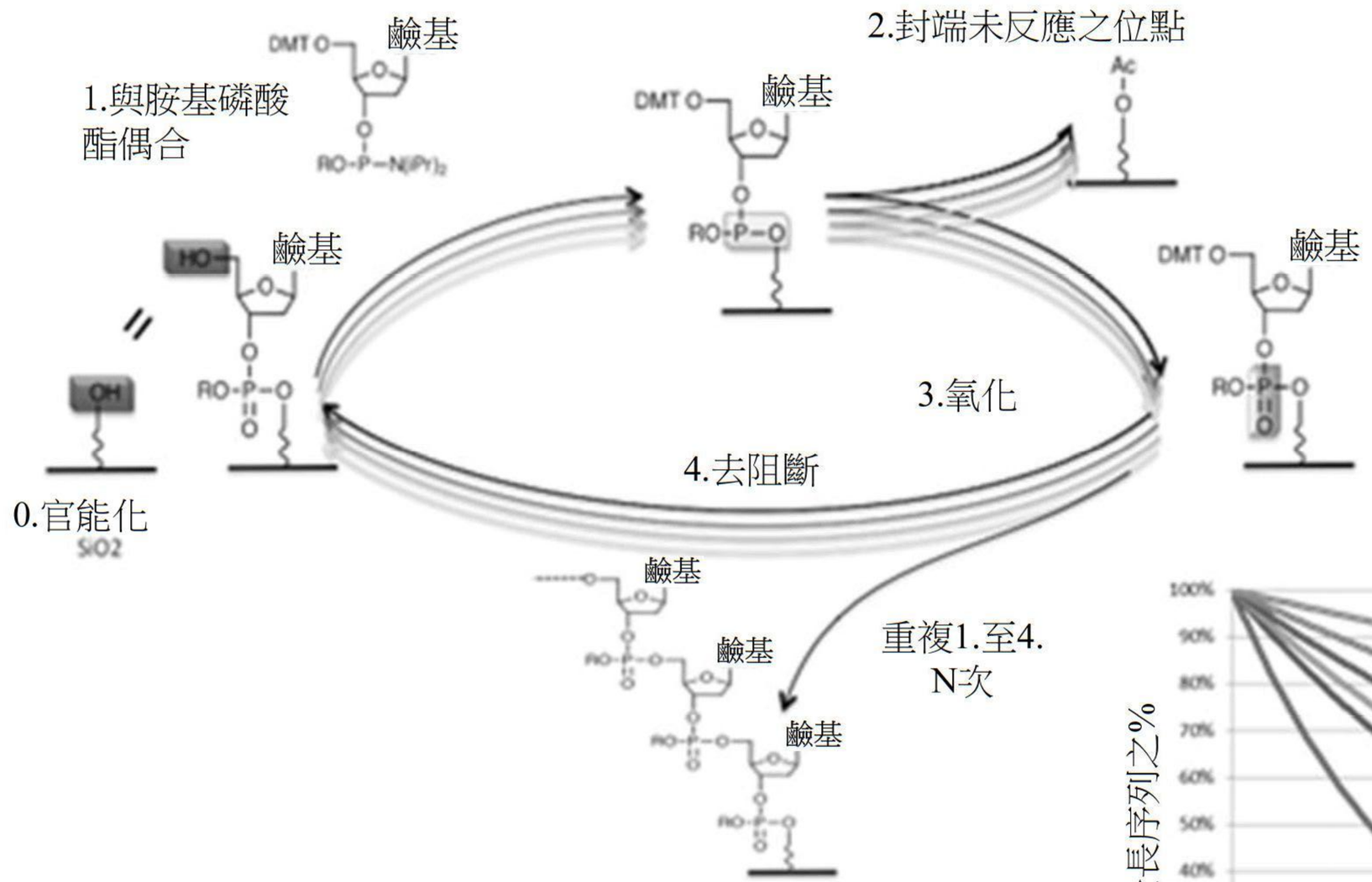


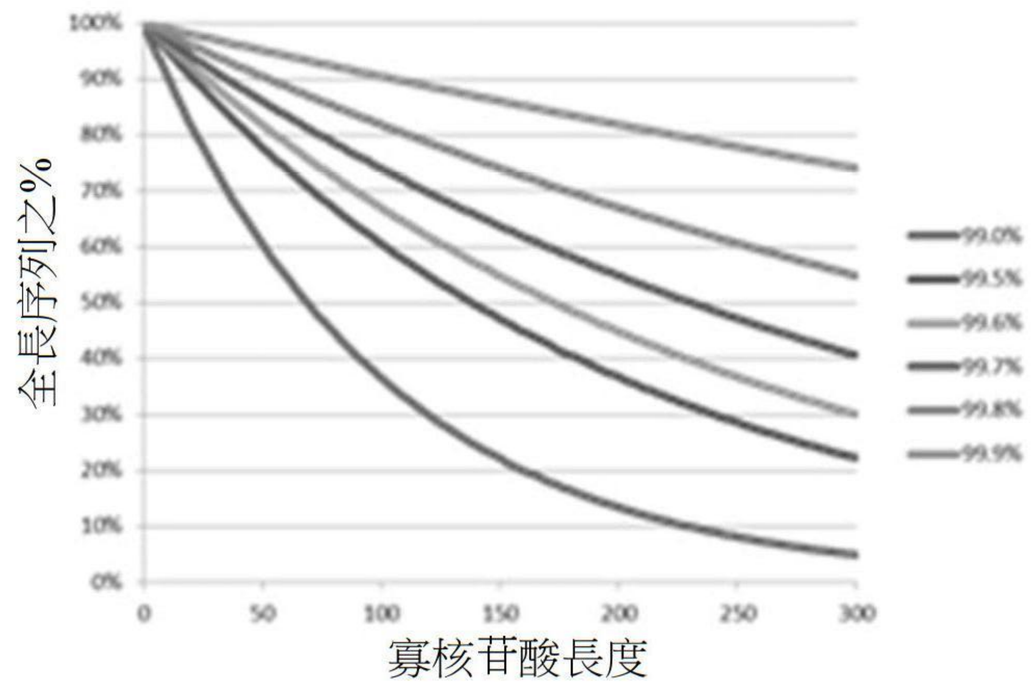
【圖9】


單凹槽真空夾盤
矽晶圓
真空夾盤
a
燒結金屬
矽晶圓
燒結金屬插入物
接受元件
及熱控制
真空源
b
燒結金屬夾盤截面
矽晶圓
用黏著劑固定
在原地之燒結
金屬插入物
真空源
接受元件及熱控制
c

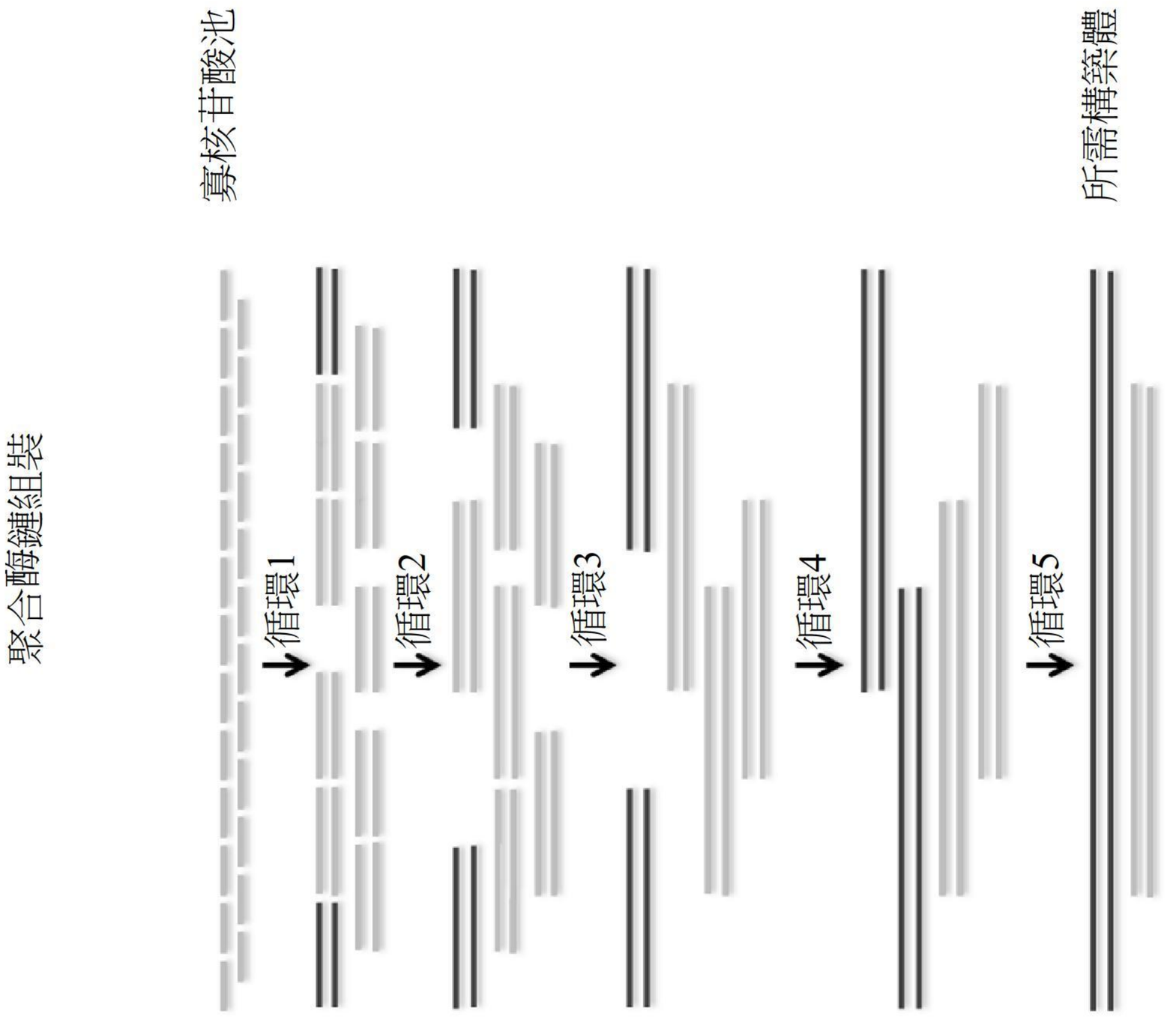
【圖10】

標準胺基磷酸酯化學方法

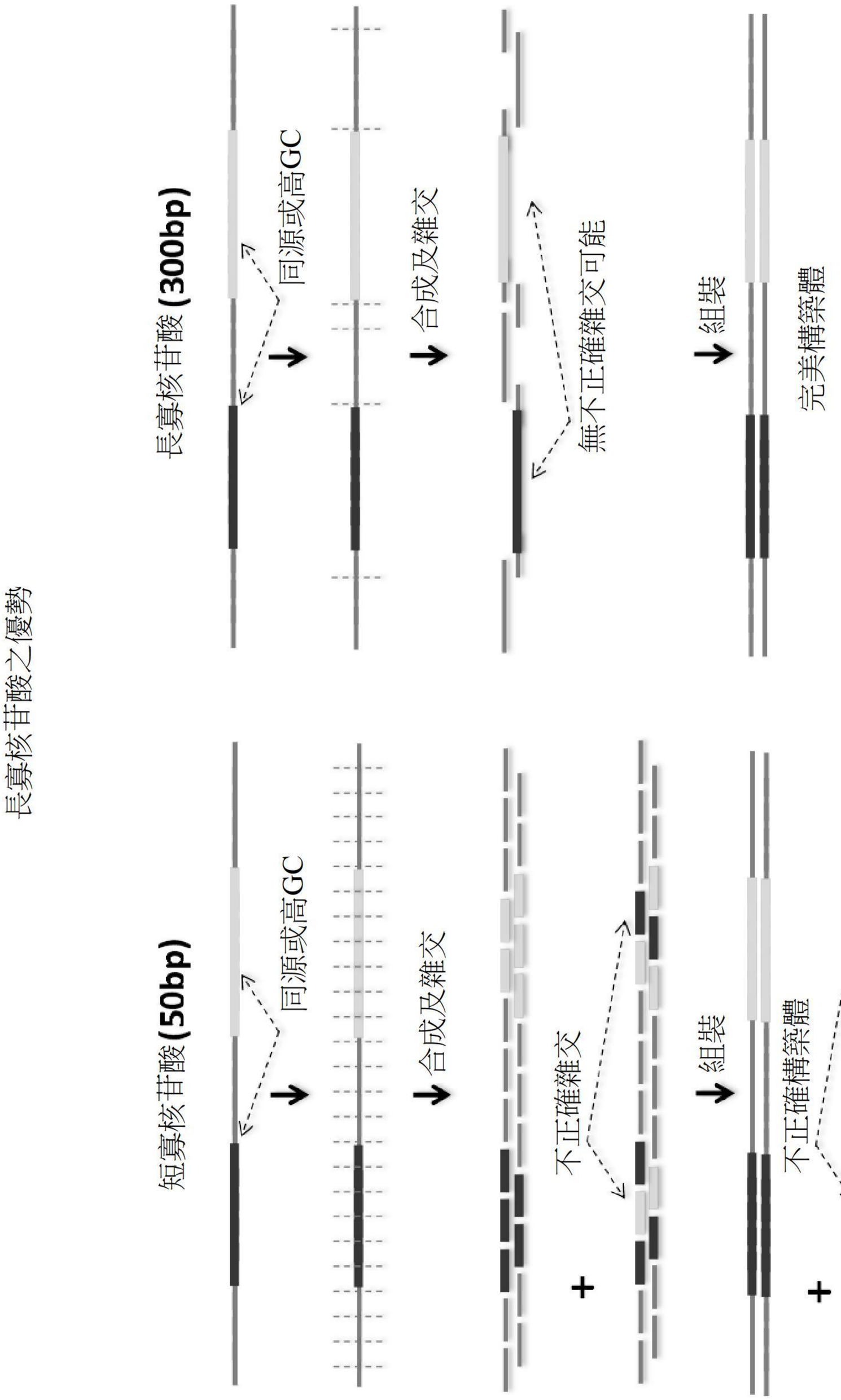




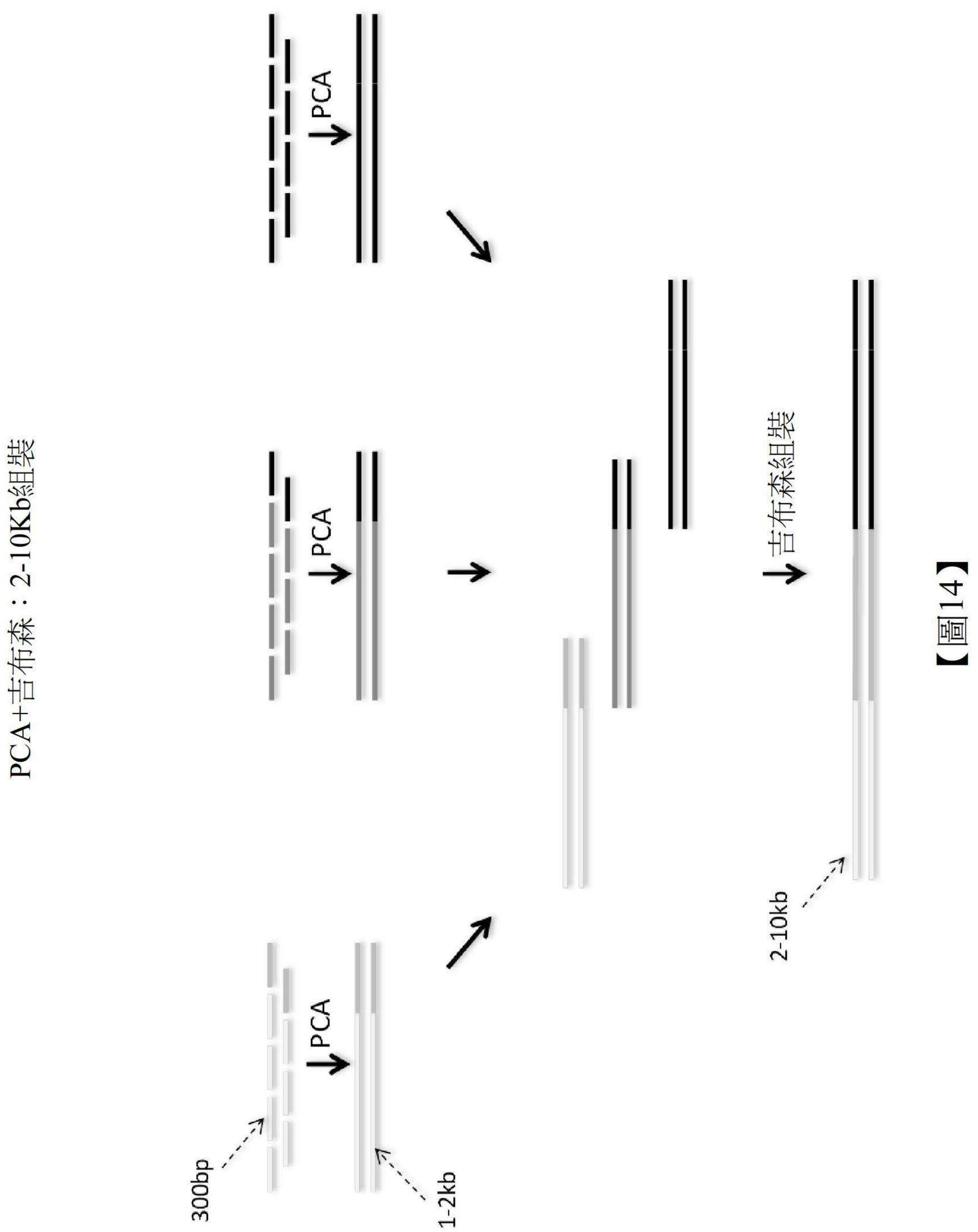
【圖11】



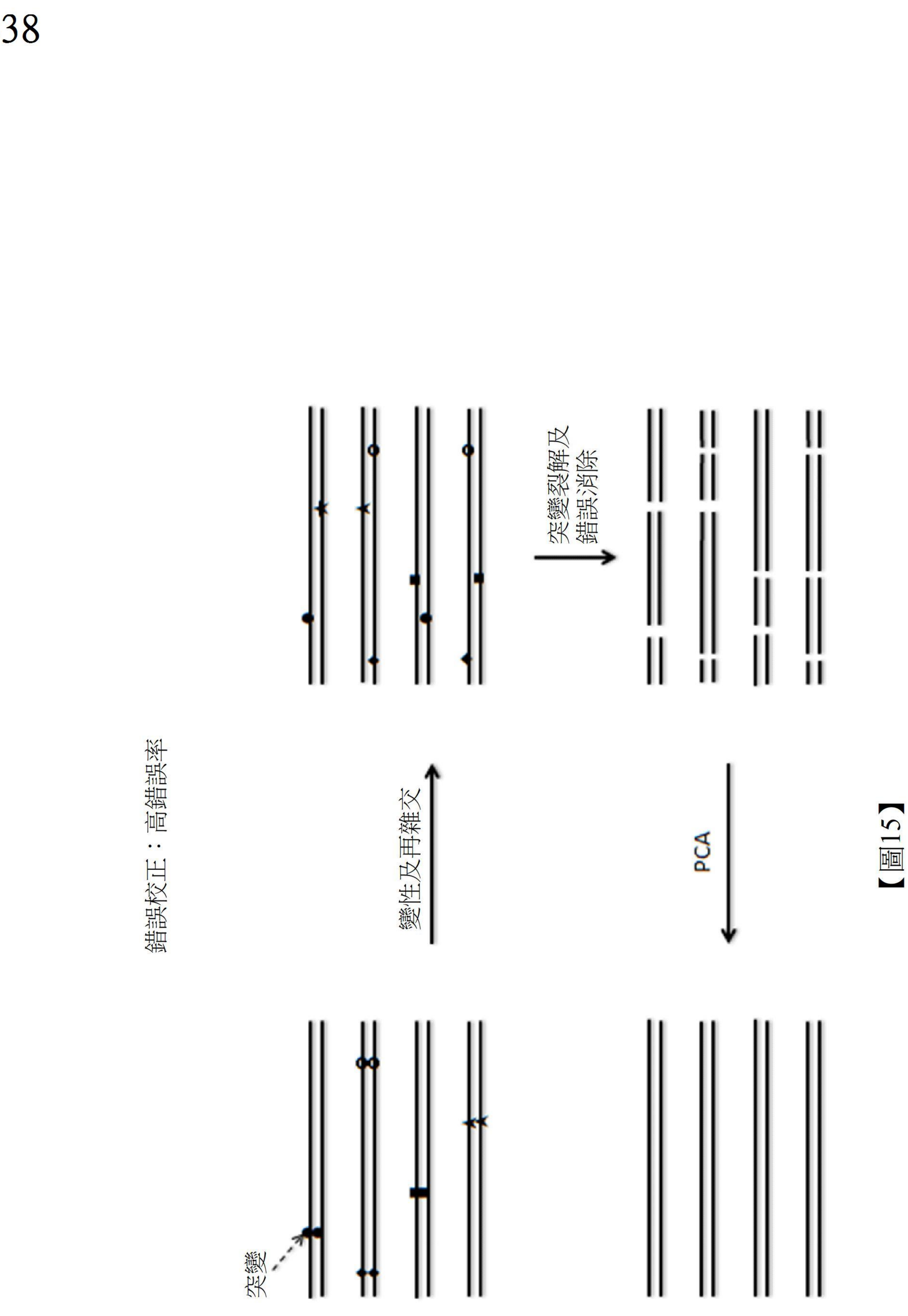
【圖12】


長寡核苷酸 (300bp)
同源或高GC
合成及雜交
無不正確雜交可能
組裝
完美構築體
長寡核苷酸之優勢
短寡核苷酸 (50bp)
同源或高GC
合成及雜交
不正確雜交
+
組裝
不正確構築體
+

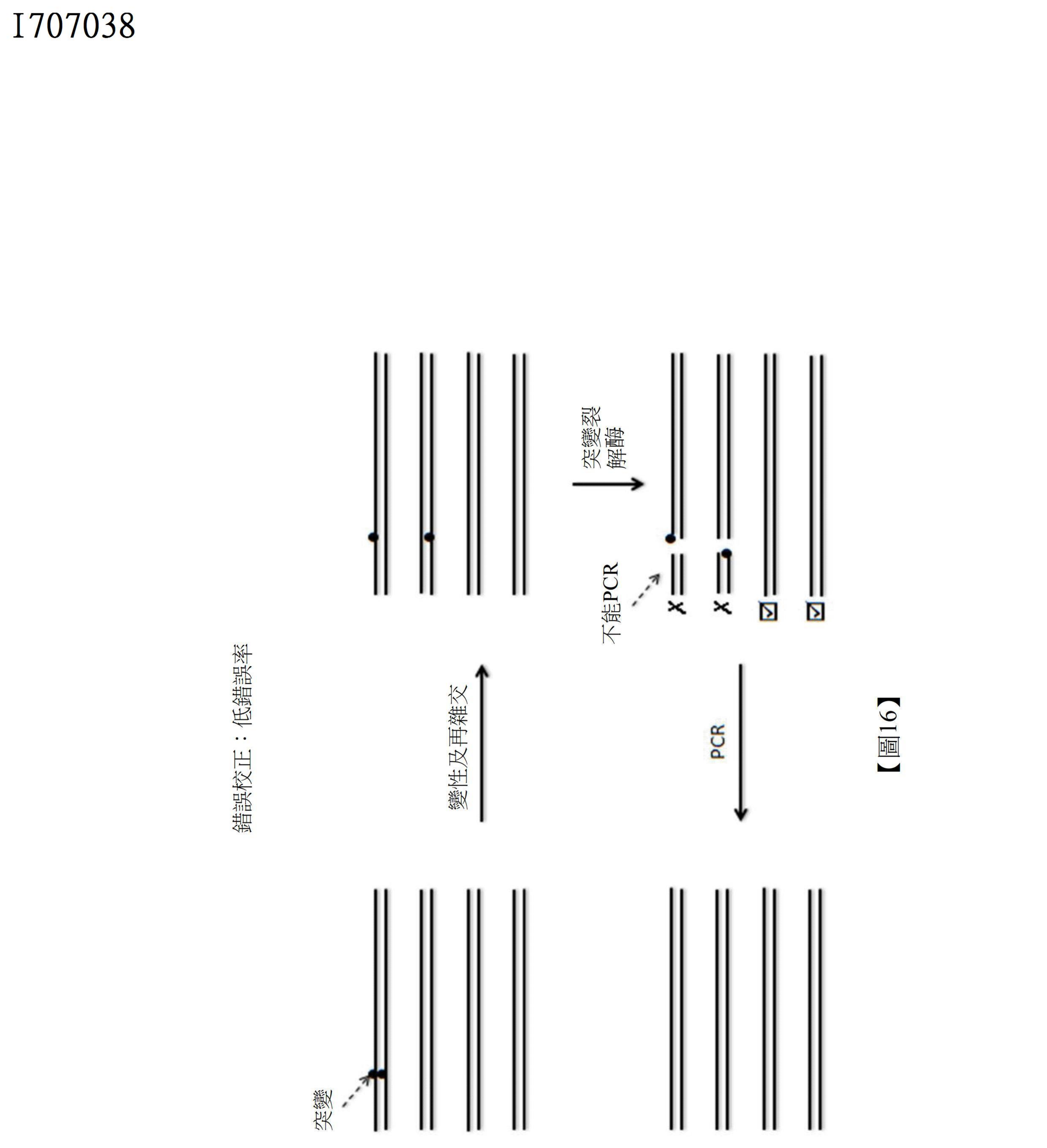
【圖13】



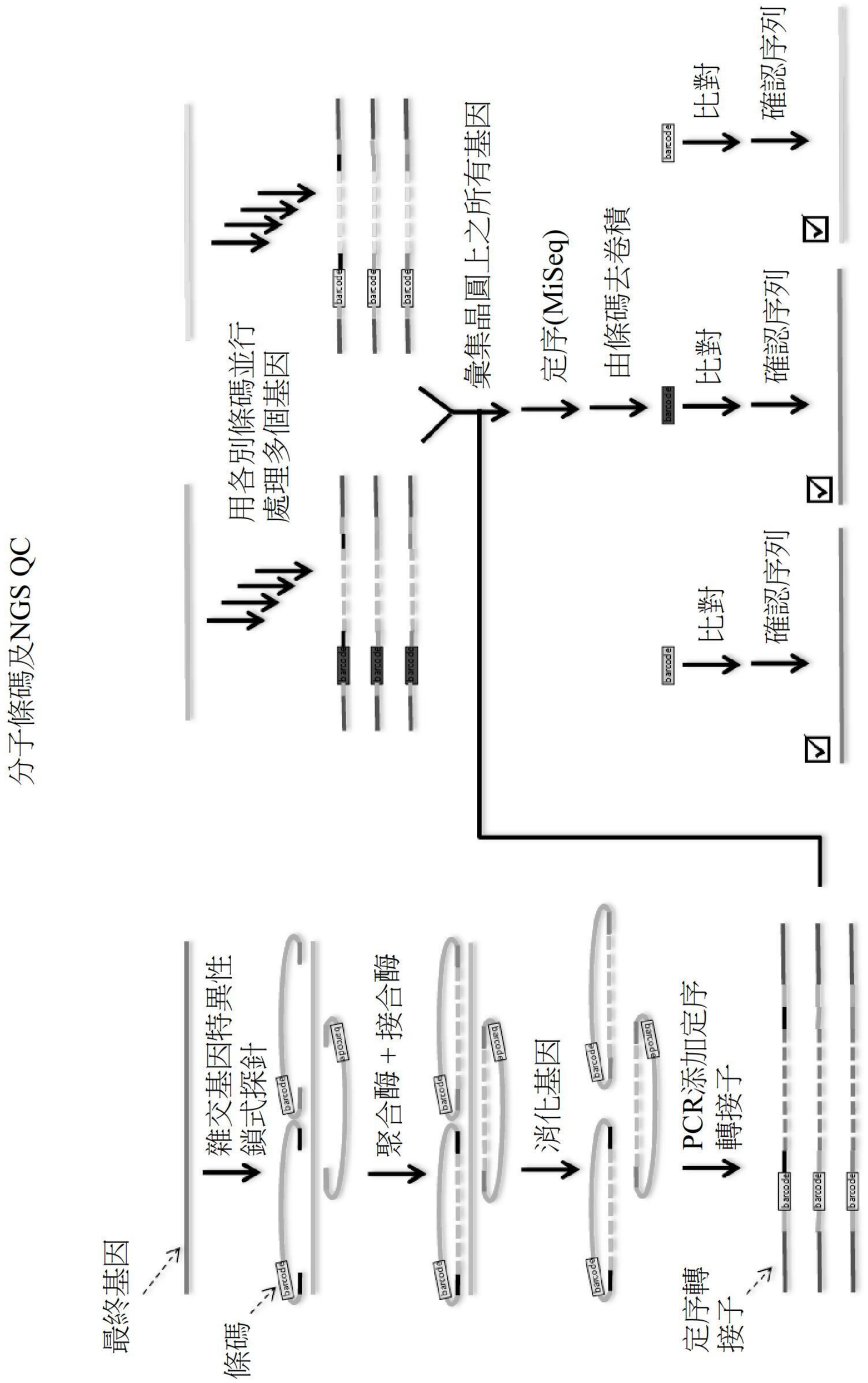
【圖14】



【圖15】

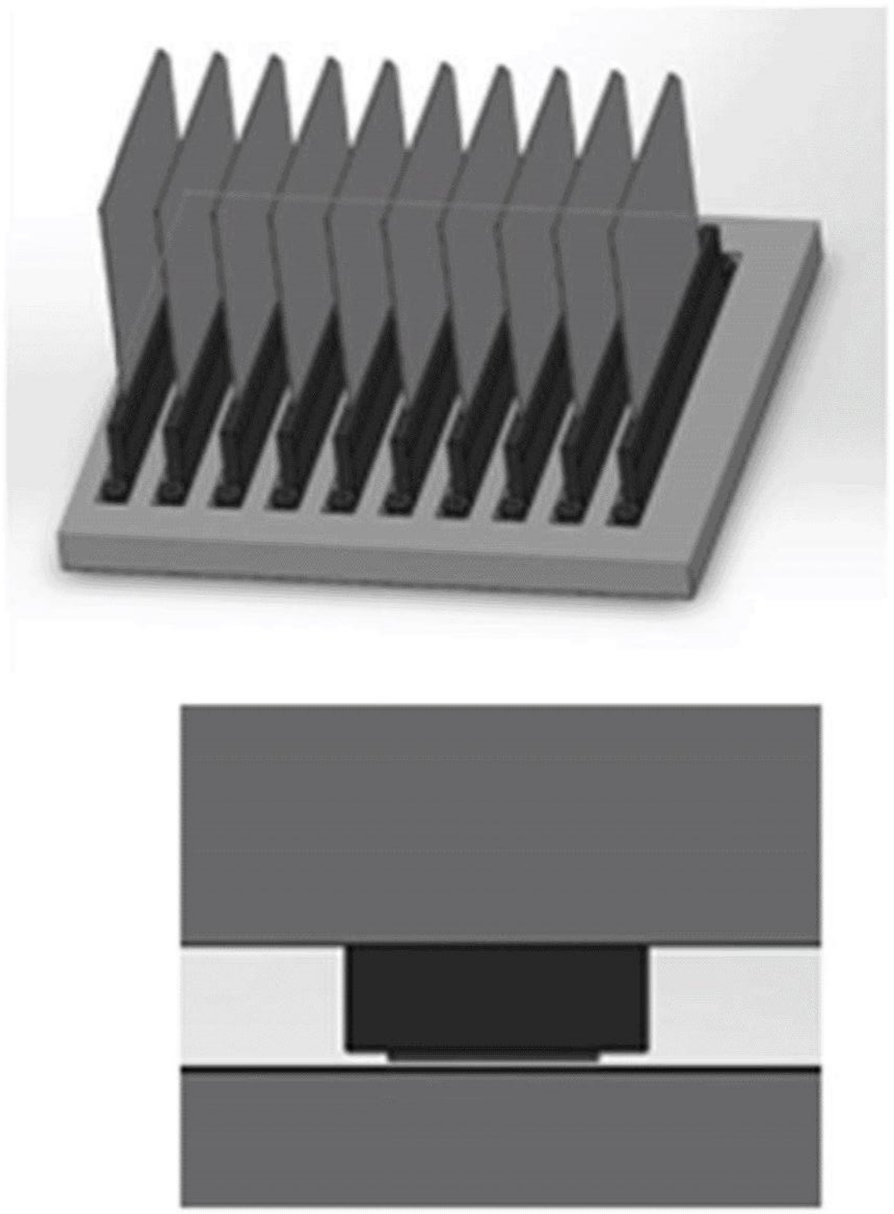


【圖16】


分子條碼及NGS QC
最終基因
雜交基因特異性
鎖式探針
聚合酶 + 接合酶
消化基因
PCR添加定序
轉接子
條碼
定序轉
接子
用各別條碼並行
處理多個基因
彙集晶圓上之所有基因
定序(MiSeq)
由條碼去卷積
比對
確認序列
barcode

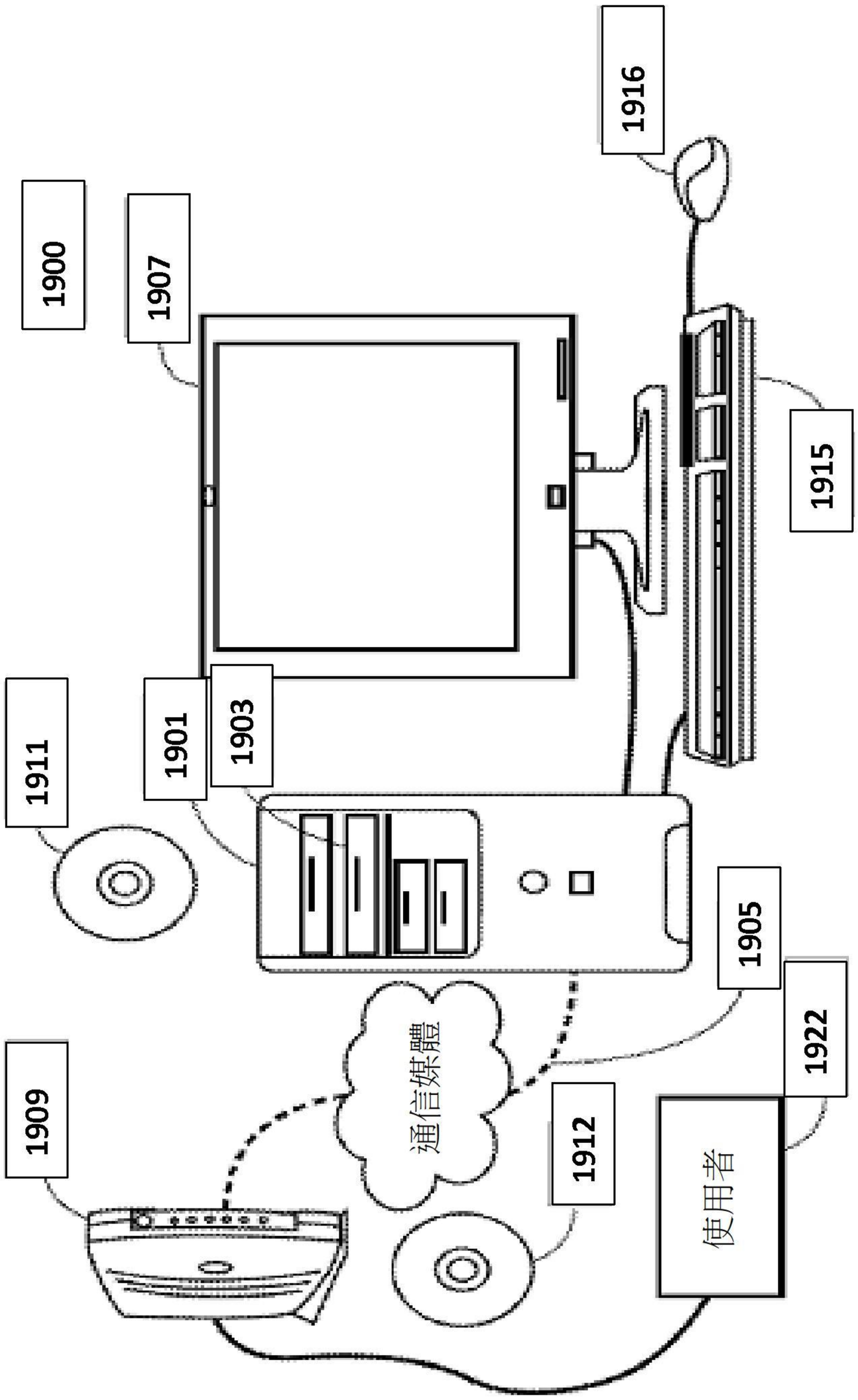
【圖17】

噴墨總成

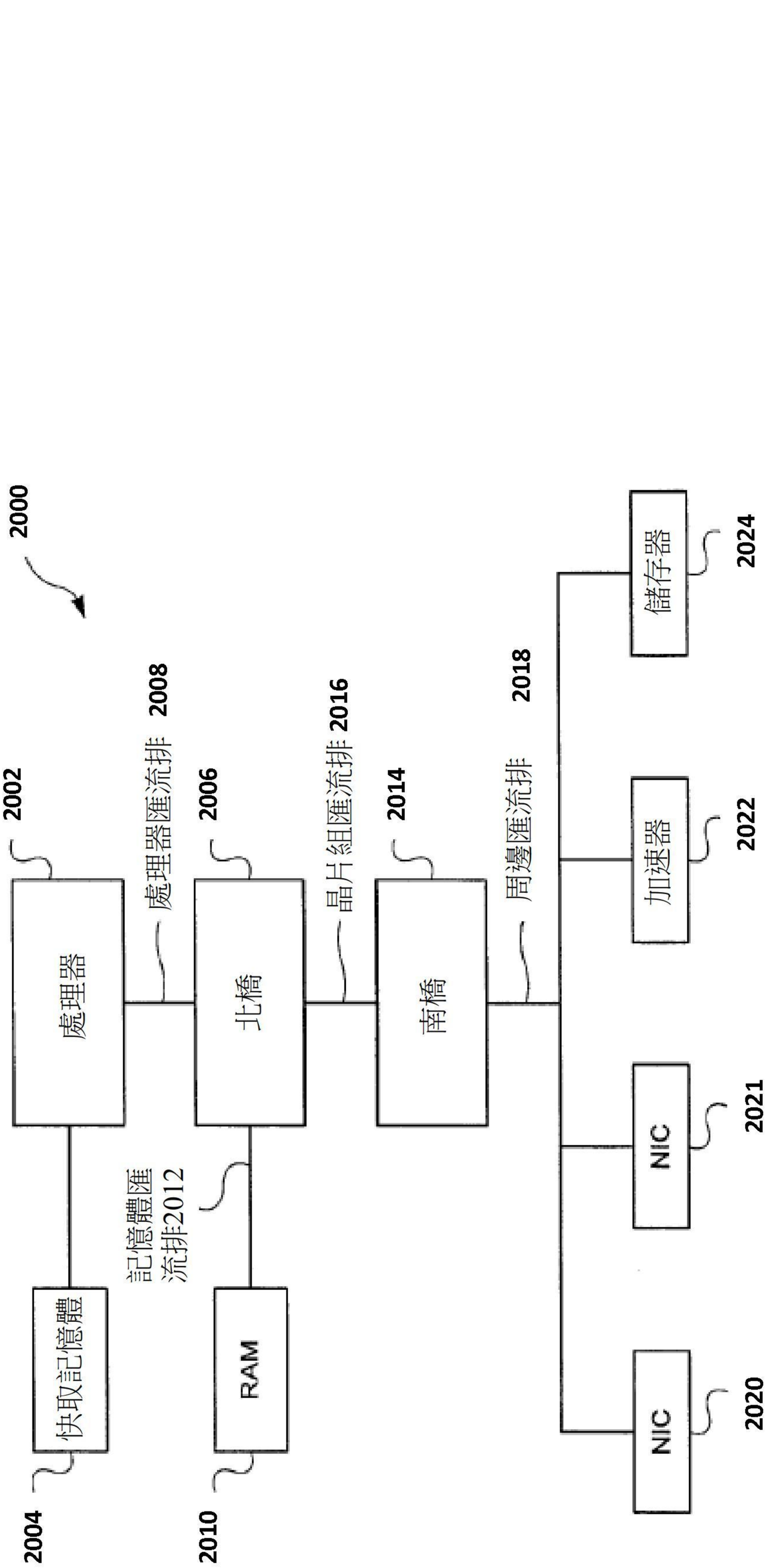


- 10個頭之噴墨總成
- 噴墨頭具有含在254 μm中心之256個噴嘴的矽孔板
- 100微米飛行高度
- 每一頭可進入橫越的每一孔

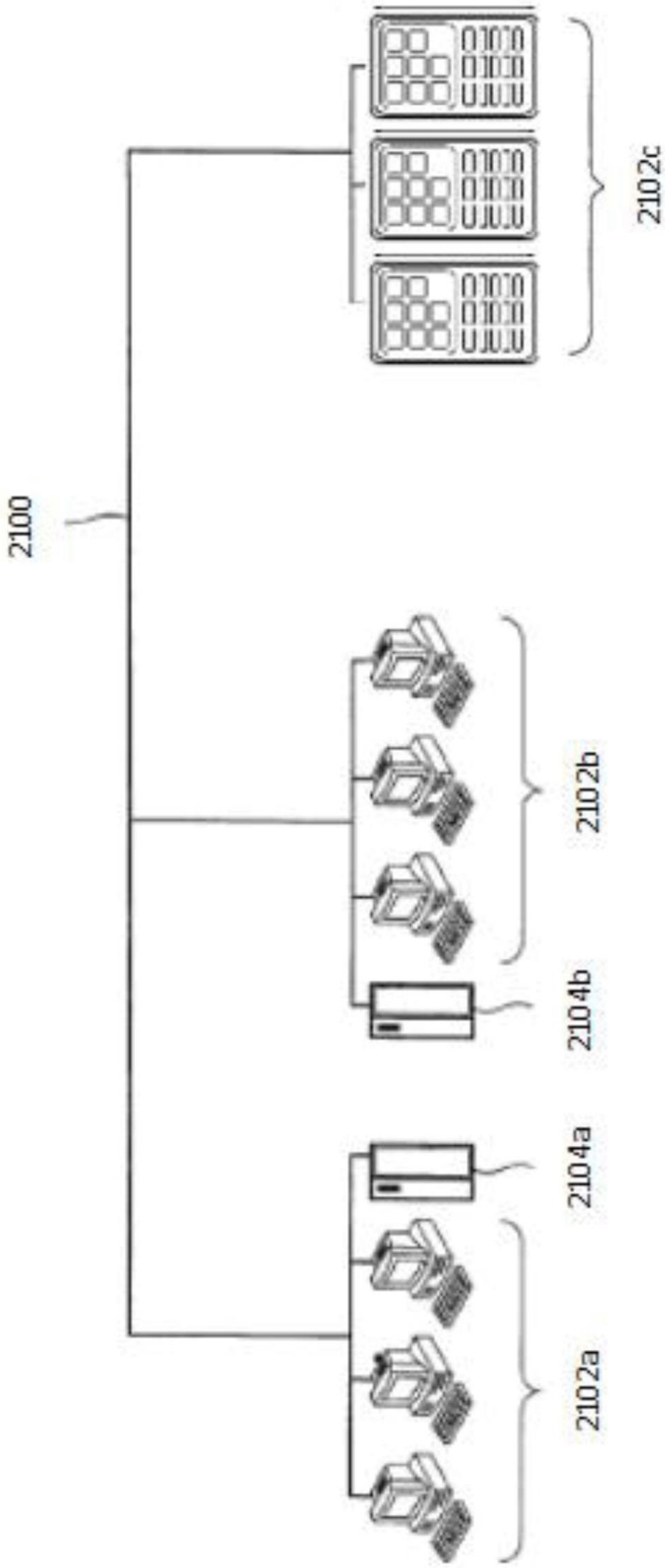
【圖18】


1900
1907
1916
1915
1911
1901
1903
1905
1909
通信媒體
1912
使用者
1922

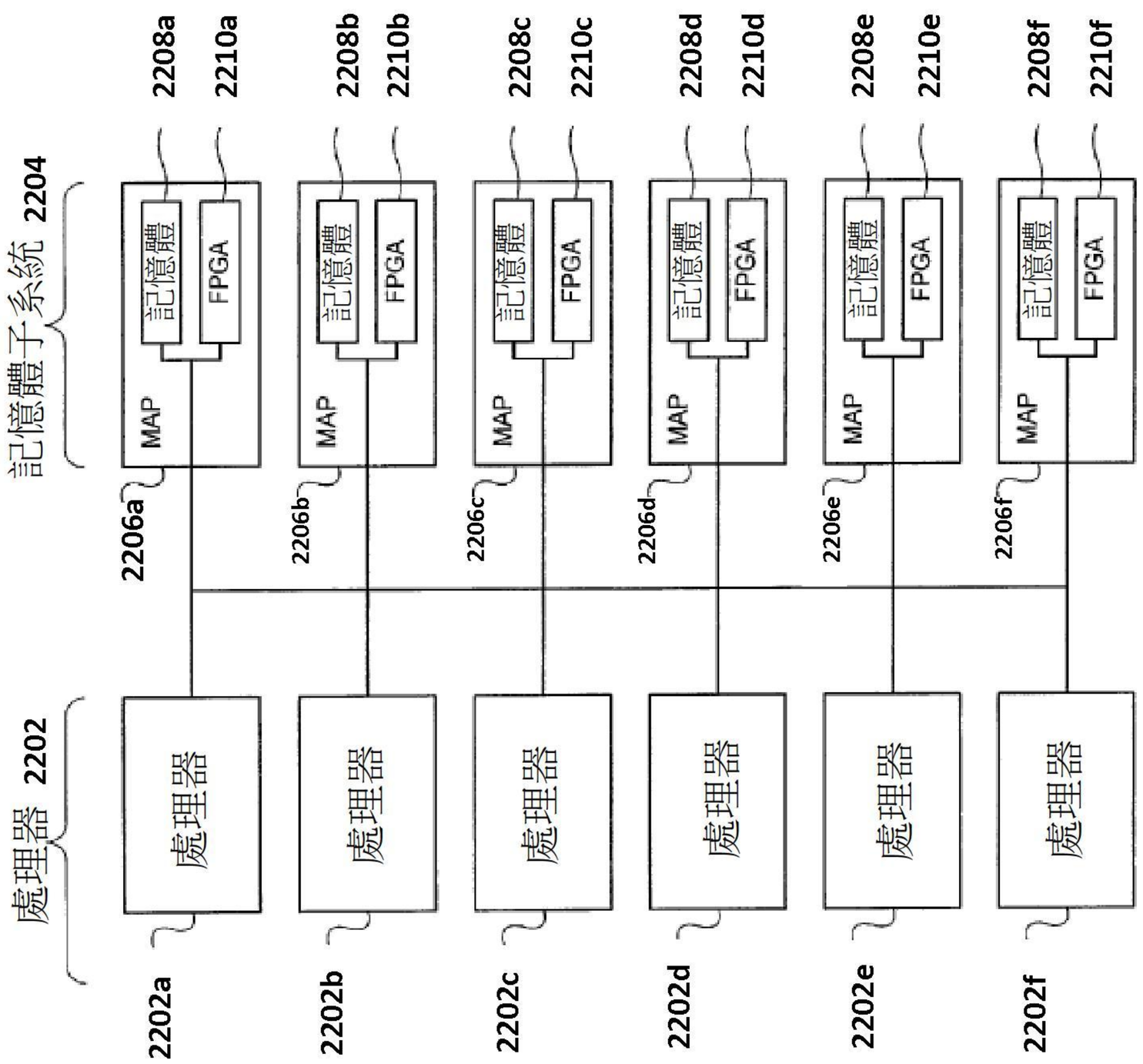
【圖19】


2000
處理器
2002
處理器匯流排
2008
北橋
2006
晶片組匯流排
2016
南橋
2014
周邊匯流排
2018
儲存器
2024
加速器
2022
NIC
2021
NIC
2020
快取記憶體
2004
記憶體匯流排2012
RAM
2010

【圖20】



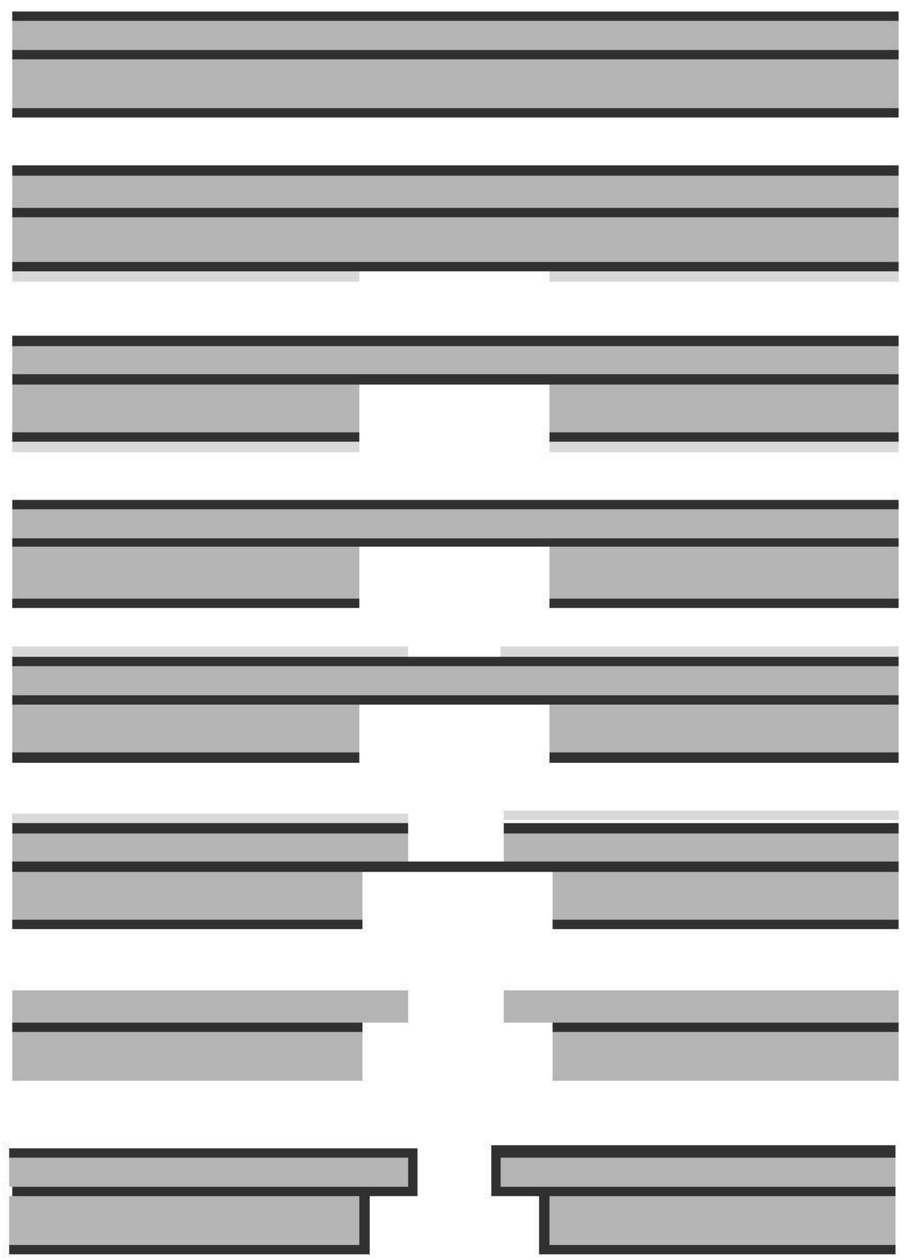
【圖21】


記憶體子系統 2204
處理器 2202
2206a
2206b
2206c
2206d
2206e
2206f
MAP
記憶體
FPGA
2208a
2208b
2208c
2208d
2208e
2208f
2210a
2210b
2210c
2210d
2210e
2210f
處理器
2202a
2202b
2202c
2202d
2202e
2202f

【圖22】

前端處理

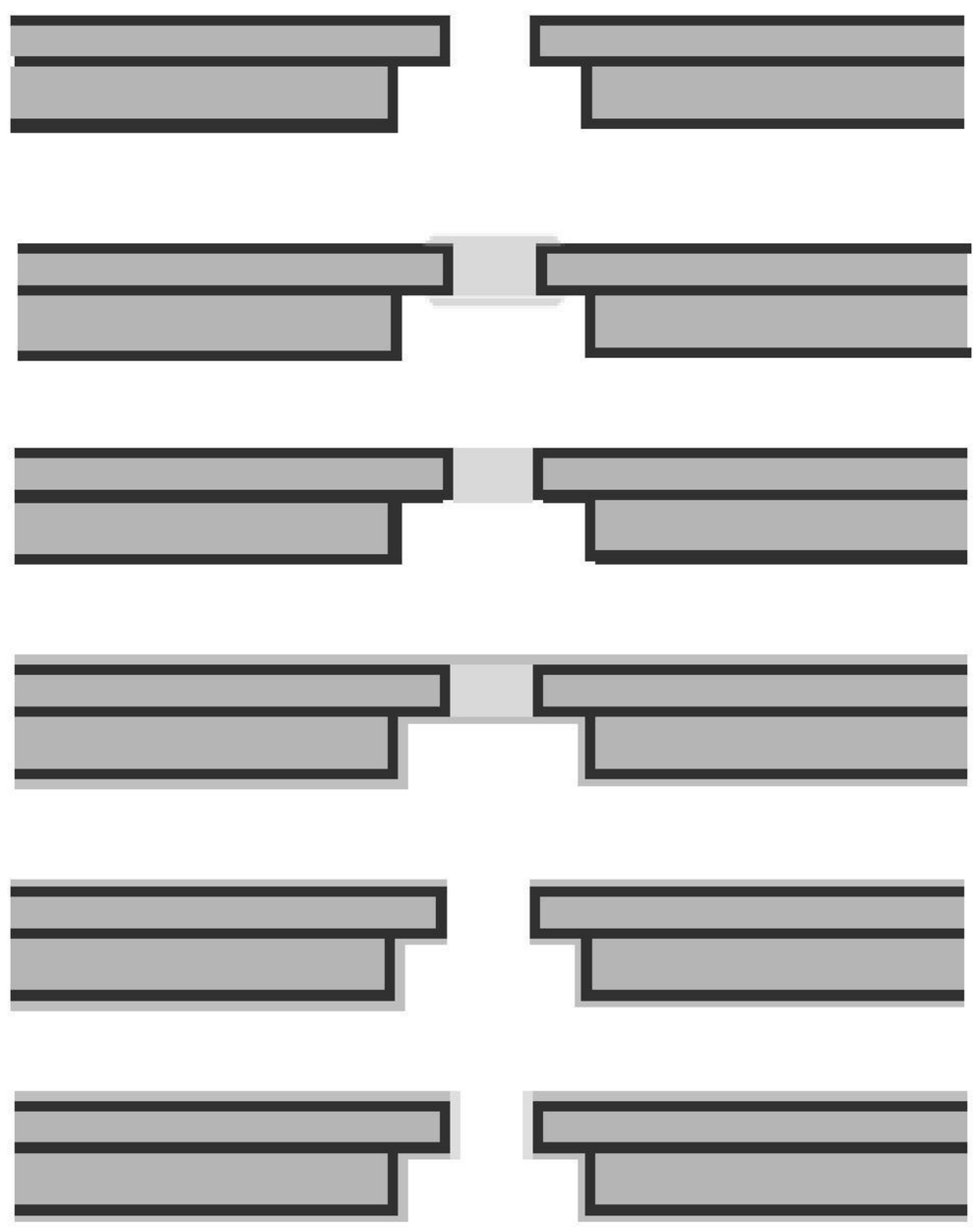
1. 具有氧化物之SOI基板
2. 操作側光刻
3. 操作側深RIE
4. 光阻剝除
5. 裝置側光刻
6. 裝置側深RIE
7. 光阻及氧化物剝除
8. 氧化物生長



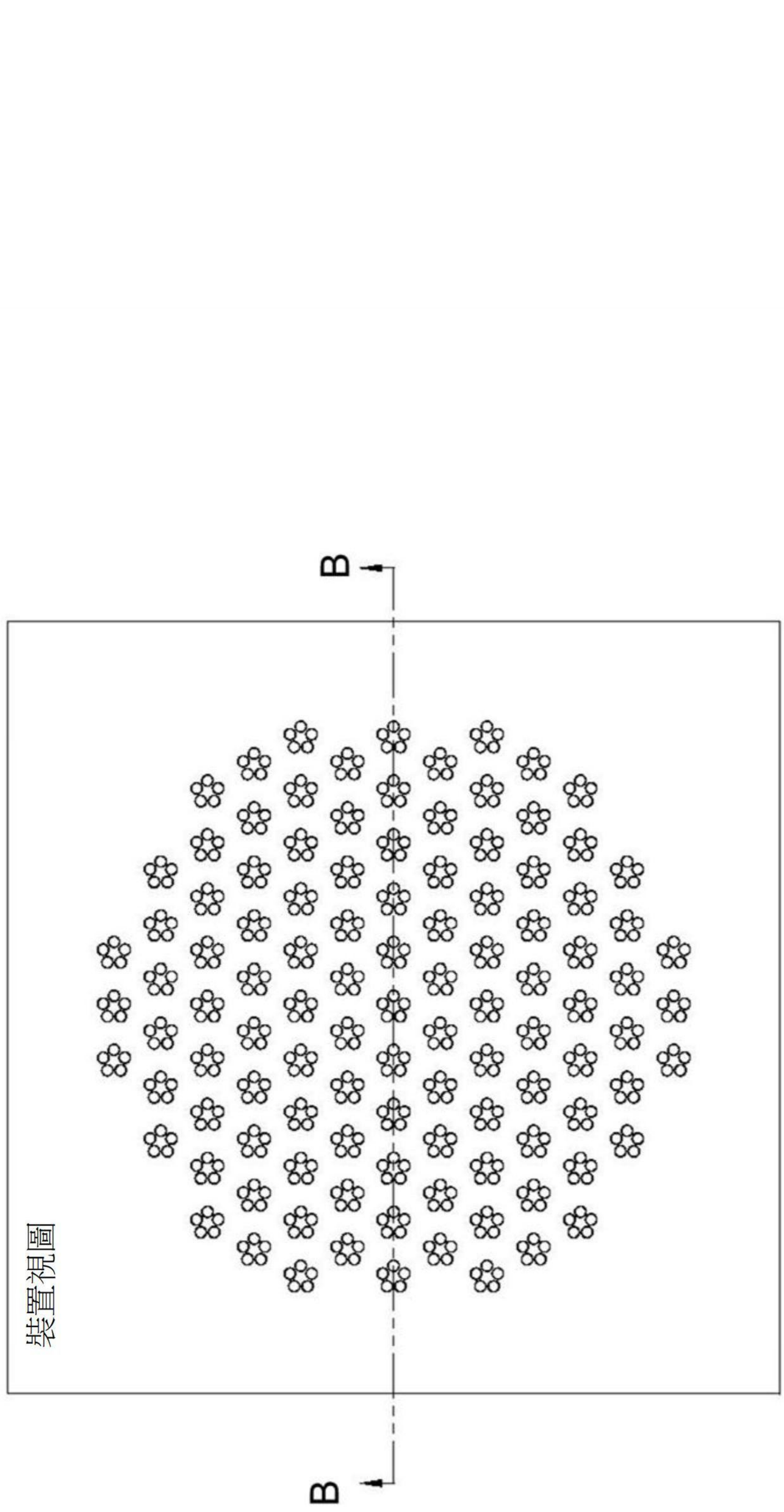
【圖23】

後端處理

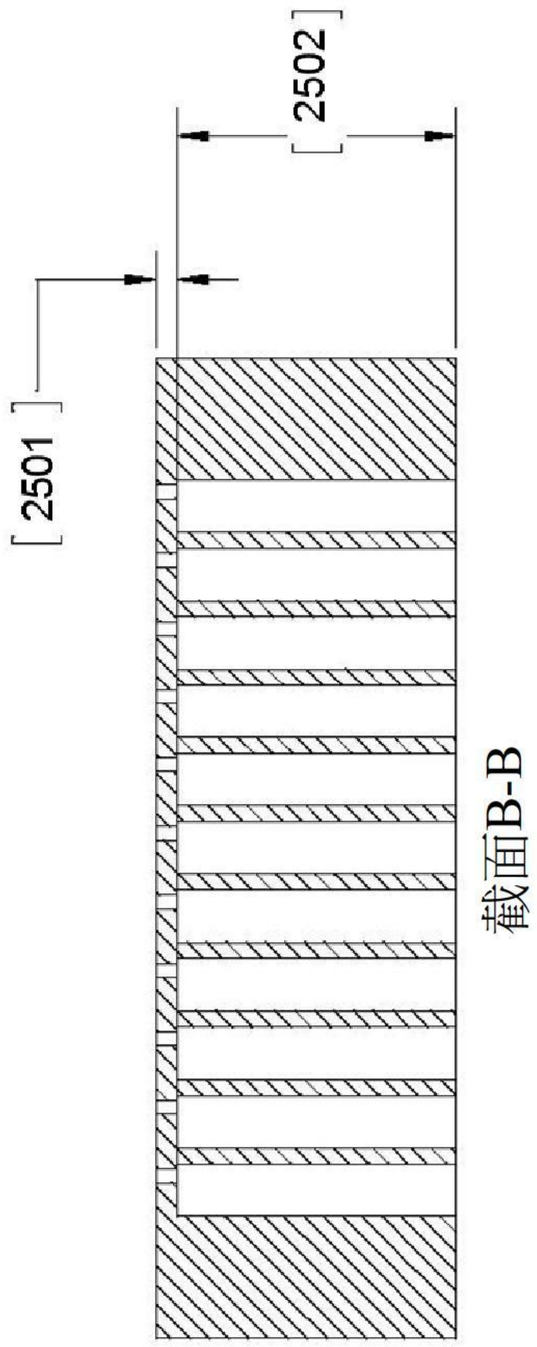
1. 後端處理結果
2. 噴墨光阻
3. 氧電漿回蝕
4. 被動官能化
5. 光阻剝除
6. 主動官能化



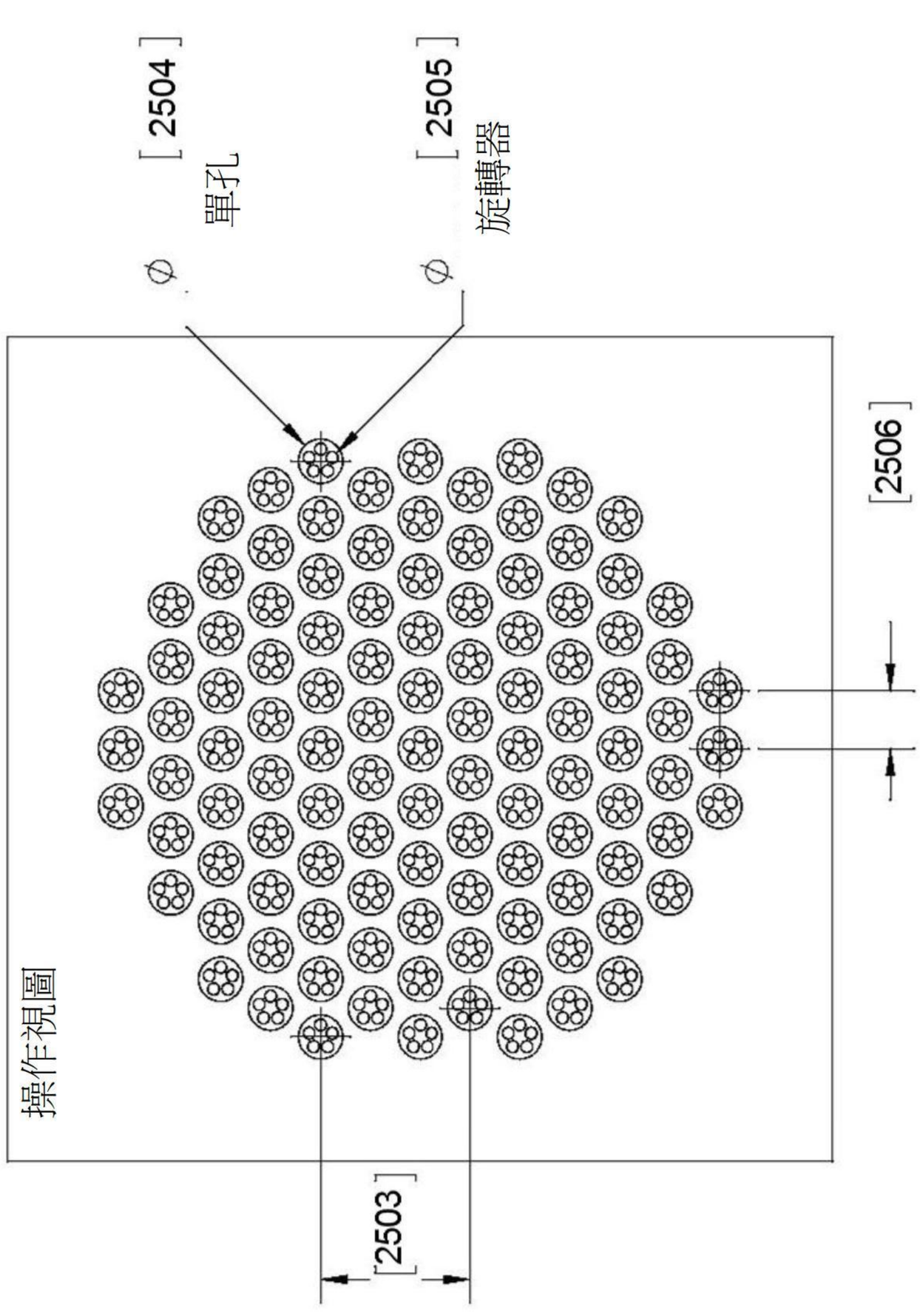
【圖24】



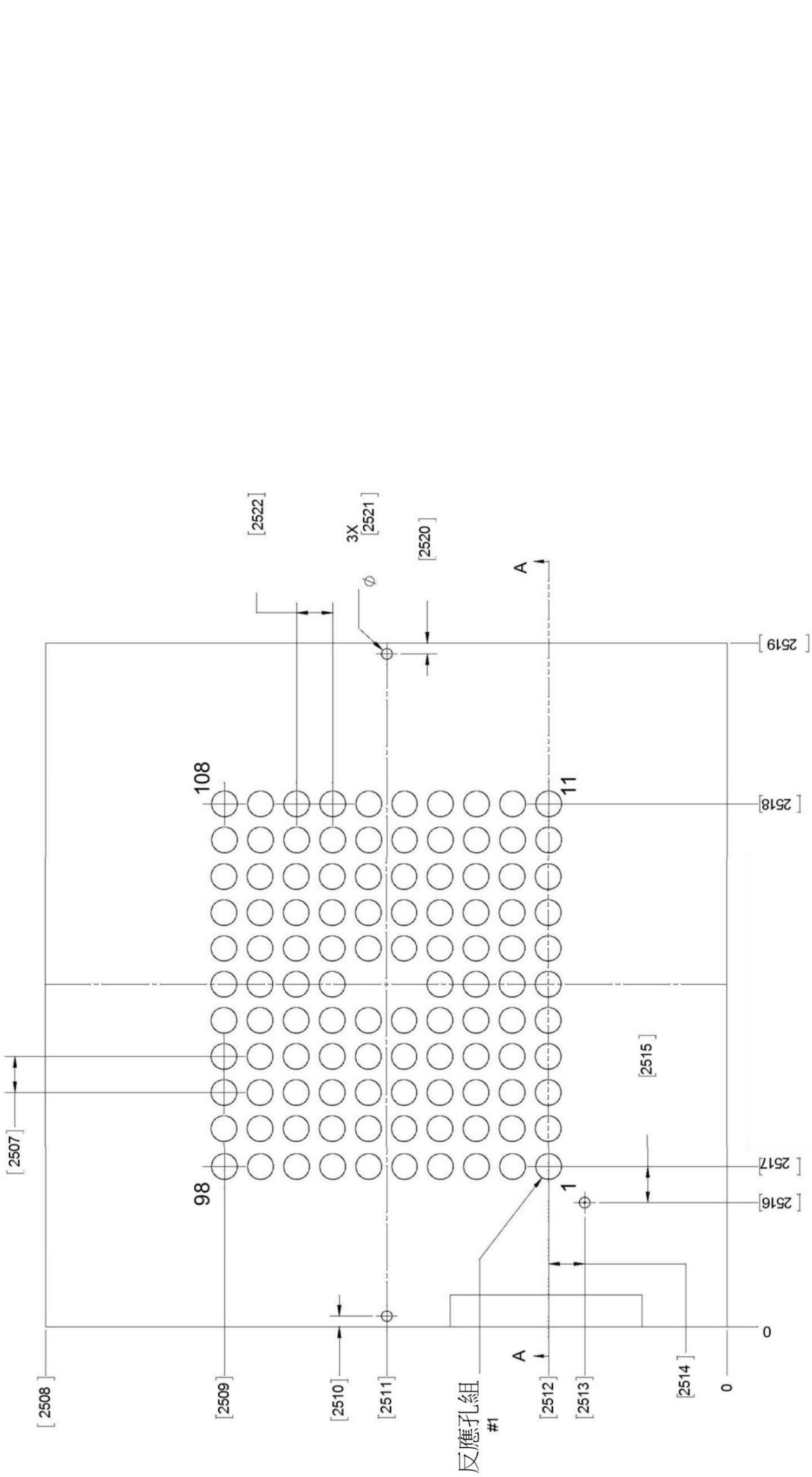
【圖25A】



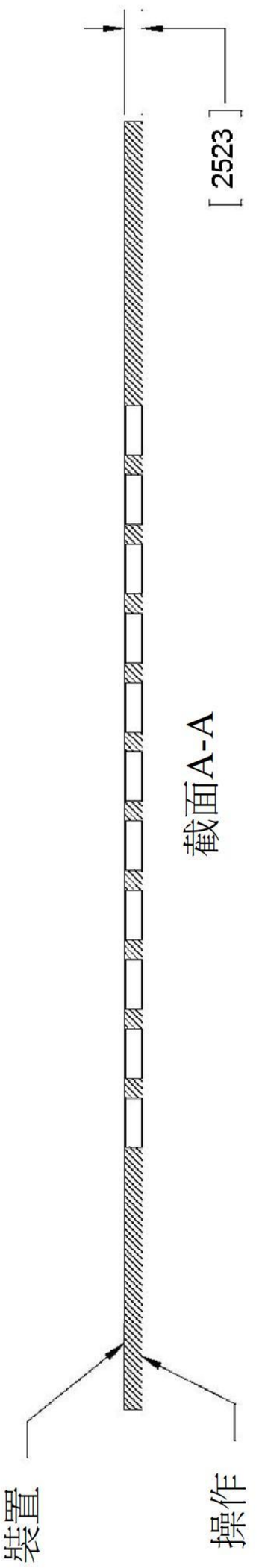
【圖25B】



【圖25C】

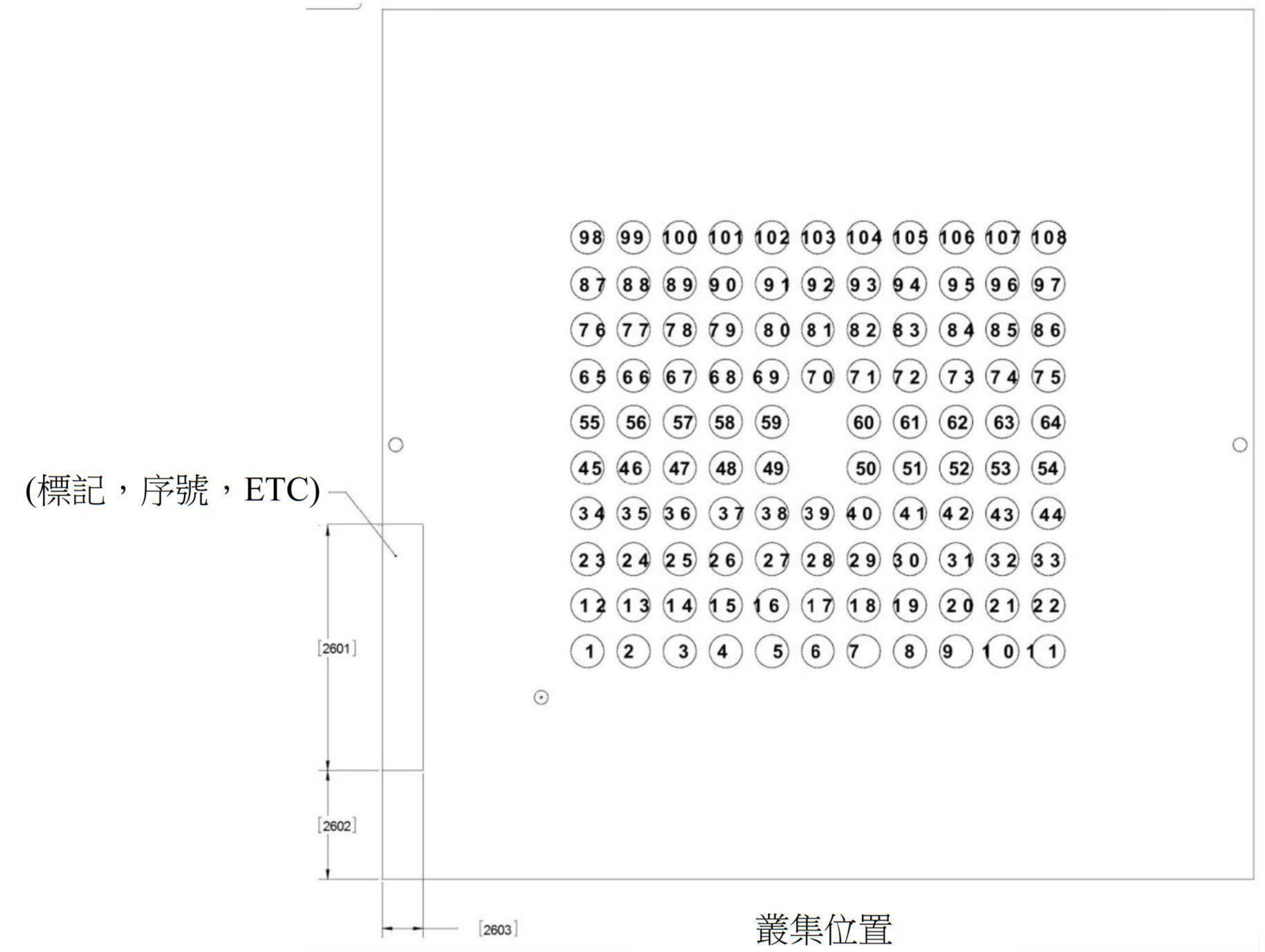

[2522]
3X [2521]
[2520]
A
ϕ
[2519]
[2518]
108
11
[2507]
98
1
[2517]
[2516]
[2515]
0
[2508]
[2509]
[2510]
[2511]
反應孔組
#1
A
[2512]
[2513]
[2514]
0

【圖25D】



【圖25E】

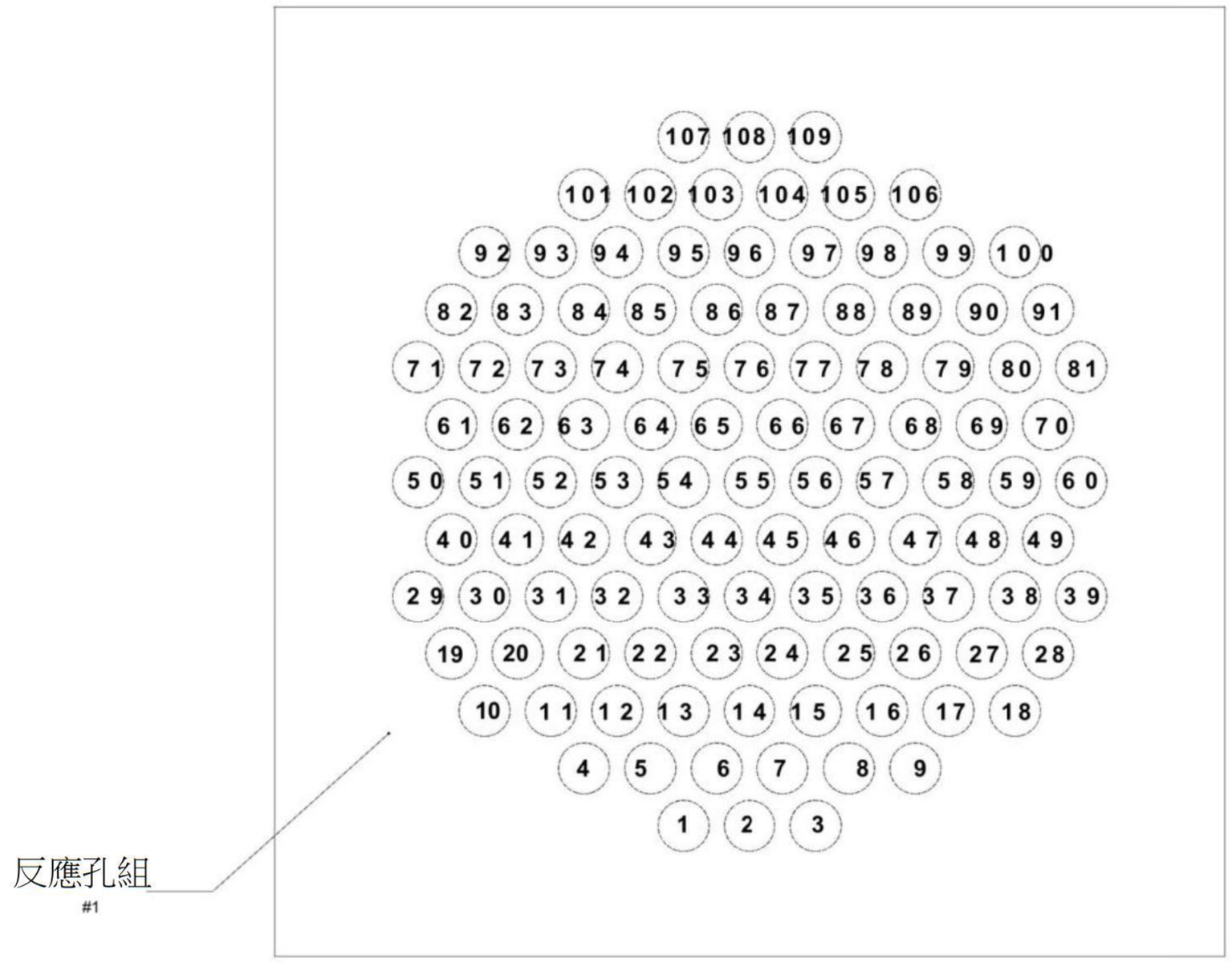
[2523]



叢集位置

(裝置視圖)

【圖25F】

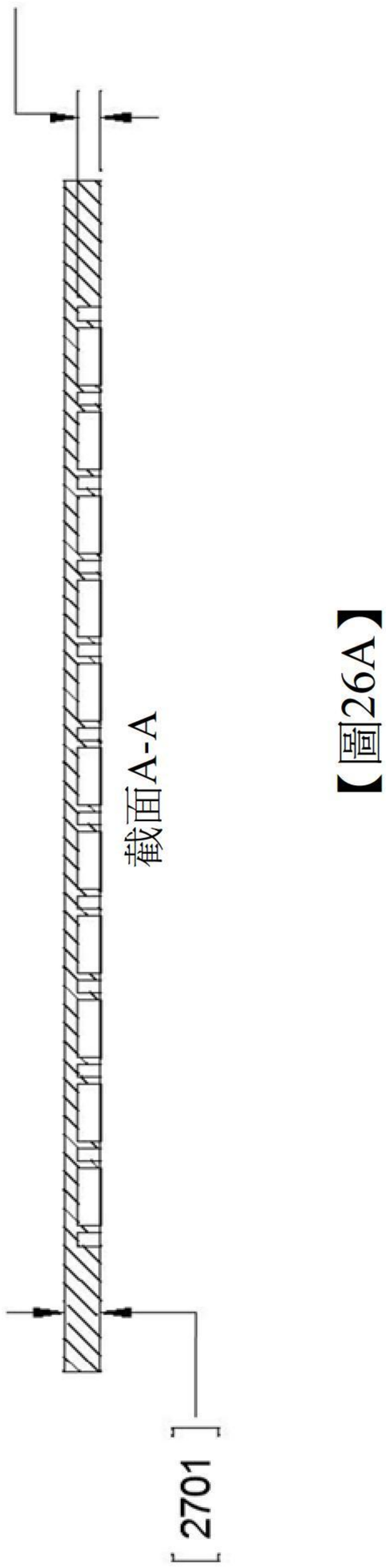


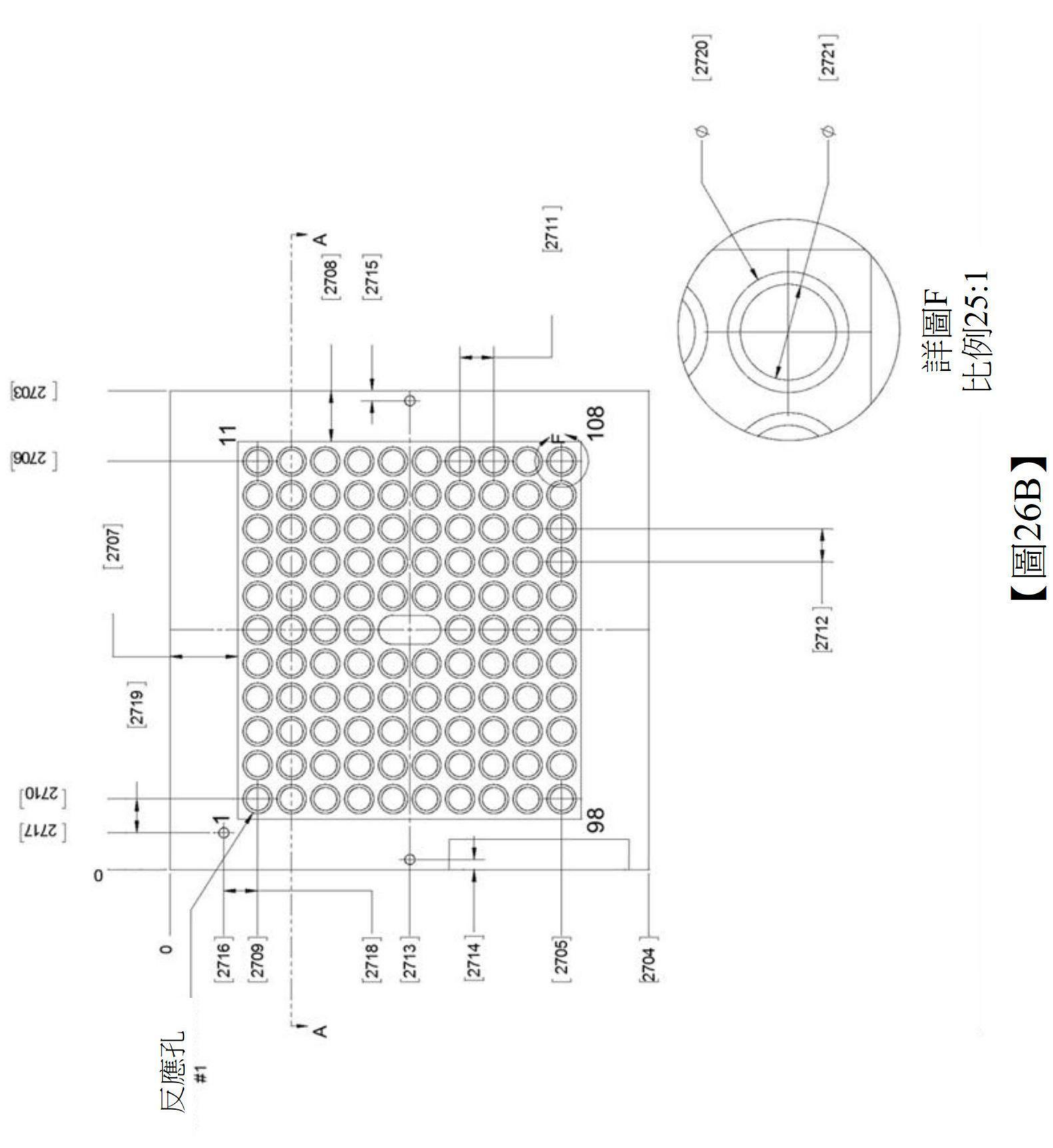
個別叢集內之孔位置

(裝置視圖)

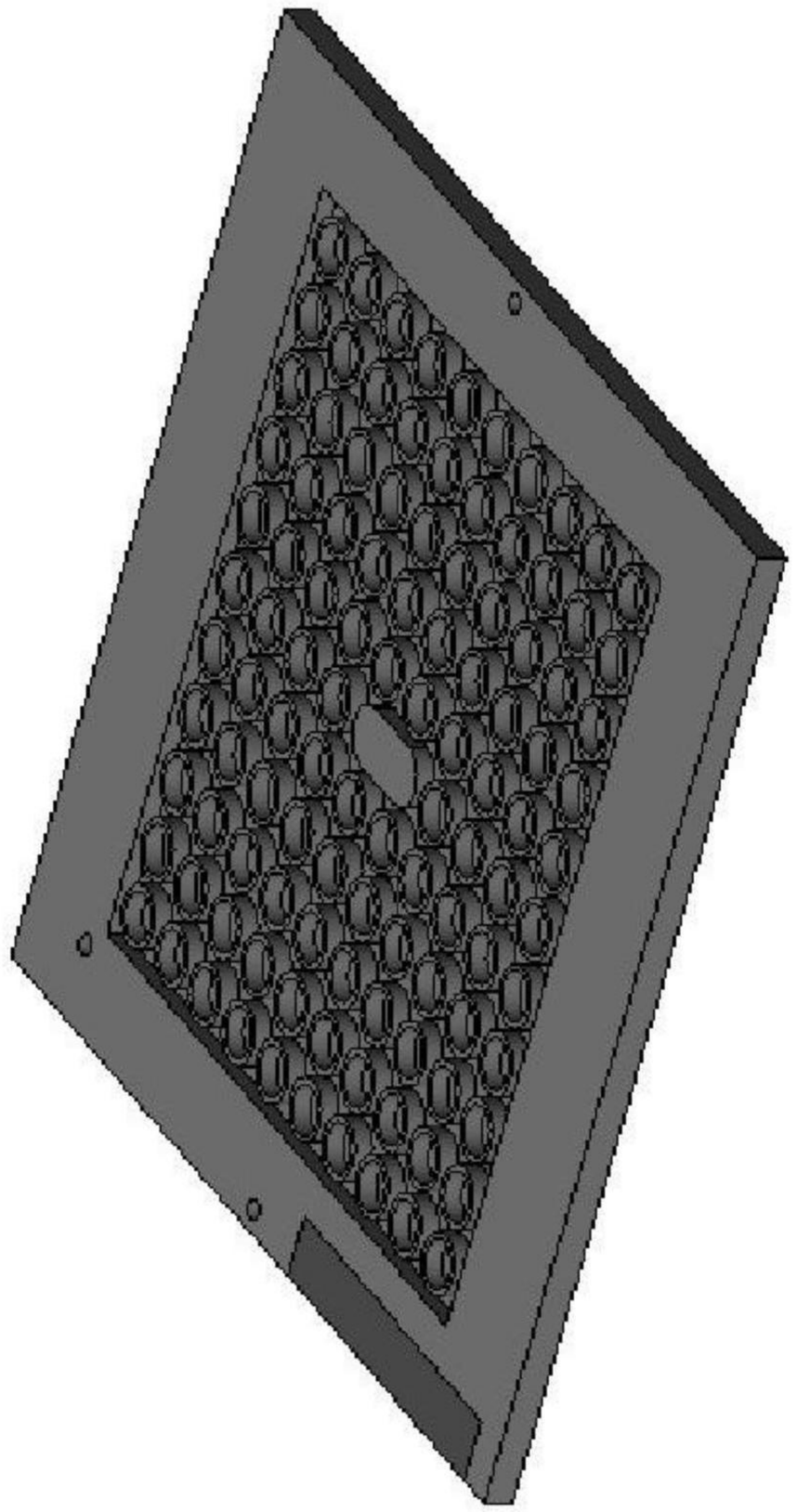
【圖25G】

【圖26A】

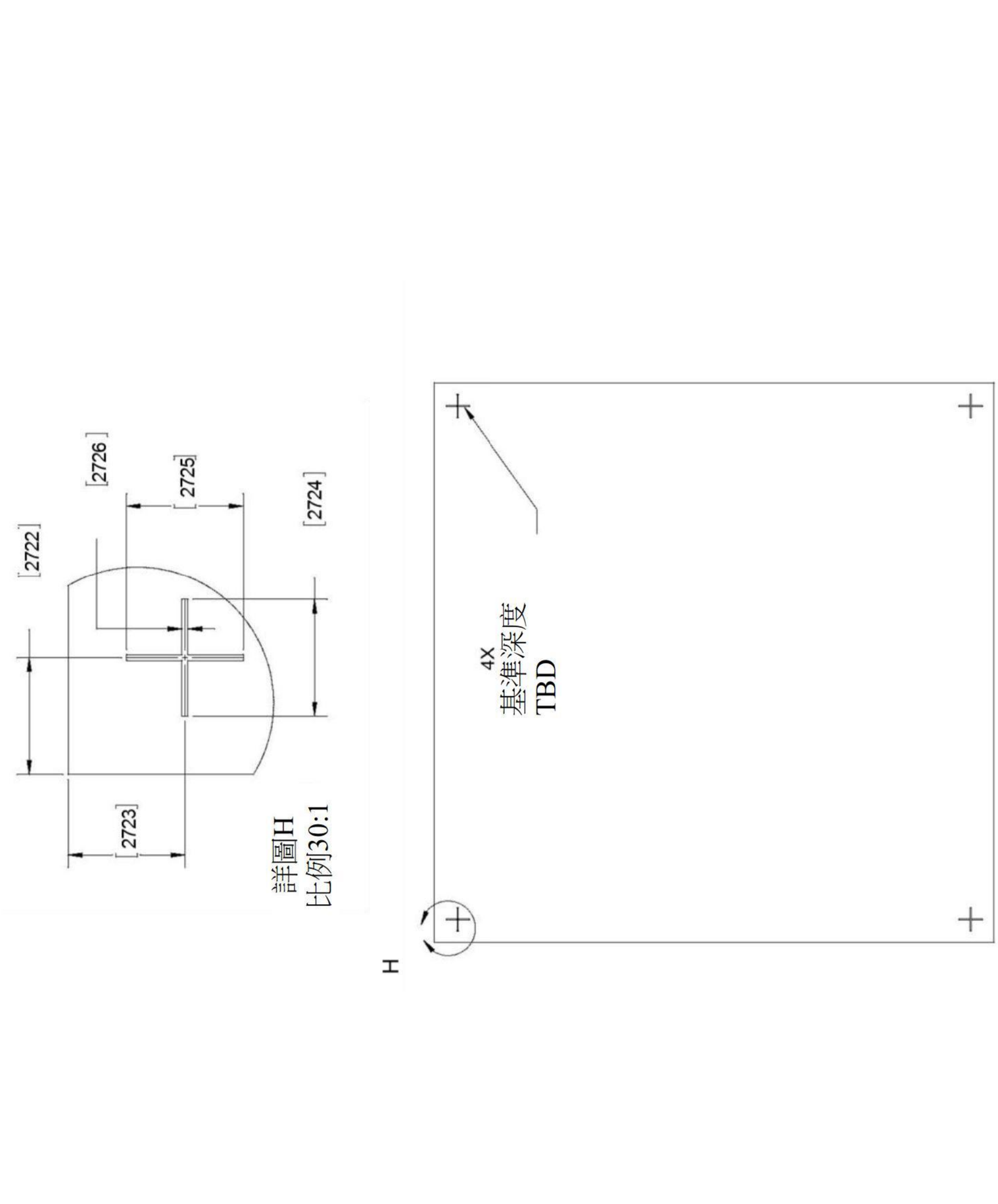



[2720]
[2721]
詳圖F
比例25:1
[2711]
[2708]
[2715]
A
11
108
F
[2707]
[2703]
[2706]
[2719]
[2710]
[2717]
0
1
98
[2716]
[2709]
[2718]
[2713]
[2714]
[2705]
[2704]
[2712]
反應孔
#1

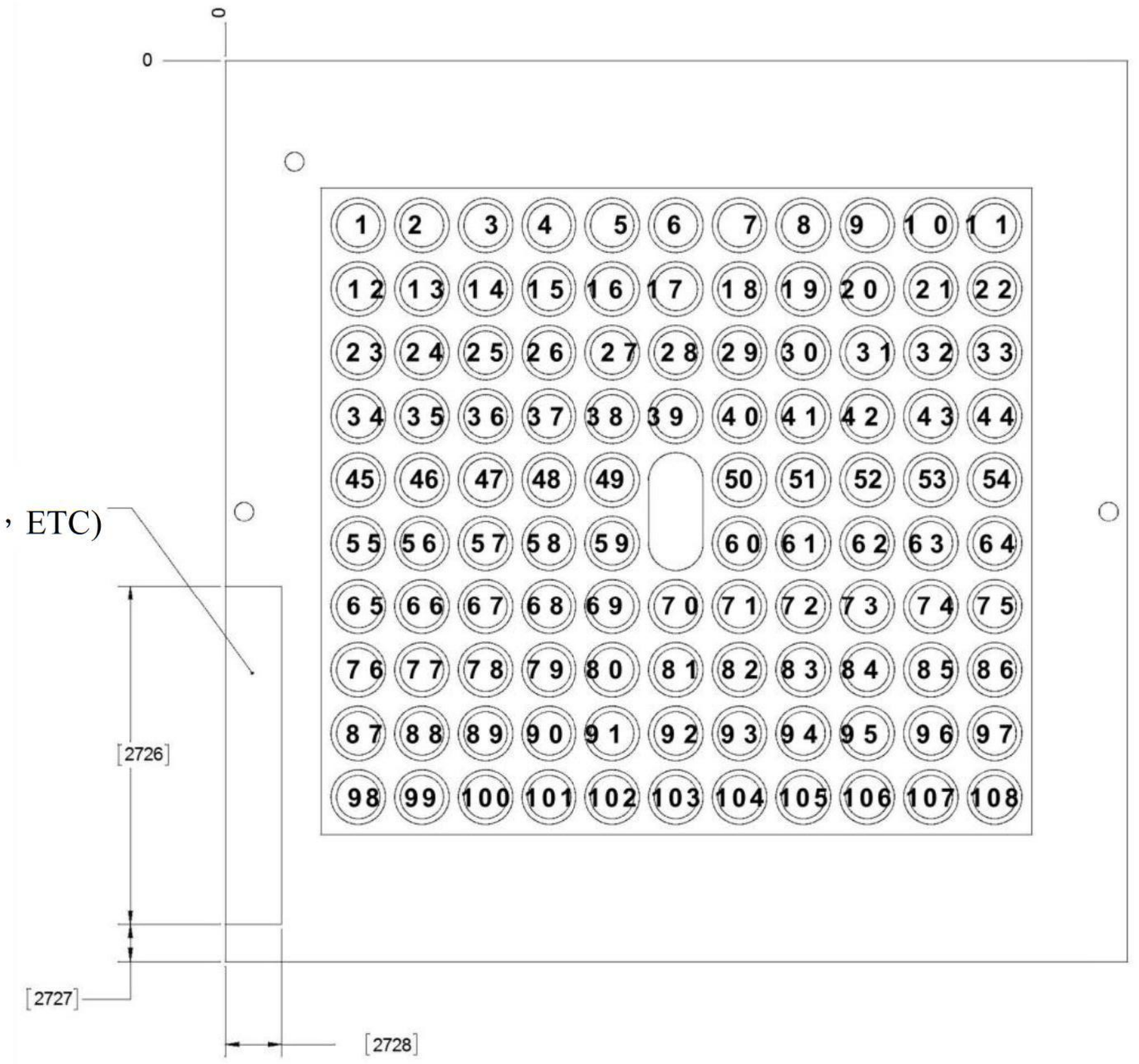
【圖26B】



【圖26C】

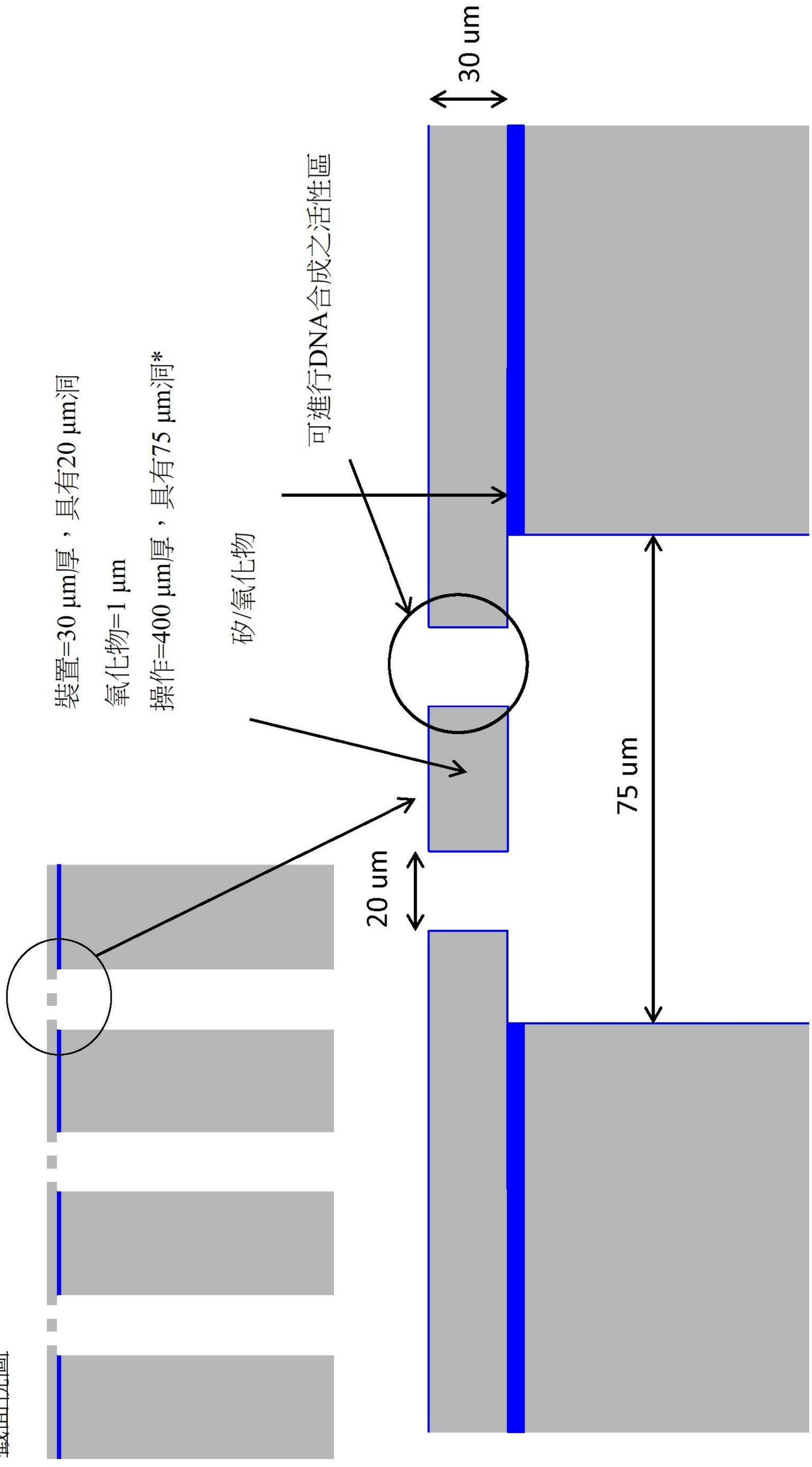


【圖26D】

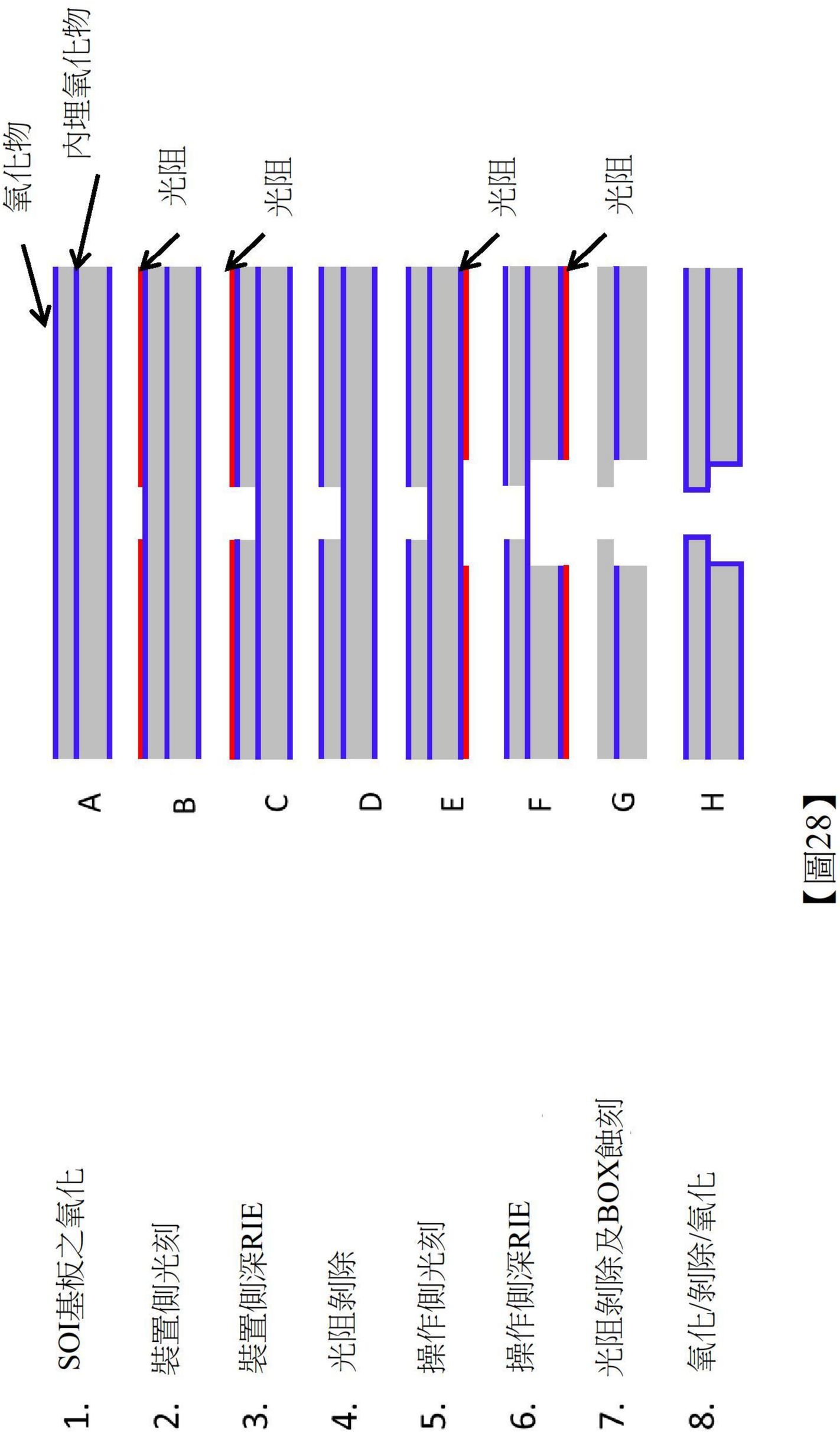

0
0
遮擋
(標記，序號，ETC)
[2726]
[2727]
[2728]
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22
23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44
45 46 47 48 49 50 51 52 53 54
55 56 57 58 59 60 61 62 63 64
65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75
76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86
87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97
98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108

反應孔位置

【圖26E】


30 um
可進行DNA合成之活性區
砂/氧化物
裝置=30 μm厚，具有20 μm洞
氧化物=1 μm
操作=400 μm厚，具有75 μm洞*
20 um
75 um
截面視圖

【圖27】


1. SOI基板之氧化
2. 裝置側光刻
3. 裝置側深RIE
4. 光阻剝除
5. 操作側光刻
6. 操作側深RIE
7. 光阻剝除及BOX蝕刻
8. 氧化/剝除/氧化
氧化物
內埋氧化物
光阻
光阻
光阻
光阻
A
B
C
D
E
F
G
H

【圖28】

1. 清潔晶片(強清潔劑 + O_2電漿)

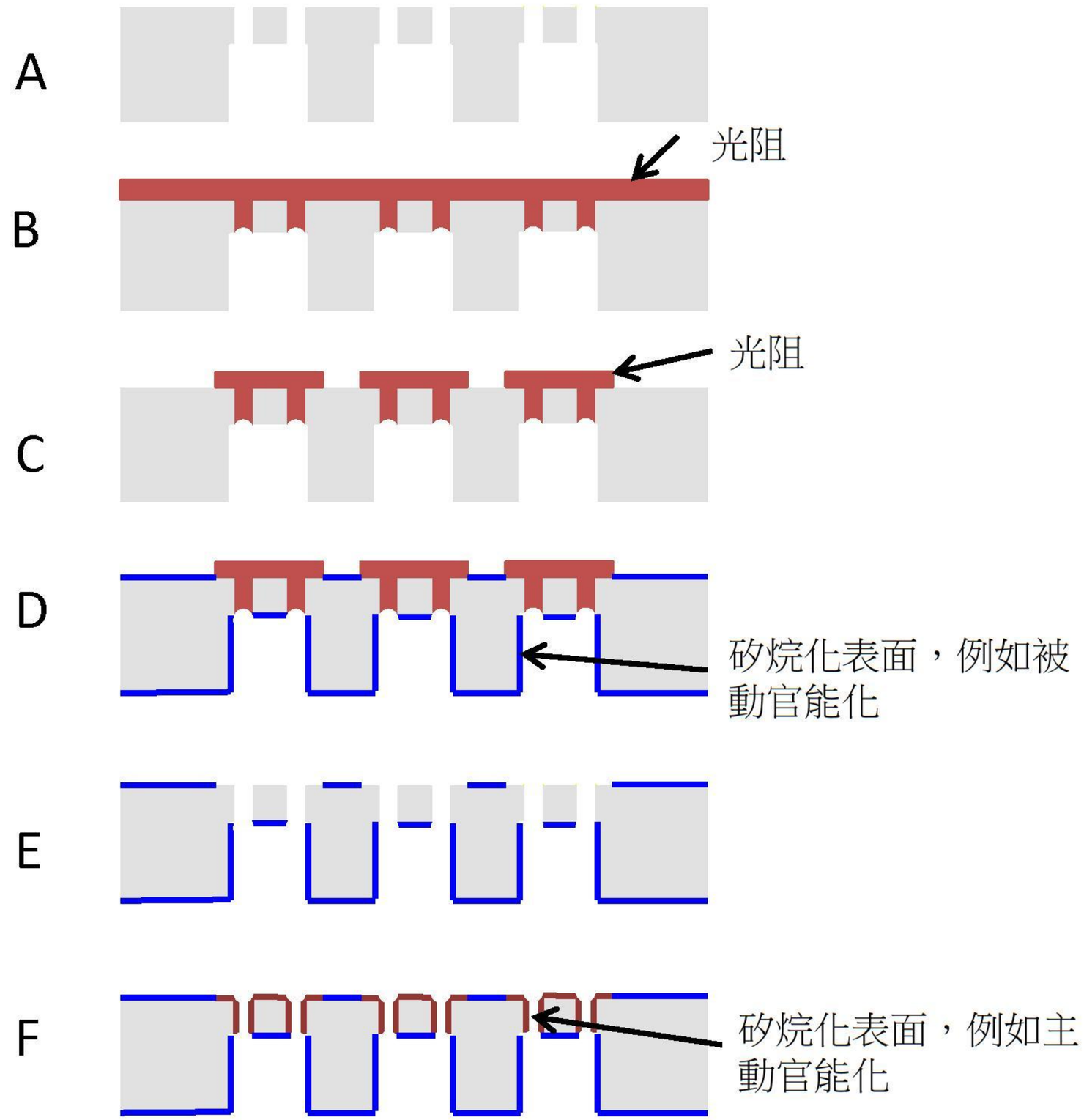
2. 用光阻塗佈

3. 光刻+除渣

4. 例如用氟矽烷CVD官能化

5. 抗蝕劑剝除

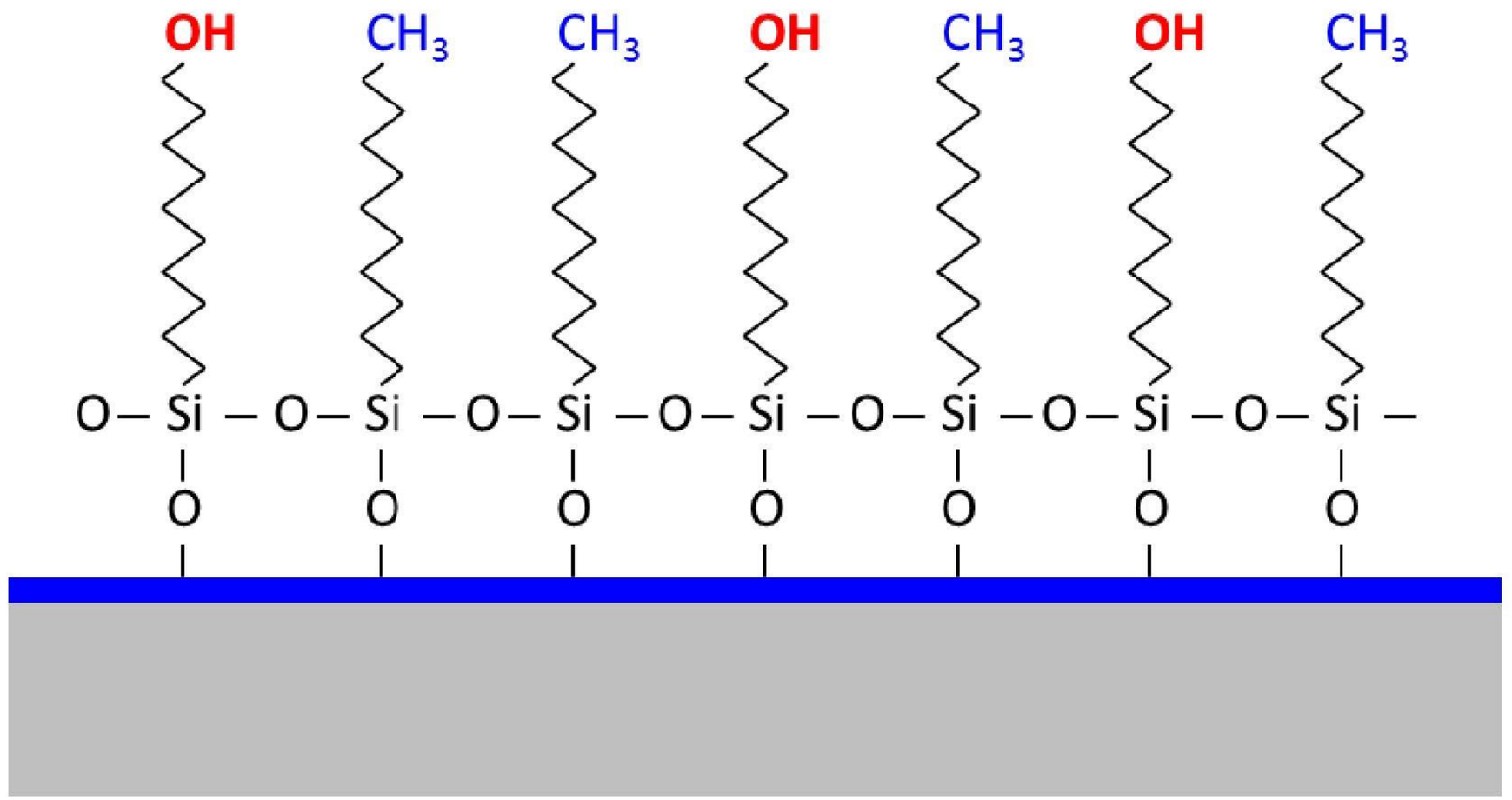
6. 主動官能化



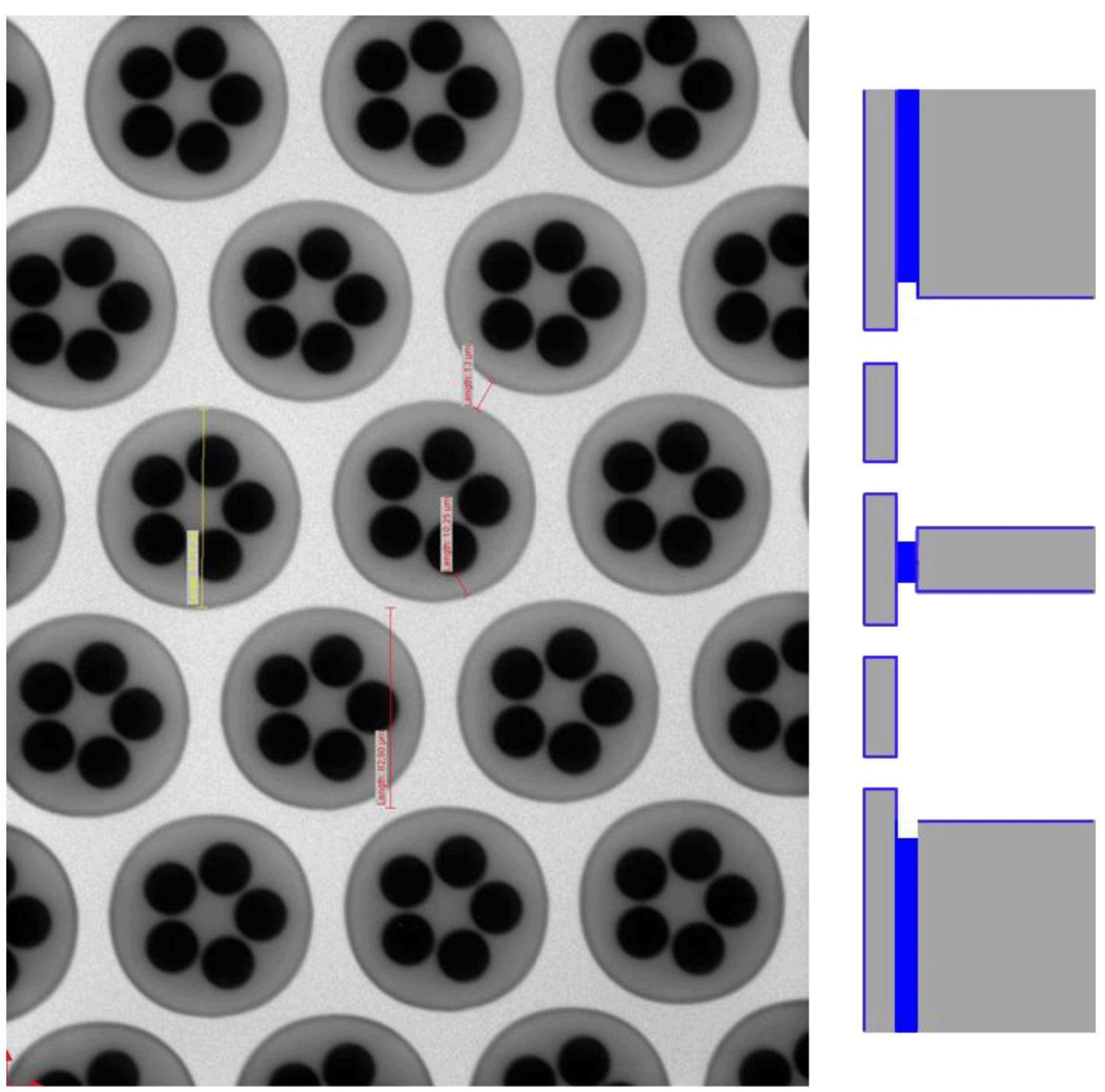
【圖29】

主動官能化

- 藉由施用混合矽烷稀釋羥基在被動基團海洋中之濃度

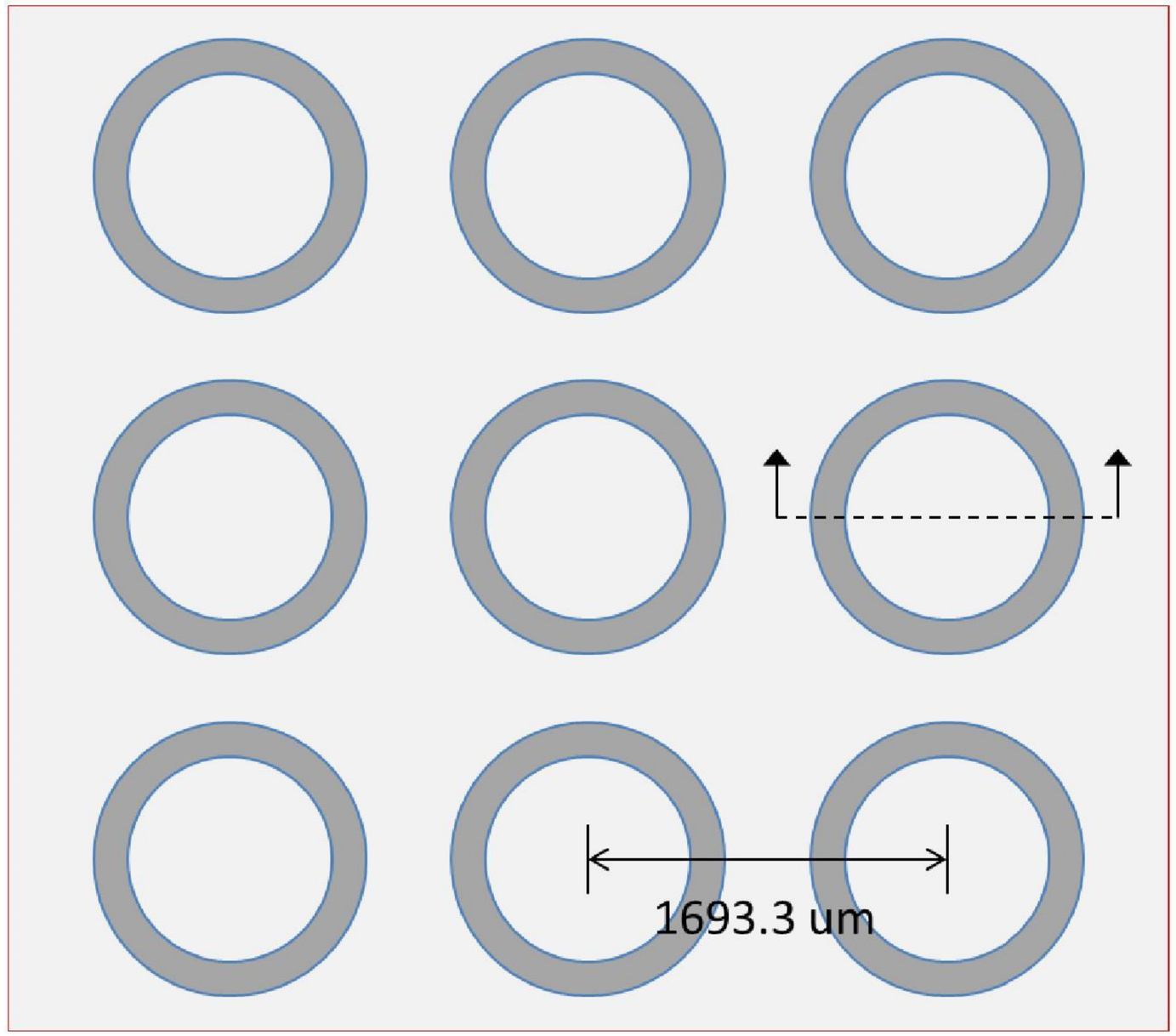


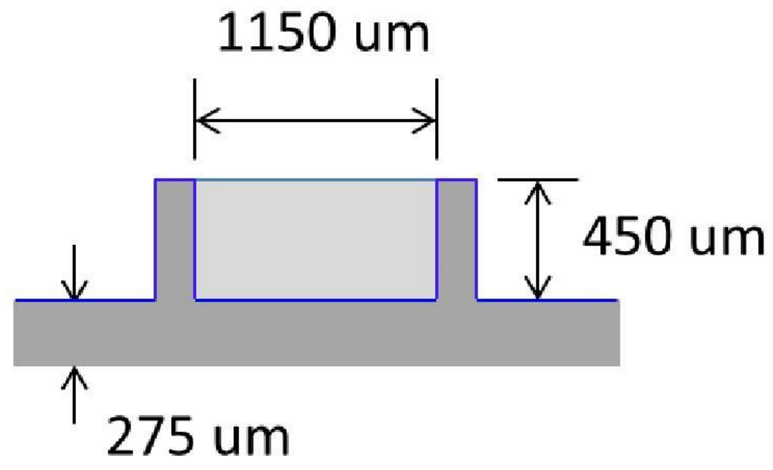
【圖30】



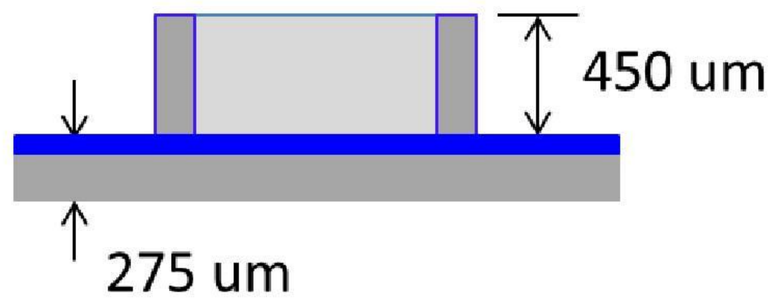
【圖31】

奈米孔晶片結構

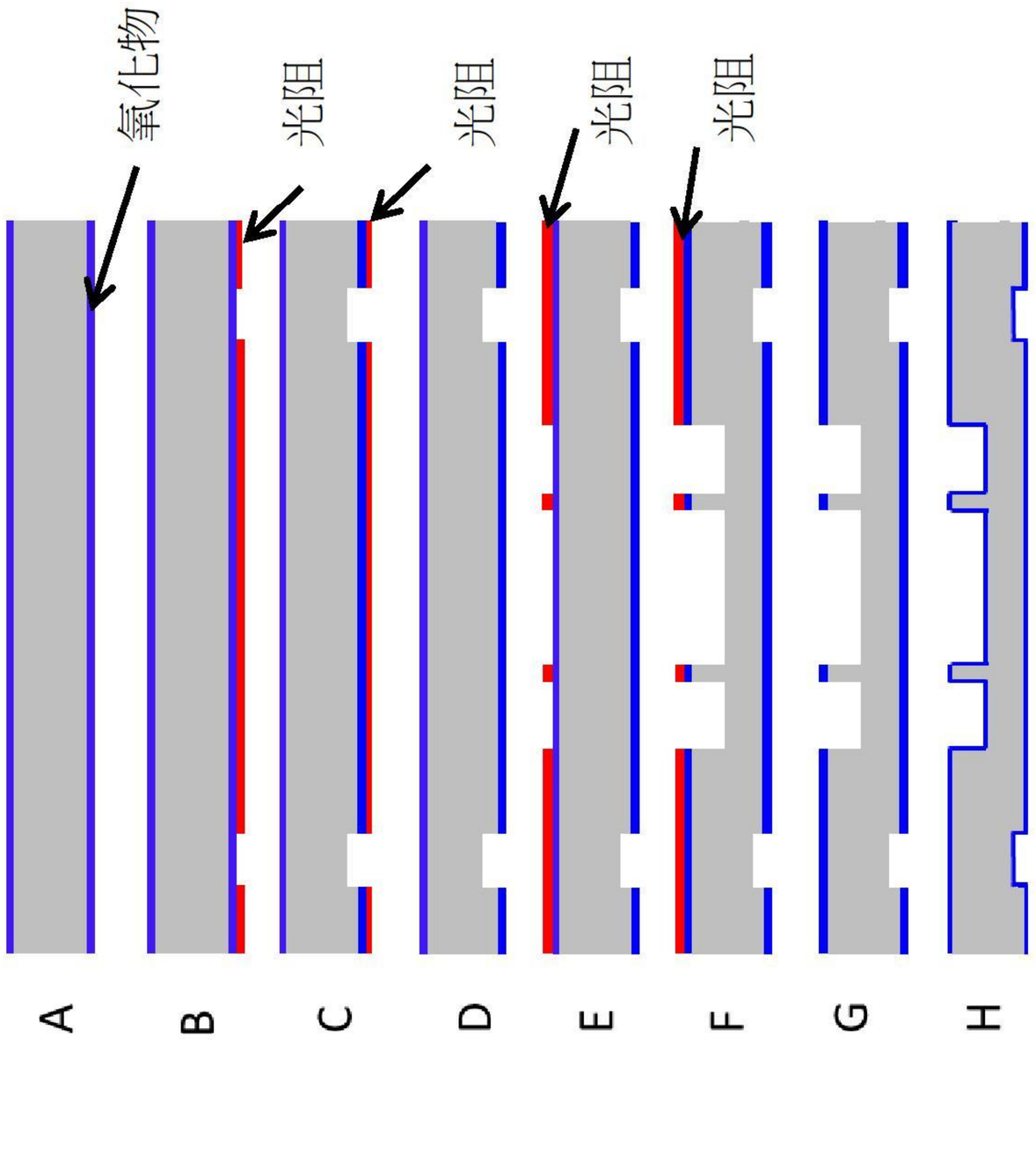




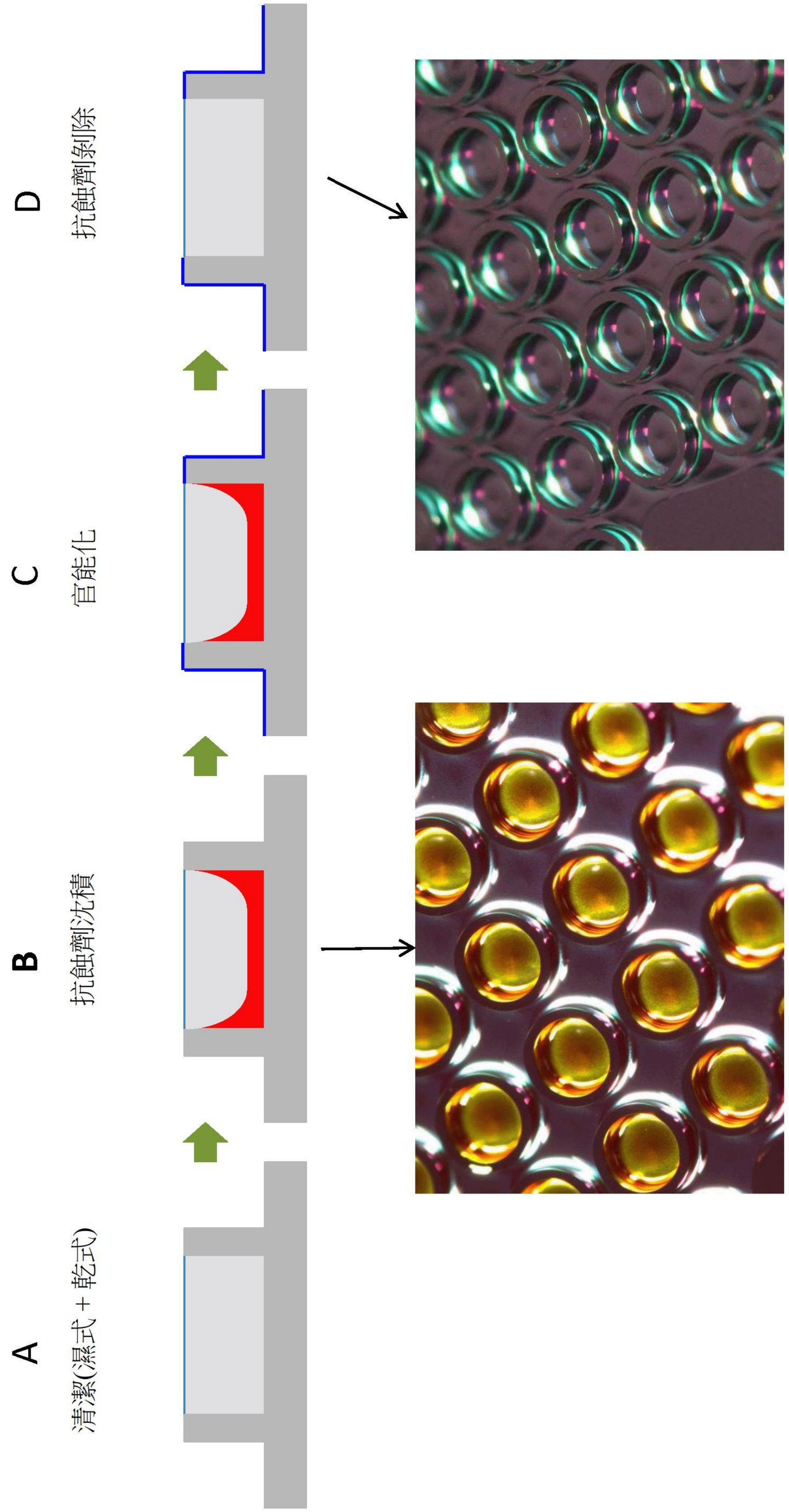
若使用SOI晶圓



【圖32】

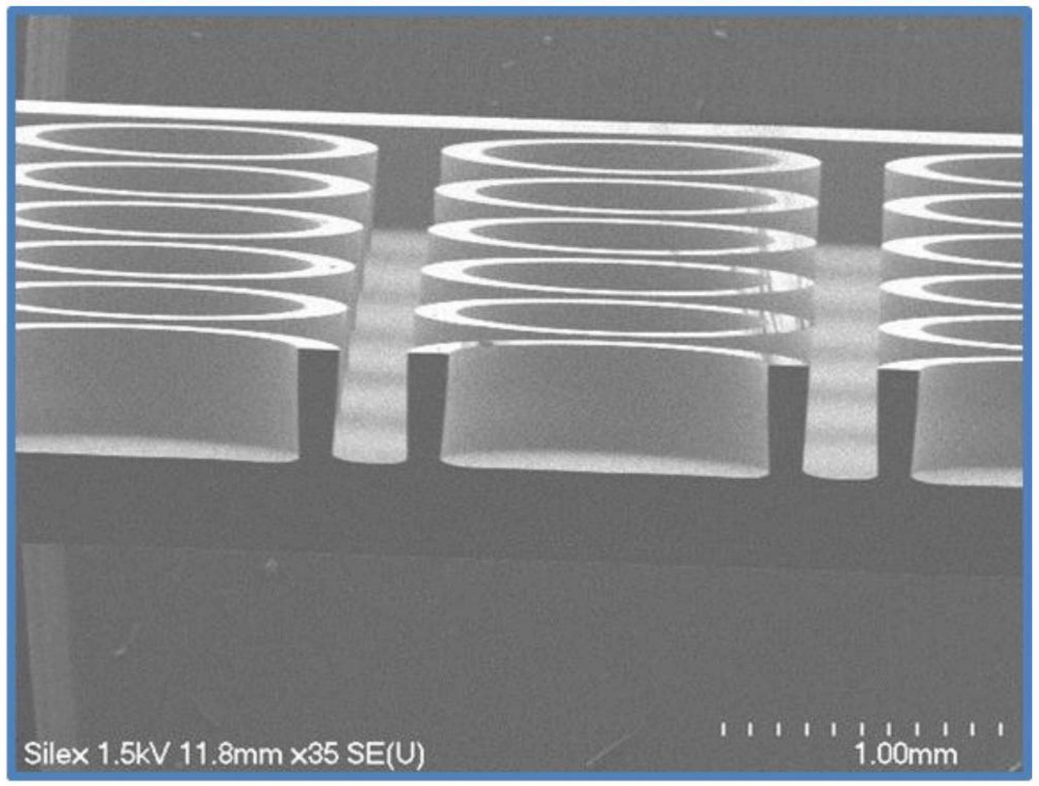

氧化物
光阻
光阻
光阻
光阻
A
B
C
D
E
F
G
H
1. 基板之氧化
2. 背側光刻
3. 背側蝕刻
4. 光阻剝除
5. 前側光刻
6. DRIE孔
7. 光阻剝除
8. 氧化物生長/剝除/氧化

【圖33】

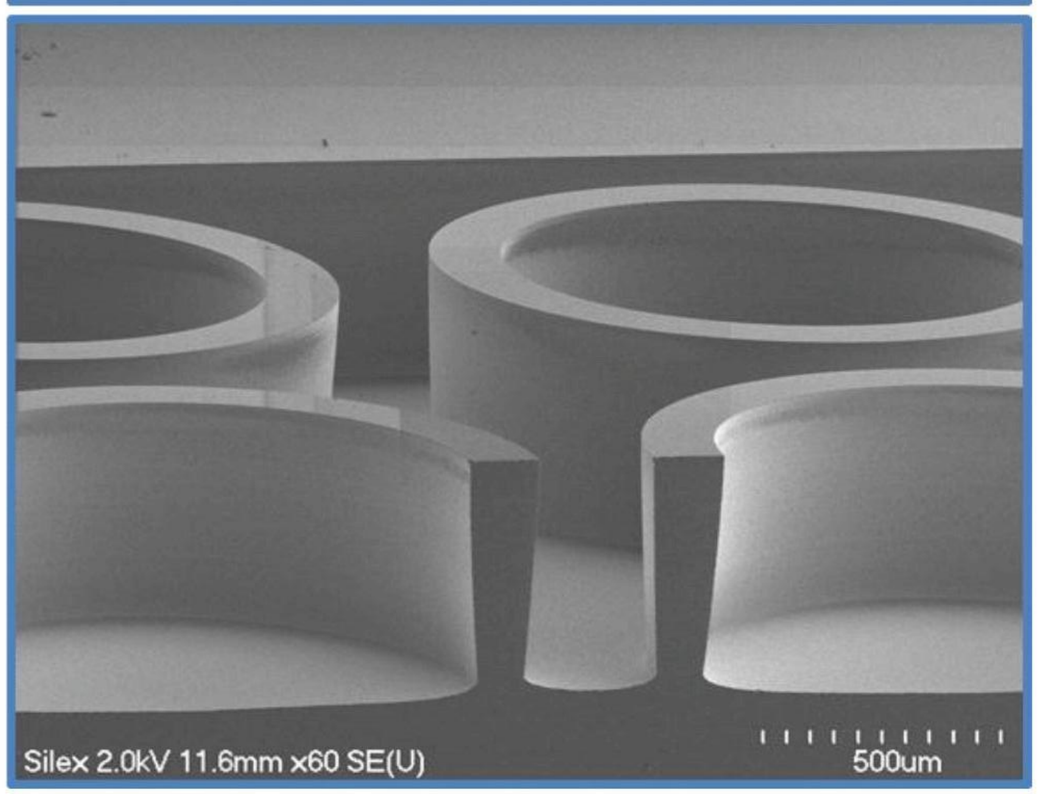


【圖34】

A


Silex 1.5kV 11.8mm x35 SE(U)
1.00mm

B


Silex 2.0kV 11.6mm x60 SE(U)
500um

【圖35】

各種官能化組態

1. 均一官能化

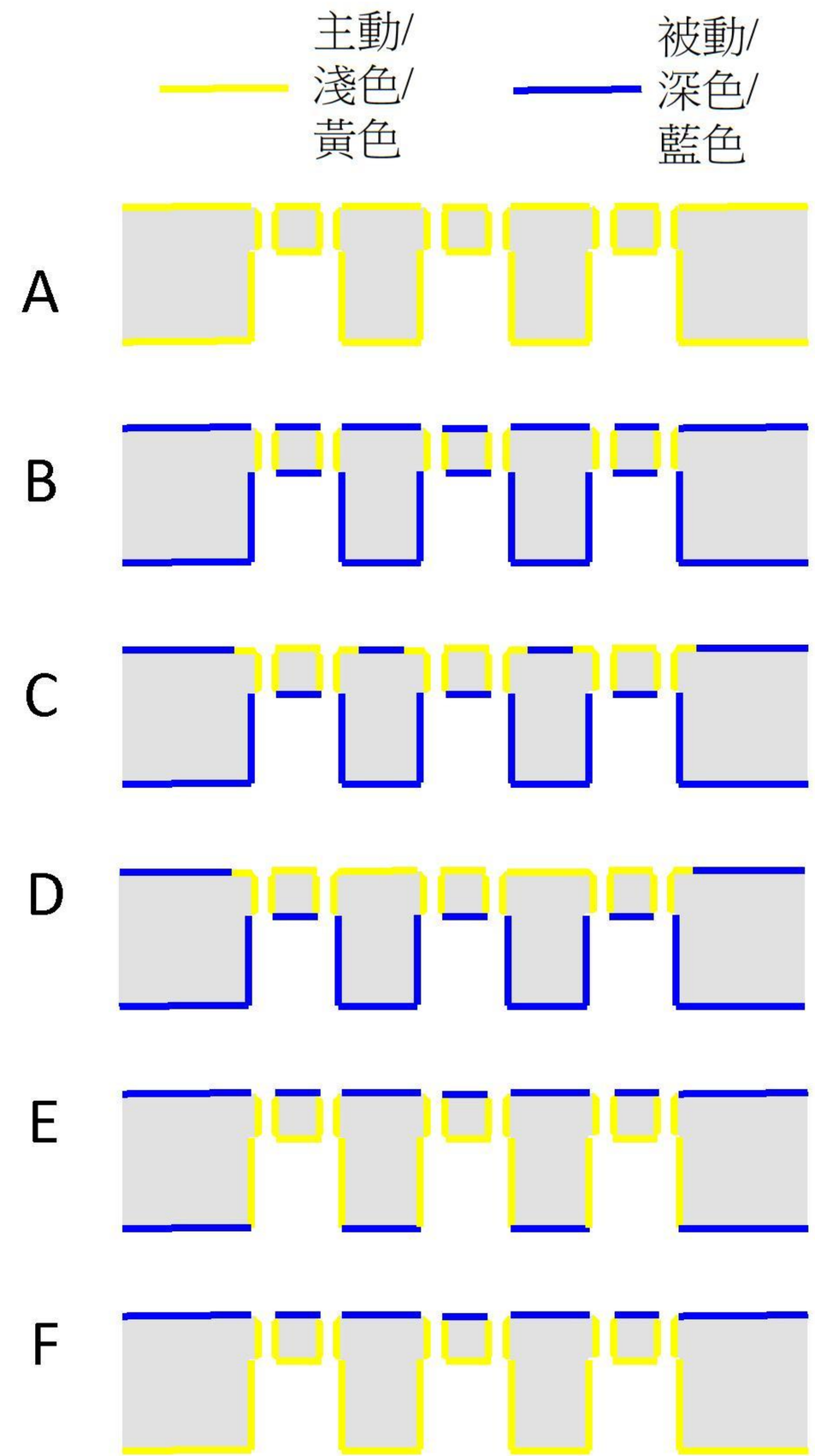
2. 頂部/底部旋轉器銳緣，被動通孔

3. 頂邊旋轉器蓋板，被動通孔

4. 頂邊叢集蓋板，被動通孔

5. 頂部旋轉器銳緣，主動通孔

6. 頂部旋轉器銳緣，主動通孔+底部



【圖36】

方法流程A (用於組態2-4)

1. 清潔晶片(強清潔劑 + O_2電漿)

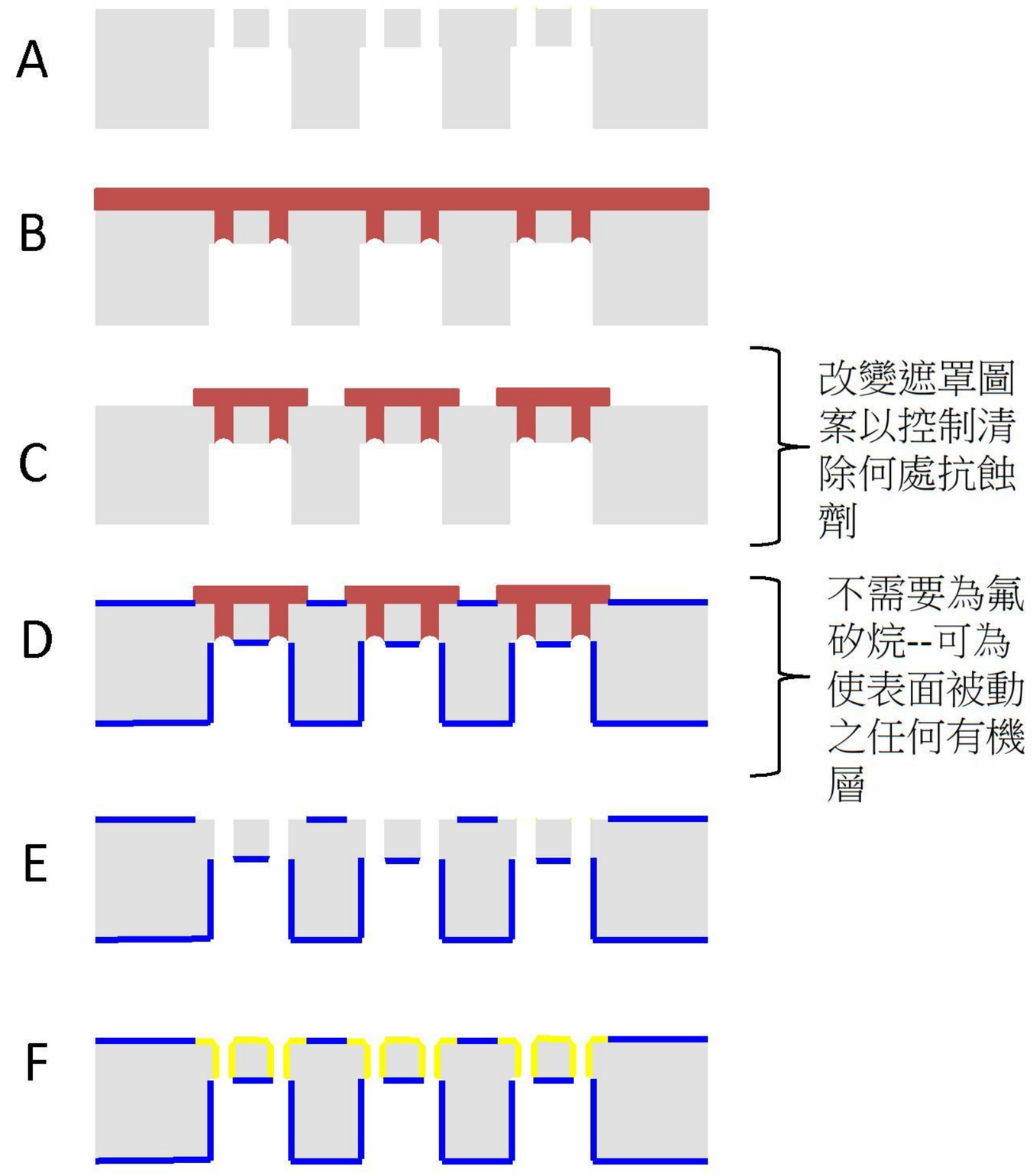
2. 施用光阻

3. 光刻+除渣

4. 氟矽烷沈積

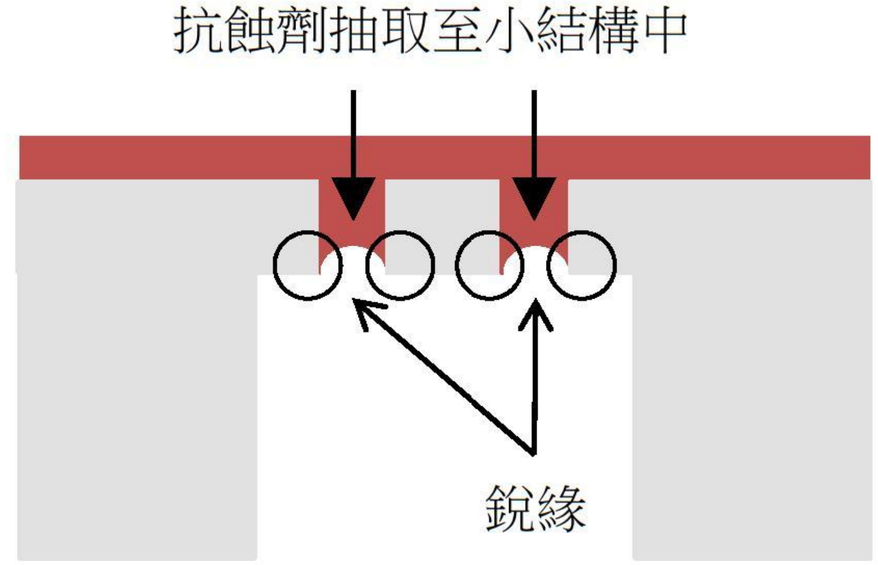
5. 在溶劑中之抗蝕劑剝除

6. 主動官能化

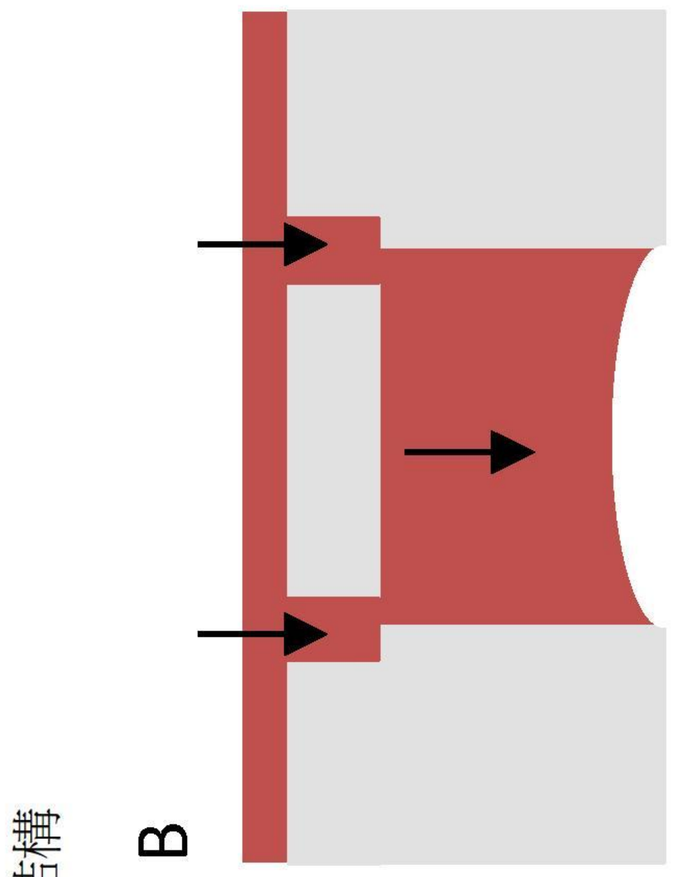


【圖37】

抗蝕劑毛細作用控制方法



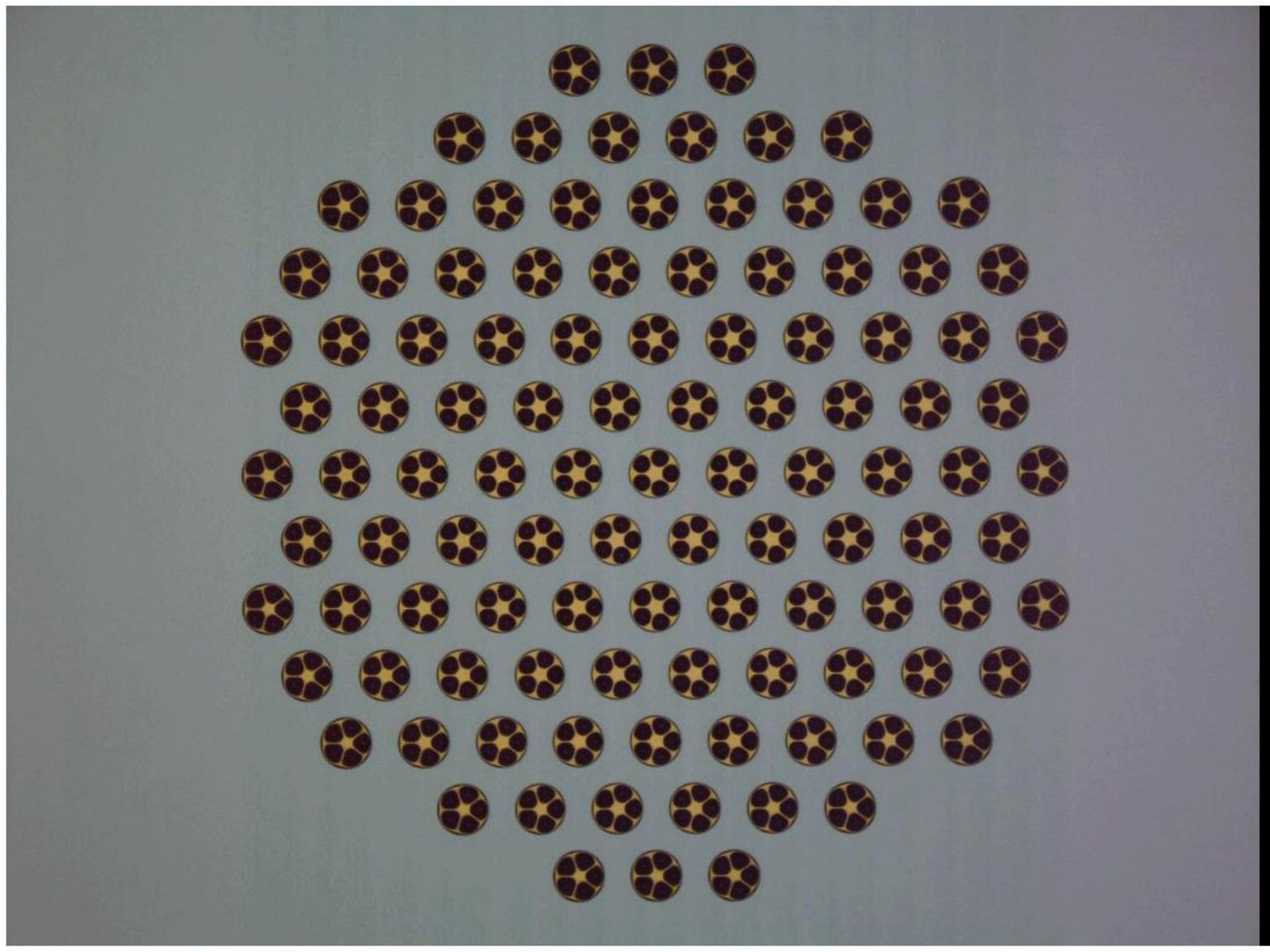
【圖38】



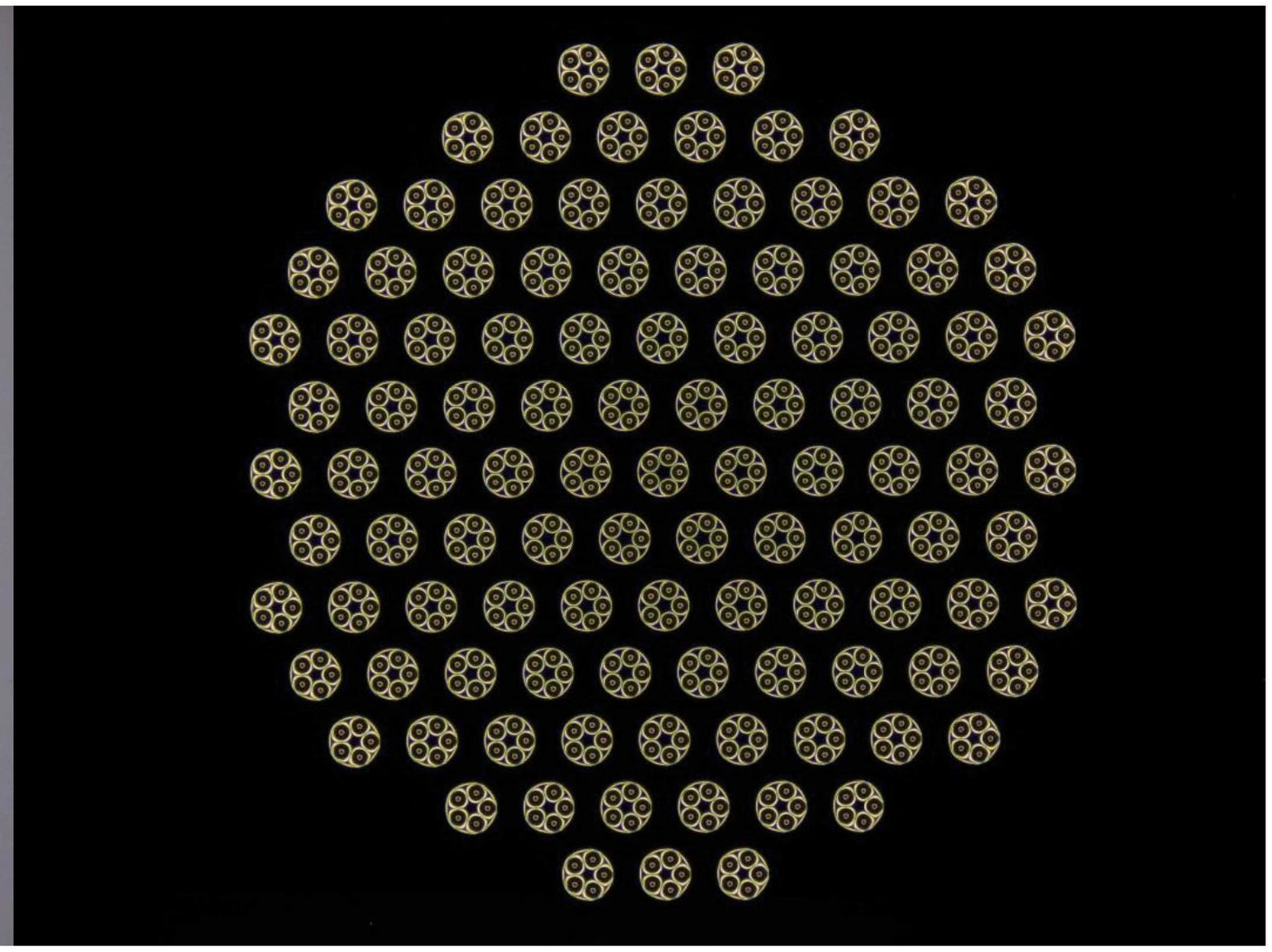
【圖39】

微影後抗蝕劑圖案

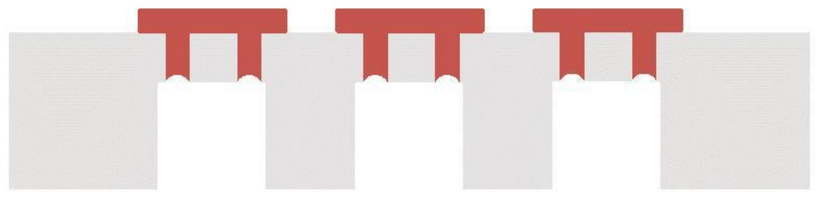
A



B



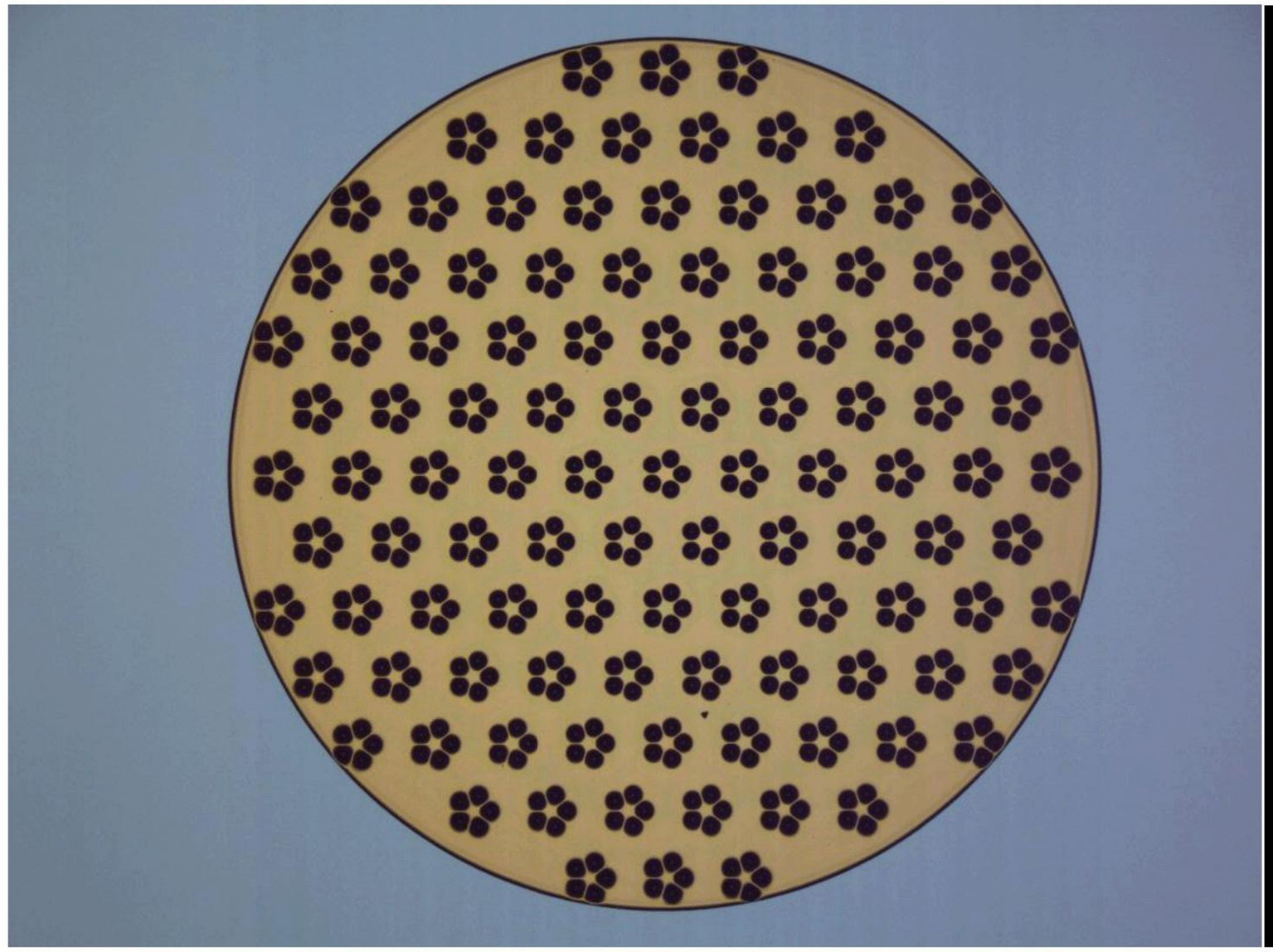
C



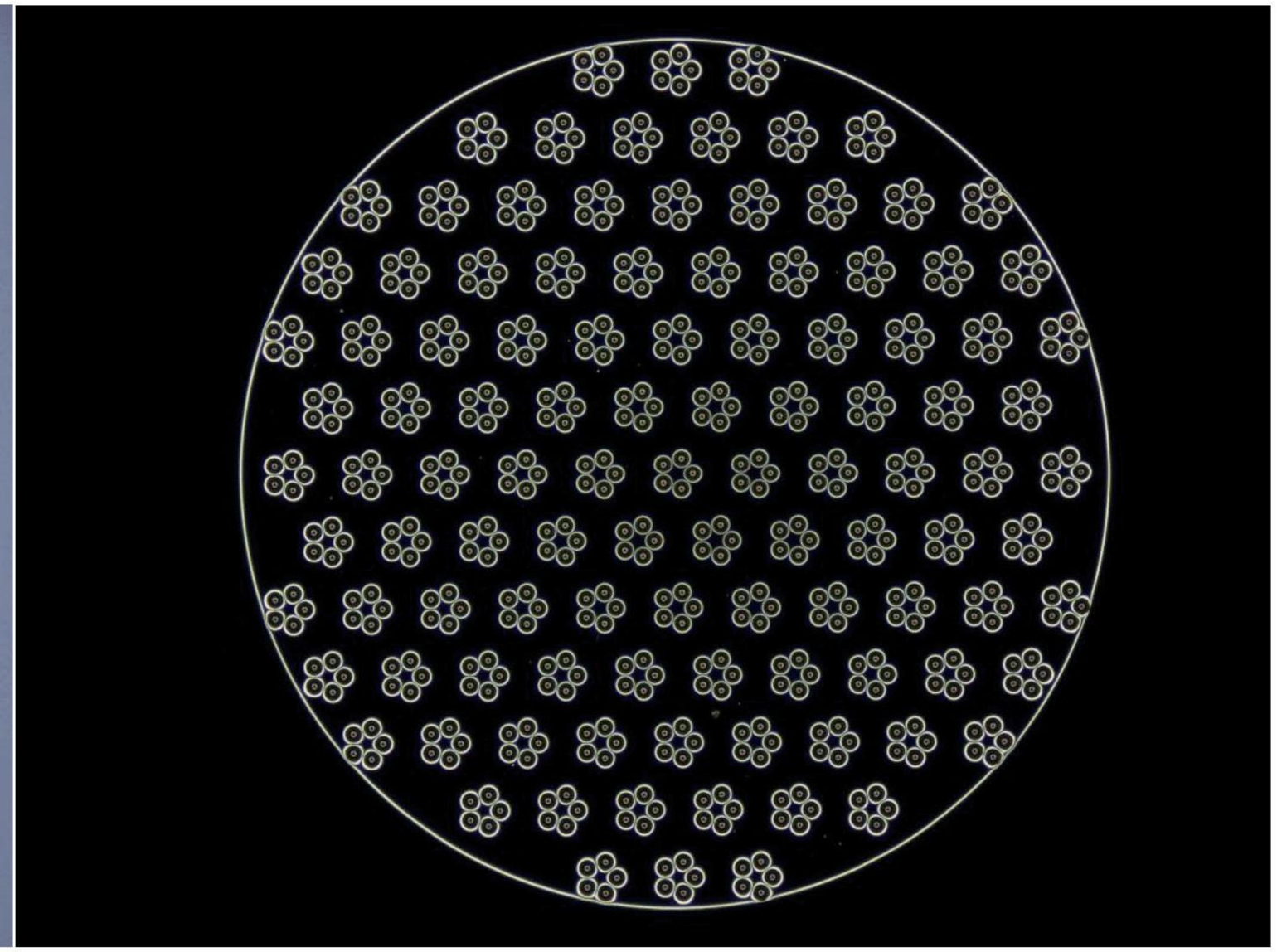
【圖40】

微影後抗蝕劑圖案

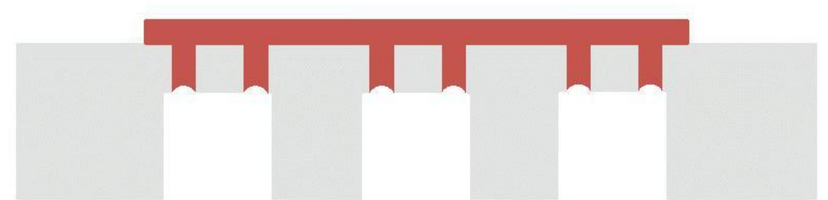
A



B



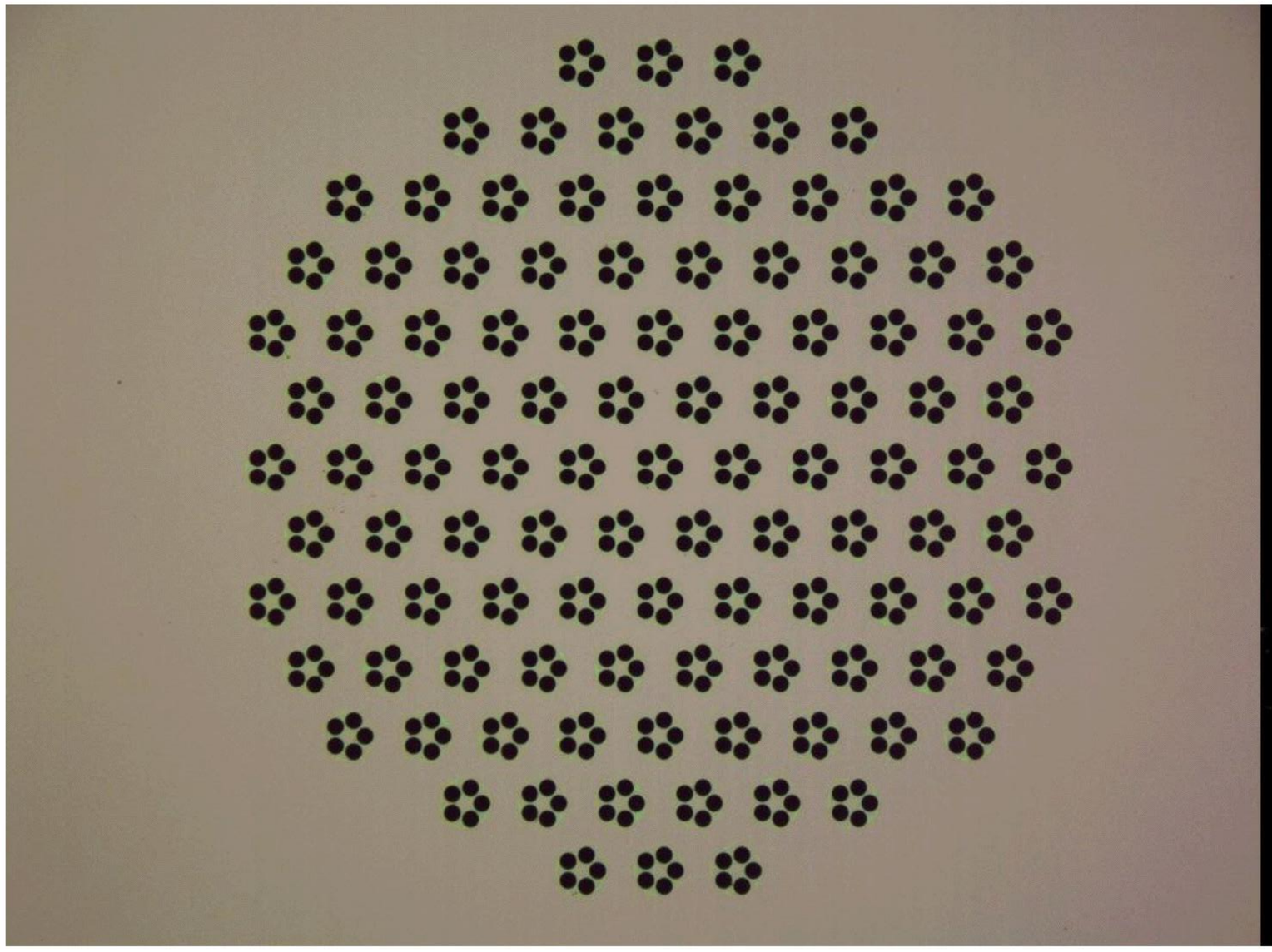
C



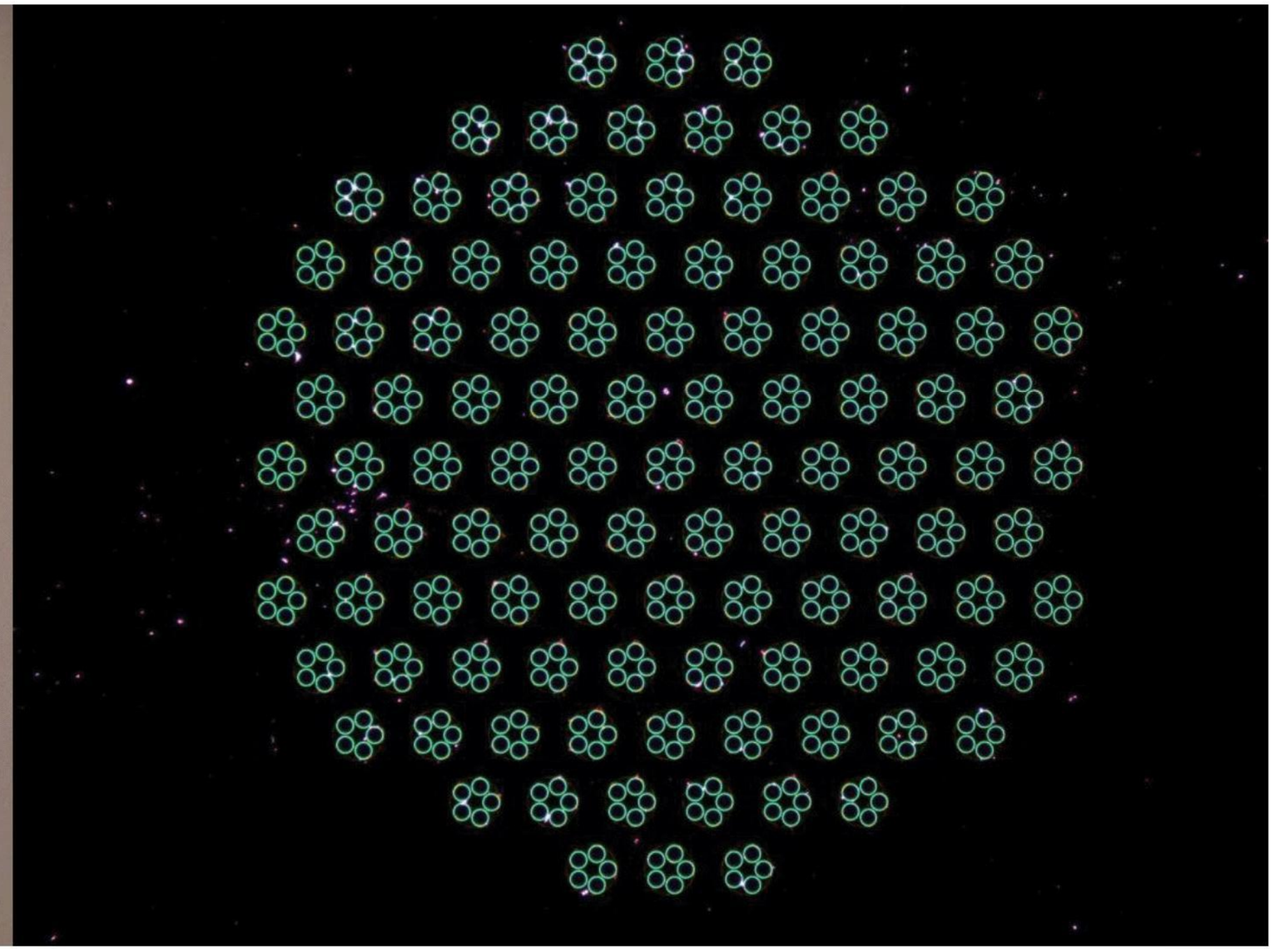
【圖41】

抗蝕劑剝除後(在氟化後)

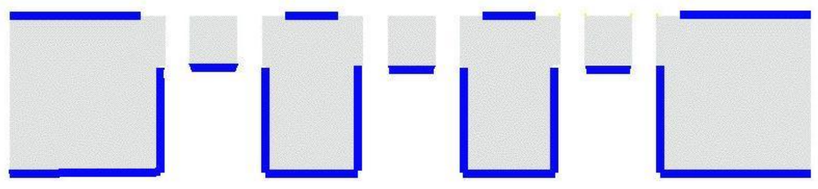
A



B

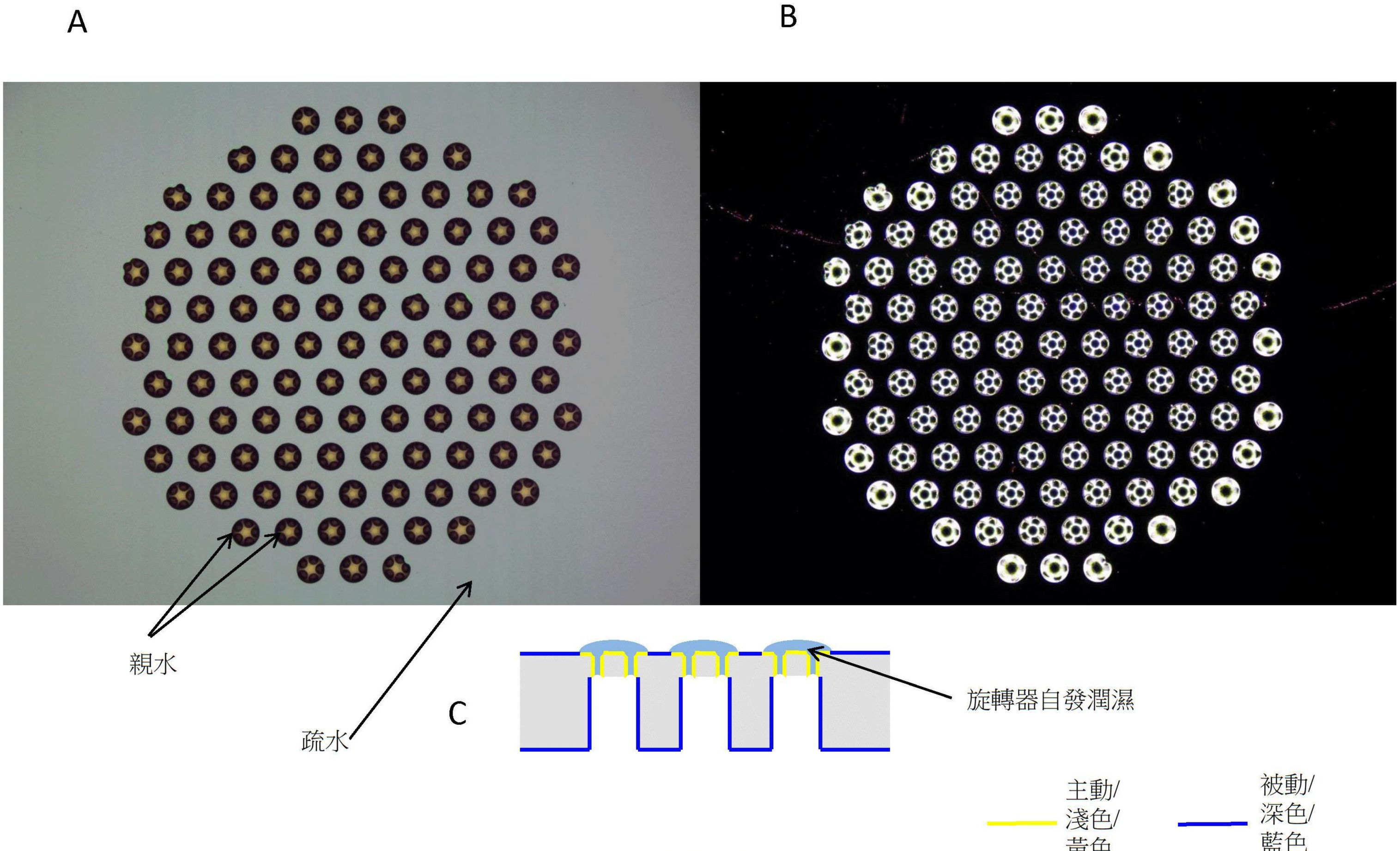


C



【圖42】

充分負載有DMSO之角蛋白晶片



【圖43】

方法流程B (用於組態6)

主動/淺色/黃色　　被動/深色/藍色

1. 清潔晶片(強清潔劑 + O_2電漿)

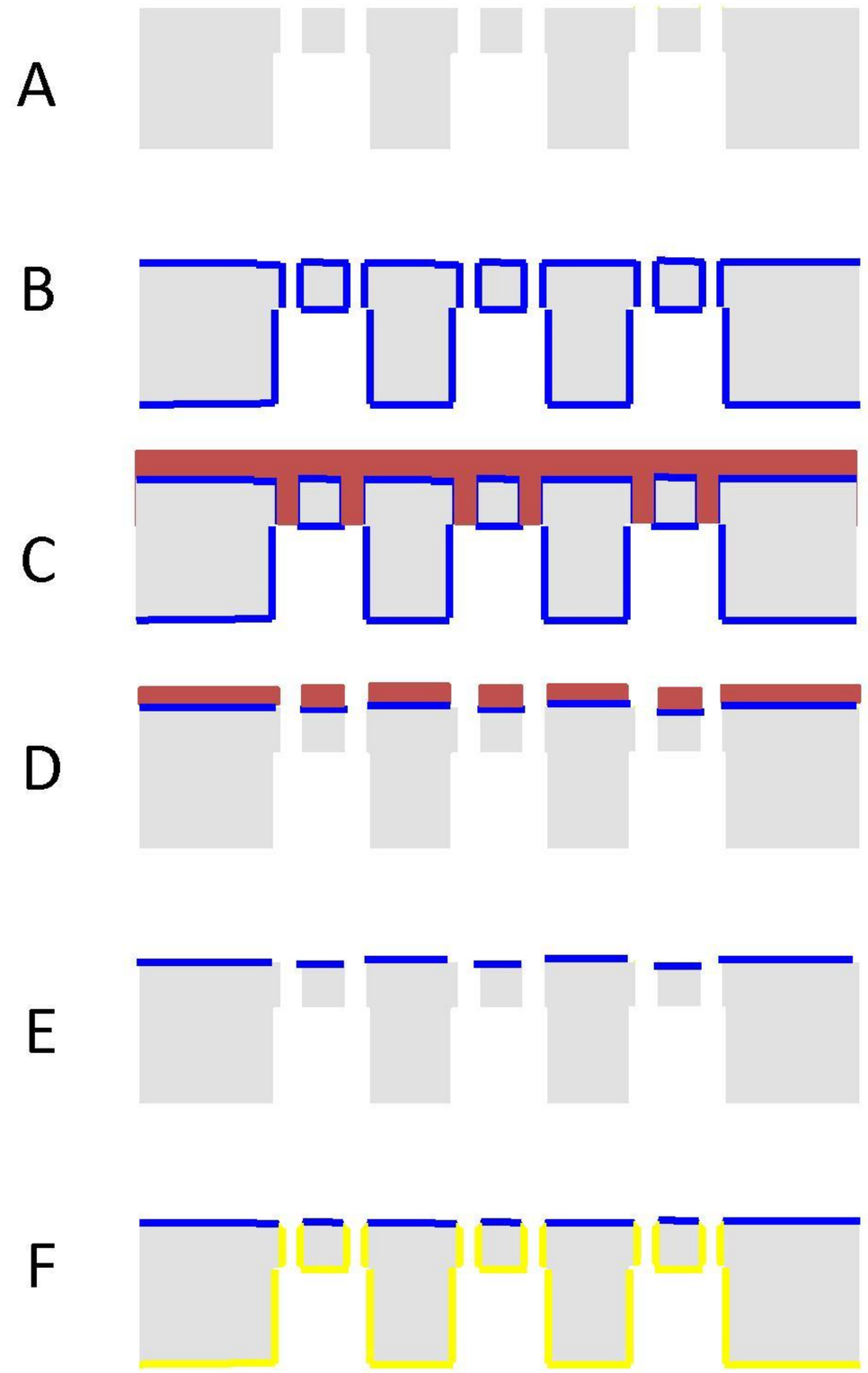
2. 被動官能化

3. 抗蝕劑施用

4. 光刻 + 蝕刻

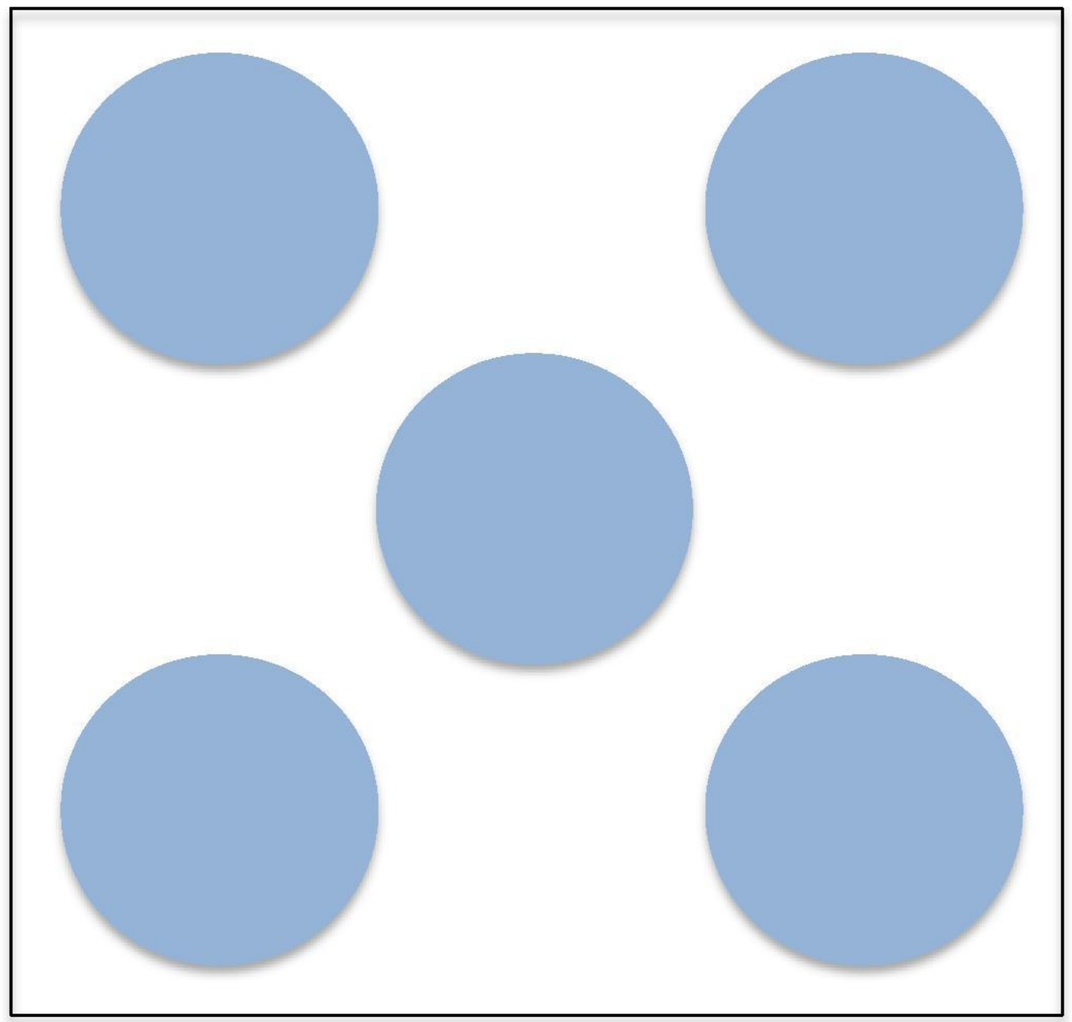
5. 抗蝕劑剝除

6. 主動官能化

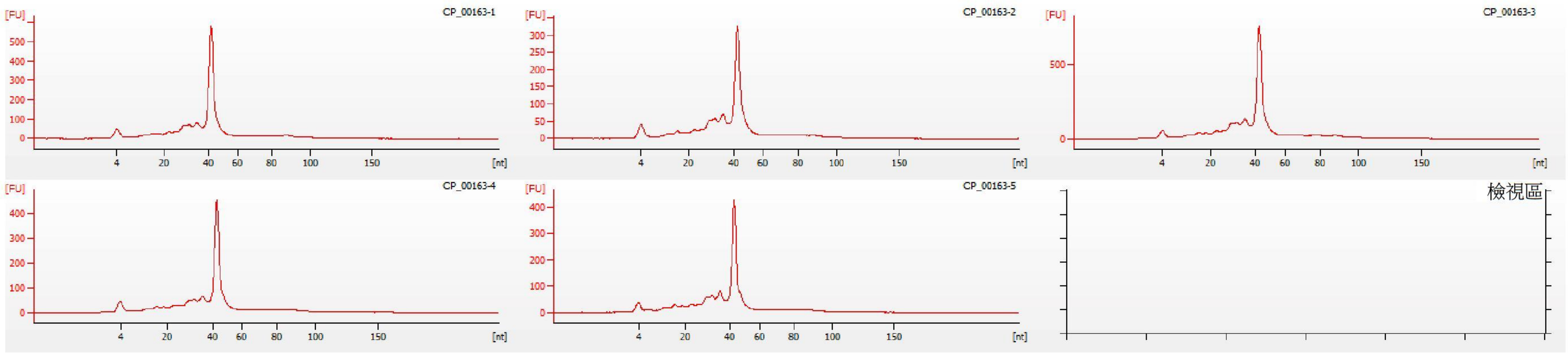


【圖44】

A

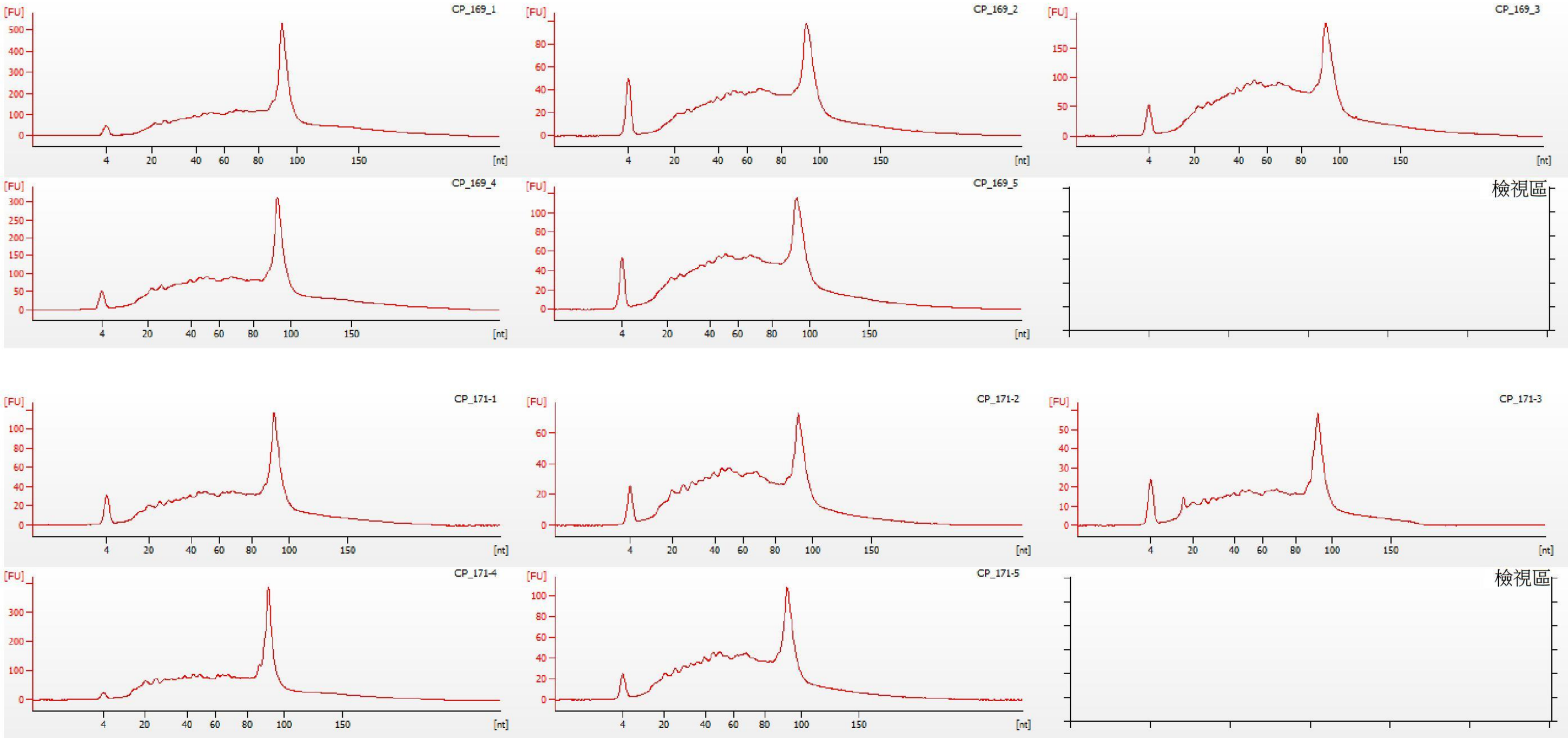


B

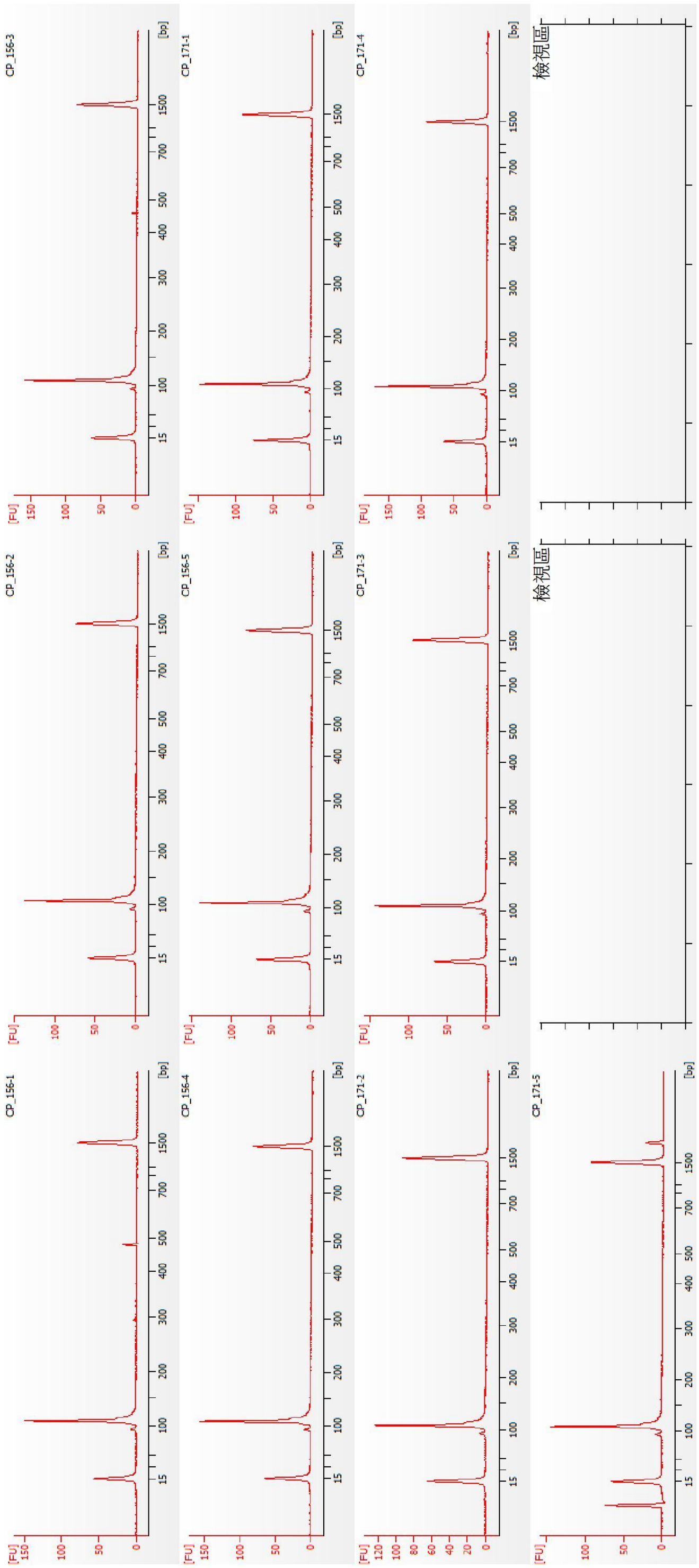


【圖45】

在2D寡核苷酸合成裝置上合成100聚體序列

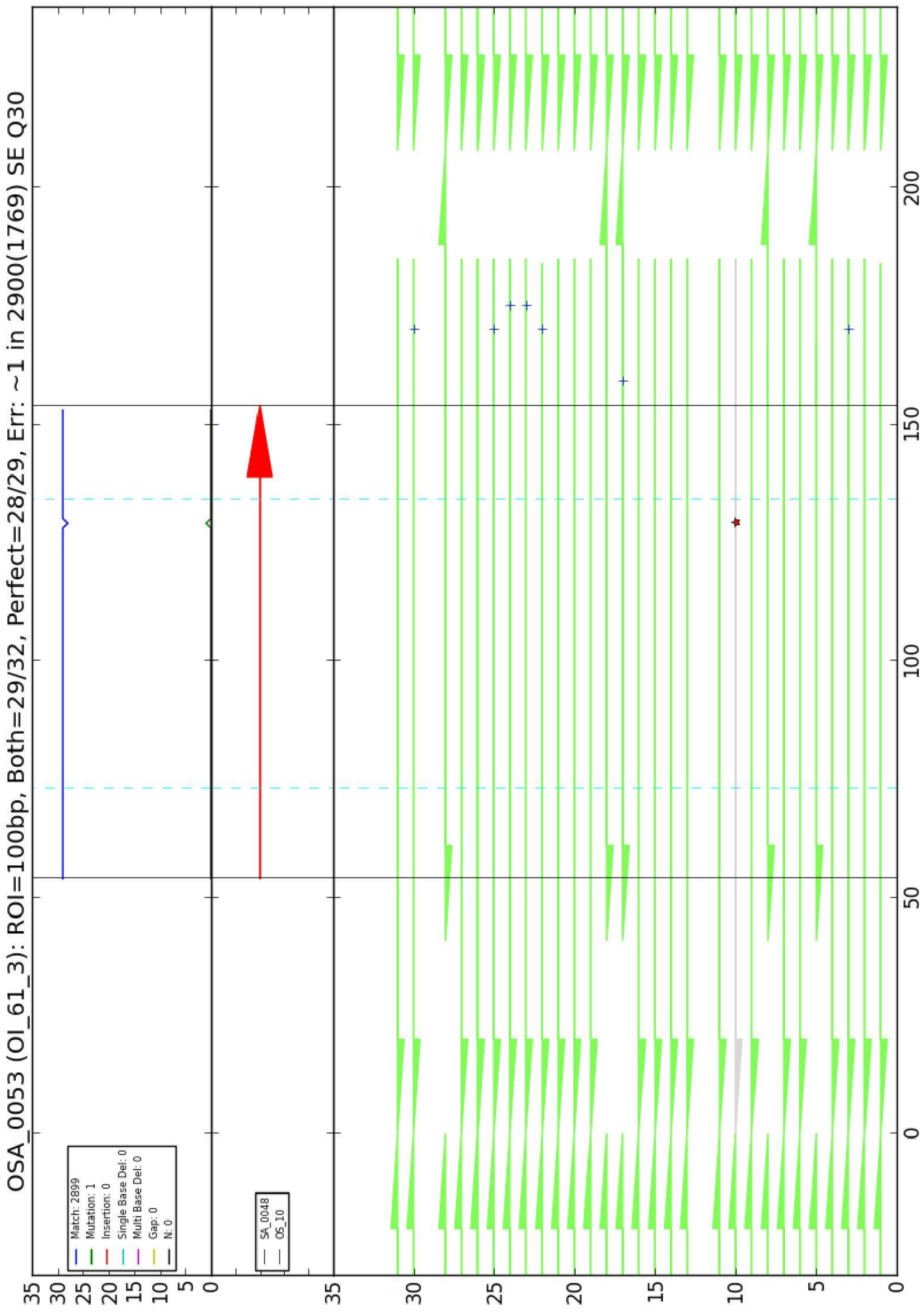


【圖46】


CP_156-3
CP_171-1
CP_171-4
CP_156-2
CP_156-5
CP_171-3
CP_156-1
CP_156-4
CP_171-2
CP_171-5
檢視區
檢視區
[bp]
[FU]

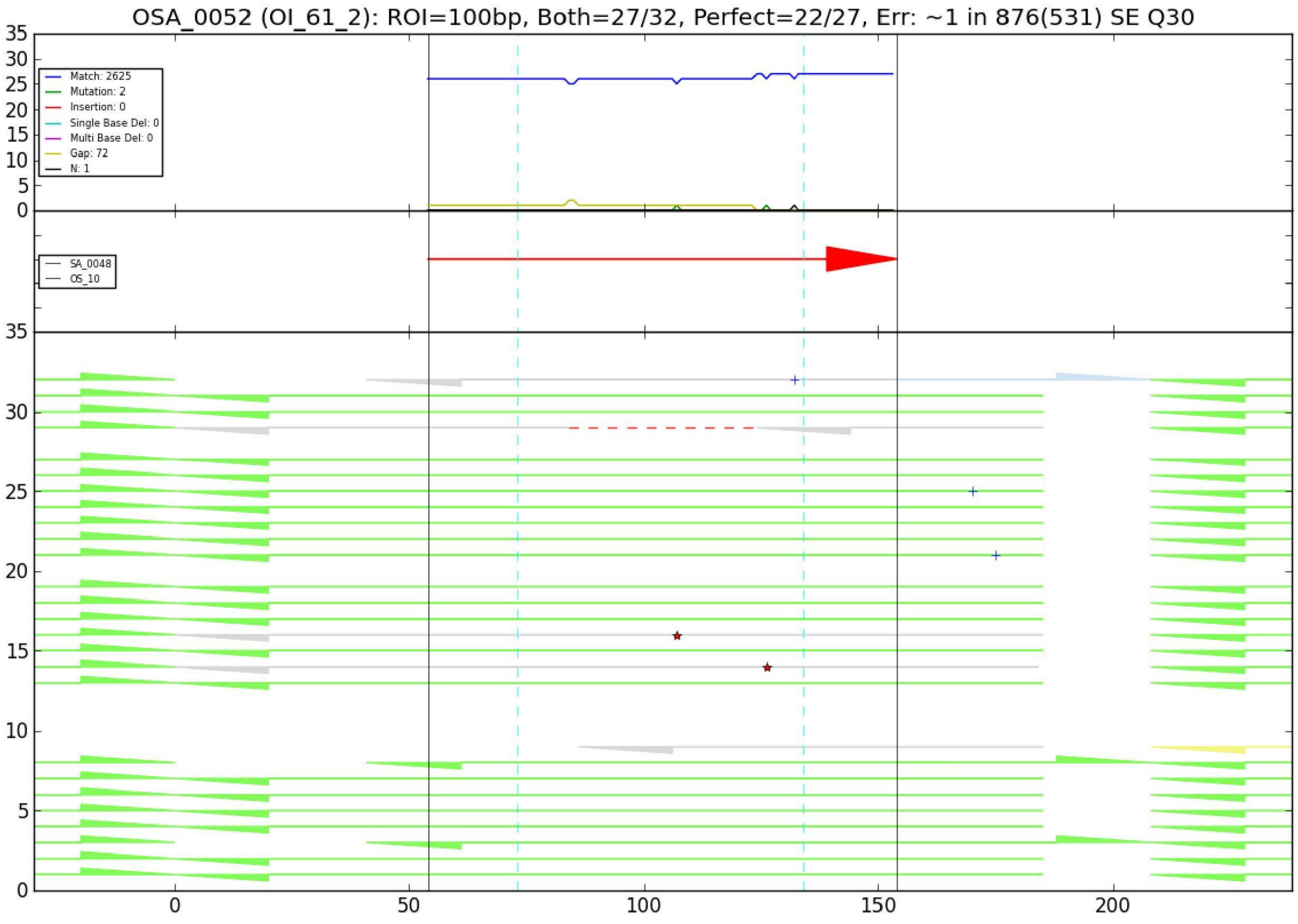
【圖47】

比對圖譜


OSA_0053 (OI_61_3): ROI=100bp, Both=29/32, Perfect=28/29, Err: ~1 in 2900(1769) SE Q30
Match: 2899
Mutation: 1
Insertion: 0
Single Base Del: 0
Multi Base Del: 0
Gap: 0
N: 0
SA_0048
OS_10
0
5
10
15
20
25
30
35
50
100
150
200

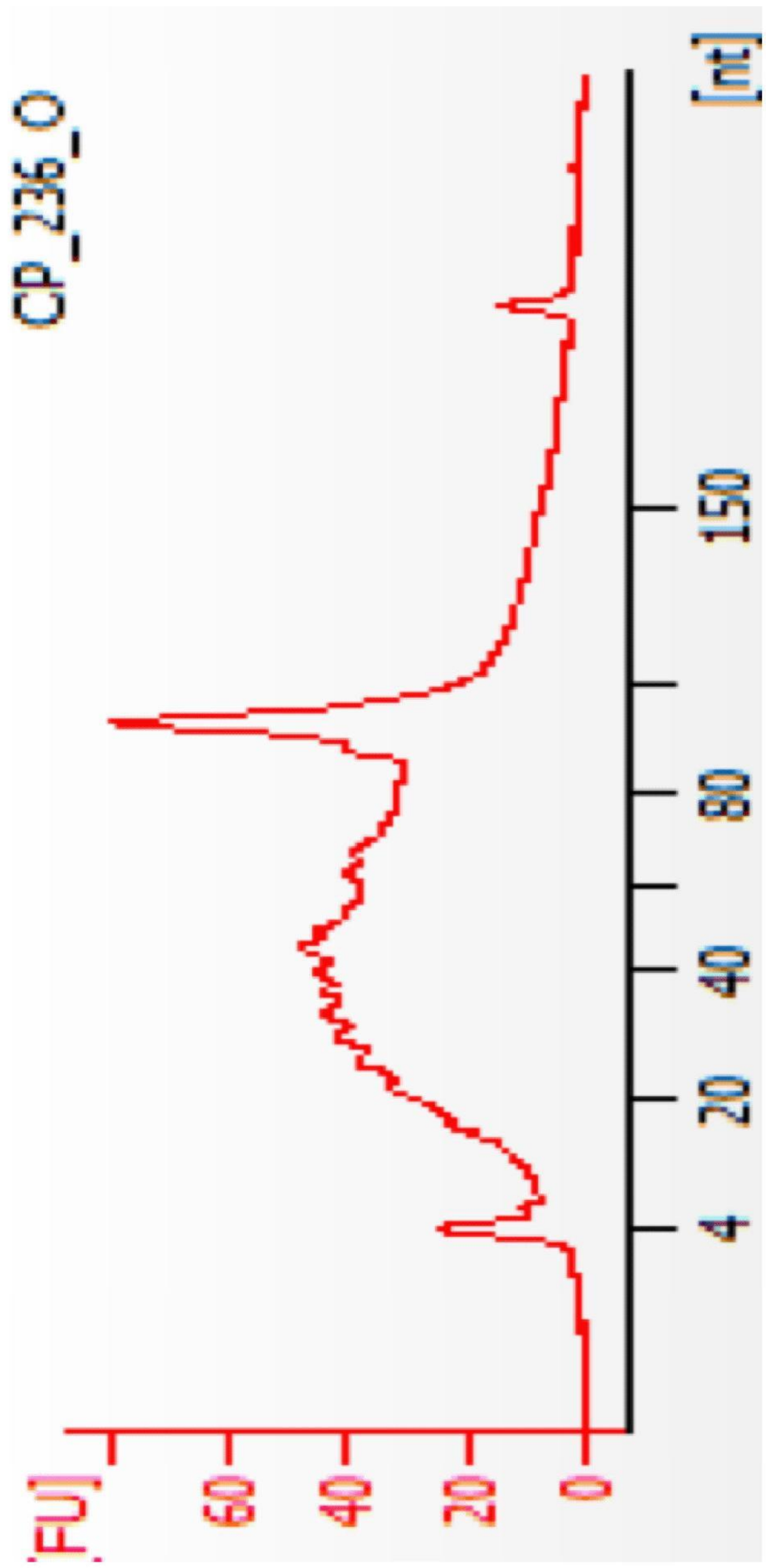
【圖48】

比對圖譜

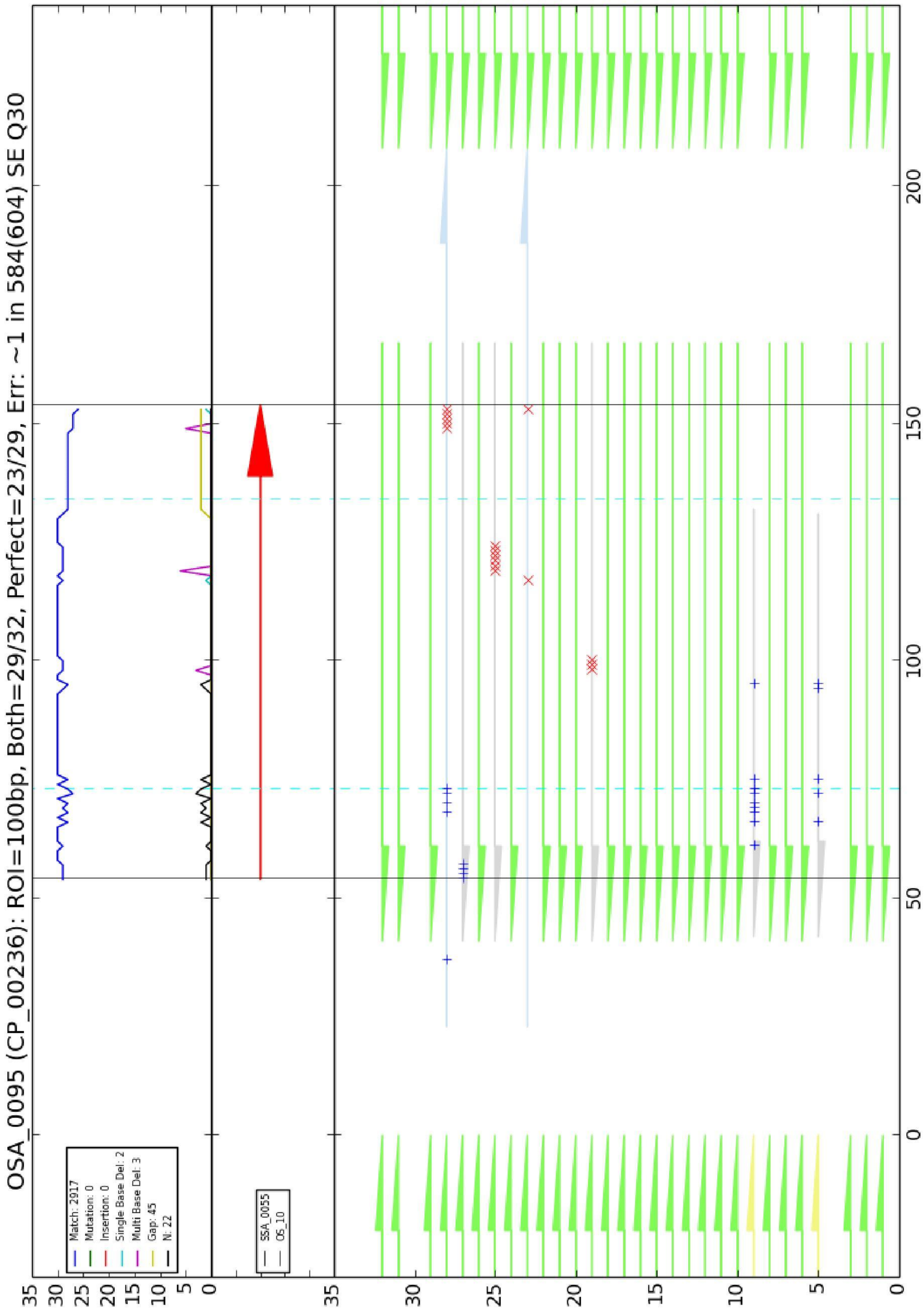


8/5/2014

【圖49】


CP_236_O
[nt]
150
0
80
40
20
4
60
40
20
0
[FU]
A
OSA_0095
[bp]
1500
400
300
200
100
15
50
0
[FU]
B

【圖50】


比對圖譜過濾
OSA_0095 (CP_00236): ROI=100bp, Both=29/32, Perfect=23/29, Err: ~1 in 584(604) SE Q30
Match: 2917
Mutation: 0
Insertion: 0
Single Base Del: 2
Multi Base Del: 3
Gap: 45
N: 22
SSA_0055
OS_10
35
30
25
20
15
10
5
0
200
150
100
50
0

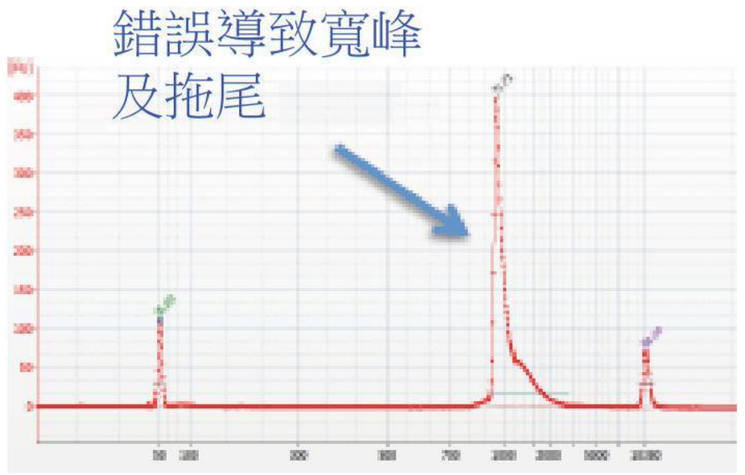
【圖51】

錯誤校正

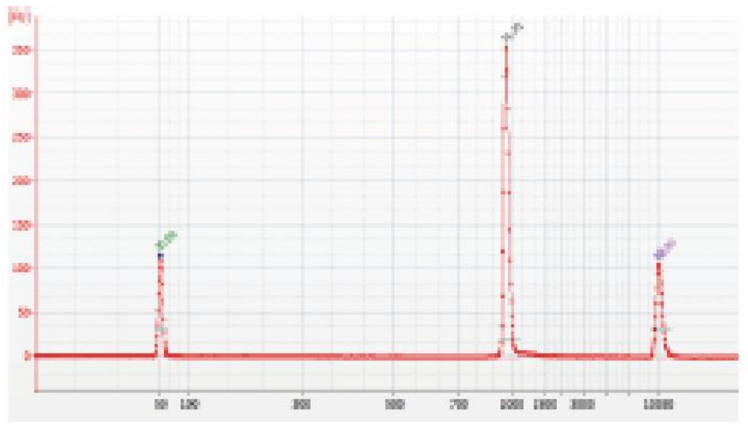
使用CorrectASE實現之效能-錯誤率低於1/5 kb個錯誤

CorrectASE處理1kb

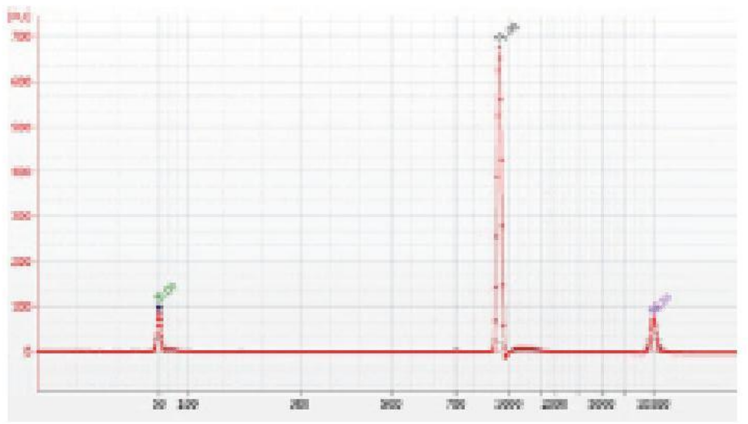
由低品質寡核苷酸合成之基因



在錯誤校正前，1/789 bp個錯誤

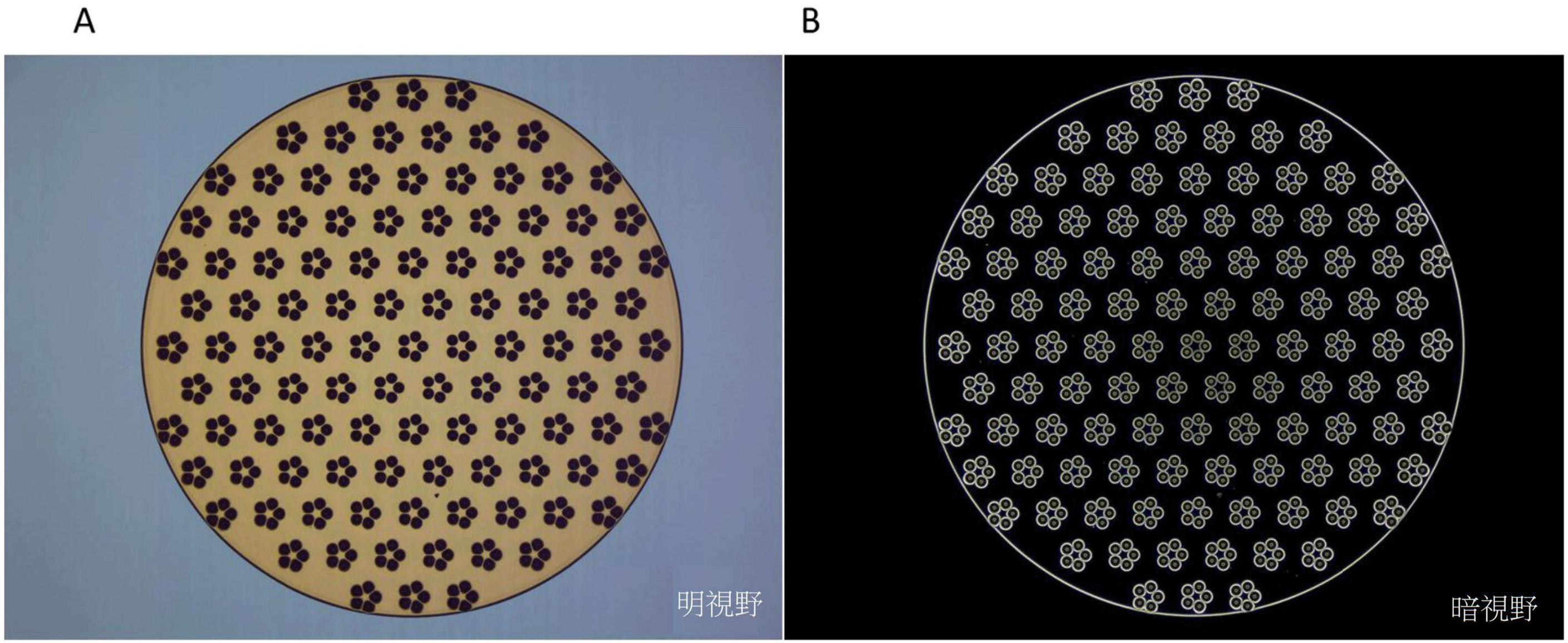


在第1次錯誤校正後，1/5,190 bp個錯誤

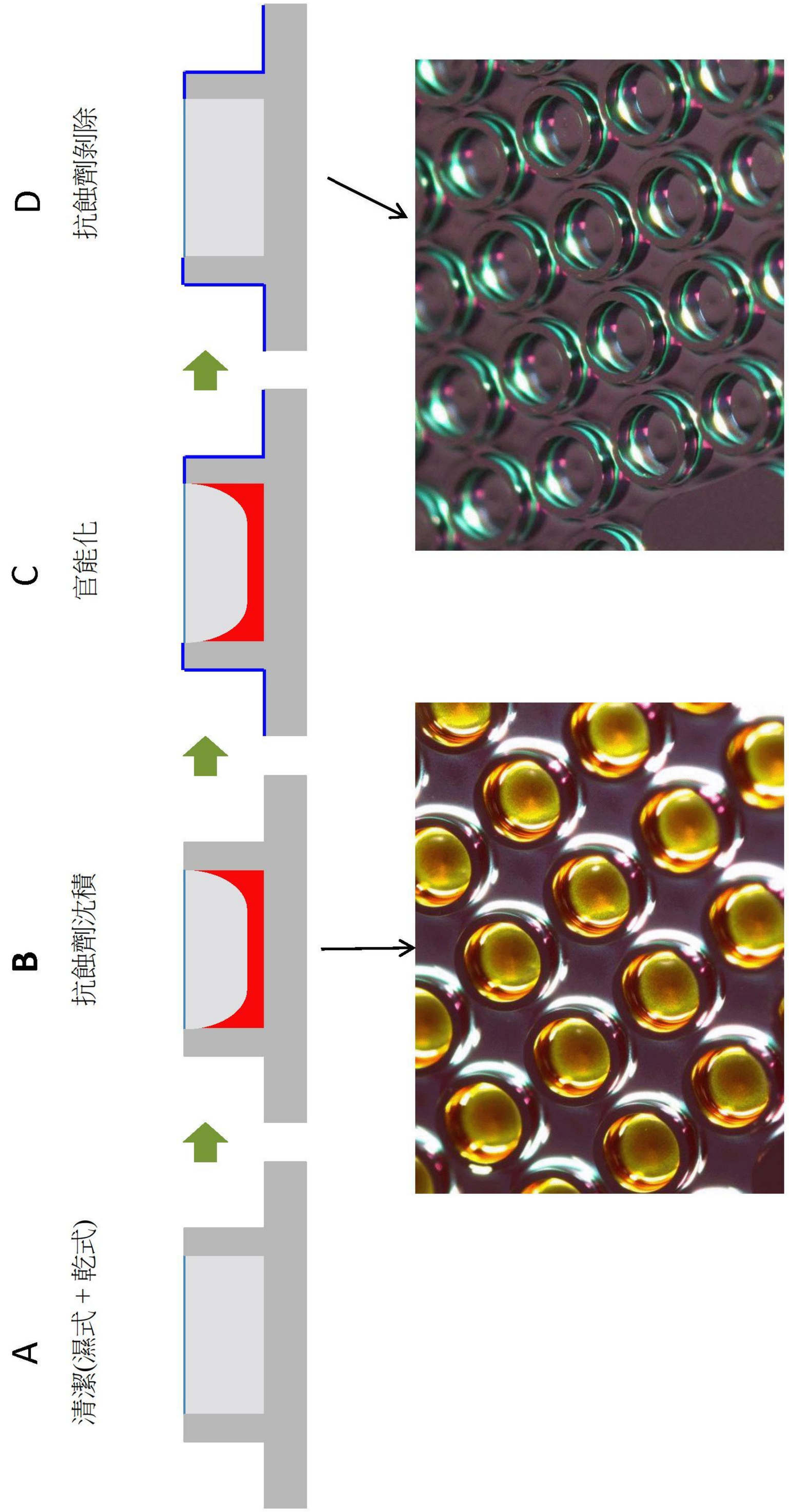


在第2次錯誤校正後，1/6,315 bp個錯誤

【圖52】

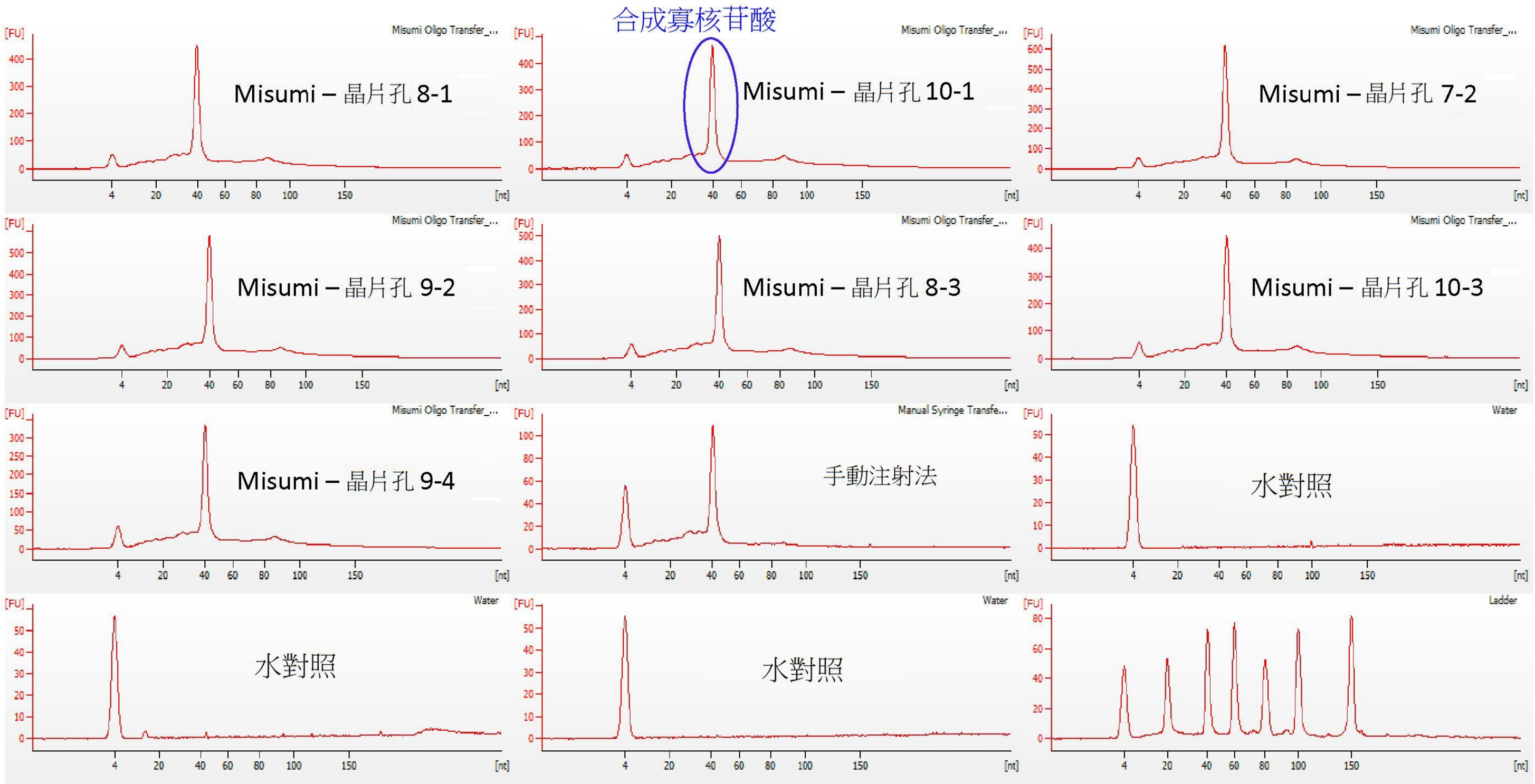


【圖53】



【圖54】

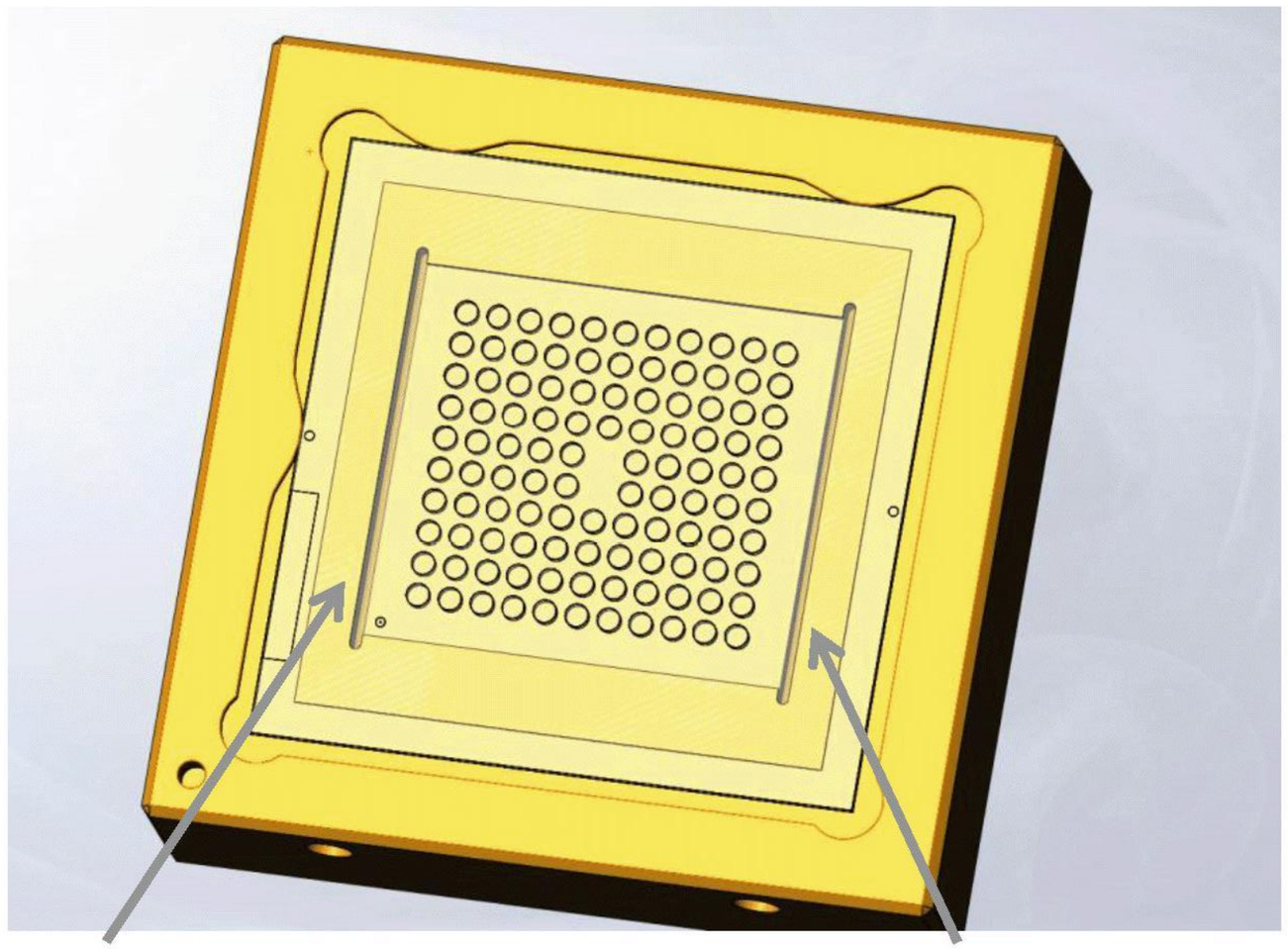
生物分析儀結果


合成寡核苷酸
Misumi – 晶片孔 8-1
Misumi – 晶片孔 10-1
Misumi – 晶片孔 7-2
Misumi – 晶片孔 9-2
Misumi – 晶片孔 8-3
Misumi – 晶片孔 10-3
Misumi – 晶片孔 9-4
手動注射法
水對照
水對照
水對照
Misumi Oligo Transfer_...
Manual Syringe Transfe...
Water
Ladder
[FU]
[nt]

【圖55】

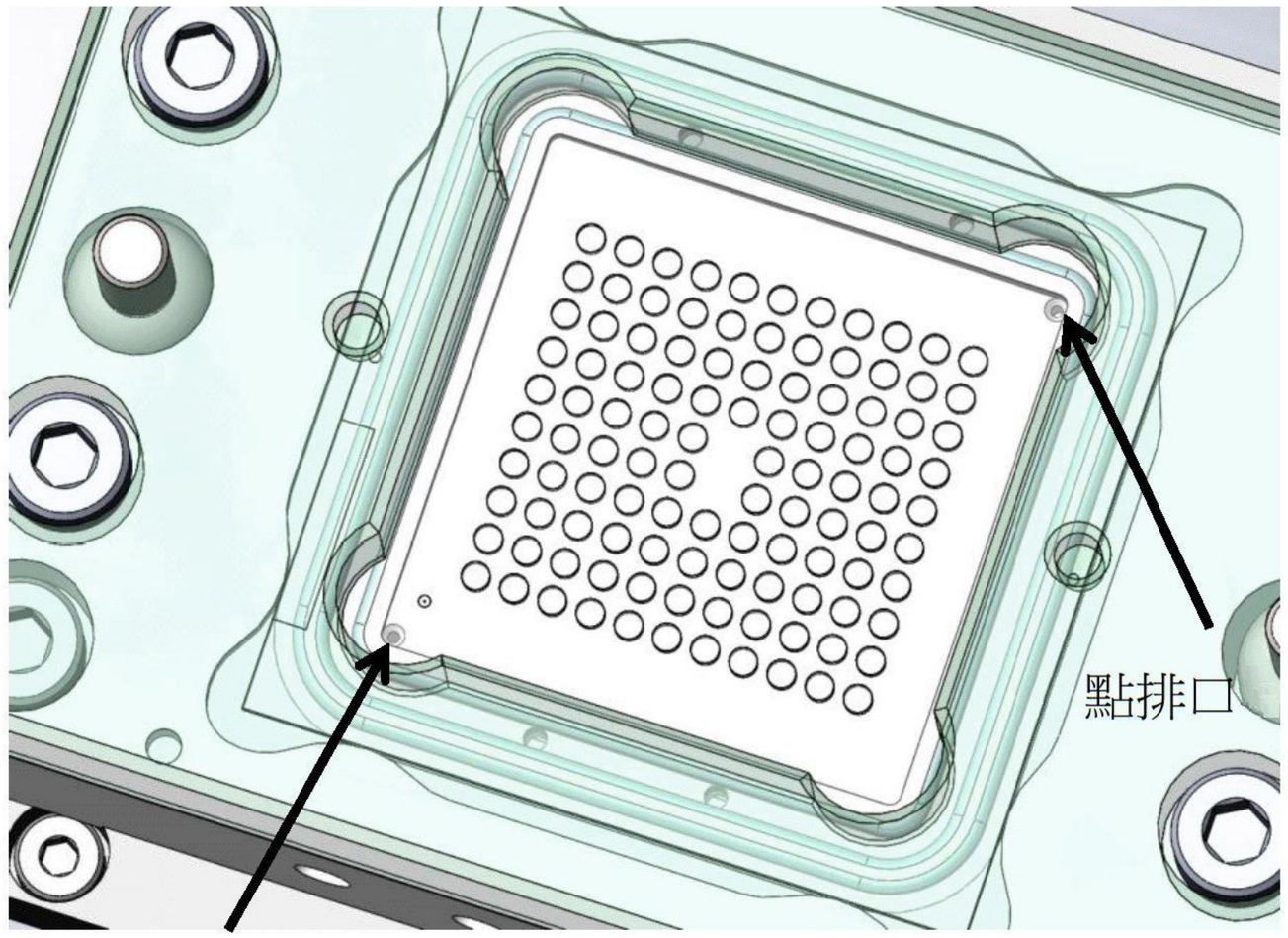
點來源口及點排口

A



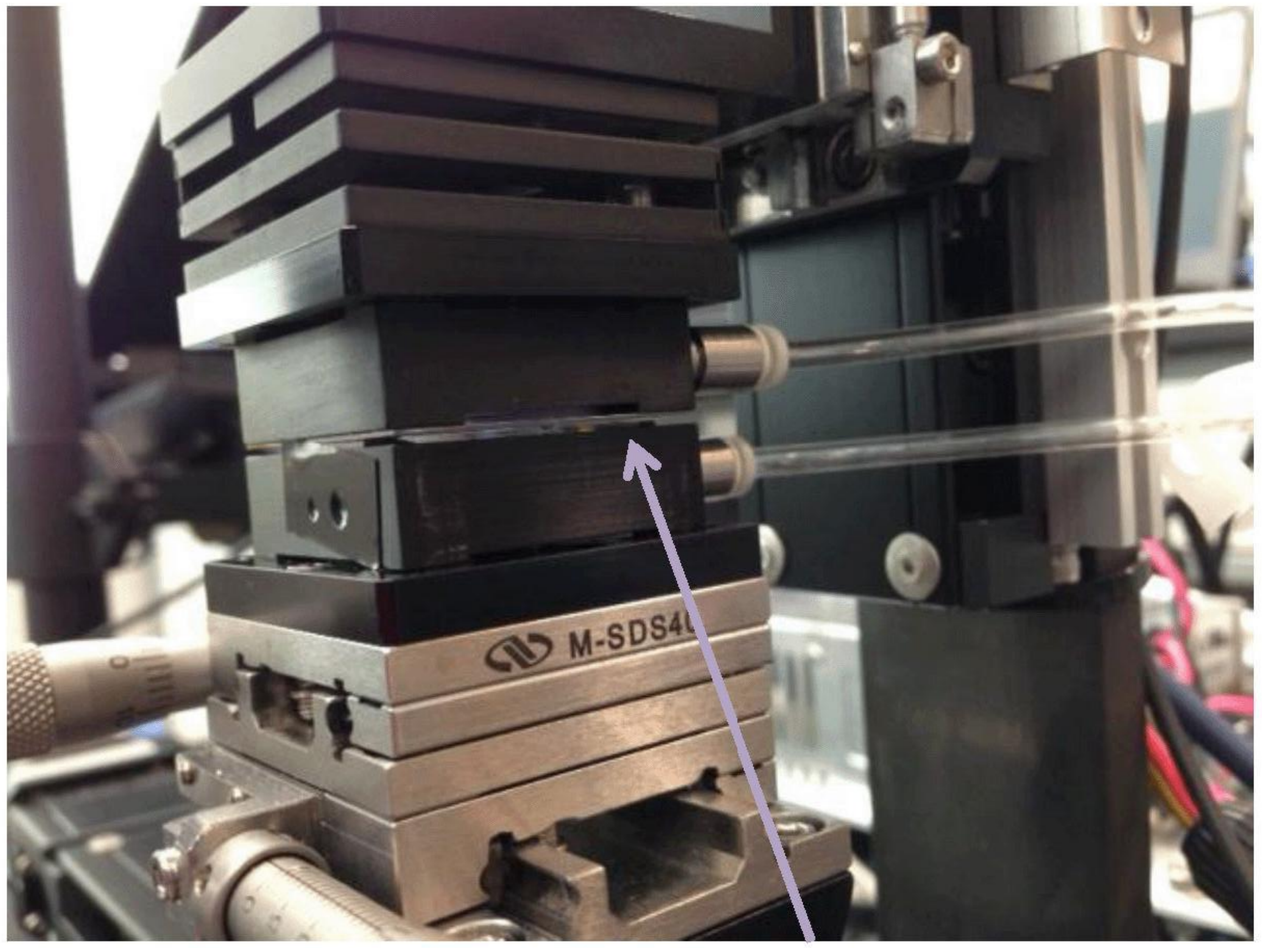
流槽設計1
(線來源口，線排口)

B



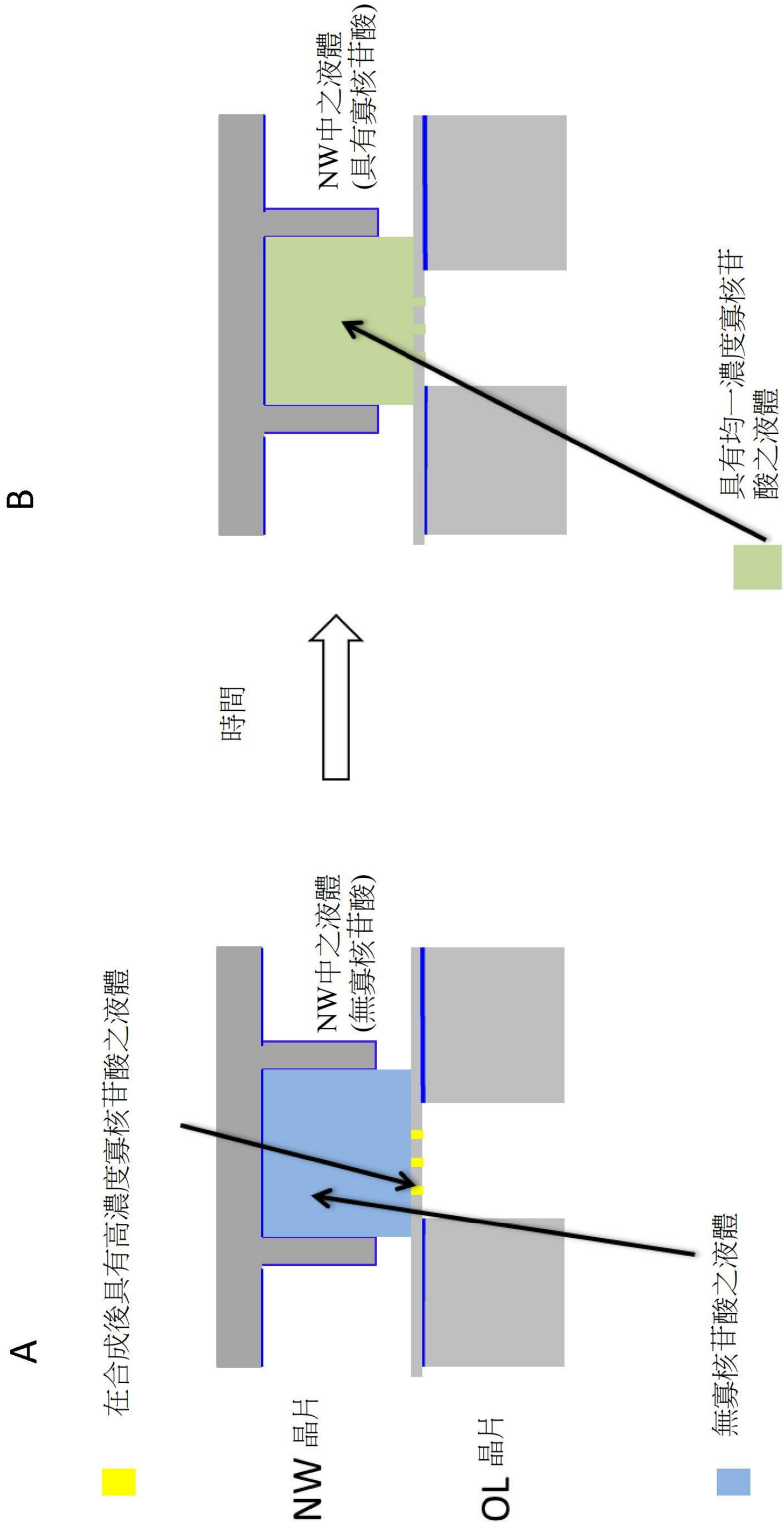
流槽設計2
(點來源口，點排口)

【圖56】

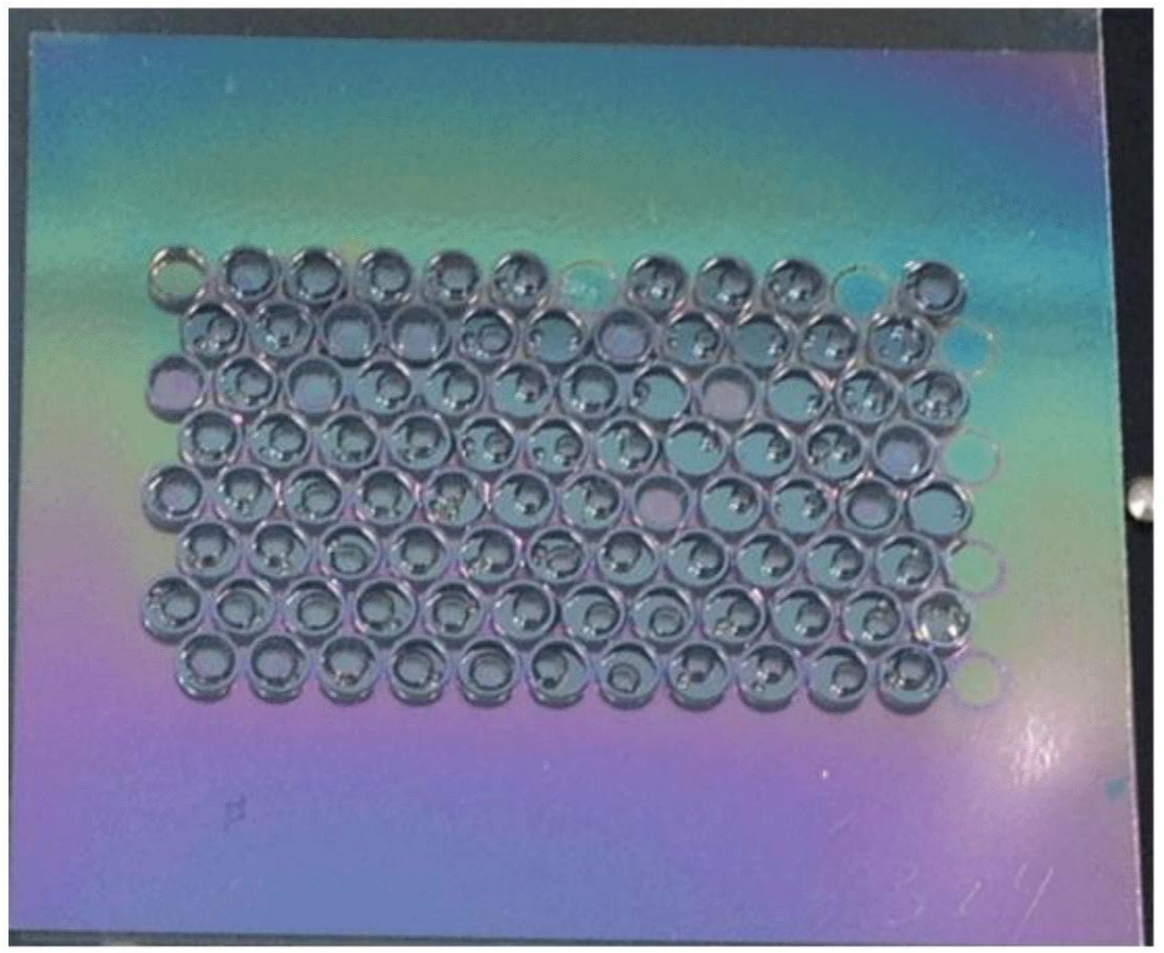


~ 50um 間隙 , 10min

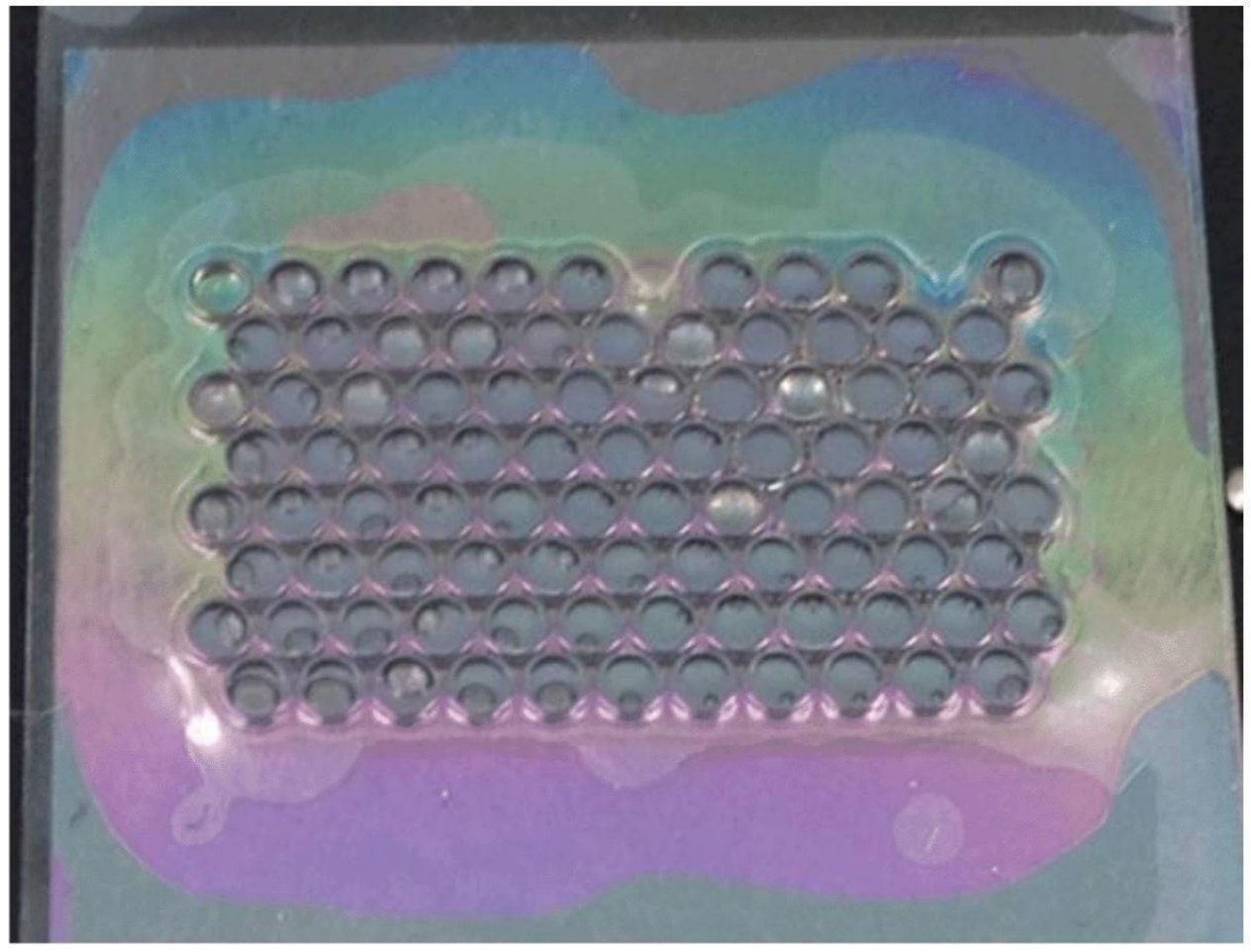
【圖57】


B
NW中之液體
(具有寡核苷酸)
具有均一濃度寡核苷酸之液體
時間
A
在合成後具有高濃度寡核苷酸之液體
NW中之液體
(無寡核苷酸)
NW 晶片
OL 晶片
無寡核苷酸之液體

【圖5】



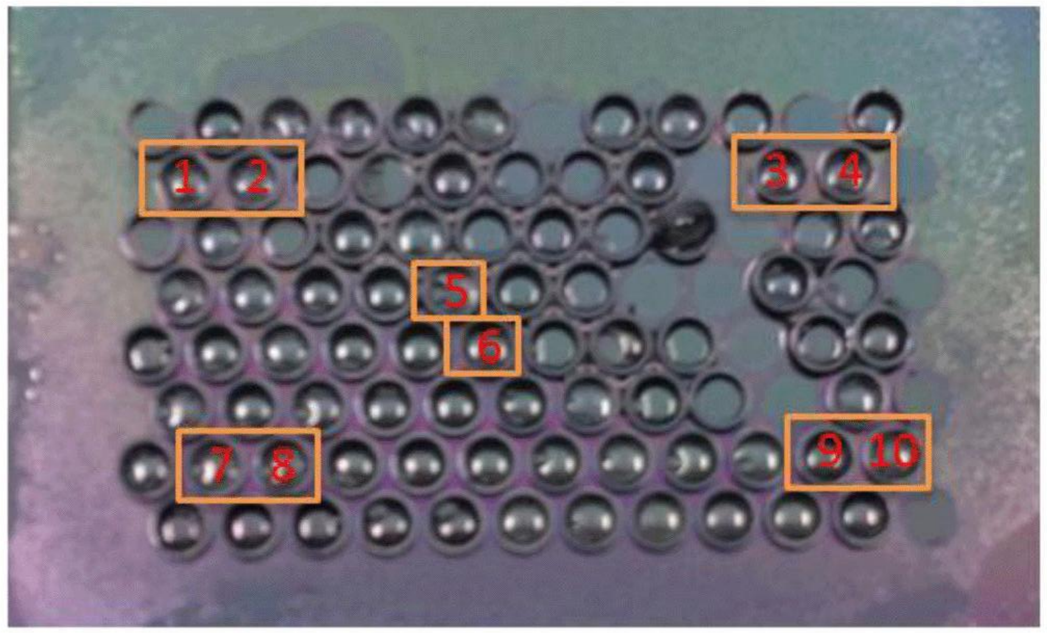
在PCA之前



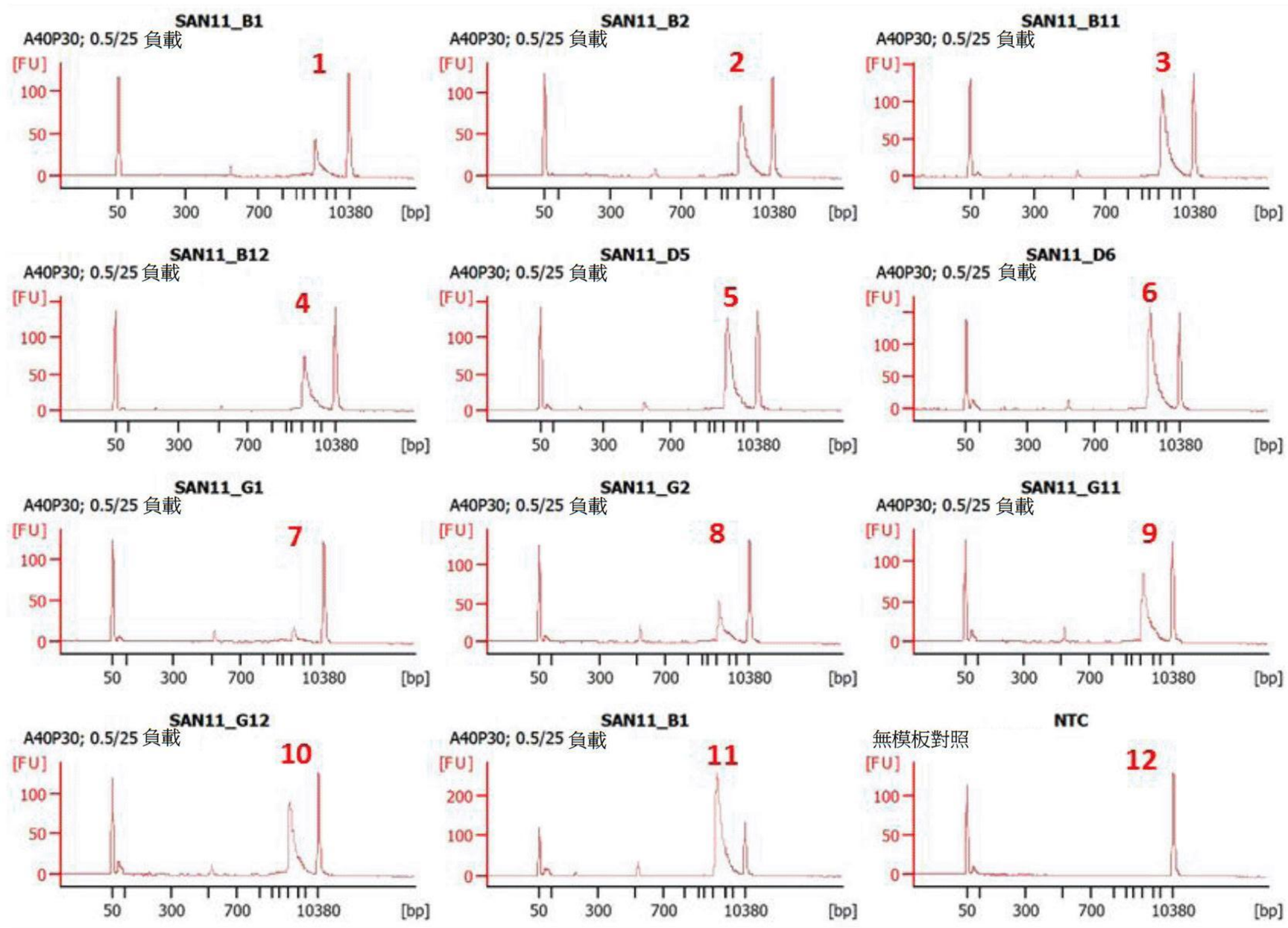
在PCA之後

【圖59】

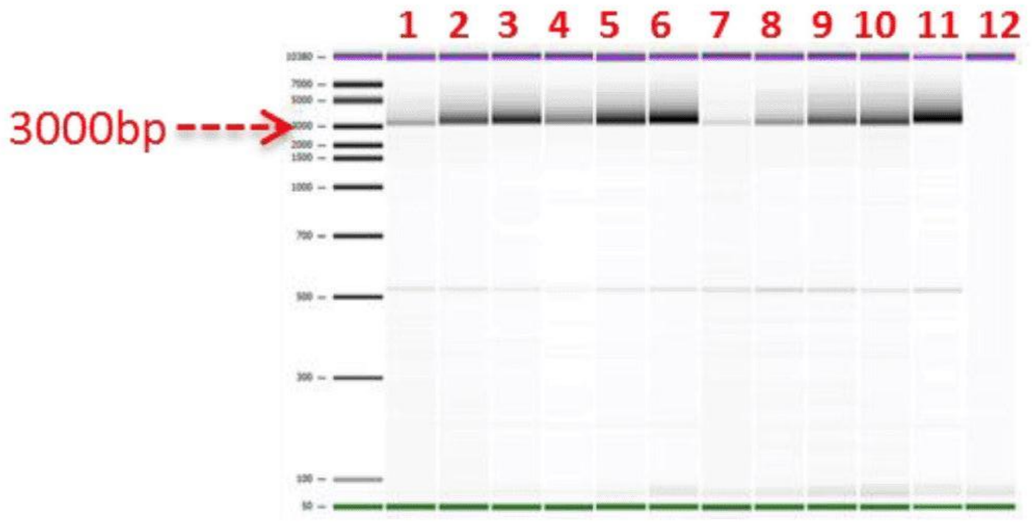
A


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

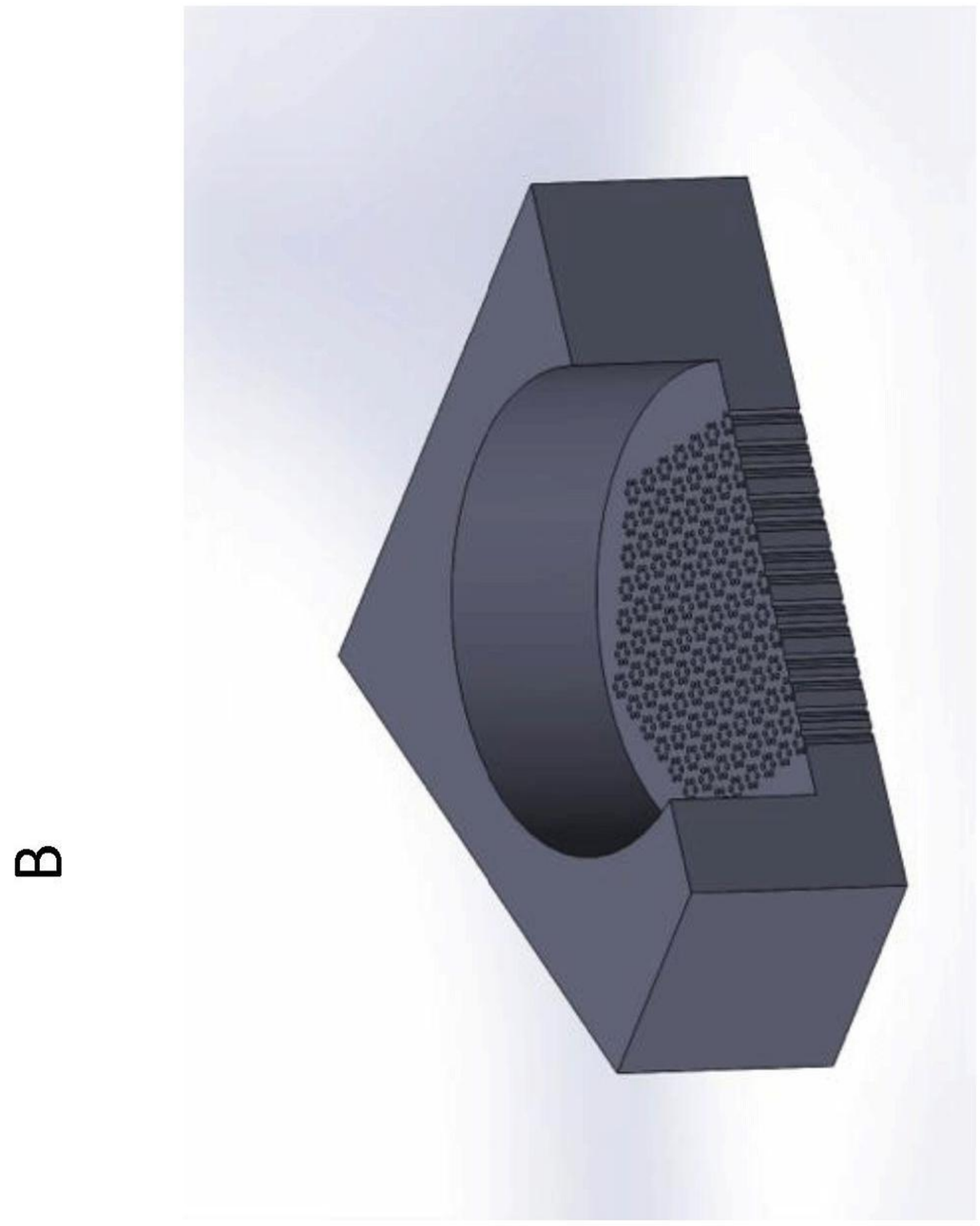
B


SAN11_B1
A40P30; 0.5/25 負載
1
SAN11_B2
A40P30; 0.5/25 負載
2
SAN11_B11
A40P30; 0.5/25 負載
3
SAN11_B12
A40P30; 0.5/25 負載
4
SAN11_D5
A40P30; 0.5/25 負載
5
SAN11_D6
A40P30; 0.5/25 負載
6
SAN11_G1
A40P30; 0.5/25 負載
7
SAN11_G2
A40P30; 0.5/25 負載
8
SAN11_G11
A40P30; 0.5/25 負載
9
SAN11_G12
A40P30; 0.5/25 負載
10
SAN11_B1
A40P30; 0.5/25 負載
11
NTC
無模板對照
12
[FU]
[bp]
50
300
700
10380

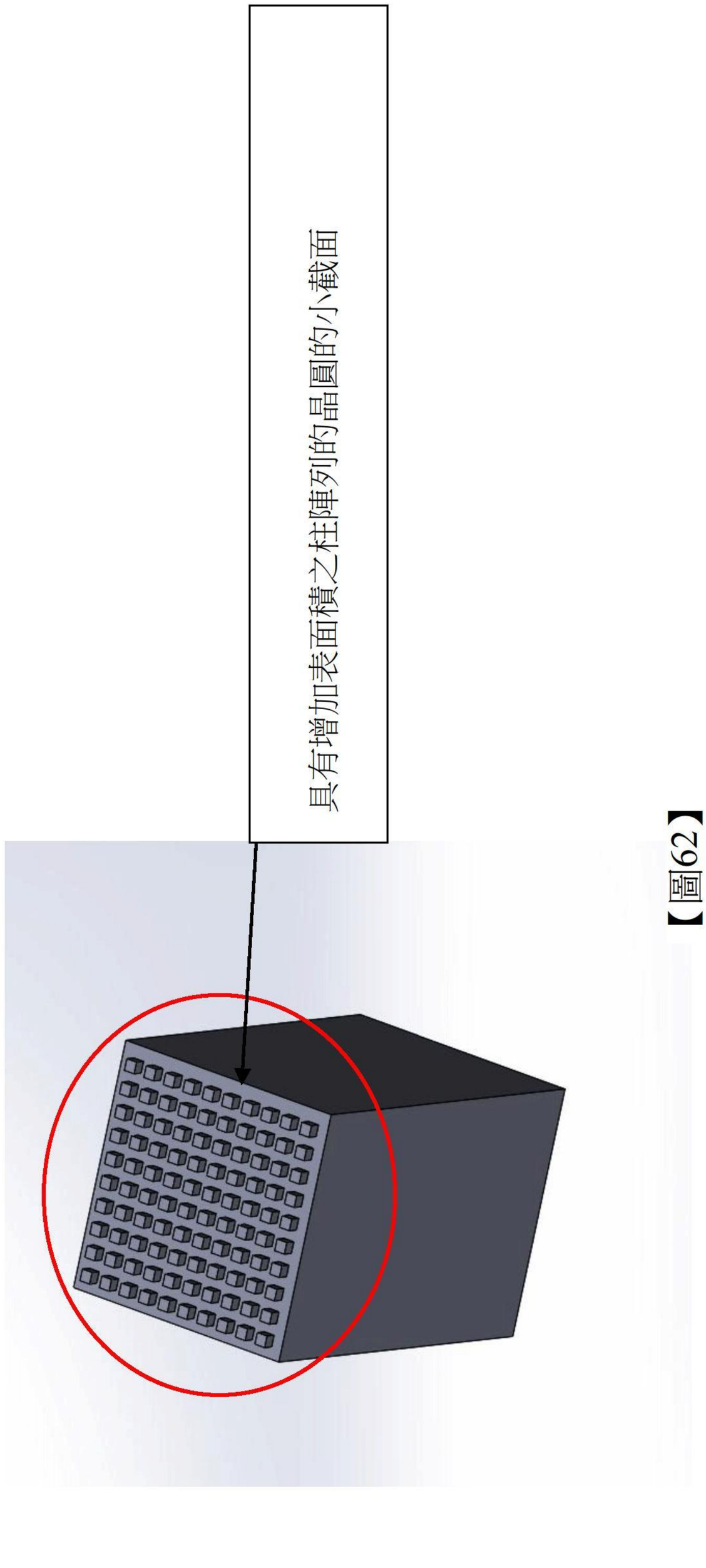
C


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
3000bp

【圖60】

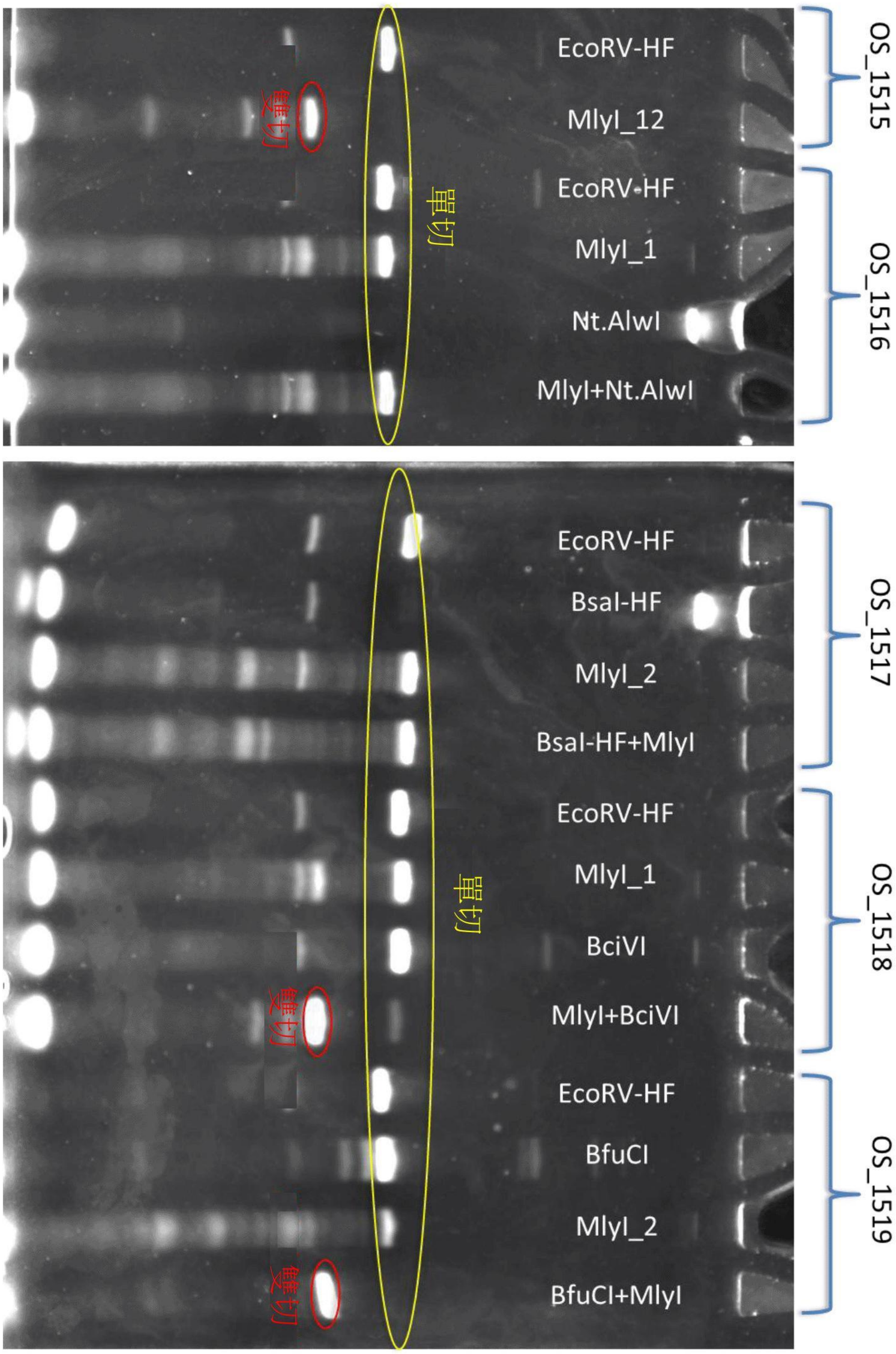


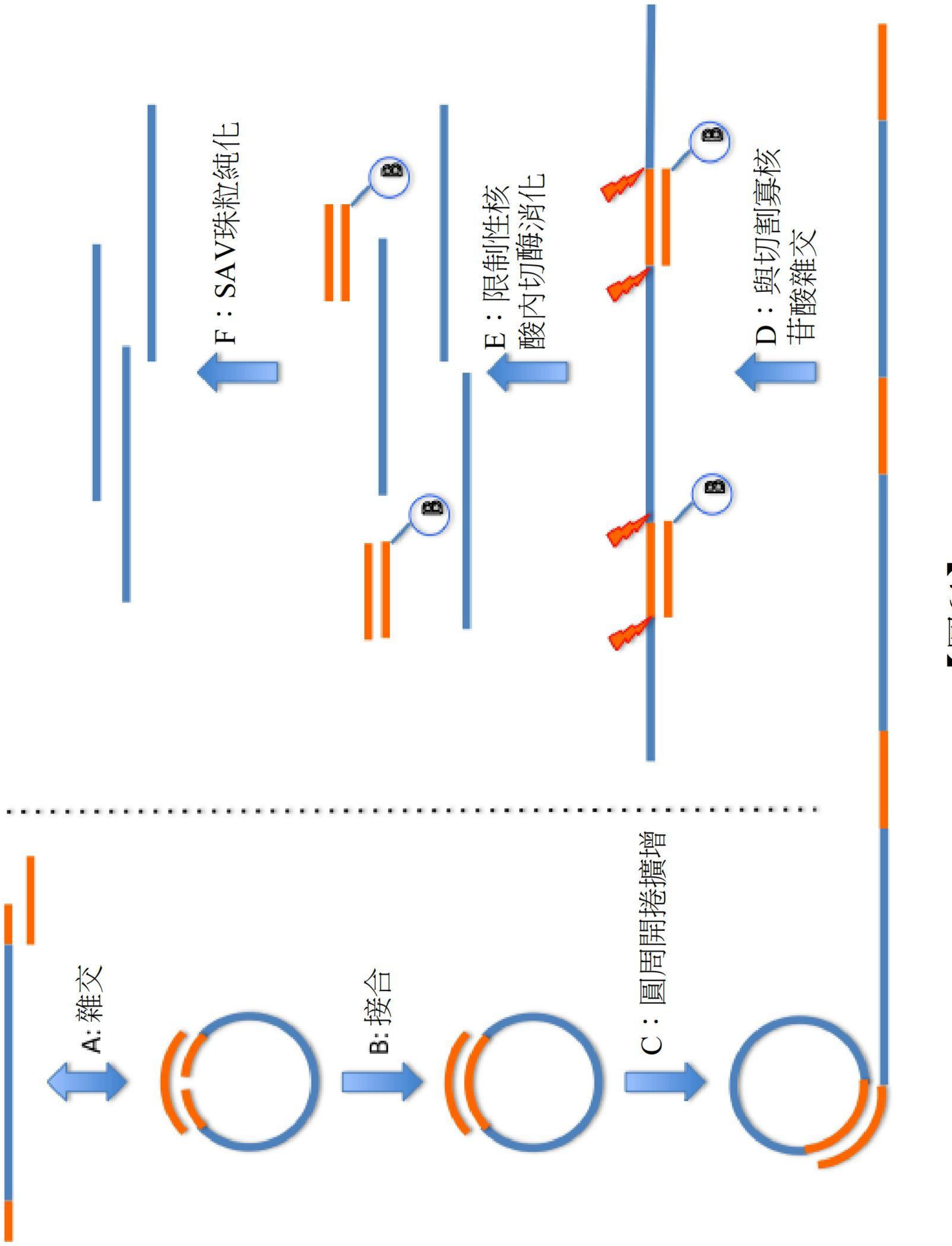
【圖61】



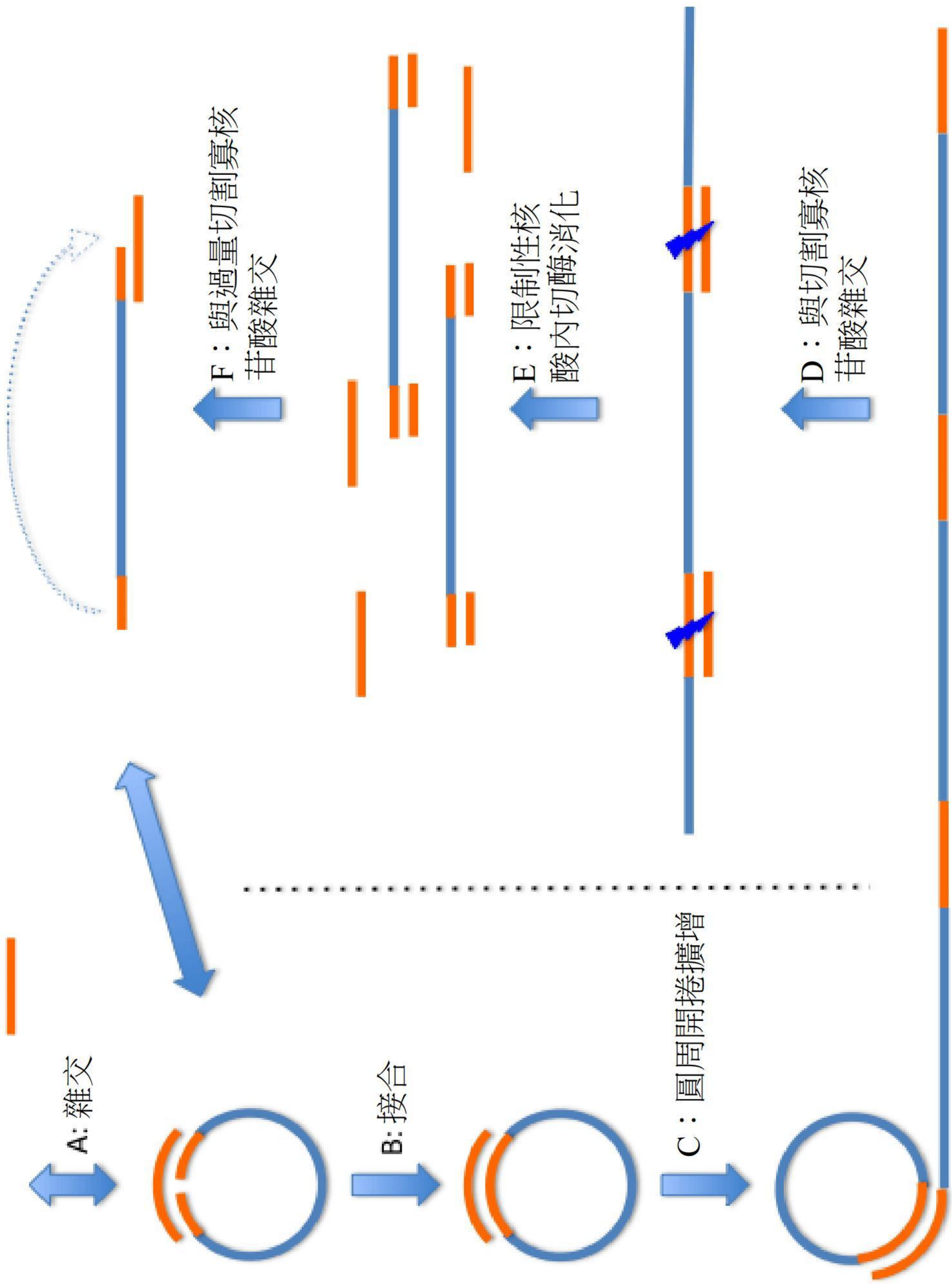
【圖62】

【圖63】


EcoRV-HF
MlyI_12
EcoRV-HF
MlyI_1
Nt.AlwI
MlyI+Nt.AlwI
EcoRV-HF
BsaI-HF
MlyI_2
BsaI-HF+MlyI
EcoRV-HF
MlyI_1
BciVI
MlyI+BciVI
EcoRV-HF
BfuCI
MlyI_2
BfuCI+MlyI
單切
雙切
OS_1515
OS_1516
OS_1517
OS_1518
OS_1519



【圖64】



【圖65】