



(21)申請案號：108127455

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 02 日

(51)Int. Cl.：

*C08F222/06 (2006.01)**C08F222/40 (2006.01)**C08F8/00 (2006.01)**C09D135/00 (2006.01)**C12Q1/6869 (2018.01)**C12Q1/689 (2018.01)**B01L3/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/08/06 美國

62/715,067

(71)申請人：美商康寧公司 (美國) CORNING INCORPORATED (US)

美國

(72)發明人：方 曄 FANG, YE (US)；萊恩 傑佛瑞格蘭 LYNN, JEFFREY GLENN (US)；孫

偉 SUN, WEI (CN)；魏 瑩 WEI, YING (US)

(74)代理人：李世章；彭國洋

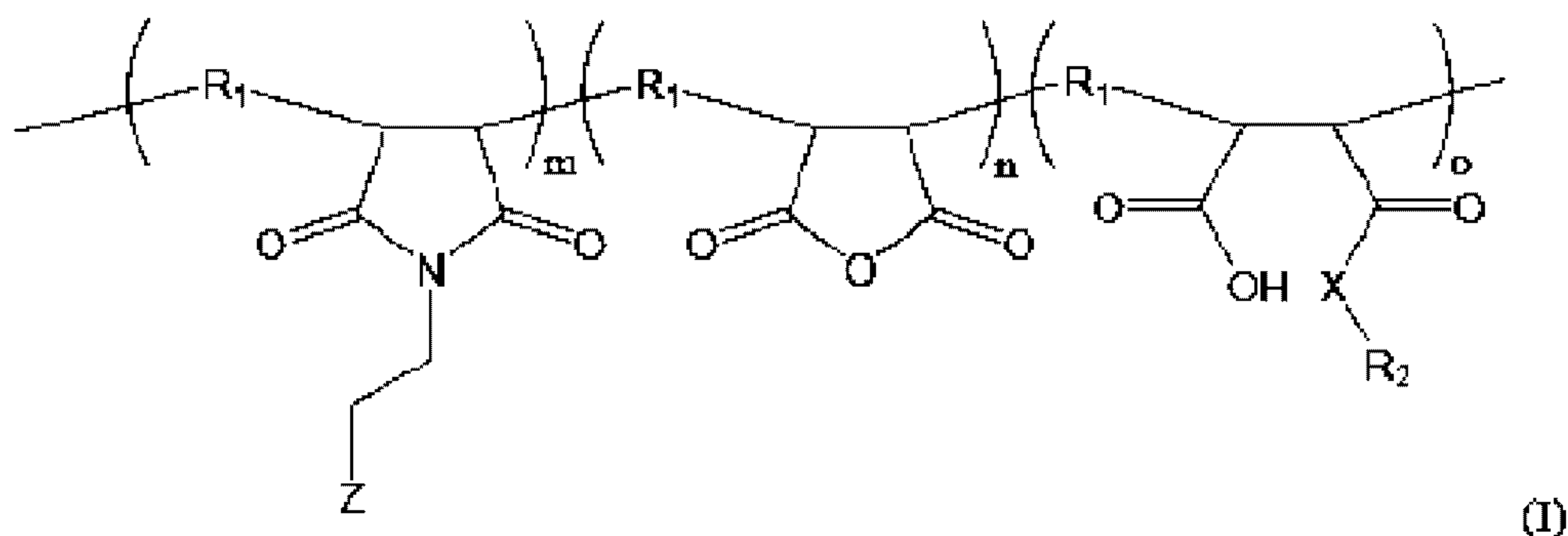
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：6 共 49 頁

(54)名稱

具有穩定聚合物塗層之流動槽及其用於基因定序之用途

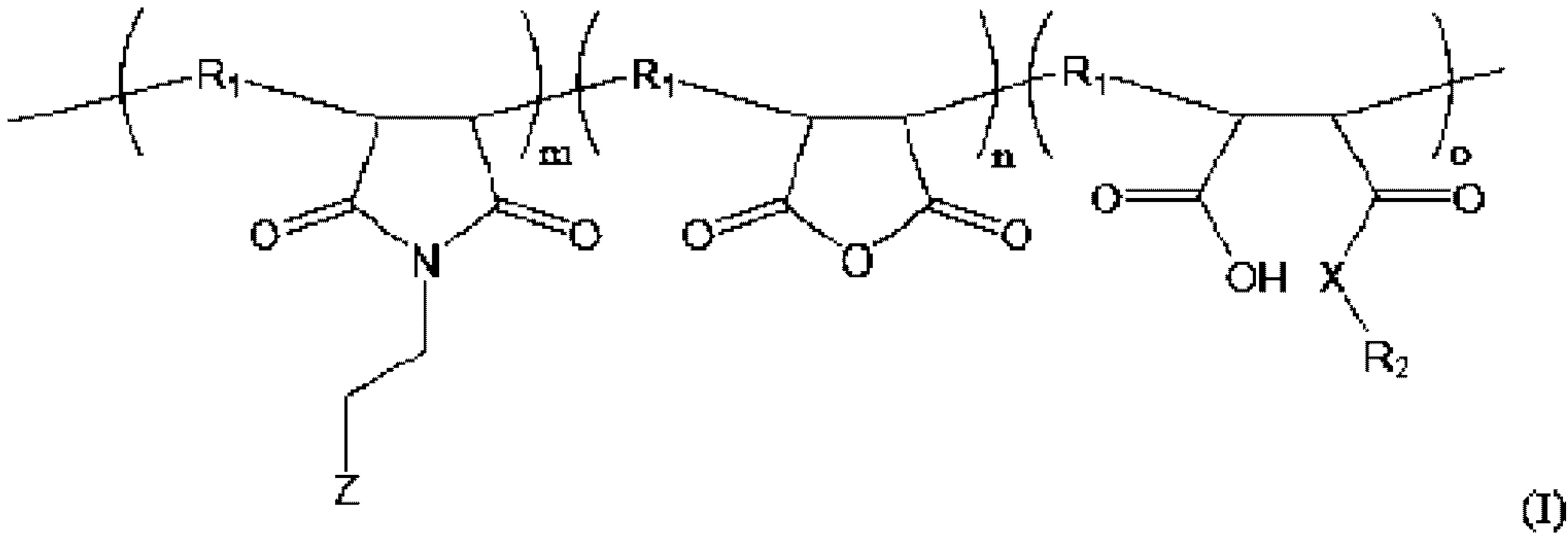
(57)摘要

本發明提供一流動槽物件，其中該流動槽物件包括具有一或多個層之一基板；佈置在該基板中之一流體通道，其中該流體通道包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面包括：一偶聯劑，該偶聯劑具有共價連接至該流體通道之該基板之一第一官能基及共價連接至一式(I)聚合物之一第二醯亞胺官能基：



R₁ 係已與馬來酸酐共聚合之一不飽和單體之一殘基。R₂ 係 H、一烷基、一寡(乙二醇)及/或一二烷基胺，m、n 及 o 各自為 1 至 10,000。X 係一二價 NH、O 及/或 S。Z 係該第一官能基。

A flow cell article is provided where the flow cell article includes a substrate having one or more layers; a fluidic channel disposed in the substrate wherein the fluidic channel includes at least one reactive surface comprising: a coupling agent having a first functional group covalently attached to the substrate of the fluidic channel and a second imide functional group covalently attached to a polymer of formula (I):



The R_1 is a residue of an unsaturated monomer that has been copolymerized with maleic anhydride. R_2 is H, an alkyl group, an oligo(ethylene glycol), and/or a dialkyl amine. m , n , and o are each from 1 to 10,000. X is a divalent NH, O, and/or S. Z is the first functional group.

指定代表圖：

符號簡單說明：

10:流動槽物件

14:固體基板

16:層

18:流體通道

22:反應性表面

26:偶聯劑

30:第一官能基

34:第二官能基

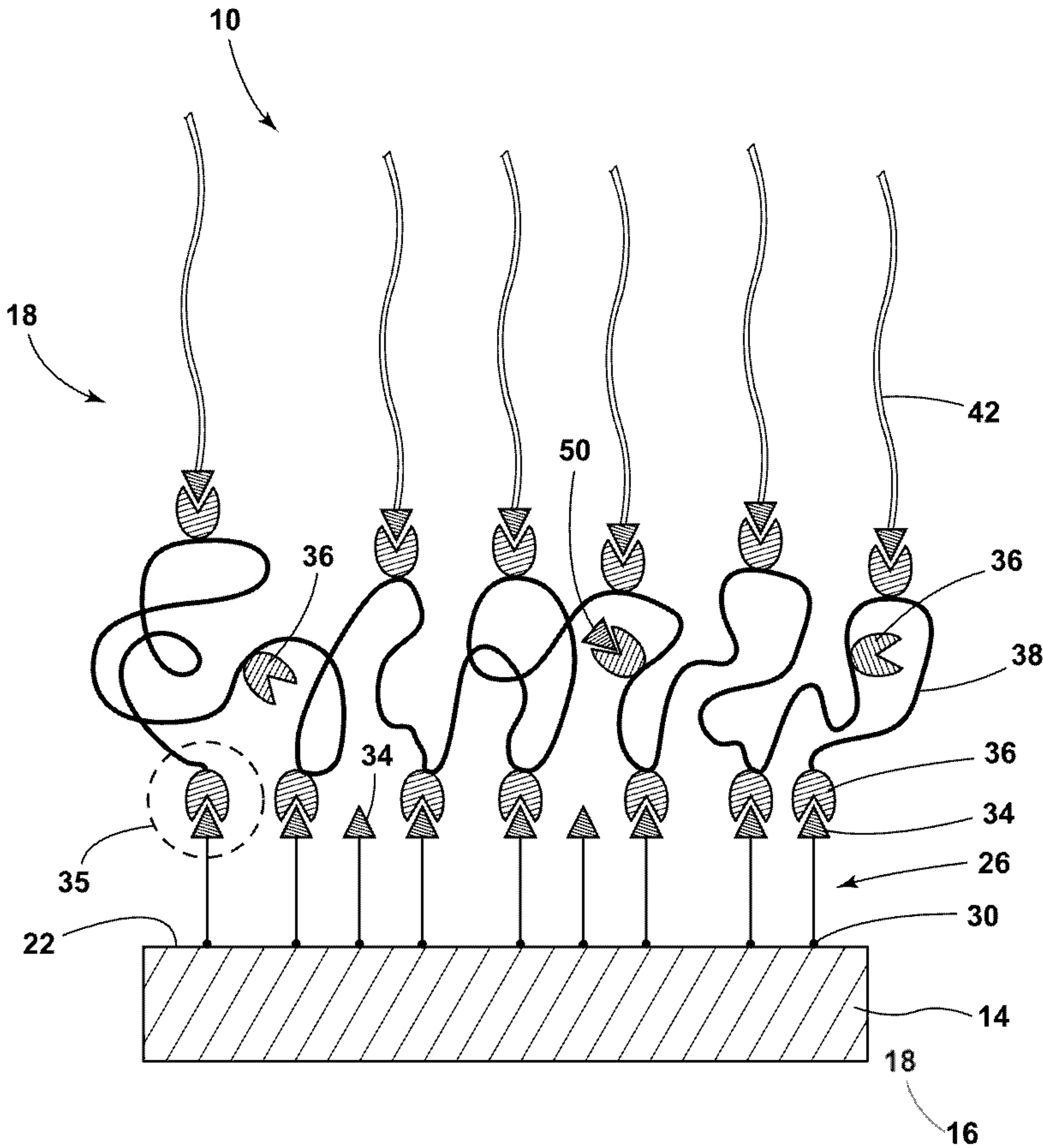
35:聚合物鍵聯

36:連接基團

38:聚合物

42:核酸引子分子

50:表面改質分子



第1圖



202019989

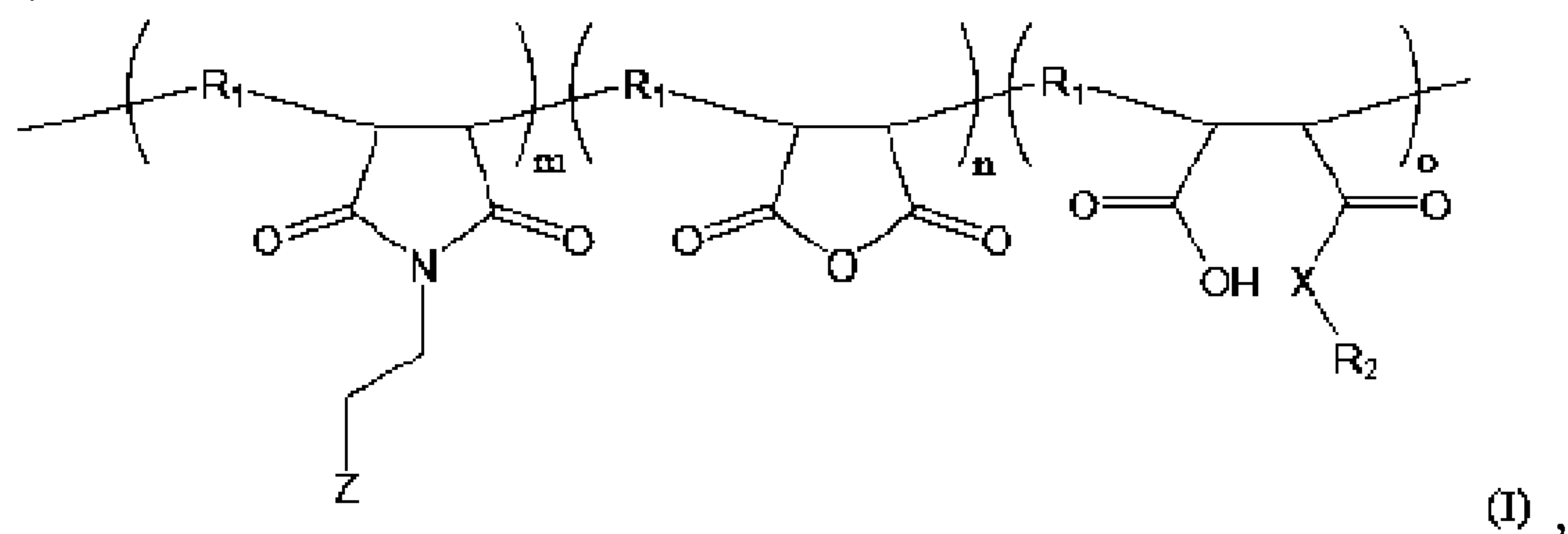
【發明摘要】

【中文發明名稱】具有穩定聚合物塗層之流動槽及其用於基因定序之用途

【英文發明名稱】FLOW CELLS WITH STABLE POLYMER COATING AND THEIR USES FOR GENE SEQUENCING

【中文】

本發明提供一流動槽物件，其中該流動槽物件包括具有一或多個層之一基板；佈置在該基板中之一流體通道，其中該流體通道包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面包括：一偶聯劑，該偶聯劑具有共價連接至該流體通道之該基板之一第一官能基及共價連接至一式(I)聚合物之一第二醯亞胺官能基：

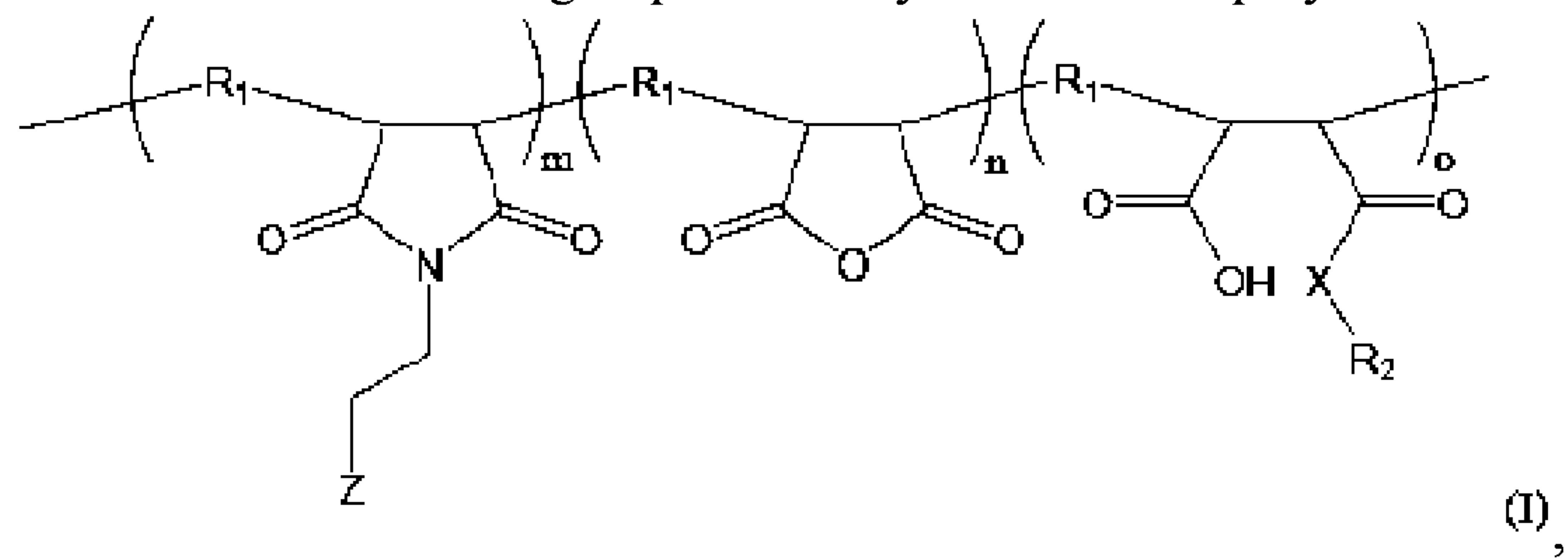


R_1 係已與馬來酸酐共聚合之一不飽和單體之一殘基。 R_2 係 H、一烷基、一寡(乙二醇)及/或一二烷基胺， m 、 n 及 o 各自為 1 至 10,000。 X 係一二價 NH、O 及/或 S。 Z 係該第一官能基。

【英文】

A flow cell article is provided where the flow cell article includes a substrate having

one or more layers; a fluidic channel disposed in the substrate wherein the fluidic channel includes at least one reactive surface comprising: a coupling agent having a first functional group covalently attached to the substrate of the fluidic channel and a second imide functional group covalently attached to a polymer of formula (I):



The R₁ is a residue of an unsaturated monomer that has been copolymerized with maleic anhydride. R₂ is H, an alkyl group, an oligo(ethylene glycol), and/or a dialkyl amine. m, n, and o are each from 1 to 10,000. X is a divalent NH, O, and/or S. Z is the first functional group.

【指定代表圖】第（ 1 ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

- 1 0 ... 流 動 槽 物 件
- 1 4 ... 固 體 基 板
- 1 6 ... 層
- 1 8 ... 流 體 通 道
- 2 2 ... 反 應 性 表 面
- 2 6 ... 偶 聯 劑
- 3 0 ... 第 一 官 能 基
- 3 4 ... 第 二 官 能 基
- 3 5 ... 聚 合 物 鍵 聯

3 6 ... 連 接 基 團

3 8 ... 聚 合 物

4 2 ... 核 酸 引 子 分 子

5 0 ... 表 面 改 質 分 子

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】具有穩定聚合物塗層之流動槽及其用於基因定序之用途

【英文發明名稱】FLOW CELLS WITH STABLE POLYMER COATING AND THEIR USES FOR GENE SEQUENCING

【技術領域】

相關申請案之交互參照

【0001】本申請案主張根據專利法於2018年8月6日提出申請之美國臨時申請案第62/715,067號之優先權益，該申請案之內容之全文皆以引用方式併入本文中。

【0002】本揭示內容係關於微流體流動槽裝置以及製造及使用微流體裝置用於生物分子分析、具體而言基因定序之方法。

【先前技術】

【0003】各種各樣之生物分子分析技術(如DNA微陣列、下一代定序(next generation sequencing; NGS)或基於DNA之生物感測器)皆採用合成DNA探針分子作為最關鍵之檢測元件。該等DNA探針分子通常需要共價連接至固體支撐物，包括平面二維表面及三維表面，例如微珠及微米/奈米顆粒。該等DNA探針分子共價連接在表面上可使用多種不同之方法達成。不管使用哪種方法，該等基因定序技術皆有許多定序週期，每個週期涉

及多個嚴格之洗滌步驟，反過來，該等步驟通常會導致DNA分子隨時間丟失，由此限制欲達成之閱讀長度。

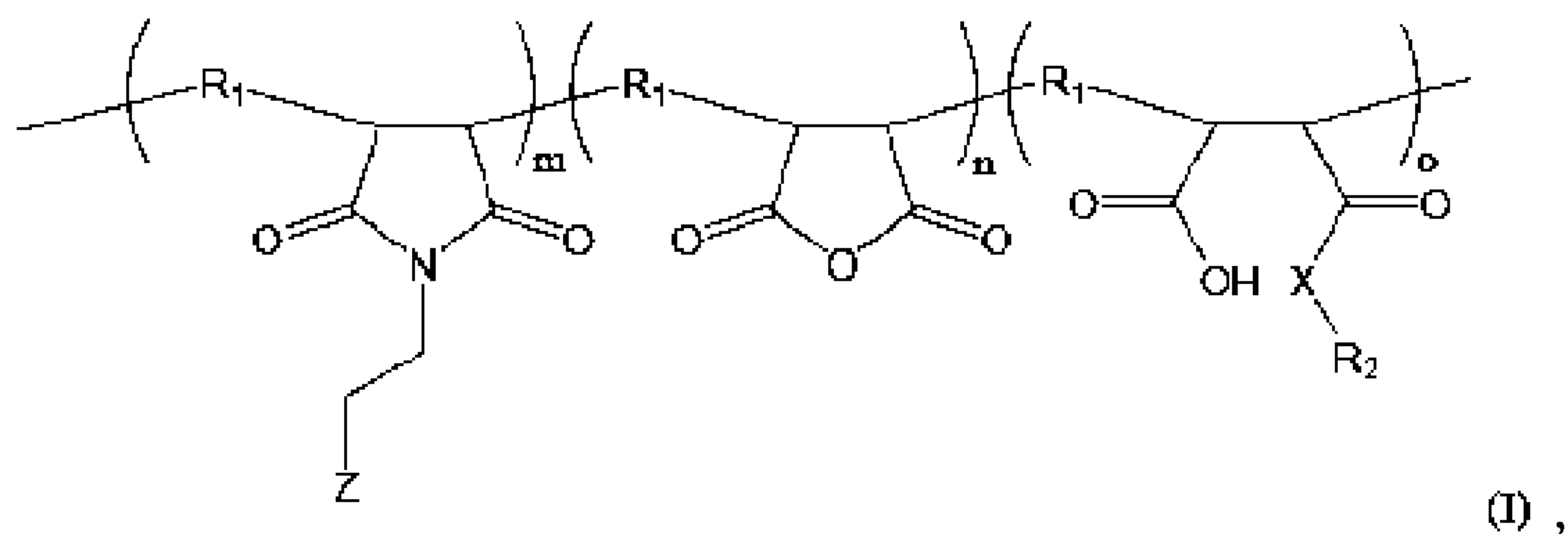
【0004】基於光學檢測之NGS技術通常使用高密度DNA引子(亦稱為引子坪)自生物樣品捕獲DNA片段，所有片段皆具有與DNA引子序列互補之銜接序列。捕獲DNA片段後，立即使所有DNA片段局部擴增，形成理想之單株簇。聚簇後，藉由合成來確定每個簇內之DNA片段之序列，該合成由數百個循環組成，每個循環由使用DNA聚合酶添加核苷酸、然後洗滌、成像、終止子裂解及洗滌組成。因此，藉由合成進行之DNA定序在微流體裝置(例如流動槽)內遇到了劇烈之多步處理，其中DNA與反應基板之連接可能有問題。

【0005】因此，需要改進之技術及相應之化學物質，以更有效地將DNA片段偶聯至微流體流動槽裝置中使用之各種不同之基板上，該等受質能夠經受合成定序DNA鏈中使用之循環條件。新化學物質之開發可在DNA片段與流動槽裝置之受質之間提供更穩定之鍵聯，此可轉化為製造更長DNA序列之可靠性、準確性及製造成本之提高。

【發明內容】

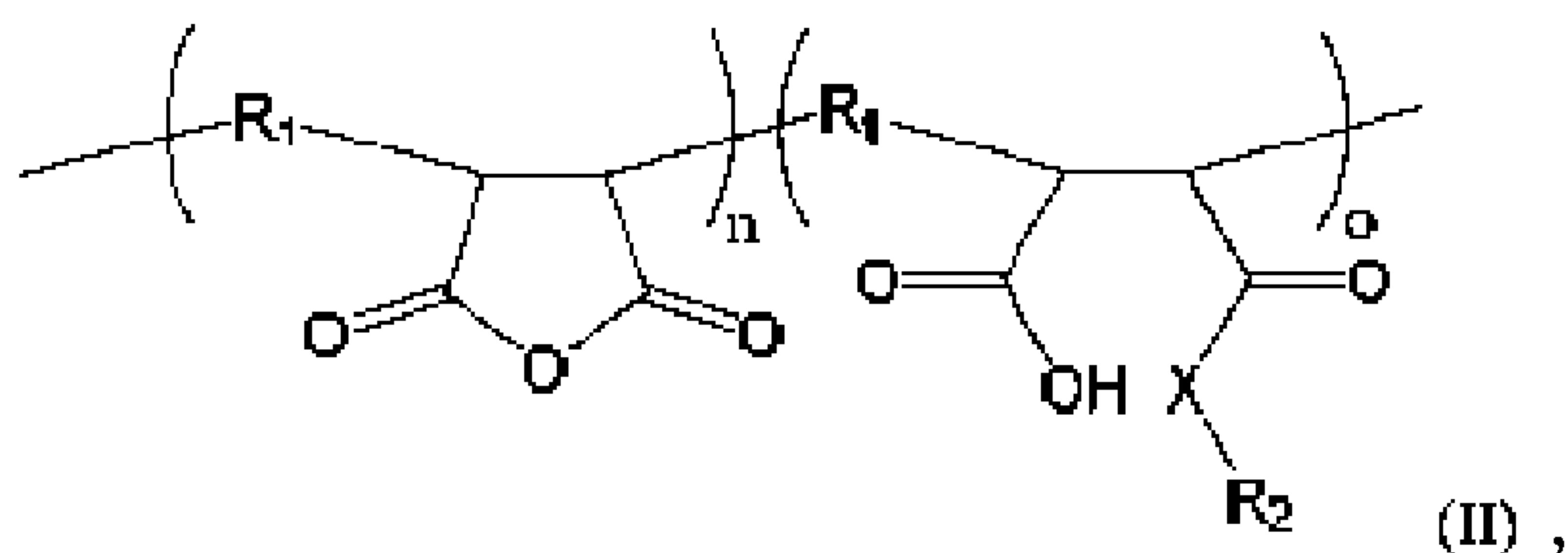
【0006】根據本揭示內容之一些態樣，流動槽物件包括：具有一或多個層之基板；佈置在基板中之流體通道，其中流體通道包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面具有：偶聯劑，其具有共價連接至流體通道之基板

之第一官能基及共價連接至式(I)聚合物之第二醯亞胺官能基：



其中： R_1 係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基； R_2 係 H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺；m、n 及 o 各自為 1 至 10,000；X 係二價 NH、O 及/或 S；且 Z 係第一官能基。

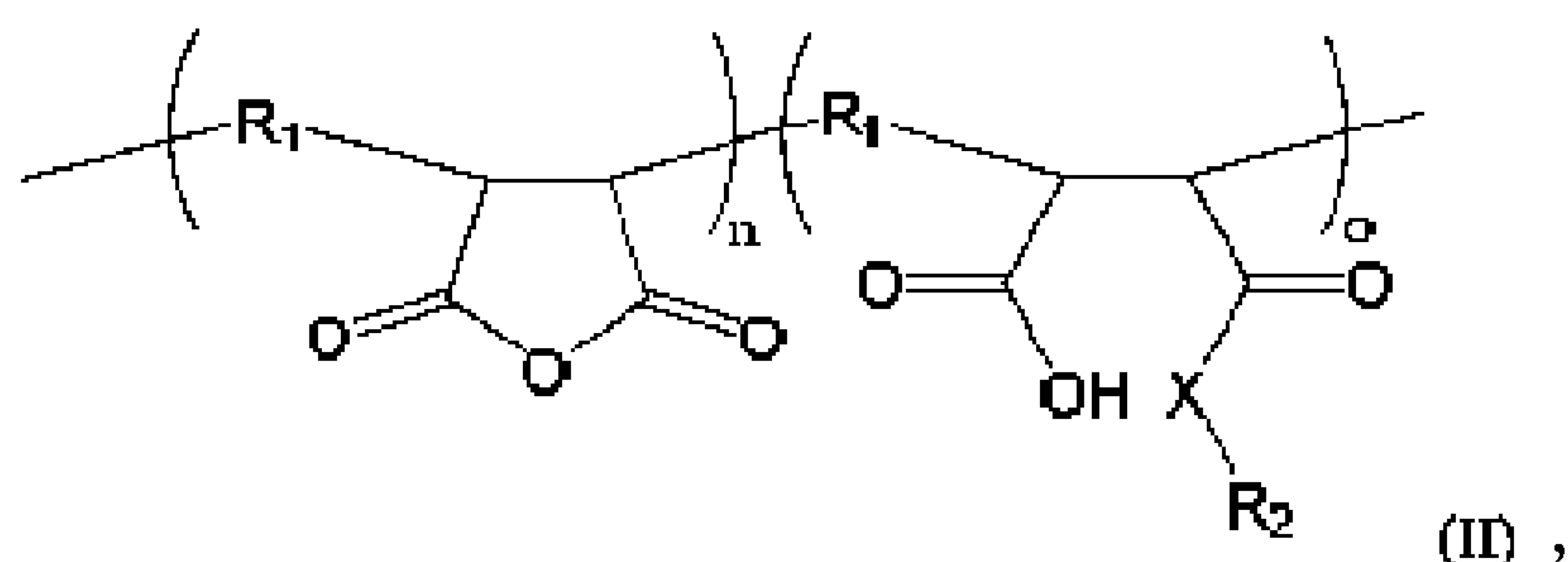
【0007】 根據本揭示內容之一些態樣，流動槽系統包括：具有一或多個層之基板；佈置在基板中之流體通道，其中流體通道包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面具有：偶聯劑，其具有共價連接至流體通道之基板之第一官能基及遠離基板定位之第二官能基；欲共價連接至偶聯劑之第二官能基之式(II)聚合物：



其中： R_1 係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基； R_2 係 H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺；n 及 o 各自係 1 至 10,000 之整數；且 X 係二價 NH、O 及/或 S；

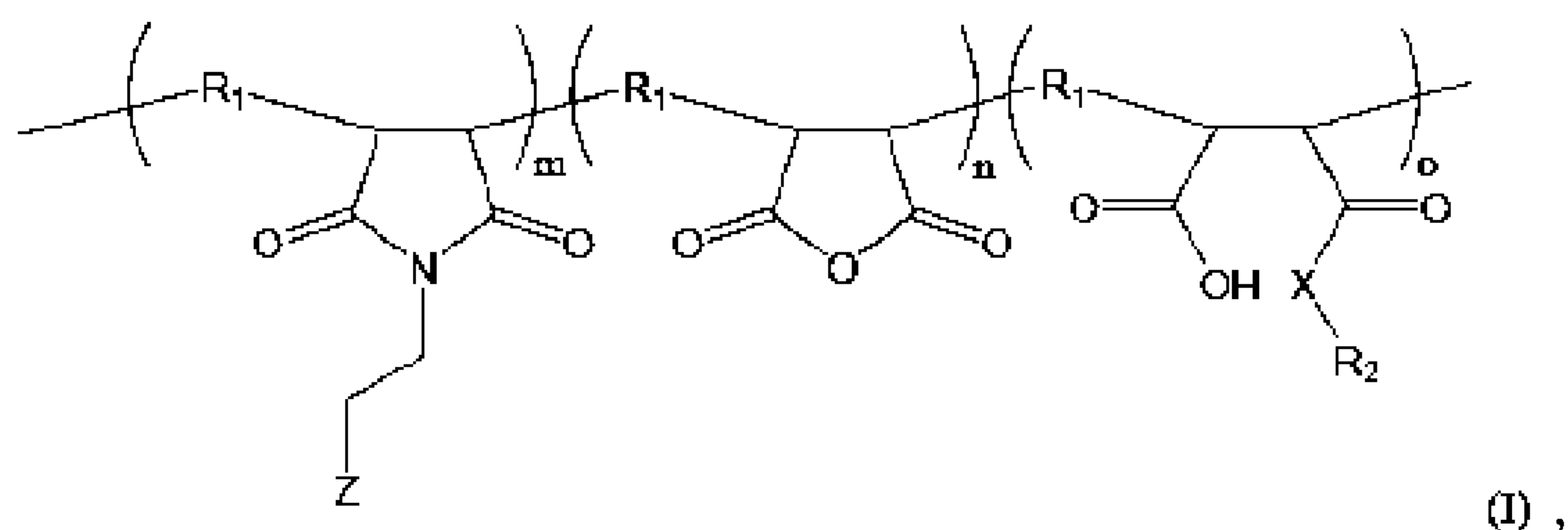
共價連接至聚合物之核酸引子分子。

【0008】 根據本揭示內容之其他態樣，提供製備流動槽物件之方法。該方法包括以下步驟：使佈置在基板中之流體通道與偶聯劑接觸以將第一官能基共價連接至流體通道；使式(II)聚合物與偶聯劑接觸以將聚合物共價連接至第二官能基以在系鏈聚合物上形成醯亞胺鍵聯；



其中：R₁ 係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基；R₂ 係 H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺；n 及 o 各自係 1 至 10,000 之整數；且 X 係二價 NH、O 及/或 S；使核酸引子分子與系鏈聚合物接觸以將核酸引子分子共價連接至系鏈聚合物。

【0009】 根據本揭示內容之其他態樣，提供對核酸定序之方法。該方法包括以下步驟：提供流動槽物件，該物件具有：包括一或多個層之基板；佈置在基板中之流體通道，其中流體通道包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面包括偶聯劑，該偶聯劑具有共價連接至流體通道之基板之第一官能基及共價連接至式(I)聚合物之第二醯亞胺官能基：



其中： R_1 係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基； R_2 係 H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺； m 、 n 及 o 各自為 1 至 10,000； X 係二價 NH、O 及/或 S；且 Z 係第二官能基；使核酸引子分子與式(I)聚合物接觸以將核酸引子分子共價連接至式(I)聚合物；使用核酸引子分子捕獲 DNA 片段，其中每個 DNA 片段含有核酸引子分子之互補序列；及將核苷酸添加至核酸引子分子之末端以合成所捕獲每個 DNA 片段之互補 DNA 序列，其中互補 DNA 序列經由核酸引子分子共價偶聯至式(I)聚合物。

【0010】 其他特徵及優點將在隨後之詳細描述中闡述，並且熟習此項技術者根據該描述將部分地容易明瞭或者藉由實踐本文所述之實施例(包括隨後之詳細描述、申請專利範圍以及附圖)認識到該等特徵及優點。

【0011】 應理解，前文一般描述及下文詳細描述僅具有例示性，並且意欲提供理解申請專利範圍之性質及特徵之概述或框架。附圖包括在內以提供進一步之理解，並且納入並構成本說明書之一部分。附圖圖解說明一或多個實施例，並且與該描述一起用於解釋各個實施例之原理及操作。

【圖式簡單說明】

【0012】 下文係對附圖中各圖之描述。各圖不一定係按比例繪製，並且為了清楚及簡明起見，各圖之某些特徵及某些視圖可按比例放大或示意性地顯示。

【0013】 第1圖係根據本揭示內容之一些態樣共價偶聯至DNA探針分子之流動槽物件之示意圖；

【0014】 第2圖係根據本揭示內容之一些態樣共價鍵結至偶聯劑之聚合物塗層之示意性視圖，該偶聯劑連接至形成流體通道之基板；

【0015】 第3圖係根據本揭示內容之一些態樣共價鍵結至偶聯劑之聚合物塗層之示意性視圖，該偶聯劑連接至塗覆在形成流體通道之基板上之金屬氧化物層；

【0016】 第4A-4C圖係根據本揭示內容之一些態樣具有聚合物塗層之流體通道表面之掃描電子顯微鏡影像；

【0017】 第5A圖及第5B圖分別顯示根據本揭示內容之一些態樣，在與Cy3染料標記之dT30雜交後，具有八個通道之流動槽物件之照片影像(5A)及螢光影像(5B)，每個通道由連接至聚合物塗層之胺封端之dA30組成；且

【0018】 第6圖係顯示醯胺鍵聯及醯亞胺鍵聯對閱讀長度定序之比較差異之圖，該等醯胺鍵聯及醯亞胺鍵聯用於將偶聯劑共價鍵結至用於連接DNA之聚合物塗層。

【實施方式】

【0019】 其他特徵及優點將在隨後之詳細描述中闡述，並且熟習此項技術者根據該描述將部分地容易明瞭或者藉由實踐如隨後之描述以及申請專利範圍及附圖中所述之實施例認識到該等特徵及優點。

【0020】 如本文使用之術語「及/或」在用於兩個或更多個項目之列表中時意指可單獨使用所列項目中之任一者，或者可使用所列項目中之兩者或更多者之任一組合。例如，若組合物闡述為含有組分A、B及/或C，則該組合物可含有單獨A；單獨B；單獨C；A及B之組合；A及C之組合；B及C之組合；或者A、B及C之組合。

【0021】 在本文件中，諸如第一及第二、頂部及底部及諸如此類關係術語僅用於區分一個實體或動作與另一個實體或動作，而不一定要求或暗示該等實體或動作之間之任何實際該關係或順序。

【0022】 熟習此項技術者以及製造或使用本揭示內容之彼等將會作出對本揭示內容之修改。因此，應理解，附圖中顯示及上文所述之實施例僅出於說明之目的，而不欲限制本揭示內容之範圍，本揭示內容之範圍由以下申請專利範圍限定，如根據專利法之原理、包括等同原則所解釋。

【0023】 出於本揭示內容之目的，術語「偶聯(coupled)」(以其所有形式：偶聯(couple)、偶聯(coupling)、偶聯(coupled)等)通常意指兩個組件直接或間接相互連接。此種連接本質上可為固定的或本質上

可為可移動的。此種連接可藉由兩個組件及任何其他中間構件彼此或與兩個組件一體形成為單個整體來達成。除非另有說明，否則此種連接本質上可為永久性的，或者本質上可為可去除或可釋放的。

【0024】 如本文所用，術語「約」意指量、大小、配方、參數及其他數量及特徵不為並且不需要係精確的，而是可為近似的及/或根據需要更大或更小，反映公差、轉換因子、捨入、測量誤差及諸如此類，以及熟習此項技術者已知之其他因素。當術語「約」用於闡述範圍之值或終點時，本揭示內容應理解為包括所提及之特定值或終點。

無論說明書中範圍之數值或終點是否引用「約」，範圍之數值或終點意欲包括兩個實施例：一個由「約」修飾，且另一個不由「約」修飾。應進一步理解，每個範圍之終點相對於另一個終點係重要的，並且獨立於另一個終點。

【0025】 如本文使用之術語「實質」、「實質上」及其變化形式意欲指出所述特徵等於或近似等於一值或描述。例如，「實質上平坦」之表面意欲表示平坦或近似平坦之表面。此外，「實質上」意欲表示兩個值相等或近似相等。在一些實施例中，「實質上」可表示彼此約10%以內、例如彼此約5%以內或者彼此約2%以內之值。

【0026】 如本文使用之方向術語 - 例如上、下、右、左、前、後、頂部、底部 - 僅參照所繪製之附圖且不欲暗指絕對定向。

【0027】 除非明確表示相反之情形，否則如本文所用術語「該」、「一個(a或an)」意指「至少一個」，並且不應限於「僅一個」。因此，例如，除非上下文另外明確指示，否則提及「一個組件」包括具有兩個或更多個該等組件之實施例。

【0028】 如本文使用之術語「下一代定序」或「NGS」定義為包括一種使用生物樣品中許多小DNA片段之平行定序來確定基因序列之DNA定序技術。NGS可用於對基因體中之每一個核苷酸或基因體之小部分(如外顯子體或基因之預選子集)進行定序。

【0029】 在過去十年中，人類遺傳變異之編目取得了非凡之進展，並將該等變異與疾病易感性、對特定療法之反應性、對危險藥物副作用之易感性以及其他醫學上可操作之特徵聯繫起來。NGS之進步導致每兆鹼基之成本降低，所定序基因體之數量及多樣性增加。全基因體定序進步之關鍵係使用流動槽將自生物DNA樣品產生之數百萬個DNA片段分配至流動槽之表面上，使得幾乎所有固定之片段皆可同時定序。一些NGS技術、尤其短閱讀定序技術包括將DNA片段共價固定至流動槽之表面上進行定序。能夠達成DNA分子至流動槽表面上之穩定、可再現且最佳之連接對定序效率及品質有重要意義。

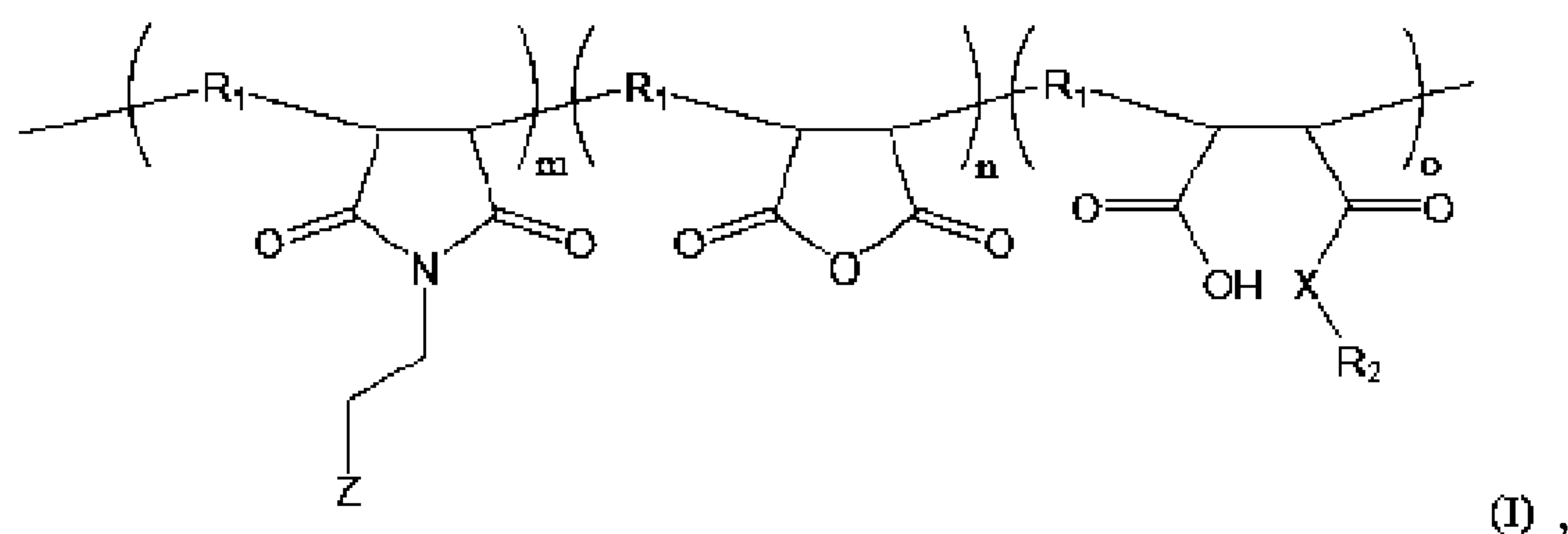
【0030】 本揭示內容之實施例概言之係關於核酸分析，且更具體而言係關於製備及使用微流體流動槽裝置用於例如大規模平行基因體學分析(例如，下一代定序

NGS)之方法。許多重要之分子應用如DNA微陣列、NGS或基於DNA之生物感測器可使用連接至固體支撐物之合成DNA探針分子，該等支撐物包括平面二維表面如玻璃、二氧化矽或矽載玻片，以及三維表面如微珠及微米/奈米顆粒。在微流體表面上固定DNA探針分子通常可使用多種方法來達成，例如靜電相互作用、共價偶聯、截留及諸如此類。一種用於將DNA探針共價連接至表面之技術涉及使用雙功能連接體分子，利用醯胺鍵連接DNA探針分子與胺呈現表面。例如，許多基於光學檢測之基因定序方法之共同點係使用含有高密度寡核苷酸引子或探針之表面，其中DNA引子共價連接至表面。然而，基於醯胺鍵之共價連接相對於強有力之定序循環通常具有相對較低之穩定性，因此只能實現短閱讀長度。

【0031】 本揭示內容提供用於將胺封端DNA引子分子共價偶聯至固體支撐物用於核酸分析、尤其基因定序之材料及方法。本揭示內容另外提供共價捕獲胺封端DNA探針片段之反應性表面。可精確控制片段密度及位置，使得多株簇之合成及生長可在空間上得到有效控制及定序，並提高品質及精確度。

【0032】 在本揭示內容之各個態樣中，提供流動槽物件10。流動槽物件10包括具有一或多個層16之基板14；佈置在基板14中之流體通道18，其中流體通道18包括至少一個具有偶聯劑26之反應性表面22，該偶聯劑26具有共價連接至流體通道18之基板14之第一官能基30及使用

醯亞胺鍵共價連接至聚合物 38 之第二官能基 34 (例如一級胺)，共價連接之聚合物 38 可以式 (I) 表示：



R_1 係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基。 R_2 係 H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺， m 、 n 及 o 各自為 1 至 10,000。 X 係二價 NH、O 及/或 S。 Z 係第一官能基 30。

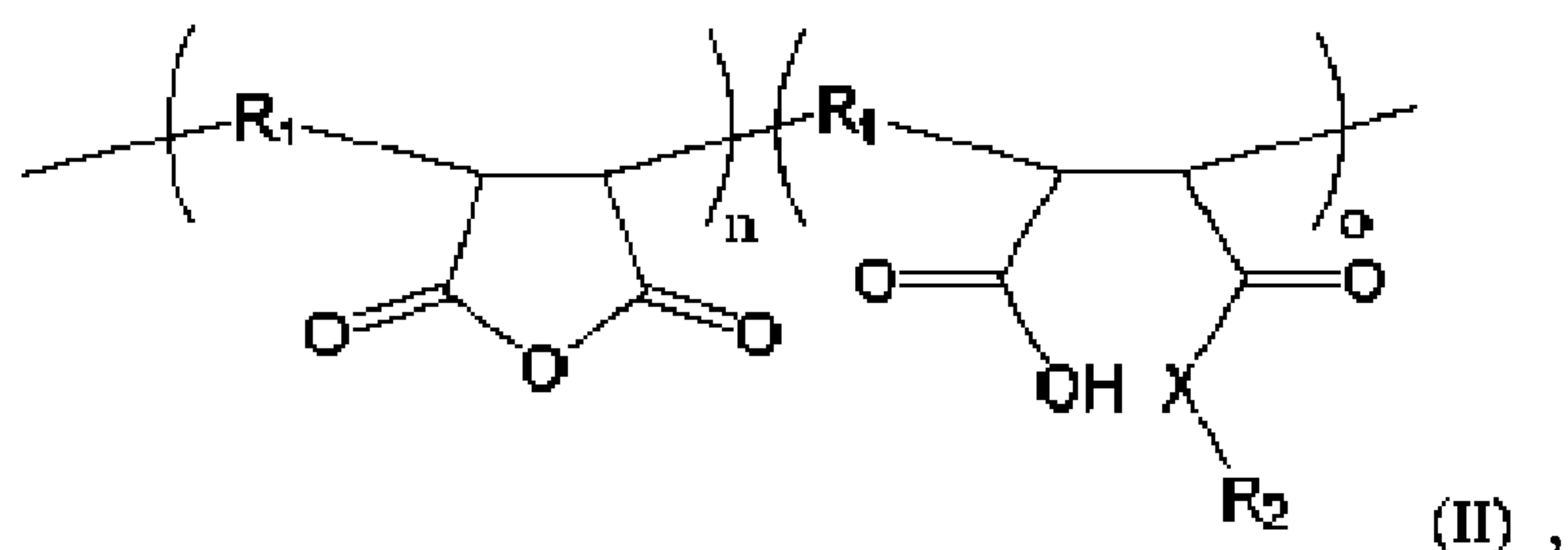
【0033】 現參考第 1 圖，提供根據本揭示內容之一些態樣共價偶聯至複數個核酸引子分子 42 之流動槽物件 10 之示意性視圖。固體支撐物或基板 14 可操作地偶聯至偶聯劑 26，其中偶聯劑 26 包括共價連接至基板 14 之第一官能基 30 及共價連接至聚合物 38 之第二官能基 34。在一些態樣中，偶聯劑 26 之第一官能基 30 包括胺基矽烷及/或有機磷酸胺基酯。聚合物 38 包括連接基團 36，其可用於共價偶聯第二官能基 34 以形成聚合物鍵聯 35。在一些態樣中，可使用相同類型之連接基團 36 使用相同或不同類型之聚合物鍵聯 35 共價偶聯複數個核酸引子分子 42 及第二官能基 34。作為傳統使用之更具反應性之醯胺或酯鍵之替代，在一些態樣中，用於本文所揭示實施例中之聚合物鍵聯 35 可包括醯亞胺官能基，其可經由一級胺與酸酐官

能基之間之縮合反應形成。在一些態樣中，連接基團 36 係琥珀酸酐基團，第二官能基 34 係一級胺，且相應聚合物鍵聯基團 35 係鹽亞胺。完全合成之流動槽物件 10 包括使用偶聯劑 26 共價鍵結至聚合物 38 之基板 14 以及經由聚合物 38 共價偶聯至基板 14 之至少一個核酸引子分子 42。DNA 結合之流動槽物件 10 將經定位以面向或延伸至流體通道 18 中以提供反應性表面 22 以捕獲或結合期望 DNA 片段。

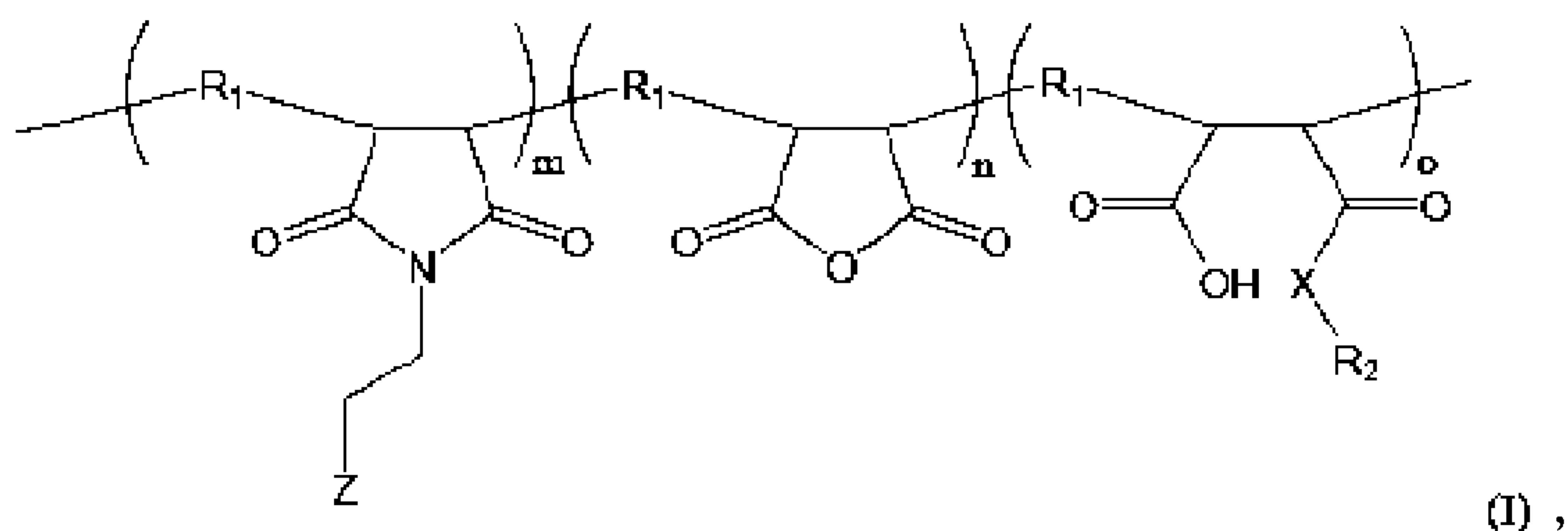
【0034】 在一些態樣中，聚合物 38 可包括含有酸酐官能基之聚合物。在一些態樣中，聚合物 38 可包括聚(乙烯-共-馬來酸酐)(EMA)、聚乙烯-接枝-馬來酸酐、聚丙烯-接枝-馬來酸酐、聚(乙烯/馬來酸酐)、聚(乙烯-共-丙烯酸乙酯-共-馬來酸酐)、聚(異丁烯-共-馬來酸酐)、聚(馬來酸酐-共-1-十八烯)、聚(苯乙烯-共-馬來酸酐)、聚(苯乙烯-共-馬來酸)或其組合。

上文所列示之每種共聚物可包括交替共聚物(例如 ABABAB)、嵌段共聚物(例如 AAA BBB AAA BBB)及/或無規共聚物(例如 ABBA B A A B A B)結構。例如，在一些態樣中，聚合物 38 可包括聚(乙烯-共-馬來酸酐)，其中乙烯及馬來酸酐單體以交替、無規或嵌段結構鍵結在一起。在一些態樣中，m 對 n 之相對比率(m:n)為約 0.5 至約 1.0。

【0035】 在一些態樣中，用於共價鍵結及偶聯偶聯劑 26 之聚合物 38 以下文式(II)表示：



其中：R₁ 係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基；
R₂ 係 H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺；n 及 o 各自係 1 至 10,000 之整數；且 X 係二價 NH、O 及/或 S。
當乙烯與馬來酸酐共聚合時，不飽和單體之殘基 R₁ 將為例如二價乙基。具有式(II)之聚合物 38 與第二官能基 34 反應後，聚合物 38 之經改質結構由下文式(I)表示：



其中：R₁、R₂ 及 X 皆如上文式(II)中所列示；m、n 及 o 各自係 1 至 10,000 之整數；且 Z 係第一官能基 30。
在一些態樣中，例如使用流動槽系統，核酸引子分子 42 可使用反應性琥珀酸酐官能基共價鍵結、偶聯及連接至具有式(I)之聚合物 38，該反應性琥珀酸酐官能基納入聚合物骨架中以與核酸引子分子 42 之胺基形成鹽亞胺鍵聯。

【0036】 在一些態樣中，本揭示內容亦可提供具有 DNA 探針分子改質之表面之流動槽，其中可精確地控制 DNA 探針分子之密度，使得可達成優異之 DNA 雜交、後

續多株簇形成及定序。DNA 探針分子可藉由將聚合物改質之流動槽表面與胺封端 DNA 探針分子在特定濃度之調節第二小分子(例如表面改質分子 50)存在下一起培育共價連接至胺反應性聚合物塗覆之流動槽表面。

【0037】 仍參考第 1 圖，可使用表面改質分子 50 來控制偶聯劑 26 及/或核酸引子分子 42 與聚合物 38 之偶聯反應之度(例如量或程度)，該聚合物 38 可控制或確定所連接核酸引子分子之密度。核酸引子分子 42 對表面改質分子 50 之比率可決定定位於反應性表面 22 上之核酸引子分子 42 之量或密度。在一些態樣中，核酸引子分子 42 對表面改質分子 50 之莫耳比(P:S)可為例如 0.01:1、0.1:1、1:1、1:2、1:5、1:10、1:20、1:50、1:100、1:1000、1:10,000 及類似比率，包括中間值及範圍，此端視給定應用期望之密度而定。例如，在可使用橋擴增方法達成聚簇之一些態樣中，核酸引子分子 42 之密度可相對較低(例如 10,000 或 100,000/平方微米流體通道 18 表面積)。當使用模板步移方法達成聚簇時，核酸引子分子 42 之密度可能相對較高(例如 25,0000 或 500,000/平方微米流體通道 18 表面積)。

【0038】 在一些態樣中，表面改質分子 50 可為含胺小分子。在一些態樣中，R₂ 可為表面改質分子 50。表面改質分子 50 可包括例如乙醇胺、N,N-二甲基乙二胺、N,N-二乙基乙二胺、(2-胺基乙基)-三甲基銨、胺封端聚乙二醇及/或寡-乙二醇。表面改質分子 50 亦可在定序期間呈

現生物分子與聚合物38表面之非特異性結合並減少定序週期內之背景信號。在其他態樣中，表面改質分子50可在聚合物塗覆期間引入或可在核酸引子分子42官能化步驟期間引入。在一些態樣中，表面改質分子50可包括例如(但不必限於)單-、二-及三-胺基矽烷，例如 γ -胺基丙基矽烷、3-(胺基丙基)三乙氧基矽烷(APTES)、3-胺基丙基)三甲氧基矽烷、3-胺基丙基二甲基甲氧基矽烷、3-胺基丙基(二乙氧基)甲基矽烷、胺基丙基倍半矽氧烷(APS)、N-[3-(三甲氧基矽基)丙基]乙二胺、N1-(3三甲氧基矽基丙基)二乙三胺、乙二胺、丙胺、烯丙基胺、乙醇胺、(2-胺基乙基)三甲基銨或其組合。

【0039】 在一些態樣中，核酸引子分子42可為例如胺封端核酸或核酸片段。在一些態樣中，核酸引子分子42可具有例如每個聚合物38鏈1至10,000個核酸引子分子42之表面密度。在其他態樣中，核酸引子分子42可具有例如每平方微米流體通道18表面積1至500,000個核酸引子分子42之密度。在其他態樣中，當需要多株聚簇進行定序時，核酸引子分子42可具有例如每平方微米(μm^2)流體通道18表面積1,000至500,000個核酸引子分子42之密度。或者，當需要單次分子分析進行定序時，核酸引子分子42可具有例如每 μm^2 流體通道18表面積1至約1000個核酸引子分子42之密度。在一些態樣中，核酸引子分子42可為例如5'-胺封端dA30、3'-胺封端dA30、胺封端dT30及類似探針分子。在其他態樣中，

核酸引子分子42可用用於RNA定序之RNA探針分子取代。

【0040】 在一些態樣中，流動槽物件10可包括例如至少兩個固體基板14，該等固體基板使用本領域已知之技術結合在一起，該等技術包括例如雷射輔助製程、膠帶、聚醯亞胺黏著劑、壓敏黏著膠帶或其組合。在一些態樣中，兩個基板14可由相同材料製成，或在其他態樣中，兩個基板可由不同材料製成。端視應用，基板14可為例如塑膠、玻璃、矽、熔融二氧化矽或石英。流動槽物件10界定室、空腔及/或流體通道18。流動槽物件10可包括例如用於將液體導入及導出室之介質流之埠(參見Illumina.com; Illumina Sequencing Technology, Spotlight: Illumina® Sequencing)。在一些態樣中，基板14可包括玻璃、玻璃陶瓷、矽、熔融二氧化矽、石英、熱塑性或熱固性塑膠。

【0041】 現參考第2圖，提供根據本揭示內容之一些態樣之中間微流體裝置44之示意性視圖，該中間微流體裝置44包括共價鍵結至偶聯劑26之聚合物38，該偶聯劑26連接至基板14。第2圖中所圖解說明之中間微流體裝置46包括塗覆在基板表面上之聚合物38，該基板表面將定位於流體通道18內。定位於中間微流體裝置44之流體通道18中之基板14之表面可首先用偶聯劑26塗覆。如圖解說明，在一些態樣中，偶聯劑26可包括胺基矽烷。使用胺基矽烷作為偶聯劑26提供欲用作第一官能基30之矽烷

及欲用作第二官能基 34 之胺。在第一官能基 30 矽烷共價偶聯(例如形成共價鍵)至基板 14 之表面後，用作第二官能基 34 之胺可共價偶聯至聚合物 38。在一些態樣中，聚合物 38 上用於偶聯胺之連接基團 36 (參見第 1 圖)或琥珀酸酐部分將縮合以與縮合反應中放出之水分子形成醯亞胺鍵聯或醯亞胺鍵。共價偶聯至偶聯劑 26 以在基板 14 上形成塗層之所得聚合物 38 含有三種不同類型之官能基：1) 將偶聯劑 26 共價偶聯至聚合物 38 之醯亞胺基團；2) 納入支持偶聯劑 26 及 DNA 片段 42 連接之聚合物骨架中之胺反應性酸酐基團(例如琥珀酸酐基團)；及 3) 用於幫助調諧 DNA 密度及表面性質之改質官能基(例如酯、胺、羧酸、羧酸酯及/或硫代酯)。

【0042】 仍參考第 2 圖，偶聯劑 26 可包括胺基矽烷，而固體基板可為玻璃、玻璃陶瓷、矽、熔融二氧化矽、熱塑性塑膠、熱固性塑膠及/或石英。胺基矽烷可包括包含一級胺及矽烷官能基二者之分子，該等一級胺及矽烷官能基通常使用例如烷基、烷氧基及/或二醇基團彼此連接。在一些態樣中，胺基矽烷可包括 3-胺基丙基三甲氧基矽烷、3-胺基丙基三乙氧基矽烷、3-(2-胺基乙基)-胺基丙基三甲氧基矽烷、胺基丙基甲基二烷氧基矽烷、4-胺基丁基三乙氧基矽烷、4-胺基-3,3-二甲基丁基三甲氧基矽烷、N-(6-胺基己基)胺基甲基三乙氧基矽烷或其組合。在一些態樣中，胺基矽烷之矽烷可包括例如倍半矽氧烷或其混合物。在其他態樣中，胺基矽烷可包括例如 3-(胺基

丙基)三乙氧基矽烷且倍半矽氧烷可為例如胺基丙基倍半矽氧烷。

【0043】 現參考第3圖，提供根據本揭示內容之一些態樣之中間微流體裝置44a之示意性視圖，該中間微流體裝置44a包括共價鍵結至偶聯劑26之聚合物38，該偶聯劑26連接至定位於基板14上之金屬氧化物層46。中間微流體裝置44a包括塗覆在基板表面上之聚合物38。在一些態樣中，基板14之表面可首先用中間微流體裝置44a之金屬氧化物層46塗覆，其中金屬氧化物層46隨後可用偶聯劑26塗覆。如圖解說明，在一些態樣中，偶聯劑26可包括有機磷酸胺基酯。使用有機磷酸胺基酯作為偶聯劑26提供欲用作第一官能基30之有機磷酸酯及欲用作第二官能基34之胺。在第一官能基30或有機磷酸酯共價偶聯(例如形成共價鍵)至基板14之金屬氧化物層46表面後，第二官能基34或胺可共價偶聯至聚合物38。在一些態樣中，聚合物38上用於偶聯胺之連接基團36(參見第1圖)或琥珀酸酐部分可縮合以與縮合反應中放出之水分子形成醯亞胺鍵聯或醯亞胺鍵。

【0044】 仍參考第3圖，偶聯劑26可包括有機磷酸胺基酯，其中固體基板14偶聯或塗覆有金屬氧化物層46。用於金屬氧化物層46中之金屬氧化物可包括例如(但不限於) Al_2O_3 、 ZnO_2 、 Ta_2O_5 、 Nb_2O_5 、 SnO_2 、 MgO 、銦錫氧化物、 CeO_2 、 CoO 、 Co_3O_4 、 Cr_2O_3 、 Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 、 In_2O_3 、 Mn_2O_3 、 NiO 、 $\alpha\text{-TiO}_2$ (銳鈦礦)、

$r - TiO_2$ (金紅石)、 WO_3 、 Y_2O_3 、 ZrO_2 。在一些態樣中，金屬氧化物層 46 在可見波長範圍內(例如 400 至 750 nm)係透明的。例如，金屬氧化物層 46 在可見波長範圍內可具有至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 或 99% 之透射率。

【0045】 在一些態樣中，有機磷酸胺基酯可包括具有一級胺及有機磷酸酯官能基中之至少一者或兩者之分子。胺及有機磷酸酯官能基可使用例如烷基、烷氧基及/或二醇基團彼此偶聯。有機磷酸胺基酯可包括磷酸二氫 3-胺基丙基酯、磷酸 4-胺基苯基酯、磷酸二氫 2-胺基乙基酯、硫代磷酸 2-(3-胺基丙基)胺基乙基酯或其組合。

【0046】 現參考第 4A-4C 圖，提供根據本揭示內容之一些態樣之具有聚合物塗層之流體通道表面之掃描電子顯微鏡影像。具有穩定聚合物塗層之微流體通道 18 表面之三個呈現之掃描電子顯微鏡影像包括：(1)表面之低解析度 SEM 影像，顯示兩個區域：左(a)及右(b)；(B)表面 A 之左側部分之高解析度 SEM 影像，顯示聚合物以奈米顆粒之形式存在；及(C)與 dA30 反應後表面 A 之右側部分之高解析度 SEM 影像，顯示大多數聚合物奈米顆粒係開放的以在表面上形成均勻之 dA30-聚合物塗層，該穩定聚合物塗層用胺封端 dA30 引子 DNA 部分地處理。

【0047】 仍參考第 4A-4C 圖，聚合物 38 在主要使用醯亞胺鍵共價連接至表面後即可呈奈米顆粒形式，特別是單鏈奈米顆粒形式，而非延伸之聚合物鏈形式。奈米顆粒塗

覆方案係藉由在有機溶劑之混合物中一起培育胺呈現表面與聚合物來實現，其中每種單一聚合物自組裝成奈米顆粒。有機溶劑之混合物包括聚合物可溶性溶劑如 N-甲基-2-吡咯啉酮 (N-methyl-2-pyrrolidone; NMP) 及聚合物不溶性溶劑如異丙醇 (isopropyl alcohol; IPA)、基本上由其組成或由其組成。如第 4 A 圖及第 4 B 圖所示，主要使用醯亞胺鍵與偶聯劑共價連接至表面之聚合物包括個別奈米顆粒、基本上由其組成或由其組成。然而，在用 DNA 引子 (本文係 5'-胺基-C6-dA30) 官能化後，聚合物奈米顆粒變得開放並覆蓋整個表面，形成均勻之塗層，如第 4 A 圖及第 4 C 圖所示。由於 DNA 帶負電，故 DNA 分子之間之自斥力會導致聚合物分子膨脹，覆蓋整個表面，即使連接之聚合物奈米顆粒之間有空隙。同樣值得注意的是聚合物奈米顆粒在連接至基板後分佈均勻。不受限於任何理論，人們認為此歸因於熟知之聚合物顆粒在溶劑中之擁擠效應。藉由使用 dA30 功能化表面之合成定序以及基於模板步移之聚簇及可逆終止子 DNA 合成化學，顯示 EMA 奈米顆粒塗覆之表面實現平均 75 次閱讀，而延伸之 EMA 聚合物鏈塗覆之表面僅允許平均幾次閱讀 (< 10 bp)。藉由控制聚合物 38 之濃度及用於塗覆之反應持續時間，可控制共價連接至基板之聚合物奈米顆粒之密度。用於塗覆製程之較低濃度之聚合物 38 可導致連接之聚合物奈米顆粒之密度較低。基於聚合物擁擠效應及由偶聯之 DNA 引子分子誘導之膨脹後每種聚合物之有

限表面覆蓋，聚合物塗覆之基板可視為圖案化表面，即使聚合物奈米顆粒可具有不同大小（如第4B圖所示）。因此，當連接之聚合物奈米顆粒之密度較低時（例如，每 $10,000\text{ nm}^2$ 、或每 $20,000\text{ nm}^2$ 、或每 $40,000\text{ nm}^2$ 、或每 $100,000\text{ nm}^2$ 、或每 $250,000\text{ nm}^2$ 、或每 $1,000,000\text{ nm}^2$ 一個聚合物奈米顆粒），吾人可在由單個聚合物奈米顆粒覆蓋之區域內產生單個簇，從而有效地形成無規但分離良好之簇陣列。此尤其可用於高密度圖案化定序應用。

【0048】 現參考第5A-5B圖，提供根據本揭示內容之一些態樣之具有八個通道之流動槽物件之照片影像（5A）及螢光影像（5B），每個通道包括連接至聚合物塗層之胺封端 dA30、基本上由其組成或由其組成。第5A圖顯示整個流動槽之照片影像，且第5B圖顯示具有8個通道之整個流動槽之共聚焦螢光影像，每個通道包括在與Cy3標記之dT30雜交後連接至反應性聚合物塗層之胺封端 dA30、基本上由其組成或由其組成。

具體而言，首先用 γ -(γ)-胺基丙基矽烷塗覆所有通道，然後共價連接丙胺衍生之聚（乙烯-alt-馬來酸酐）。隨後，在 $100\text{ }\mu\text{M}$ 乙醇胺存在下將所有通道與 $50\text{ }\mu\text{M}$ 5'-胺封端 dA30一起培育，隨後如下所提及進行進一步處理。通道1至8自頂部至底部為：通道1、2、7及8：用磷酸鹽緩衝液（PBS）沖洗三次；通道3及6：與 0.05 M NaOH一起培育 5 min ，用PBS沖洗三次；以及通道4

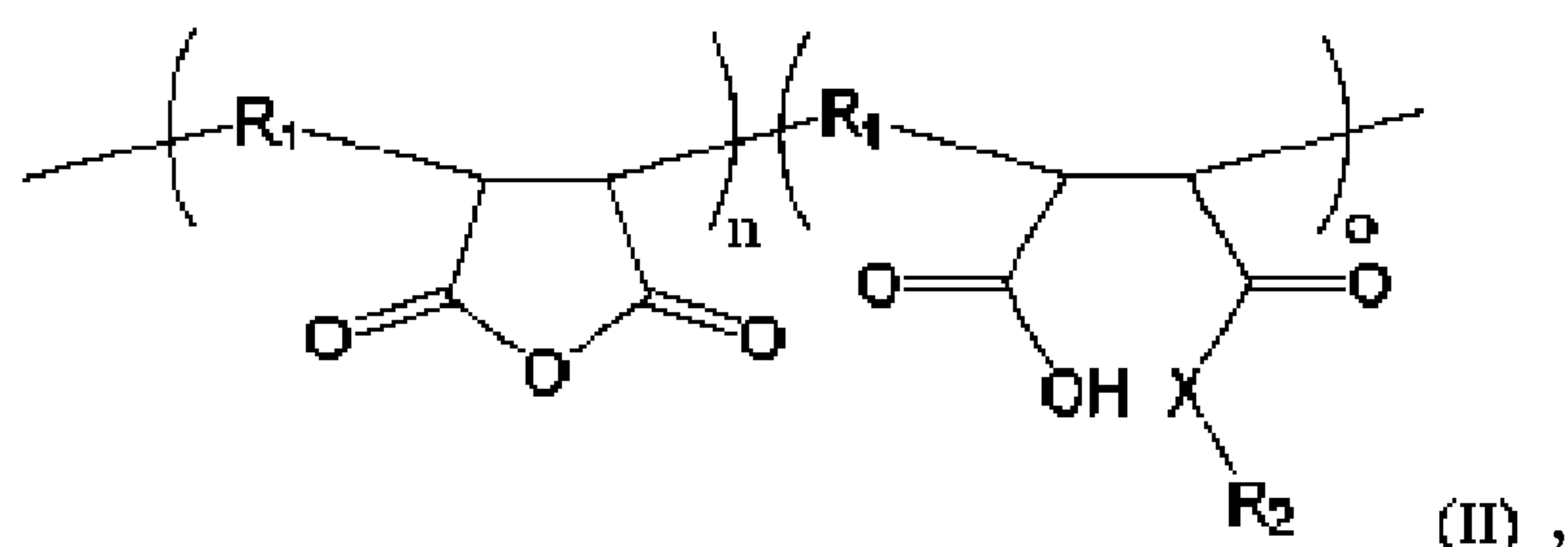
及 5：用 60℃ 之水沖洗五次，每次 1 min。最後，將所有通道與 1 μ M Cy3 標記之 dT30 一起培育 45 min。用 PBS 沖洗三次並乾燥後，使用共聚焦顯微鏡掃描整個流動槽。將收集之所有螢光影像組裝在一起，形成如圖所示之整個流動槽之螢光影像。

【0049】 現參考第6圖，提供顯示醯胺鍵聯及醯亞胺鍵聯定序閱讀長度之比較差異之圖，該等醯胺鍵聯及醯亞胺鍵聯用於將偶聯劑共價鍵結至用於連接DNA之聚合物塗層。該圖圖解說明兩種聚合物塗層定序讀取長度之比較差異：一種聚合物使用醯胺鍵連接；且另一種聚合物使用醯亞胺鍵連接。

【0050】 在本揭示內容之一些態樣中，含酸酐聚合物38與偶聯劑26之胺端基之間之醯亞胺鍵係使用兩步依序反應方案形成。首先，使聚合物之酸酐基團與表面上之胺基反應形成醯胺鍵，然後經由熱處理(120-150℃達幾個小時)閉環形成醯亞胺鍵。如第6圖所示，藉由使用dA30官能化表面合成之定序以及基於模板步移之聚簇及可逆終止子DNA合成化學顯示經由醯亞胺鍵共價連接至胺呈現表面之聚合物允許平均75次閱讀，而經由醯胺鍵共價連接至胺呈現表面之聚合物僅實現平均25次閱讀。考慮到醯亞胺鍵對苛刻處理(如NaOH、劇烈洗滌、室溫至高溫之間之溫度循環)之高穩定性，進一步優化DNA連接(如密度及分佈)可進一步大大增加閱讀長度(如單端定序高達200次閱讀)。在本文中，微流體通道表面係用相同

之塗覆及功能化方案處理，只是使用3小時120℃熱處理來驅動醯亞胺鍵形成。

【0051】 在本揭示內容之一些態樣中，提供製備流動槽物件10之方法。該方法包括：使佈置在基板14中之流體通道18與偶聯劑26接觸以將第一官能基共價連接至流體通道18；使式(II)聚合物38與偶聯劑26接觸以將聚合物38共價連接至第二官能基34以在系鏈聚合物上形成醯亞胺鍵聯；

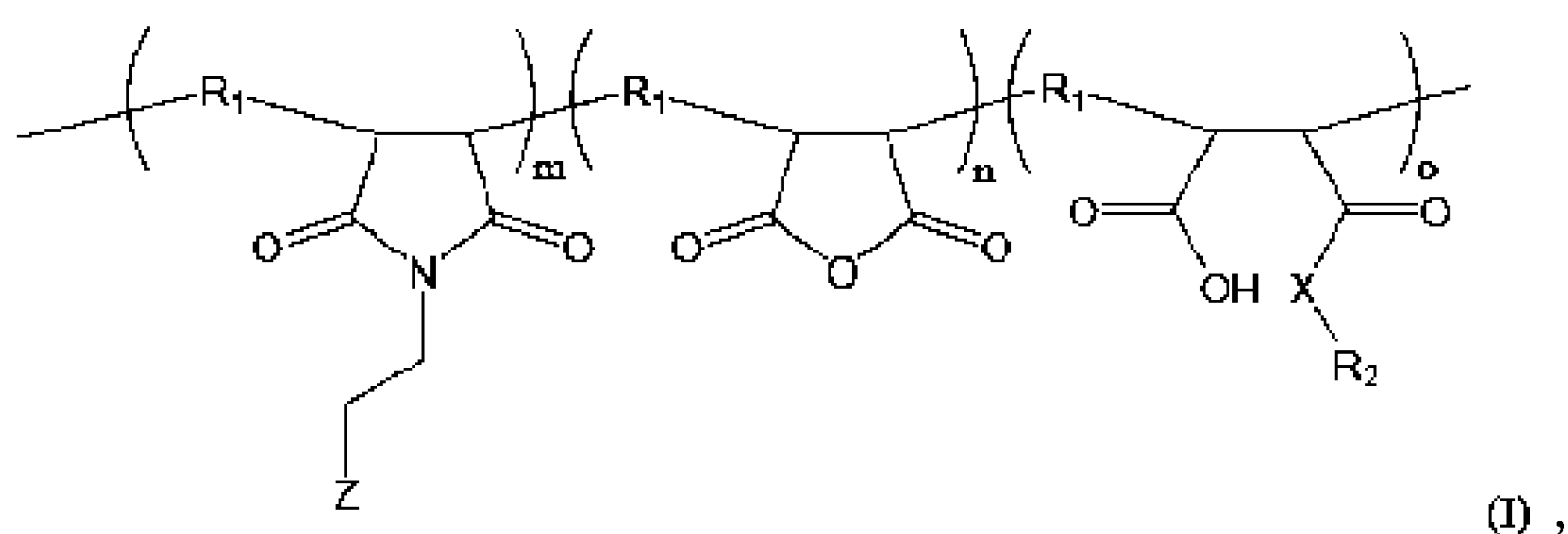


其中： R_1 係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基； R_2 係H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺； n 及 o 各自係1至10,000之整數；且 X 係二價NH、O及/或S。該方法可進一步包括使核酸引子分子42與系鏈聚合物38(參見式(II))接觸以將核酸引子分子42共價連接至系鏈聚合物38。在一些態樣中，使核酸引子分子42與系鏈聚合物38接觸可視情況包括存在表面改質分子50以使用偶聯劑26將核酸引子分子42共價連接至偶聯至基板14之聚合物38以形成流動槽物件10。在一些態樣中，控制連接至聚合物38之核酸引子分子42之密度可藉由使用不同比率之表面改質分子50對核酸引子分子42來實現。

【0052】 應理解，前面討論之概述及教示流動槽物件10之描述同樣適用於製備流動槽物件10之方法及使用流動槽物件10之方法，該流動槽物件10可以任何組合使用。

【0053】 在一些態樣中，製備流動槽物件之方法可進一步包括藉由預先測定及選擇(藉由例如化學計算)聚合物對核酸引子分子42之比率來控制核酸引子分子42之密度。

【0054】 在本揭示內容之其他態樣中，本揭示內容提供對核酸定序之方法，該方法包括：提供流動槽物件10，該流動槽物件10具有：具有一或多個層之基板14；佈置在基板14中之流體通道18，其中流體通道18包括至少一個包括偶聯劑26之反應性表面22，該偶聯劑26具有共價連接至流體通道18之基板14之第一官能基30及共價連接至具有醯亞胺功能性連接體之式(I)聚合物之第二官能基34：



其中：R₁係已與馬來酸酐共聚合之不飽和單體之殘基；R₂係H、烷基、寡(乙二醇)及/或二烷基胺；m、n及o各自為1至10,000；X係二價NH、O及/或S；且Z係第一官能基30。對核酸定序之方法進一步包括使核酸

引子分子 42 與系鏈聚合物 38 接觸以將核酸引子分子 42 共價連接至系鏈聚合物 38。

【0055】 在一些態樣中，在產生流動槽物件 10 後，可實施用於對核酸區段測序之方法。該方法進一步包括使核酸引子分子 42 與式 (I) 聚合物 38 接觸以將核酸引子分子 42 共價連接至式 (I) 聚合物 38；使用核酸引子分子 42 捕獲 DNA 片段，其中每個 DNA 片段含有核酸引子分子 42 之互補序列；及將核苷酸添加至核酸引子分子 42 之末端以合成所捕獲每個 DNA 片段之互補 DNA 序列，其中互補 DNA 序列經由核酸引子分子 42 共價偶聯至式 (I) 聚合物 38。在一些態樣中，用於對核酸區段測序之方法可進一步包括使來自 DNA 片段之互補 DNA 序列變性；自流動槽物件收集 DNA 片段；經由共價偶聯至式 (I) 聚合物之核酸引子分子 42 使用互補 DNA 序列合成靶 DNA 片段；及自流動槽物件 10 收集靶 DNA 片段。

【0056】 在一些態樣中，自樣品捕獲每個含有核酸引子分子 42 之互補序列之 DNA 片段並自引子分子 42 末端共價添加核苷酸之步驟可用於合成每個捕獲片段之互補 DNA 序列。根據應用需要，該等互補 DNA 片段可個別或單獨地共價偶聯至系鏈聚合物。然後可使雙鏈 DNA、互補 DNA 序列及捕獲之 DNA 片段變性，並且可收集及去除相應鏈。在一些態樣中，在去除 DNA 片段之後，可使用聚合酶鏈式反應局部擴增每個互補 DNA 或 DNA 片段以形成單株簇。端視用於螢光成像之光學系統之解析度，所

得簇之直徑大小可為 50 nm 至 1000 nm。此合成方法提供可用於基於合成定序之下一代定序 (next generation sequencing; NGS) 技術之技術，其中多株簇通常在定序之前形成。在核酸引子分子 42 及 DNA 分子偶聯至基板 14 之流體通道 18 之後，可使用例如橋擴增、排除擴增或模板步移方法來達成簇之產生。

【0057】 應理解，前面討論之概述及教示流動槽物件 10 之描述同樣適用於核酸片段定序之方法，該流動槽物件 10 可以任何組合使用。

【0058】 本揭示內容使得胺封端核酸引子分子 42 (例如，5'-胺-dA30 或 5'-胺-dT30) 能夠快速共價偶聯至基板 14。偶聯可在例如 1 小時內完成。

【0059】 本揭示內容提供與使用雙功能連接體或其他方式之偶聯相比，核酸引子分子 42 更穩定地連接至基板上。此部分歸因於聚合物層對胺呈現表面 (例如 APTES) 之多價強錨定，且部分歸因於醯亞胺鍵之形成。鑒於 DNA 定序通常需要運行許多反應循環，並且涉及一些苛刻處理，例如在定序閱讀前用 NaOH 沖洗以使任何二倍體 DNA 變性，故此穩定之鍵結連接至關重要。使用藉由琥珀酸酐官能基與構建至偶聯劑 26 及 / 或核酸引子分子 42 中之一級胺反應形成之醯亞胺鍵聯提供化學抗性及穩定之共價化學鍵聯，其對由定序化學中使用之該等苛刻化學處理引起之降解損失或表面分離有抗性。

【0060】 本揭示內容亦提供精確控制核酸引子分子42與含有與探針互補之銜接序列之靶DNA片段之間(且最終更有效)的雜交之方法。此現象主要歸因於甚至在塗覆之後聚合物鏈之撓性。相比之下，對於基於雙功能連接體之DNA連接，該等DNA分子非常靠近表面，因此阻止有效雜交。

【0061】 本揭示內容亦提供對連接至表面之核酸引子分子42之密度之精確控制，此允許使用者確定對DNA雜交效率及隨後之聚簇效率之可調節性。此控制可藉由兩種不同之化學反應中之任一者來達成。首先，用表面改質分子50(例如丙胺或諸如此類)部分地改質及衍生化胺反應性聚合物。此官能化可有助於控制聚合物38在用於塗覆之溶液中之溶解度，以及連接至基板14之偶聯劑26後之反應位點。

然後，可將胺封端核酸引子分子42與胺反應性聚合物38改質之表面在表面改質分子50(例如乙醇胺或類似試劑)存在下以期望之濃度一起培育。此步驟控制共價偶聯反應，且進而控制連接之核酸引子分子42之密度。該兩種不同反應之組合允許對連接至基板14之流體通道18之核酸引子分子42或DNA/RNA引子分子進行優異的密度控制，並最終控制形成之簇之密度及定序之效率。

【0062】 本揭示內容亦可應用於使用奈米圖案流動槽之NGS。奈米圖案化可使用最先進之光微影或奈米壓印方法來達成。在一些態樣中，流動槽物件10可包括胺反

應性聚合物塗層及共價結合之核酸引子分子42之離散點陣列。奈米圖案化可藉由例如最先進之光微影或奈米壓印技術來達成。在替代實施例中，可使用低密度之聚合物奈米顆粒塗層作為隨機圖案化表面，使得形成之簇可由每個聚合物奈米顆粒限制，並且彼此很好地分離。

【0063】 本揭示內容亦可適用於使用基於核酸之生物感測器之不同生物分子分析技術，其中連接之核酸引子分子42之密度對於生物分析之成功可能至關重要。

【0064】 熟習此項技術者應理解，所述裝置及其他組件之構造可不限於任何特定材料。除非本文另外闡述，否則本文所揭示裝置之其他例示性實施例可由眾多種材料形成。

【0065】 出於本揭示內容之目的，術語「偶聯(coupled)」(以其所有形式偶聯(couple)、偶聯(coupling)、偶聯(coupled)等)通常意指兩個組件(電或機械)直接或間接相互連接。此種連接本質上可為固定的或本質上可為可移動的。此種連接可藉由兩個組件(電或機械)及任何其他中間構件彼此或與兩個組件一體形成為單個整體來達成。除非另有說明，否則此種連接本質上可為永久性的，或者本質上可為可去除或可釋放的。

【0066】 同樣重要的是應注意，如例示性實施例中所示之裝置之元件之構造及佈置僅具有說明性。儘管在本揭示內容中僅詳細闡述了本發明之幾個實施例，但閱讀本揭示內容之熟習此項技術者將容易瞭解，許多修改在實質上不

背離所述標的物之新穎教示及優點下係可能的(例如,各種元件之大小、尺寸、結構、形狀及比例、參數值、安裝佈置、材料之使用、顏色、定向等之變化形式)。例如,顯示為一體形成之元件可由多個部件構成,或者顯示為多個部件之元件可一體形成,界面之操作可顛倒或者以其他方式變化,結構及/或構件或連接器或系統之其他元件之長度或寬度可變化,元件之間提供之調節位置之性質或數量可變化。應注意,系統之元件及/或總成可由提供足夠強度或耐久性之眾多種材料中之任一者、眾多種顏色、紋理及組合中之任一者構成。因此,所有該等修改皆意欲包括在本發明之範圍內。在不背離本發明之精神之情況下,可對期望之及其他例示性實施例之設計、操作條件及佈置進行其他取代、修改、改變及省略。

【0067】 應理解,任何所述製程或所述製程中之步驟可與其他揭示之製程或步驟組合,以形成本裝置範圍內之結構。本文揭示之例示性結構及製程係出於說明之目的且不應解釋為限制性。

【0068】 亦應理解,在不背離本揭示內容之概念之情況下,可對前述結構進行變化及修改,並且應進一步理解,該等概念意欲由所附申請專利範圍覆蓋,除非該等申請專利範圍藉由其語言另有明確聲明。

【0069】 以上描述僅視為所說明實施例之描述。熟習此項技術者以及製造或使用該裝置之人員將會想到對該裝置之修改。因此,應理解,附圖中所示及上文所述之實施

例僅出於說明之目的，並不欲限制裝置之範圍，該裝置之範圍由根據包括等同原則 (Doctrine of Equivalents) 在內之專利法之原則解釋之所附申請專利範圍來界定。

【符號說明】

【 0 0 7 0 】

1 0 ... 流動槽物件

1 4 ... 固體基板

1 6 ... 層

1 8 ... 流體通道

2 2 ... 反應性表面

2 6 ... 偶聯劑

3 0 ... 第一官能基

3 4 ... 第二官能基

3 5 ... 聚合物鍵聯

3 6 ... 連接基團

3 8 ... 聚合物

4 2 ... 核酸引子分子

4 4 ... 中間微流體裝置

4 4 a ... 中間微流體裝置

4 6 ... 金屬氧化物層

5 0 ... 表面改質分子

【生物材料寄存】

【 0 0 7 1 】 國內寄存資訊 (請依寄存機構、日期、號碼順序註記)

無

【 0 0 7 2 】 國外寄存資訊 (請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註

記)

無

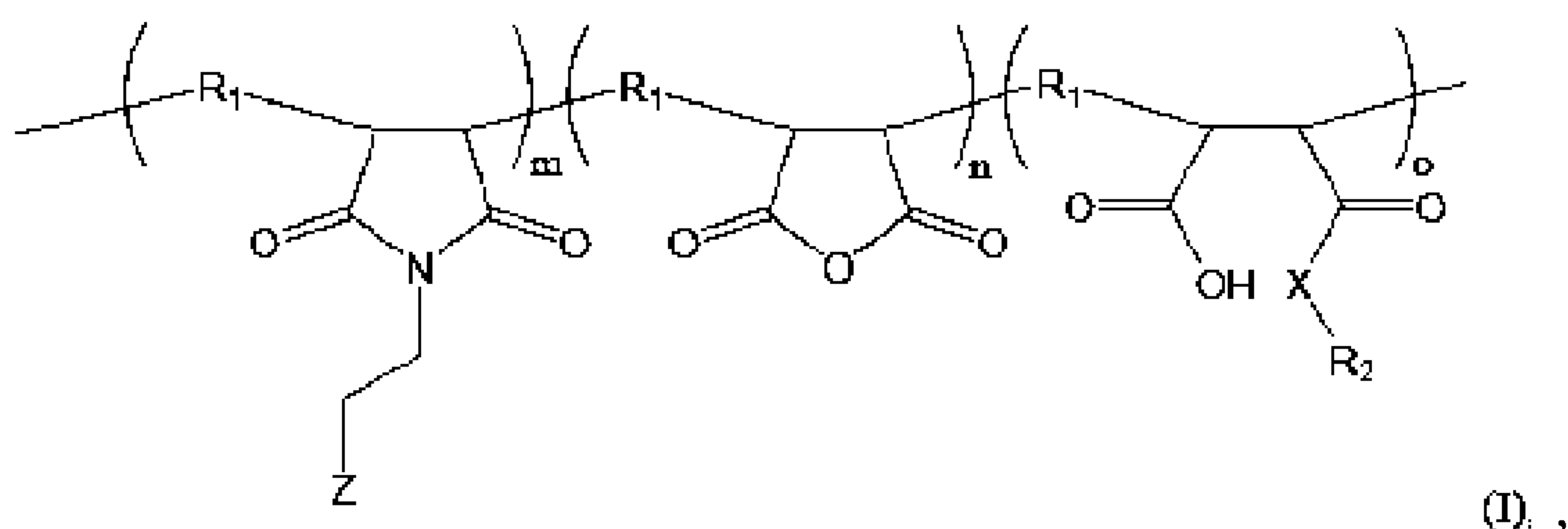
【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種流動槽物件，包括：

一基板，其包括一或多個層；

一流體通道，其佈置在該基板中或其上且包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面包括：

一偶聯劑，其包括共價連接至該基板之一第一官能基及使用至少一個鹽亞胺鍵共價連接至一式(I)聚合物之一第二官能基：



其中：

R_1 係已與馬來酸酐共聚合之一不飽和單體之一殘基；

R_2 係 H、一烷基、一寡(乙二醇)及/或一二烷基胺； m 、 n 及 o 各自為 1 至 10,000；

X 係一二價 NH、O、及/或

S；且 Z 係該第一官能基。

【第2項】 如請求項 1 所述之流動槽物件，其中該基板包括一玻璃、一玻璃陶瓷、一矽、一熔融二氧化矽、一石英、一熱塑性或一熱固性塑膠。

【第3項】如請求項1所述之流動槽物件，其中該偶聯劑包括一胺基矽烷及/或一有機磷酸胺基酯。

【第4項】如請求項3所述之流動槽物件，其中該胺基矽烷係選自由以下組成之群：3-胺基丙基三甲氧基矽烷、3-胺基丙基三乙氧基矽烷、3-(2-胺基乙基)-胺基丙基三甲氧基矽烷、胺基丙基甲基二乙氧基矽烷、4-胺基丁基三乙氧基矽烷、4-胺基-3,3-二甲基丁基三甲氧基矽烷及N-(6-胺基己基)胺基甲基三乙氧基矽烷。

【第5項】如請求項3所述之流動槽物件，其中該有機磷酸胺基酯係選自由以下組成之群：磷酸二氫3-胺基丙基酯、磷酸4-胺基苯基酯、磷酸二氫2-胺基乙基酯及硫代硫酸2-(3-胺基丙基)胺基乙基酯。

【第6項】如請求項1至5中之任一項所述之流動槽物件，其中m對n之一相對比率(m:n)為約0.5至約1.0。

【第7項】如請求項1至5中之任一項所述之流動槽物件，進一步包括共價連接至該聚合物之一核酸引子分子。

【第8項】如請求項7所述之流動槽物件，其中該核酸引子分子包括一胺封端核酸或其胺封端核酸之一混合物。

【第9項】 如請求項 7 所述之流動槽物件，其中該核酸引子分子具有 1 至 500,000 個探針分子/平方微米表面積之一密度。

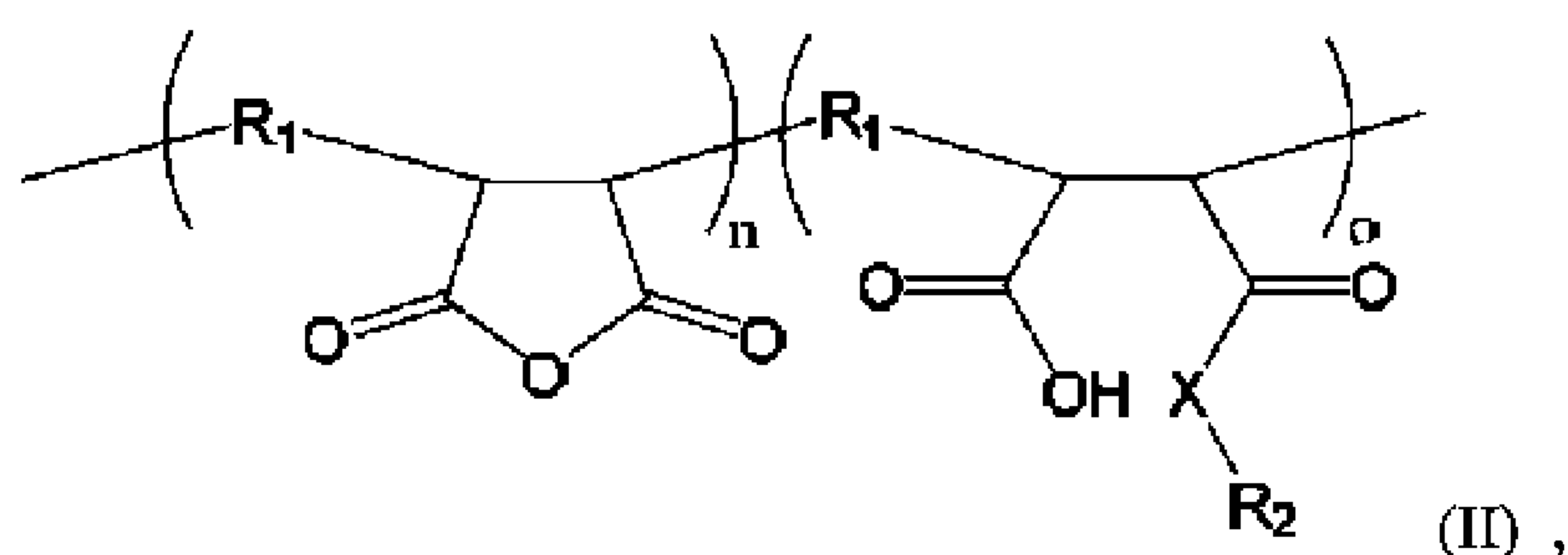
【第10項】 一種流動槽系統，包括：

一基板，其包括一或多個層；

一流體通道，其佈置在該基板中或其上且包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面包括：

一偶聯劑，其包括共價連接至該流體通道之該基板之一第一官能基及遠離該基板定位之一第二官能基；

一式(II)聚合物，其使用至少一個醯亞胺鍵共價連接至該偶聯劑之該第二官能基：



其中：

R_1 係已與馬來酸酐共聚合之一不飽和單體之一殘基；

R_2 係 H、一烷基、一寡(乙二醇)及/或一二烷基胺； n 及 o 各自係 1 至 10,000 之一整數；且

X 係一二價 NH、O 及/或 S；及

一核酸引子分子，其共價連接至該聚合物。

【第11項】 如請求項10所述之流動槽系統，其中該核酸引子分子包括一胺封端核酸或其胺封端核酸之一混合物。

【第12項】 如請求項10所述之流動槽系統，其中該核酸引子分子具有1至500,000個探針分子/平方微米表面積之一密度。

【第13項】 如請求項10所述之流動槽系統，其中該基板包括一玻璃、一玻璃陶瓷、一矽、一熔融二氧化矽、一石英、一熱塑性或一熱固性塑膠。

【第14項】 如請求項10至13中之任一項所述之流動槽系統，其中該偶聯劑包括一胺基矽烷及/或一有機磷酸胺基酯。

【第15項】 如請求項14所述之流動槽系統，其中該胺基矽烷係選自由以下組成之群：3-胺基丙基三甲氧基矽烷、3-胺基丙基三乙氧基矽烷、3-(2-胺基乙基)-胺基丙基三甲氧基矽烷、胺基丙基甲基二乙氧基矽烷、4-胺基丁基三乙氧基矽烷、4-胺基-3,3-二甲基丁基三甲氧基矽烷及N-(6-胺基己基)胺基甲基三乙氧基矽烷。

【第16項】 如請求項14所述之流動槽系統，其中該有機磷酸胺基酯係選自由以下組成之群：磷酸二氫3-胺基丙基酯、磷酸4-胺基苯基酯、磷酸二氫2-胺基乙基

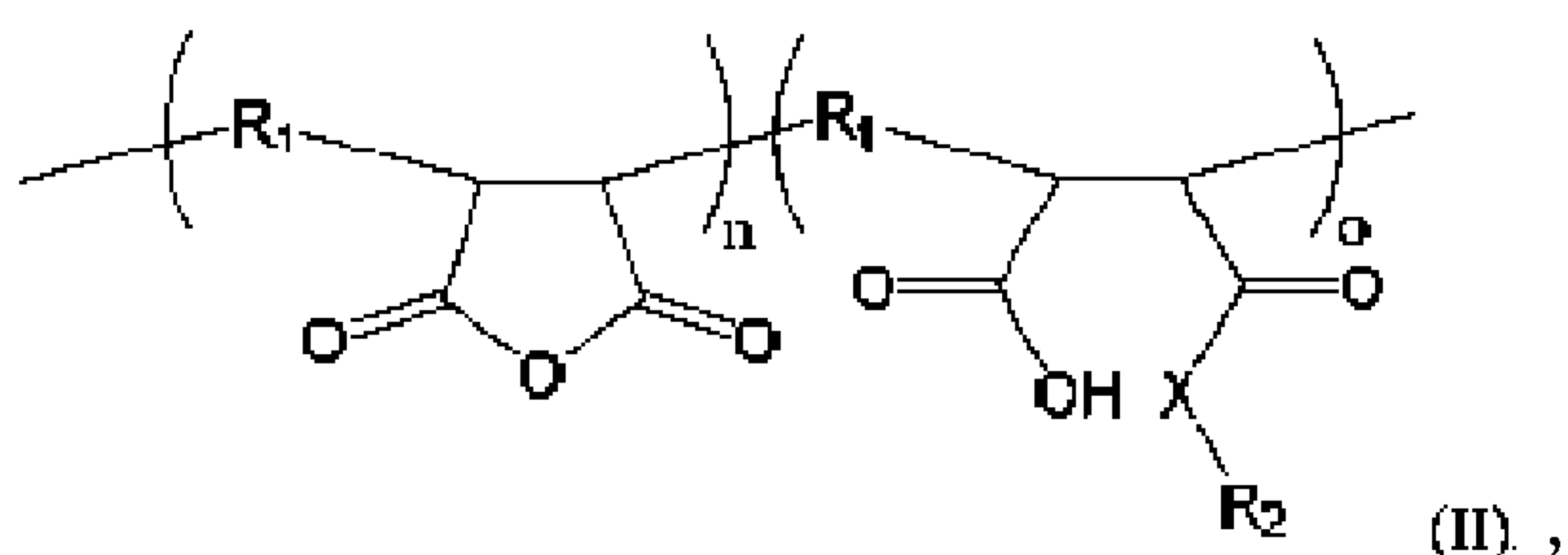
酯及硫代磷酸 2-(3-胺基丙基)胺基乙基酯。

【第 17 項】 如請求項 10 至 13 中之任一項所述之流動槽系統，其中 m 對 n 之一相對比率 ($m:n$) 為約 0.5 至約 1.0。

【第 18 項】 一種製備一流動槽物件之方法，該方法包括以下步驟：

使佈置在一基板中或其上之一流體通道與一偶聯劑接觸以將一第一官能基共價連接至該流體通道；

使一式 (II) 聚合物與該偶聯劑以將該聚合物共價連接至一第二官能基，以在一系鏈聚合物上形成一醯亞胺鍵聯；



其中：

R_1 係已與馬來酸酐共聚合之一不飽和單體之一殘基；

R_2 係 H、一烷基、一寡(乙二醇)及/或一二烷基胺； n 及 o 各自係 1 至 10,000 之一整數；且

X 係一二價 NH、O 及/或 S；及

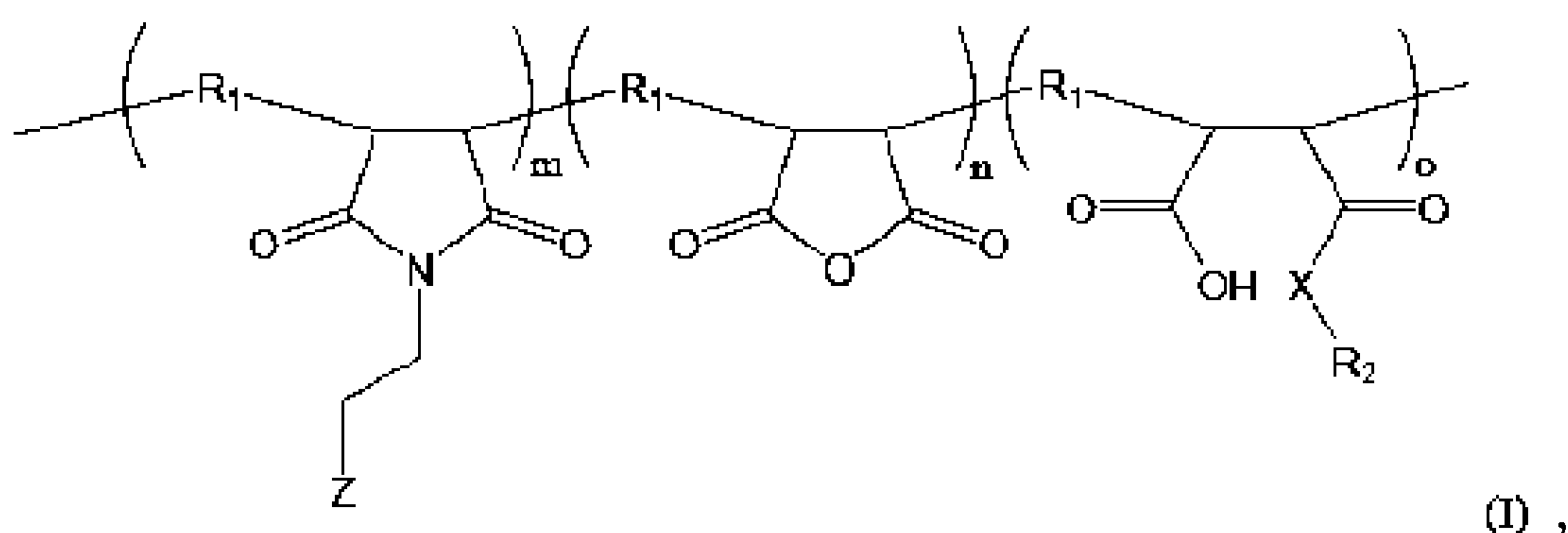
使一核酸引子分子與該系鏈聚合物接觸將該核酸引子分子共價連接至該系鏈聚合物。

- 【第19項】 如請求項18所述之方法，其中該核酸引子分子包括一胺封端核酸或其胺封端核酸之一混合物。
- 【第20項】 如請求項18所述之方法，其中該核酸引子分子具有1至500,000個探針分子/平方微米表面積之一密度。
- 【第21項】 如請求項18所述之方法，其中該基板包括一玻璃、一玻璃陶瓷、一矽、一熔融二氧化矽、一石英、一熱塑性或一熱固性塑膠。
- 【第22項】 如請求項18至21中之任一項所述之方法，其中該偶聯劑包括一胺基矽烷及/或一有機磷酸胺基酯。
- 【第23項】 如請求項22所述之方法，其中該胺基矽烷係選自由以下組成之群：3-胺基丙基三甲氧基矽烷、3-胺基丙基三乙氧基矽烷、3-(2-胺基乙基)-胺基丙基三甲氧基矽烷、胺基丙基甲基二乙氧基矽烷、4-胺基丁基三乙氧基矽烷、4-胺基-3,3-二甲基丁基三甲氧基矽烷及N-(6-胺基己基)胺基甲基三乙氧基矽烷。
- 【第24項】 如請求項22所述之方法，其中該有機磷酸胺基酯係選自由以下組成之群：磷酸二氫3-胺基丙基酯、磷酸4-胺基苯基酯、磷酸二氫2-胺基乙基酯及硫代硫酸2-(3-胺基丙基)胺基乙基酯。
- 【第25項】 一種用於定序核酸之方法，該方法包括以

下步驟：提供一流動槽物件，該流動槽物件包括：

一基板，其包括一或多個層；

一流體通道，其佈置在該基板中或其上且包括至少一個反應性表面，該至少一個反應性表面包括一偶聯劑，該偶聯劑包括共價連接至該基板之一第一官能基及使用一醯亞胺鍵共價連接至一式(I)聚合物之一第二官能基：



其中：

R_1 係已與馬來酸酐共聚合之一不飽和單體之一殘基；

R_2 係 H、一烷基、一寡(乙二醇)及/或一二烷基胺； m 、 n 及 o 各自為 1 至 10,000；

X 係一二價 NH、O 及/或 S；且 Z 係該第二官能基，

使一核酸引子分子與該式(I)聚合物接觸以將該核酸引子分子共價連接至該式(I)聚合物；

使用該核酸引子分子捕獲 DNA 片段，其中每個 DNA 片段包括該核酸引子分子之一互補序列；及

將核苷酸添加至該核酸引子分子之末端以合成所捕獲每個 DNA 片段之一互補 DNA 序列，其中該互補 DNA 序列經由該核酸引子分子共價偶聯至該式(I)聚合物。

【第26項】 如請求項25所述之方法，其中該核酸探針包括一胺封端核酸或其胺封端核酸之一混合物。

【第27項】 如請求項25所述之方法，其中該核酸探針分子具有1至500,000個探針分子/平方微米表面積之一密度。

【第28項】 如請求項25所述之方法，其中該基板包括一玻璃、一玻璃陶瓷、一矽、一熔融二氧化矽、一石英、一熱塑性或一熱固性塑膠。

【第29項】 如請求項25至28中之任一項所述之方法，其中該偶聯劑包括一含胺矽烷及/或一含胺有機磷酸酯。

【第30項】 如請求項29所述之方法，其中該含胺矽烷係選自由以下組成之群：3-胺基丙基三甲氧基矽烷、3-胺基丙基三乙氧基矽烷、3-(2-胺基乙基)-胺基丙基三甲氧基矽烷、胺基丙基甲基二乙氧基矽烷、4-胺基丁基三乙氧基矽烷、4-胺基-3,3-二甲基丁基三甲氧基矽烷及N-(6-胺基己基)胺基甲基三乙氧基矽烷。

【第31項】 如請求項29所述之方法，其中該含胺有機

磷酸酯係選自由以下組成之群：磷酸二氫 3 - 胺基丙基酯、磷酸 4 - 胺基苯基酯、磷酸二氫 2 - 胺基乙基酯及硫代磷酸 2 - (3 - 胺基丙基) 胺基乙基酯。

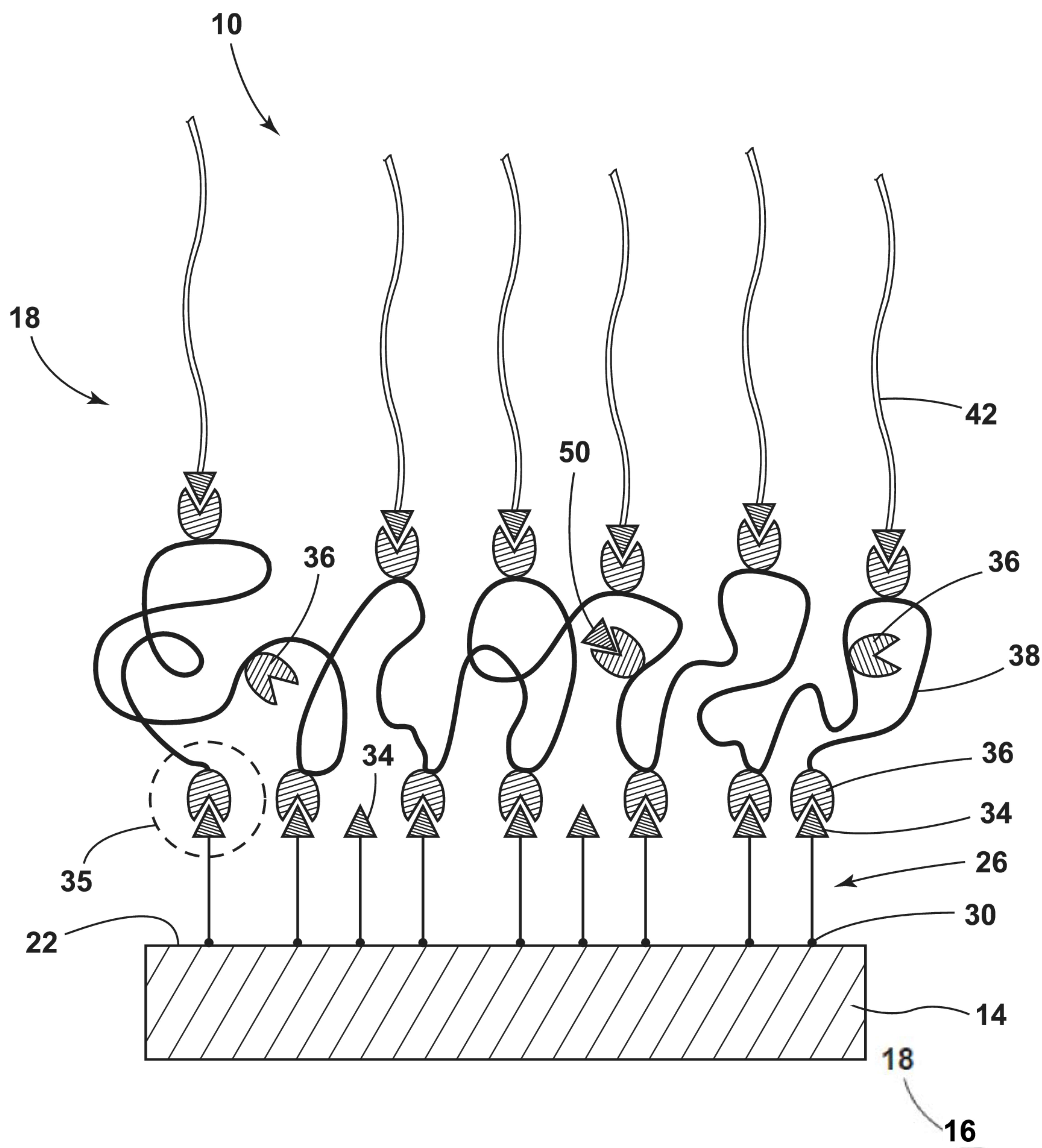
【第 32 項】 如請求項 25 至 28 中之任一項所述之方法，進一步包括以下步驟：

使來自該 DNA 片段之該互補 DNA 序列變性；及
自該流動槽物件收集該互補 DNA 序列及 / 或該 DNA 片段。

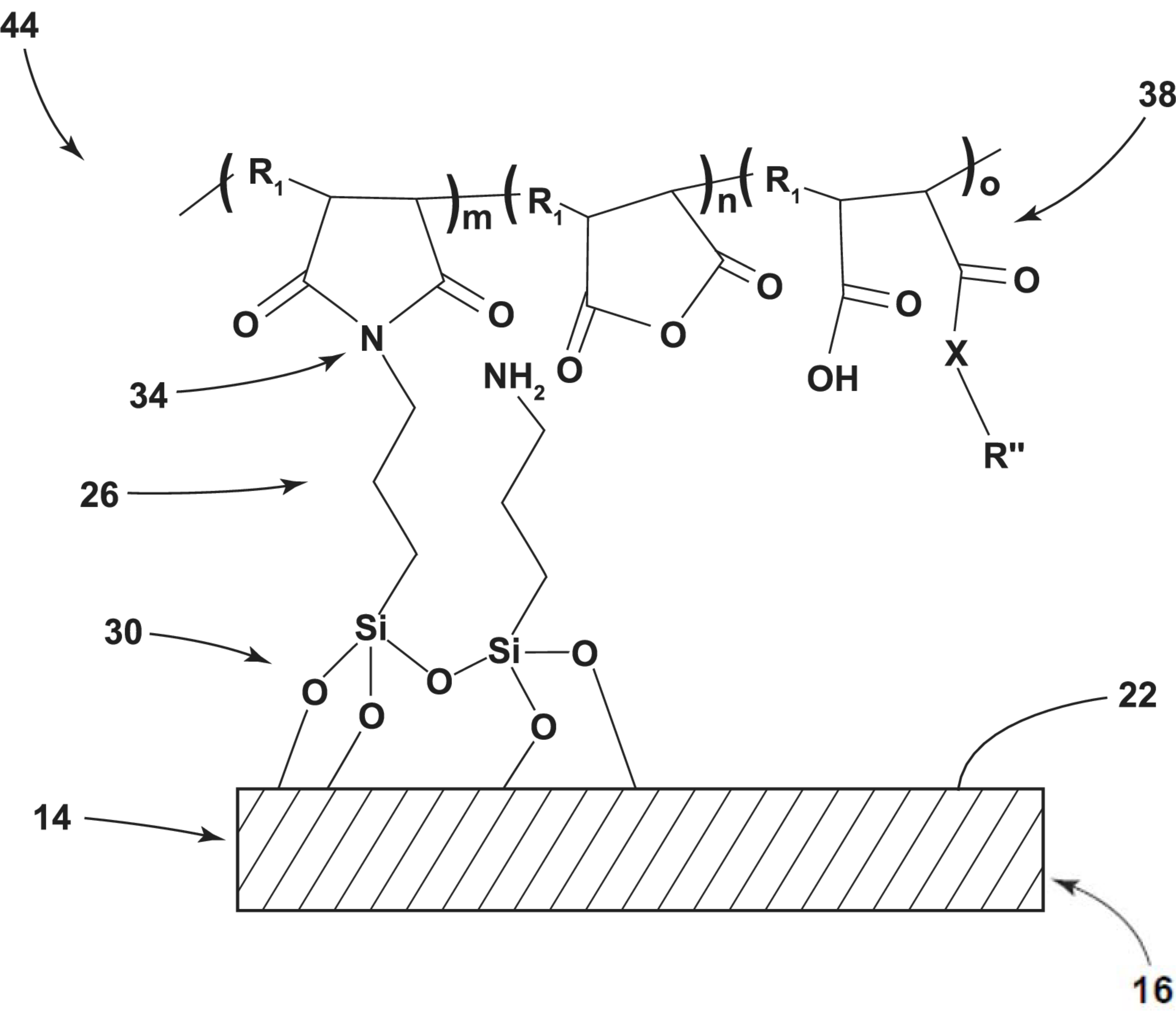
【第 33 項】 如請求項 25 至 28 中之任一項所述之方法，進一步包括以下步驟：

使來自該 DNA 片段之該互補 DNA 序列變性；
自該流動槽物件收集該 DNA 片段；
使用該互補 DNA 序列合成靶 DNA 片段，該互補 DNA 序列經由該核酸引子分子共價偶聯至該式 (I) 聚合物；及
自該流動槽物件收集該靶 DNA 片段。

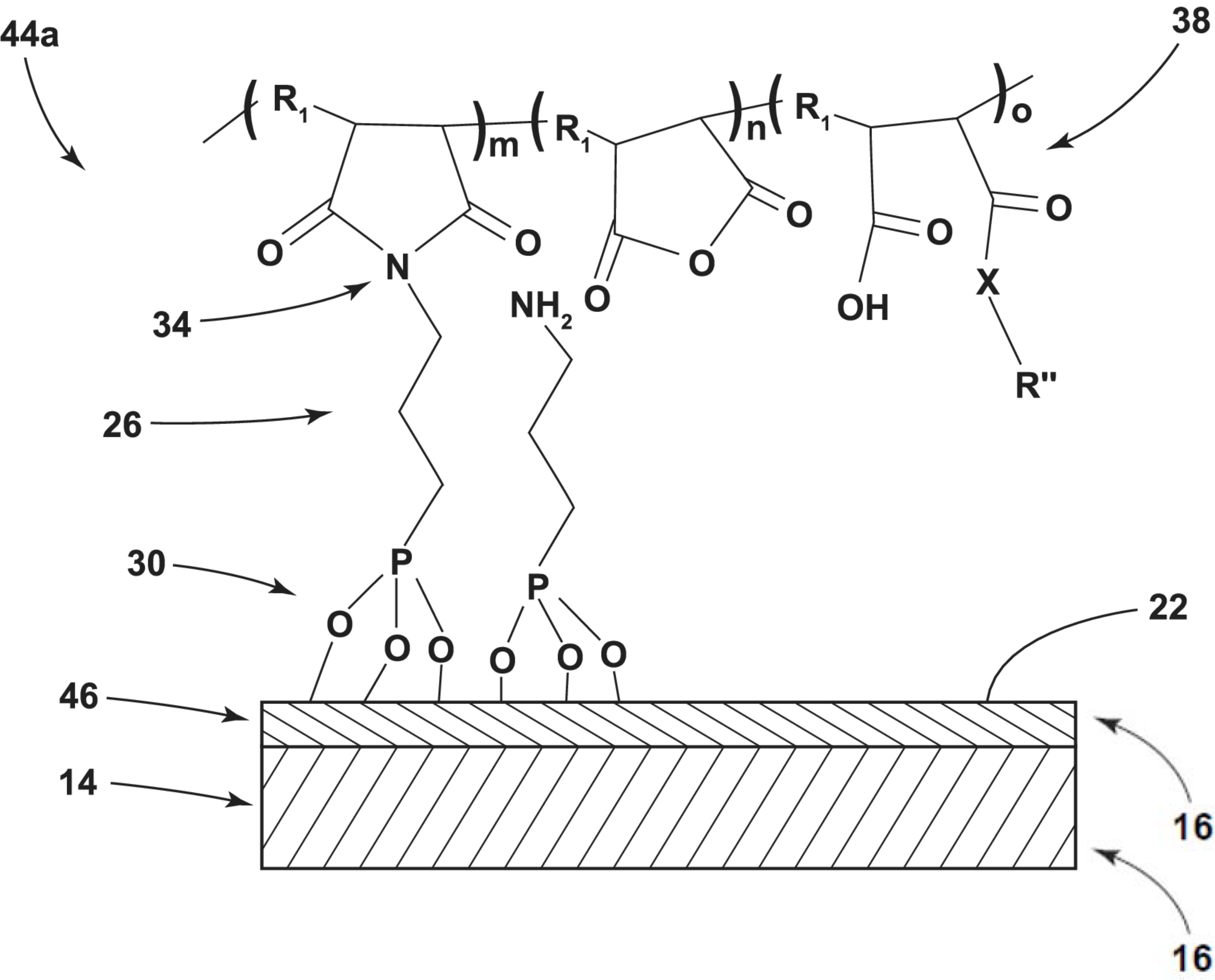
【發明圖式】



第1圖

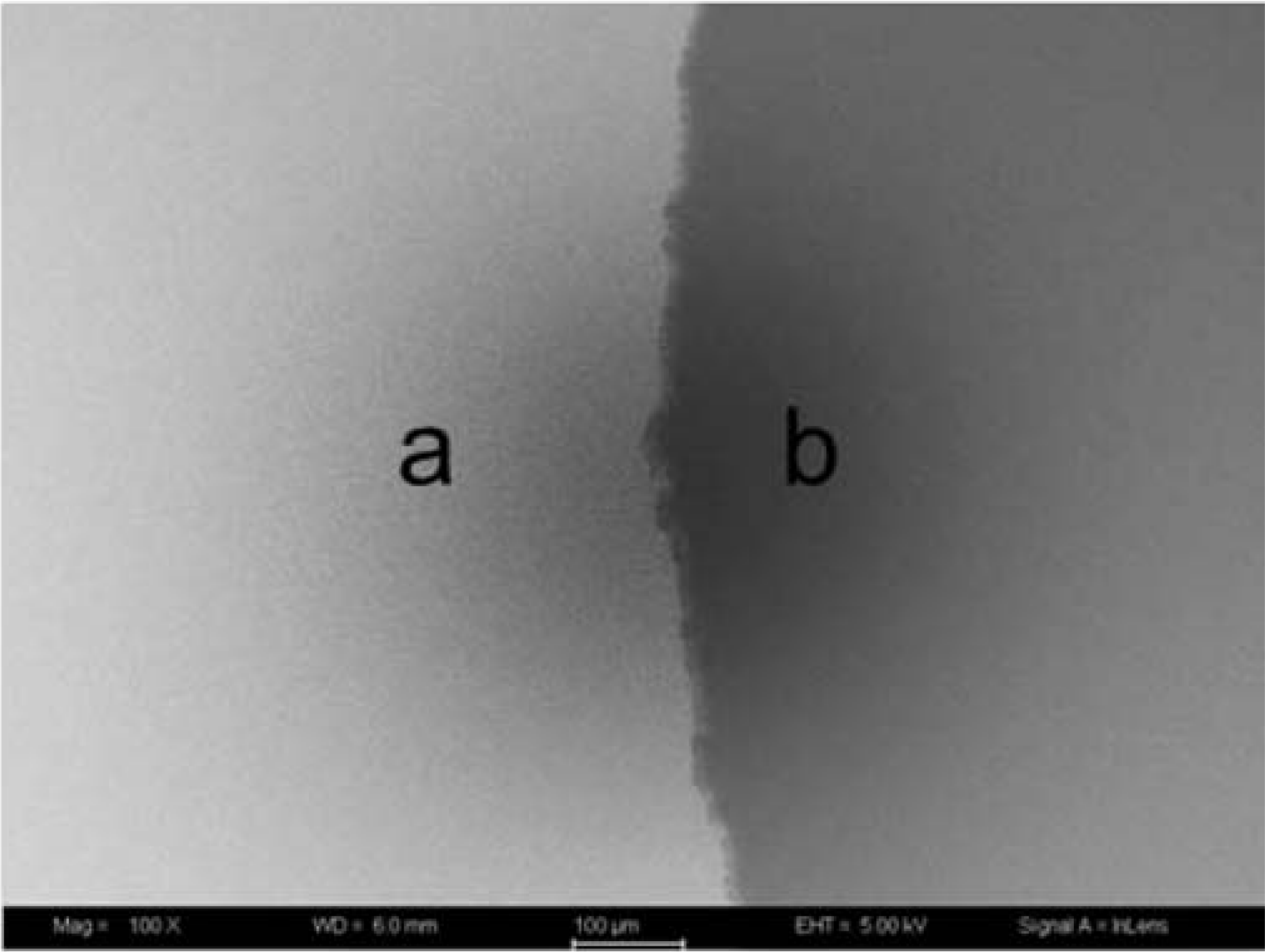


第2圖

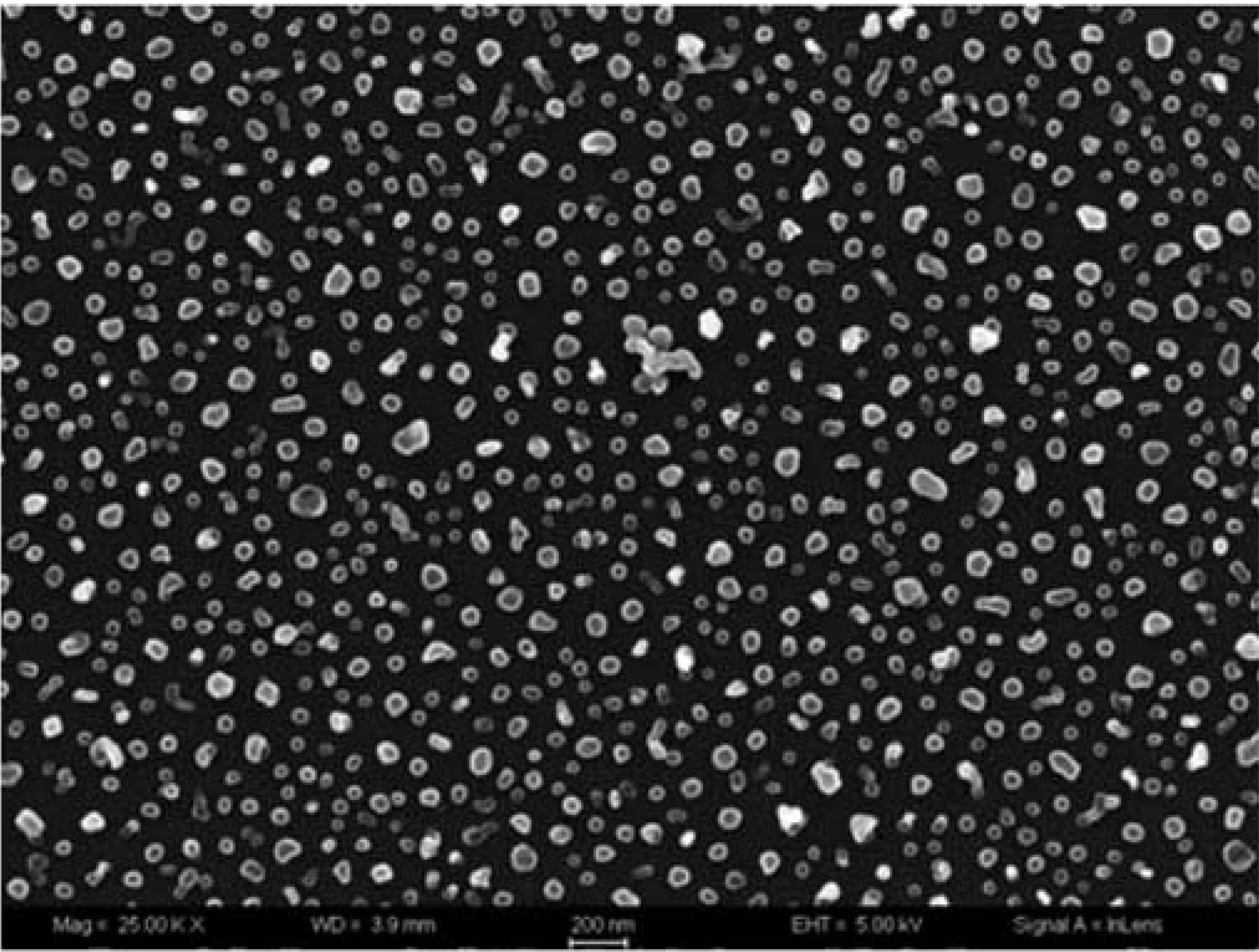


第3圖

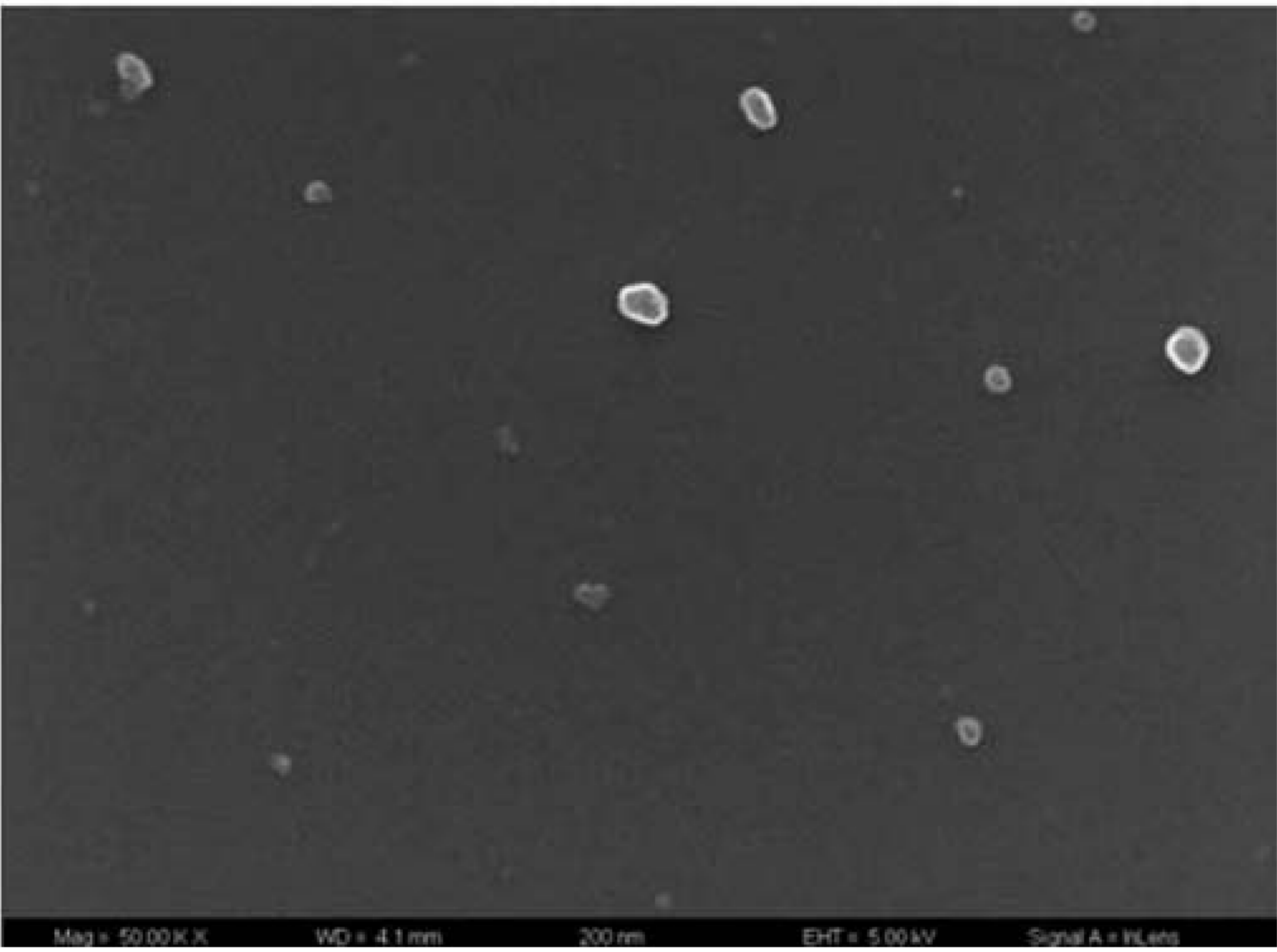
第4A圖

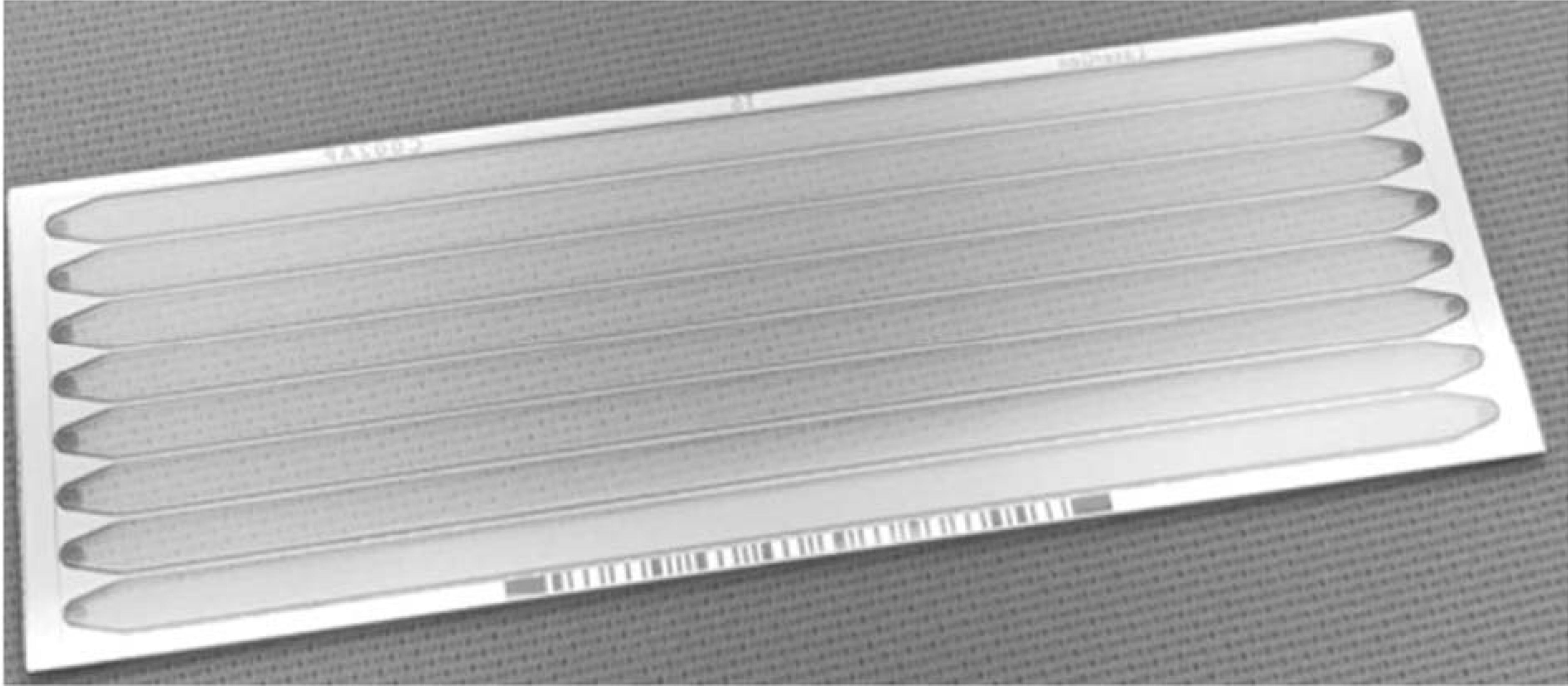


第4B圖

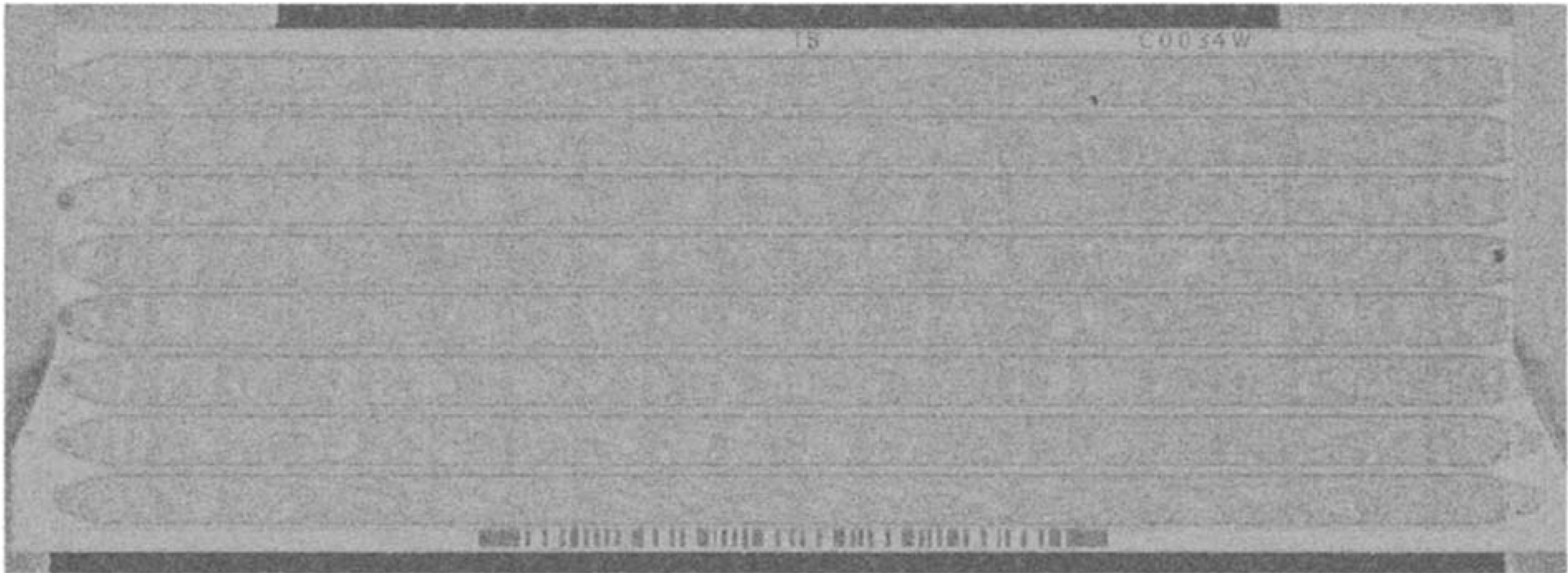


第4C圖

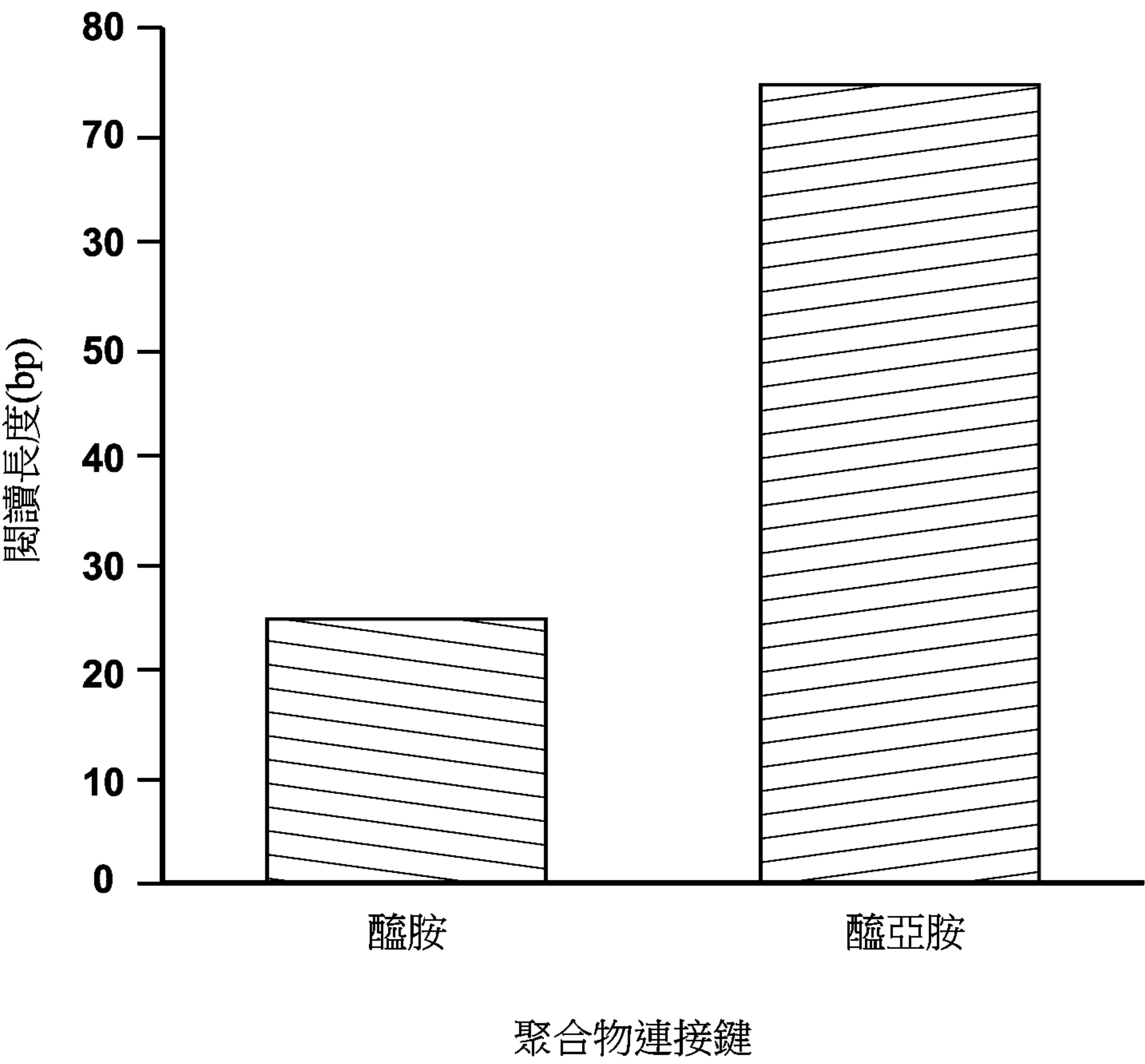




第5A圖



第5B圖



第6圖