202243733

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202243733 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：111101556 (22)申請日： 中華民國 111 (2022) 年 01 月 13 日

(51)Int. Cl.： *B01J19/00 (2006.01)* *C12Q1/68 (2018.01)*

(30)優先權：2021/01/13 美國 63/137,064

(71)申請人：美商加州太平洋生物科學公司 (美國) PACIFIC BIOSCIENCES OF CALIFORNIA, INC. (US)
美國

(72)發明人：奈米羅斯基 亞歷克斯 NEMIROSKI, ALEX (US) ；雅伯 蓋瑞 ABEL, GARY R. (US) ；霍希尼貝 哈梅德 HOSSEINI BAY, HAMED (US) ；蓋瑞森 喬許 GARRETSON, JOSHUA (US) ；雷克爾瑞 理查 LECOULTRE, RICHARD D. (US) ；派特森 科特 PATTERSON, KURT (US) ；古拉提 泰傑斯 GULATI, TEJAS (US) ；布洛克 法比恩 BLOCK, FABIAN (DE)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：322 項 圖式數：19 共 300 頁

(54)名稱

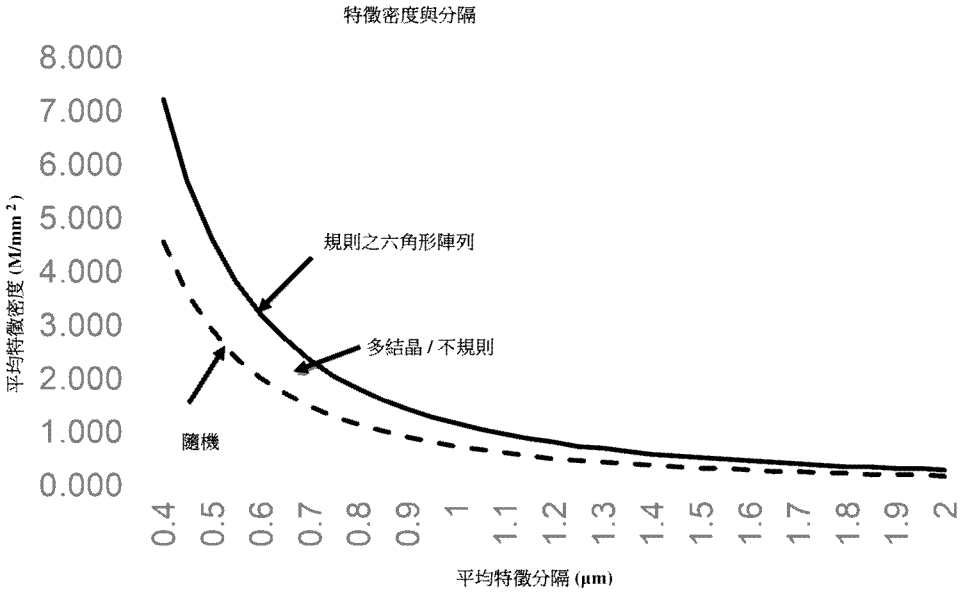
經膠態組裝之表面結構化

(57)摘要

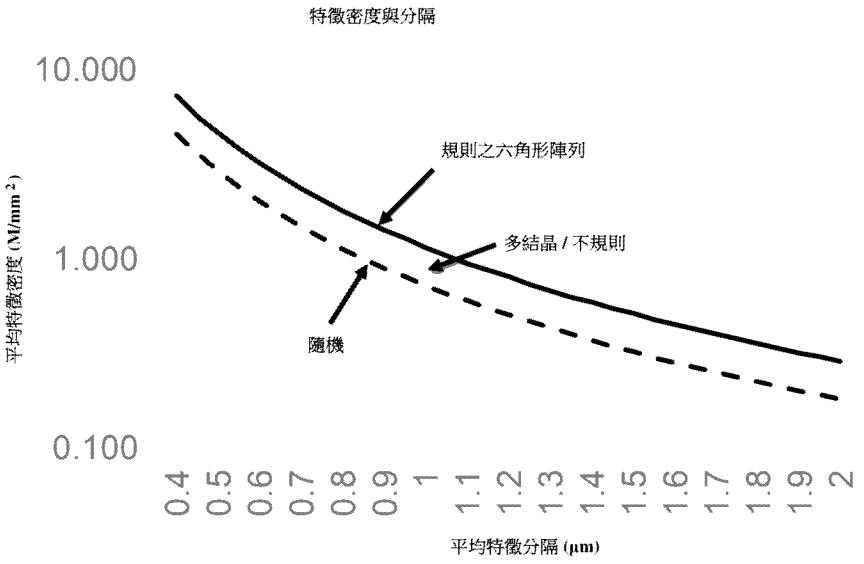
本揭露包括於表面(例如平面表面)上特定位置(例如供聚落形成之位置)並產生具有特定於表面上之位置的流通池之方法。亦揭露實施定序(例如合成式定序和結合式定序)之方法，其使用所產生之流通池並處理(例如比對、定向、揀選及評估品質)於定序期間所捕獲之流通池影像。

Disclosed herein include methods of specifying sites (e.g., sites for colony formation) on a surface (e.g., a planar surface) and generating a flow cell having the sites specified on a surface. Also disclosed are methods of performing sequencing (e.g., sequencing-by-synthesis and sequencing-by-binding) using the flow cell generated and processing (e.g., aligning, orienting, sorting, and assessing quality) images of the flow cell captured during sequencing.

指定代表圖：


特徵密度與分隔
8.000
7.000
6.000
5.000
4.000
3.000
2.000
1.000
0.000
平均特徵密度 (M/mm²)
規則之六角形陣列
多結晶 / 不規則
隨機
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2
平均特徵分隔 (μm)

【圖 1A】


特徵密度與分隔
10.000
1.000
0.100
平均特徵密度 (M/mm²)
規則之六角形陣列
多結晶 / 不規則
隨機
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2
平均特徵分隔 (μm)

【圖 1B】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

經膠態組裝之表面結構化

【英文發明名稱】

SURFACE STRUCTURING WITH COLLOIDAL ASSEMBLY

【中文】

本揭露包括於表面(例如平面表面)上特定位置(例如供聚落形成之位置)並產生具有特定於表面上之位置的流通池之方法。亦揭露實施定序(例如合成式定序和結合式定序)之方法，其使用所產生之流通池並處理(例如比對、定向、揀選及評估品質)於定序期間所捕獲之流通池影像。

【英文】

Disclosed herein include methods of specifying sites (e.g., sites for colony formation) on a surface (e.g., a planar surface) and generating a flow cell having the sites specified on a surface. Also disclosed are methods of performing sequencing (e.g., sequencing-by-synthesis and sequencing-by-binding) using the flow cell generated and processing (e.g., aligning, orienting, sorting, and assessing quality) images of the flow cell captured during sequencing.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

經膠態組裝之表面結構化

【英文發明名稱】

SURFACE STRUCTURING WITH COLLOIDAL ASSEMBLY

【技術領域】

【0001】本揭露大抵關於定序領域且更特別地關於供定序之表面結構化。

[相關申請案]

【0002】本申請案請求於2021年1月13日提出申請之美國臨時申請案號63/137,064之優先權。該相關申請案之內容整體併入本文作為參考。

【先前技術】

【0003】表面具有供聚落形成之離散位置的流通池被用於次世代定序。產生表面具有“預定”且次序位置或由上而下微影蝕刻之該流通池可能係昂貴且耗時的。對產生表面具有充分隔離位置以能以較低成本產生良好數據品質(特別是於高位置密度下)之流通池存有需求。

【發明內容】

【0004】本揭露包括於平面結構上特定結合位置之方法。於平面結構上特定結合位置之方法可包含：提供納入液體中之平面結構。該方法可包含：投遞複數個粒子至該液體之表面。該方法可包含：除去介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該平面結構接觸。於該表面上之該複數個粒子可特定於該平面結構上之複數個結合位置。與該平面結構接觸之該複數個粒子可特定於該平面結構上之複數個結合位置。

【0005】亦提供於平面結構上特定結合位置之方法。於平面結構上特定結合位置之方法可包括：提供納入液體中之複數個平面結構。該方法可包括：投遞複數個粒子至該液體之表面。該方法可包括：除去介於該複數個粒子與該複數個平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該複數個平面結構接觸。於該表面上及/或與該複數個平面結構接觸之該複數個粒子可特定於該複數個平面結構之每一者上的複數個結合位置。於該複數個平面結構之任2個平面結構上的該複數個結合位置可為不同。

【0006】可替代地或另外地，於平面結構上特定結合位置之方法可含有：提供納入液體中之該複數個平面結構的每一者之平面結構。該方法可含有：投遞複數個粒子至該液體之表面。隨後，該方法可含有：除去介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該平面結構接觸。於該表面上及/或與該平面結構接觸之該複數個粒子可特定於該平面結構上之複數個結合位置。於

該複數個平面結構之任2個平面結構上的該複數個結合位置可為不同。

【0007】可通過多種不同之方法達成除去該液體。於某些情況下，該除去包含自含有該液體、該平面表面及該複數個粒子之室除去該液體。交替地，該除去可包含自含有該液體、該平面表面及該複數個粒子之室排洩該液體。加熱該液體係除去該液體之另一方法。於某些實施態樣中，該除去包含提升該平面結構高於該液體之表面，使得至少某些該複數個粒子安置於該平面結構上。於某些情況下，除去該液體包含允許介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體蒸發。除去該液體之替代方法亦與本文所揭露者一致。

【0008】許多液體係與本文所揭露者一致。某些適當之液體具有下述特性之一或更多者：適用於堆積粒子之表面張力、足以允許除去介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體而未實質破壞粒子構形之黏度、及適用於蒸發該液體以沉積該複數個粒子於該平面表面上而未實質破壞粒子構形之揮發性。該液體經常呈親水性，雖然其他液體係與某些實施態樣一致。於例示性實施態樣中，該液體包含下述之一或更多者：水；醇，諸如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇或高級醇，其可選擇性地經氟化或其他化學修飾；緩衝液；鹽溶液；水；有機溶劑；極性溶劑；非極性溶劑；油；天然油；合成油；有機油；礦物油；石蠟油；烴油；非烴油；矽油；揮發性液體；及彼等之組合。於某

些實施態樣中，該液體之密度係約0.1 g/cm^{3}至約10 g/cm^3。該液體之密度可高於該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之密度。該液體之黏度可為約10^{-1}毫帕-秒(mPa.s)至約10^7 mPa.s。該液體之表面張力可為約10 mN.m^{-1}至約500 mN.m^{-1}。具有該等範圍以外之性質的某些液體亦與本文所揭露者一致。

【0009】於某些實施態樣中，該液體包含擴展劑、污染物或彼等之組合。該擴展劑可包含醇，諸如乙醇、異丙醇或異丁醇。該污染物可包含界面活性劑、擁擠劑、蔗糖、尿素、聚丙烯酸、1-甲基吡啶-2-醛肟氯鹽(pyridine aldoxime methyl chloride)或彼等之組合。該界面活性劑可包含十二烷基硫酸鈉、土溫(Tween)或彼等之組合。該擁擠劑可包含聚乙二醇(PEG)。該PEG可包含平均分子量約200道爾頓(dalton)(例如PEG 200)至約8000道爾頓(例如PEG 8000)之PEG。該擴展劑(或污染物)之濃度可為約1%至約20%。

【0010】粒子之範圍係與本文所揭露者一致。於某些實施態樣中，該複數個粒子包含具有相同材質之2種粒子。該複數個粒子之每個粒子可包含相同材質。於某些實施態樣中，該複數個粒子包含具有不同材質之2種粒子。該複數個粒子可包含2個具有不同材質之粒子的子集。於某些情況下，該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之材質包含聚二甲基矽氧烷(PDMS)、聚對苯二甲酸乙二酯(PET)、聚對苯二甲酸丁二酯(PBT)、聚甲基丙烯酸甲酯

(PMMA)、聚乙烯、聚甲烯、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS)、聚乙酸乙烯酯、聚胺甲酸酯或彼等之組合。

【0011】為調節該平面表面上最終結合位置之分隔距離(諸如介於2個結合位置之間的最小分隔距離)、該平面表面上組裝粒子成規則或不規則區域或為其他理由，選擇粒子半徑。經常選擇粒子以使該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之半徑(或直徑)為約10^{-9} m至約10^{-4} m。該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之體積可為約10^{-27} m^3至約10^{-12} m^3。某些粒子群具有某些或全部大小均一性，使得該複數個粒子之二者具有相同或約相同之半徑及/或該複數個粒子之每一者具有相同之半徑。交替地或另外地，某些粒子群係異質的，藉以例如調節呈不規則的或隨機的粒子分佈之可能性或比例。該等粒子可包含具有第一相同半徑(或直徑)之粒子的第一子集和具有第二相同半徑(或直徑)之粒子的第二子集。該第一相同半徑與該第二相同半徑可為不同。該第一相同半徑(或直徑)與該第二相同半徑(或直徑)可差異至少0.1 μm。該第一相同半徑和該第二相同半徑可與該第一相同半徑(或該第二相同半徑)差異至少10%。該第一相同半徑(或直徑)可大於該第二相同半徑(或直徑)。例如，該第一相同半徑係0.5 μm且該第二相同半徑可為0.4 μm。該第一相同半徑(或直徑)可小於該第二相同半徑(或直徑)。該第一粒子子集之數量與該第二粒子子集之數量的比例係約1:100至約100:1。

【0012】粒子經常係球形的，使得該複數個粒子之一

者、一或更多者或每一者具有球形形狀，雖然其他形狀亦與本文所揭露者一致。沉積於特定之平面表面的該複數個粒子(或該等粒子之子集)可包含約10^4個粒子至約10^8個粒子，雖然諸如當使用較小或較大之平面表面或使用較小或較大之粒子大小時，可使用大於或小於該等值之數量以例如調節結合位置之最小距離或間距。

【0013】該等粒子(或該等粒子之子集)可以不同之密度(諸如約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^2)存在於特定液體之表面及/或特定平面表面，雖然可替代者亦與本文所揭露者一致。於該液體之表面及/或該平面表面上的該等粒子(或該等粒子之子集)之密度的非限制性實例係至少600k/mm^2、至少800k/mm^2、至少1,000k/mm^{2}及至少2,000k/mm^2。

【0014】介於結合位置之間的間距距離之範圍係與本文所揭露者一致。可選擇間距距離，藉以調節自個別位置發出之訊號的解析度、平面表面上之位置密度或其他標準。於某些情況下，於規則的(或不規則的或隨機的)位置分佈之區域內，該複數個結合位置之2個或任2個相鄰結合位置的最小間距係約10^{-9} m至約10^{-4} m。於1個結合位置與2個鄰近(或相鄰)結合位置之間的間距可為不同。例如，於直線(或實質直線)上之3個連續結合位置可具有介於2對連續結合位置之間的不同間距。介於中間結合位置與一鄰近結合位置之間的間距與介於該中間結合位置與另一鄰近結合位置之間的間距可為不同。例如，1個結合位置可具

有多個鄰近結合位置(例如6個鄰近結合位置)。介於該結合位置與2 (或3、4、5或6)個鄰近結合位置之間的間距可為不同。通常，隨機分佈(或隨機安排)之位置展現比規則排列之區域較大之分離和間距。該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者的大小可為約10^{-9} m至約10^{-4} m，雖然該範圍以外的大小係與某些實施態樣一致。該大小可為寬度、長度、半徑或直徑。該複數個結合位置之一者、一或更多者、達實質上全部或每一者具有環形形狀。該等結合位置之其他形狀係與本文所揭露者一致。於平面表面上之該複數個結合位置可包含約10^4個結合位置至約10^8個結合位置。

【0015】遞送該複數個粒子至該液體之表面包含遞送該複數個粒子，使得例如藉由該複數個粒子局部飽和(或部分飽和)該液體之表面以使該液體之表面包含第一晶格(或第一不規則陣列)。該第一晶格(或第一不規則陣列)可包括該複數個粒子之粒子子集。遞送該複數個粒子至該液體之表面可包含藉由該複數個粒子局部飽和(或部分飽和)該液體之表面，使得該表面包含第二晶格(或第二不規則陣列)。該第二晶格(或不規則陣列)可含有該複數個粒子之粒子子集。該第二晶格(或第二不規則陣列)可藉由間斷與該第一晶格(或第一不規則陣列)分離。該間斷可為隨機排列區域，該隨機排列區域經常顯現於該液體之表面上的至少某些該複數個粒子(或該平面結構上的至少某些該複數個粒子或所生成之結合位置)之間距，該間距係局部大於

或平均大於該結晶或規則排列之第一或第二區域的間距。該間斷可為該液體之表面上無粒子(或該平面結構上無粒子或無所生成之結合位置)的區域。進一步，第一間斷或隨機排列區域經常顯現相對於平面表面或任何其他獨立產生之平面表面上的第二或所有其他間斷或隨機排列區域呈獨特或不同的粒子或位置分佈。視野內之不規則陣列通常包含複數個間斷及/或藉由間斷隔開之複數個晶格。該視野可為至少0.0001 mm^2、0.0002 mm^2、0.0005 mm^2、0.001 mm^2、0.002 mm^2、0.005 mm^2、0.01 mm^2、0.02 mm^2、0.05 mm^2、0.1 mm^2、0.2 mm^2、0.5 mm^2或1 mm^2。

【0016】局部密度之範圍係與本文所揭露者一致。於某些實施態樣中，該複數個粒子(或該所生成之結合位置或該等粒子或所生成之結合位置的任何子集)係以約200k/mm^2至約8,000k/mm^2之局部密度存在。於其他實施態樣中，該複數個粒子係以至少600k/mm^2(諸如至少800k/mm^2、至少1,000k/mm^2或至少2,000k/mm^2)之局部密度存在。

【0017】該晶格之不同構形(諸如該等粒子和經蝕刻後該等所生成之結合位置的排列或相對位置或區位)可存在於不同之實施態樣。該第一晶格經常自行組裝，使得該第一晶格包含呈六角構形之粒子的子集。該第二晶格經常自行組裝，使得該第二晶格包含呈六角構形之粒子的子集。該呈六角構形之粒子的子集之7個粒子可位於六角形之6個頂點和中心。位於該六角形之6個頂點的該6個粒子

之每一者可與位於該六角形之中心的粒子和位於該六角形之該等頂點的2個其他粒子接觸。於某些實施態樣中，該第一晶格包含等邊三角形構形之粒子的子集，使得該第一粒子子集之3個相鄰非共線粒子形成等邊三角形。可替代地或另外地，該第一晶格內相鄰粒子之間所畫的第一直線與該第二晶格內相鄰粒子之間所畫的任何第二直線不平行。可選擇結晶區域或所生成之結合位置內的粒子之幾何形狀以增加或甚至最大化該液體表面或往後經該粒子沉積之該平面表面上的局部2維粒子堆積密度或該所生成之結合位置的密度。

【0018】經常的情況是，當假定粒子之構形於晶格內具有藉由隨機或無序的區域或‘裂縫’所分離之第一結晶或規則區域與第二結晶區域，吾人可觀察到下述情況。該第一晶格包含排列成複數個第一列粒子之粒子子集。觀察到該複數列之每個第一列的粒子排列呈線性構形，使得該第一列之粒子與該第一列內與該粒子相鄰之2個粒子接觸。2個相鄰第一列可藉由第一偏距偏位，該第一偏距於第一方向可超過該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之粒子的直徑(例如約該粒子的半徑乘以3之平方根)。該2個相鄰列可藉由第二偏距偏位，該第二偏距於第二方向係諸如該複數個粒子之該粒子的直徑。該第二方向可與該第一方向垂直。於一第一列之粒子可與其他第一列之2個相鄰粒子接觸。經常地，該偏距使得第一列之粒子間具有間距，該間距係與相鄰第一列之粒子間的間距相比擬或實質

上相同，且該第一列中所生成之結合位置具有間距和分隔距離，該間距和分隔距離係分別與相鄰第一列之結合位置間的間距和分隔距離相比擬或實質上相同。

【0019】於某些實施態樣中，不規則陣列(例如第一不規則陣列或第二不規則陣列)內之每個粒子係以閾值距離或超過閾值距離遠離該不規則陣列之該粒子的最近相鄰粒子。該閾值距離可為該粒子之半徑。不規則陣列可不包含位於任何六角形之6個頂點和中心的7個相鄰粒子。不規則陣列可不包含環繞位於六角形之6個頂點的第7個粒子之6個相鄰粒子。不規則陣列可包含7個相鄰粒子，其中6個係位於非為六角形之六面形狀的6個頂點且環繞該7個相鄰粒子之第7個粒子。不規則陣列可不包含六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形之粒子。不規則陣列可不包含位於六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形內彼此位於至少閾值距離(例如5 μm)內之粒子。

【0020】於某些實施態樣中，遞送該複數個粒子包含同時及/或依次遞送該複數個粒子之第一粒子子集至該液體表面之第一區位和該複數個粒子之第二粒子子集至該液體表面之第二區位。遞送該複數個粒子可包含同時及/或依次遞送該複數個粒子之複數個粒子子集(例如5個粒子子集)至該液體表面之不同區位。

【0021】與本文所揭露者一致，該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子遭受蝕刻，藉以例如於經蝕刻之平面表面上復現或映現出作為結合位置之粒子分佈或構

形。該蝕刻可產生：複數個保留區域，其中該平面表面上之物質(或物質層或活性位置層)係與該複數個粒子接觸(直接或間接；諸如被該複數個粒子屏蔽)或與該複數個粒子接近且係經差異性保留。蝕刻該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子可產生：複數個經蝕刻之區域，其中該物質未與該複數個粒子接觸(直接或間接；諸如被該複數個粒子屏蔽)且經差異性除去。該物質層可為親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。

【0022】遮罩層可位於該物質上(或位於該物質之頂端)。於該複數個保留區域之該平面表面上的該物質可經由該複數個保留區域之該遮罩層與該複數個粒子接觸(諸如直接經由屏蔽)。該複數個保留區域之該遮罩層係與該複數個粒子接觸且係經差異性保留。該複數個經蝕刻之區域的該遮罩層未與該複數個粒子接觸且經差異性除去。

【0023】經常，保留區域(和由該保留區域特定之結合位置)的大小係小於經該蝕刻前與該保留區域接觸之粒子的大小。保留區域(和由該保留區域特定之結合位置)的大小係小於經該蝕刻後與該保留區域接觸之粒子的大小。交替地，保留區域(和由該保留區域特定之結合位置)的大小係大於經該蝕刻後與該保留區域接觸的該複數個粒子之粒子的大小。例如，某些或所有粒子可被完全降解。

【0024】蝕刻經常包含降解該複數個粒子之至少1個粒子或每個粒子(或2或更多個粒子或達至實質上所有粒子)的一部分。該降解可決定或影響於該平面結構上該複

數個結合位置之結合位置的大小，該平面結構對應該複數個保留區域之保留區域，其中該至少1個粒子係與該平面表面接觸。該降解可決定或影響於該平面結構上該複數個結合位置之2個相鄰結合位置之間的分隔距離。該分隔距離可為該2個相鄰結合位置之間的最短距離，其係由該2個相鄰結合位置之最近的邊測量。於某些實施態樣中，該方法包含於該蝕刻後除去任何該複數個粒子或保留之任何每個粒子的任何部分。該方法可包含除去經差異性保留之與該複數個粒子接觸的該複數個保留區域之該遮罩層。於某些實施態樣中，該複數個經蝕刻之區域於蝕刻後可不包含殘留之物質層和遮罩。可替代地或另外地，該方法可包含鈍化該複數個經蝕刻之區域以產生經鈍化之區域。鈍化該複數個經蝕刻之區域可於除去該遮罩層之前發生。該經鈍化之區域可為親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。

【0025】許多蝕刻方法係與本文所揭露者一致。例示性方法包括電漿蝕刻、反應離子蝕刻(RIE)、電容式RIE、感應式RIE、深度反應離子蝕刻、化學氣相沉積(CVD)、電漿增強CVD(PECVD)或彼等之組合。於某些實施態樣中，該蝕刻包含等向性蝕刻、定向性蝕刻、垂直性蝕刻或彼等之組合。使用1種氣體或2或更多種氣體以各種不同地實施蝕刻，該等氣體係諸如選自O_2、CF_4、C_2F_6、C_4F_8、CHF_3、SF_6、NF_3、BCl_3、Cl_2、HBr及Ar之群組的氣體。例如，該蝕刻包含使用氧氣、四氟化碳氣體或彼等之組合

的蝕刻。於某些實施態樣中，該蝕刻包含實施2或更多個蝕刻步驟。該2或更多種氣體之任2者的比例可為約1:100至約100:1，雖然可替代者亦與某些蝕刻方法一致。該1種氣體之質量流速、該2或更多種氣體的每一者之質量流速或該2或更多種氣體之整體質量流速可為約1每分鐘的標準立方釐米(sccm)至約100 sccm或高於或低於該範圍。該蝕刻可包含使用不同氣體以實施2或更多個蝕刻步驟。該蝕刻步驟可包含實施2或更多個蝕刻步驟，其中於一蝕刻步驟使用1種氣體且於另一蝕刻步驟使用該氣體和第二種氣體。該蝕刻可包含於約10瓦(W)至約100 W之功率下實施之蝕刻。該蝕刻可包含於約1毫托(mT)至約5000 mT之壓力下實施之蝕刻。該蝕刻可包含實施約1分鐘(min)至約10分鐘之蝕刻。該蝕刻可包含於約1℃至約20℃之溫度下實施之蝕刻。

【0026】蝕刻導致粒子於該平面表面上之分佈，該等粒子至少部分被復現或映現於該平面表面上以作為結合位置。於某些實施態樣中，該複數個保留區域至少部分特定該複數個結合位置於該平面結構上。於某些實施態樣中，該複數個經蝕刻之區域至少部分特定該複數個結合位置於該平面結構上。該等結合位置之不同構形(例如該等結合位置之排列或相對位置或區位)係與本文所揭露者一致。於某些實施態樣中，該複數個保留區域可包含該複數個結合位置之第一組7個結合位置，該7個結合位置經構形呈第1六角形之6個頂點和中心。該複數個保留區域可包含該複

數個結合位置之第二組7個結合位置，該7個結合位置經構形呈第2六角形之6個頂點和中心。該第1六角形與該第2六角形可不共有邊。可替代地或另外地，該複數個保留區域包含該複數個結合位置之第一組3個結合位置，該3個結合位置經構形呈第1等邊三角形之3個頂點。該複數個保留區域可包含該複數個結合位置之第二組3個結合位置，該3個結合位置經構形呈第2等邊三角形之3個頂點。該第1等邊三角形與該第2等邊三角形可不共有邊。該第1等邊三角形和該第2等邊三角形可為藉由平移及/或迴轉而相關之全等(例如具有相同大小和形狀)等邊三角形。可替代地或另外地，該複數個保留區域包含該複數個結合位置之結合位置，該等結合位置列於複數個第一列結合位置。於該複數個第一列之每個第一列的結合位置可列於線性構形，使得於該第一列之結合位置與相鄰於該第一列之該結合位置的2個結合位置接觸。該複數個第一列之2個相鄰第一列可藉由第一偏距偏位，該第一偏距於該第一複數個第一列之第一方向可超過該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之粒子的直徑(例如約該粒子的半徑乘以3之平方根)。該2個相鄰第一列可藉由第二偏距偏位，該第二偏距係例如於該第一複數個第一列之第二方向的該複數個粒子之粒子的直徑。該第二方向可與該第一方向垂直。該複數個保留區域可包含列於複數個第二列結合位置之該複數個結合位置的結合位置。於該複數個第二列之每個第二列的該結合位置可列於第二線性構形，使得於該第二列之結合

位置與相鄰於該第二列的該結合位置之2個結合位置接觸。該複數個第二列之2個相鄰第二列可藉由於該複數個第二列之第一方向的超過該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之粒子的直徑(例如約該粒子的半徑乘以3之平方根)偏位。該2個相鄰第二列可藉由於該複數個第二列之第二方向的該複數個粒子之該粒子的直徑偏位，該第二方向係與該第一方向垂直。於某些情況下，無第一列與第二列平行。於某些情況下，第一列與第二列接觸。

【0027】該複數個結合位置可於晶格或不規則陣列包含該複數個結合位置之結合位置的子集。該複數個結合位置可於晶格(例如第一晶格和第二晶格)或不規則陣列(例如第一不規則陣列和第二不規則陣列)包含該複數個結合位置之結合位置的2個子集。該2個晶格(或不規則陣列)可藉由間斷隔開。晶格和不規則陣列可藉由間斷隔開。於某些實施態樣中，晶格係呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合。於某些實施態樣中，不規則陣列不包含於六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合內的結合位置。不規則陣列可不包含於六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合內彼此位於至少閾值距離(例如5 μm)內之粒子。

【0028】該方法可另外地包括遞送複數個核酸至該複數個結合位置。該複數個核酸之每一者可經遞送至該複數個結合位置之不同結合位置。該複數個核酸可包含至少1

個串聯的核酸。該複數個核酸可包含複數個串聯的核酸(諸如DNA瓦(tile))和自滾環擴增(RCA)之擴增產物。

【0029】於某些實施態樣中，該方法可包含於該複數個結合位置實施橋式放大或滾環擴增。被分佈於複數個珠之該複數個核酸於某些實施態樣中係與本文所揭露者一致。該複數個核酸之每一者可被分佈至該複數個珠之不同珠。

【0030】可替代地或另外地，該方法進一步包含實施滾環擴增(RCA)。該方法可包含於溶液或該複數個位置實施滾環擴增。例如，該方法可包含藉由使用擴增引子(或夾引子(splint primer))於該複數個結合位置實施滾環擴增，該擴增引子(或夾引子)連接該複數個結合位置之一者、一或更多者或每一者。該擴增引子(或該夾引子)可連接該結合位置，例如藉由諸如點擊化學反應進行共價連接。該擴增引子(或該夾引子)可包含能參與點擊化學反應之第一官能部分。該第一官能部分可包含例如甲基四嗪(MTz)。該物質層可包含能參與該點擊化學反應之第二官能部分(例如應變促進的點擊化學反應，諸如TCO-四嗪或DBCO-疊氮化物反應)。該第二官能部分可包含反式環辛烯(TCO)。該擴增引子或該夾引子可經由該點擊化學反應連接該結合位置，該點擊化學反應涉及該第一官能部分和該第二官能部分。

【0031】於某些實施態樣中，該方法可包含遞送複數個DNA瓦至該複數個結合位置。該複數個結合位置之每一

者可包含該複數個DNA瓦之至多1個DNA瓦。該複數個結合位置之2個結合位置可包含該複數個DNA瓦之2個不同的DNA瓦。該複數個DNA瓦之2或更多個DNA瓦可各別包含擴增引子(或夾引子)。該方法可進一步包含於該複數個結合位置實施滾環擴增(RCA)，其係藉由使用複數個模板核酸作為模板以延伸與該2或更多個DNA瓦之每一者連接的該擴增引子(或該夾引子)。可替代地或另外地，該方法可包含於溶液中實施滾環擴增(RCA)。於遞送該複數個核酸至該複數個結合位置之前，該滾環擴增可包含使用複數個模板核酸作為模板以延伸擴增引子(或夾引子)以產生該複數個核酸。該擴增引子(或該夾引子)可為DNA瓦之一部分。

【0032】於某些實施態樣中，該方法可包含遞送激發能至至少某些該等結合位置。該方法可包含自至少某些該等結合位置收集發射能。

【0033】本揭露提供於平面結構上特定結合位置之方法。於平面結構上特定結合位置之方法可包括下述之一或更多者：提供平面結構，該平面結構具有沉積於其上之活性位置層(或物質層)和遮罩層。該方法可包括：沉積複數個珠(或粒子)於該平面結構之該遮罩層上。該方法可包括：暴露該平面結構於蝕刻劑，藉以自未被該複數個珠屏蔽之區域差異地除去該遮罩層。該方法可包括：自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層和該活性位置層。該方法可包含：自被該複數個珠屏蔽之區域除去殘

留之遮罩層。該方法因此特定複數個結合位置，其包含殘留之該活性位置層。

【0034】本發明亦揭露於平面結構上特定結合位置之方法。於平面表面上特定結合位置之方法可包含：提供平面結構，該平面結構具有沉積於其上之活性位置層(或物質層)和遮罩層。該方法可包含：沉積複數個珠(或粒子)於該平面結構之該遮罩層上。該方法可包含：暴露該平面結構於蝕刻劑。該暴露因此自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層和該活性位置層。該暴露因此自被該複數個珠屏蔽之區域除去殘留之遮罩層。

【0035】於該方法之任何步驟(諸如沉積該複數個珠)之前，該平面結構、該活性位置層及/或該遮罩層經常係一致的(或實質上一致的)。於該沉積該複數個珠之前，該遮罩層可為一致的。於該沉積該複數個珠之前，該活性位置層可為一致的。於該沉積該複數個珠之前，該平面結構可為一致的。換言之，通過本文所揭露者，珠可沉積於缺少圖案之平面表面上，該圖案係以其他方式指定結合位置之預定陣列。結合位置可經安排呈局部規則之分佈，諸如上述者和其他本文所描述者，但是該局部規則之分佈非起於該表面上之預定圖案。交替地，本文所揭露者可用於具有預定或先前沉積之圖案的表面。

【0036】於被沉積於該平面結構之該遮罩層之前，該複數個珠可於液體中。沉積該複數個珠於該平面結構之該遮罩層上可包含除去介於該複數個珠與該平面結構之該遮

罩層之間的該液體。該液體可包含濃度為諸如1%至約20%之一或更多種成分，諸如擴展劑和污染物。該擴展劑可包含醇。該醇可包含乙醇、異丙醇、異丁醇或彼等之組合。該污染物可包含界面活性劑、擁擠劑、蔗糖、尿素、聚丙烯酸、1-甲基吡啶-2-醛肟氯鹽或彼等之組合。該界面活性劑可包含十二烷基硫酸鈉、Tween或彼等之組合。該擁擠劑可包含聚乙二醇(PEG)，其包括小分子量PEG (諸如PEG 200)和大分子量PEG (諸如PEG 8000)。

【0037】許多蝕刻劑係與本文所揭露者一致。蝕刻劑包含1種氣體或2或更多種氣體，該等氣體係諸如選自O_2、CF_4、C_2F_6、C_4F_8、CHF_3、SF_6、NF_3、NF_5、BCl_3、Cl_2、CCl_2F_2、HBr及Ar之群組的氣體，雖然其他氣體可被考慮且亦可與本文所揭露者一致。該2或更多種氣體之任2者的比例係約1:100至約100:1，雖然可替代者亦與某些蝕刻方法一致。該1種氣體之質量流速、該2或更多種氣體的每一者之質量流速或該2或更多種氣體之整體質量流速可為約1每分鐘的標準立方釐米(sccm)至約100 sccm或高於或低於該範圍。該蝕刻劑可包含氧氣。可替代地或另外地，該蝕刻劑包含四氟化碳氣體。於某些實施態樣中，該蝕刻包含實施2或更多個蝕刻步驟。該暴露可包含於約10瓦(W)至約100 W或低於或高於該範圍之功率下暴露該平面結構於該蝕刻劑。該暴露可包含於約1毫托(mT)至約5000 mT或低於或高於該範圍之壓力下暴露該平面結構於該蝕刻劑。該暴露可包含於約1分鐘(min)至約10分鐘或較短或較長之時間

暴露該平面結構於該蝕刻劑。該暴露可包含於約1℃至約20℃或低於或高於該範圍之溫度下暴露該平面結構於該蝕刻劑。

【0038】該平面結構包含之表面係耐用持久的，其足以經受得住該蝕刻過程。該平面表面之例示性材料包括矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。藉由使用本文所揭露或此技術習知之蝕刻方法和試劑，該遮罩層包含之材料可經蝕刻。該遮罩層之例示性材料包含鋁、氧化鉿錫、鉻、銅、砷化鎵、金、鉬、鉑、矽、二氧化矽、氮化矽、銀、鉭、鈦、氮化鈦、鎢或彼等之組合或與本揭露之該等方法和試劑一致或此技術習知之其他材料。

【0039】該活性位置層包含之材料係充分耐用持久以經受得住該蝕刻過程(當與該複數個粒子接觸或被該複數個粒子屏蔽時)且能提供於該表面上維持隨後之測定反應所必需之結合性。實例包括丙烯酸酯官能性矽烷、醛官能性矽烷、胺基官能性矽烷、酐官能性矽烷、疊氮化物官能性矽烷、羧酸酯官能性矽烷、膦酸酯官能性矽烷、磺酸酯官能性矽烷、環氧基官能性矽烷、硫醇官能性矽烷、酯官能性矽烷、乙烯基官能性矽烷、烯烴官能性矽烷、鹵素官能性矽烷、雙叉鏈矽烷或彼等之組合。於某些實施態樣中，該活性位置層包含胺基矽烷、環氧丙氧基矽烷、巰基矽烷、能參與該點擊化學反應之官能性部分、反式環辛烯(TCO)、甲基四嗪(MTz)或彼等之組合。於某些情況下，

該活性位置層包含胺基矽烷。與本揭露之該等方法和組成物一致的該活性位置層之其他材料亦被考慮。

【0040】沉積複數個珠經常包含堆積該複數個珠之珠呈包含第一局部晶格(或第一不規則陣列)和第二局部晶格(或第二不規則陣列)之構形，該第一局部晶格(或第一不規則陣列)與該第二局部晶格(或第二不規則陣列)係藉由局部間斷隔開。堆積該複數個珠可包含以例如約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之密度陣列該複數個珠。該堆積之珠的密度之實例包括至少600k/mm^2、至少800k/mm^2、至少1,000k/mm^{2}或至少2,000k/mm^2。沉積之珠的多種不同之數量係與本文所揭露者一致。該複數個珠可包含至少100,000珠、至少1,000,000珠、至少10,000,000珠或較少或更多珠。沉積該複數個珠可包含同時及/或依次沉積該複數個珠之珠的複數個子集(例如5個子集)於該平面結構之該遮罩層的不同區位。

【0041】該複數個珠(和該所生成之結合位置)之該第一晶格和該第二晶格可具有(或可被描述為使用或如具有)相同或不同之構形，諸如六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形。例如，該第一局部晶格經常包含呈第1六角構形的該複數個珠之第1珠的子集。呈該第1六角構形之該第1珠的子集之7個第1珠可位於第1六角形之6個頂點和中心。位於該第1六角形之該6個頂點的該6個第1珠之每一者可與位於該第1六角形之該中心的第1珠和位於該第1六角形之該等頂點的2個其他第1珠接觸。該第二局部晶

格可包含呈第2六角構形的該複數個珠之第2珠的第2子集。呈該第2六角構形之該第2珠的子集之7個第2珠可位於第2六角形之6個頂點和中心。位於該第2六角形之該6個頂點的該6個第2珠之每一者可與位於該第2六角形之該中心的第2珠和位於該第2六角形之該等頂點的2個其他第2珠接觸。該第1六角構形與該第2六角構形可具有不同的位向。該第1六角構形與該第2六角構形可具有相同的位向。該第1六角形與該第2六角形可具有不同的位向。該第1六角形與該第2六角形可具有相同的位向。

【0042】作為另一實例，該第一局部晶格包含呈第1等邊三角形構形之該複數個珠之第1珠的子集，使得3個相鄰之非共線第1珠形成第1等邊三角形。該第二晶格可包含呈第2等邊三角形構形之該複數個珠之第2珠的子集，使得3個相鄰之非共線第2珠形成第2等邊三角形。該第1等邊三角形和該第2等邊三角形可不共有邊。

【0043】例如，該第一局部晶格內相鄰珠之間所畫的第一直線與該第二局部晶格內相鄰珠之間所畫的第二直線(或任何第二直線)係不平行。可替代地，該第一局部晶格內相鄰珠之間所畫的第一直線與該第二局部晶格內相鄰珠之間所畫的第二直線(或任何第二直線)係平行。

【0044】作為另一實例，該第一晶格包含列於第1珠之複數個第一列的該複數個珠之第1珠的子集。該複數個第一列之每個第一列的第1珠可列於第一線性構形，使得該第一列之第1珠與相鄰於該第一列之該第1珠的2個第1珠

接觸。2個相鄰第一列可藉由於該第一線性構形之第一方向的第一偏距偏位。該2個相鄰第一列可藉由於該第一線性構形之第二方向的第二偏距偏位。該第一線性構形之該第二方向可與該第一線性構形之該第一方向垂直。該第二晶格可包含列於第2珠之複數個第二列的該複數個珠之第2珠的子集。該複數個第一列之每個第一列的第2珠可列於第二線性構形，使得該第二列之第2珠與相鄰於該第二列之該第2珠的2個第2珠接觸。2個相鄰第二列可藉由於該第二線性構形之第一方向的第一偏距偏位。該2個相鄰第二列可藉由於該第二線性構形之第二方向的第二偏距偏位。該第二線性構形之該第二方向可與該第二線性構形之該第一方向垂直。該第一線性構形之該第一方向與該第二線性構形之該第一方向可為不同(或相同)。該第一線性構形之該第二方向與該第二線性構形之該第二方向可為不同(或相同)。於某些實施態樣中，該第一偏距係超過該複數個珠之珠的半徑且小於該複數個珠之珠的直徑(諸如約該珠的半徑乘以3之平方根)。該第二偏距可為該複數個珠之該珠的直徑。

【0045】不規則陣列(例如該第一不規則陣列和該第二不規則陣列)內之每個珠可以閾值距離或超過閾值距離遠離該不規則陣列之該珠的最近相鄰或鄰近珠。該閾值距離可為該珠之半徑。該不規則陣列可不包含六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形或彼等之組合的珠。該不規則陣列可不包含位於六角構形、等邊三角形構形、

直線構形或線性構形或彼等之組合內彼此位於閾值距離(例如5 μm)內之珠。

【0046】該複數個珠可經隨機沉積，但儘管如此具有設定之最小或最大間距或珠距離，例如經測量之自珠之中心至相鄰或鄰近珠之中心的距離。雖然經隨機沉積或沉積於表面上而無任何預定之圖案，但是該複數個珠經常形成第一區域和第二區域，該第一區域具有規則放置之珠且該第二區域具有隨機(或不規則)放置之珠。

【0047】除去該遮罩層和該活性位置層包含例如除去珠材質和該複數個珠或殘留之每個珠的任何部分。該複數個珠之一者、一或更多者或每一者的半徑(或直徑)可為約10^{-9} m至約10^{-4} m或較短或較長。該複數個珠之一者、一或更多者或每一者的體積可為約10^{-27} m^3至約10^{-12} m^3或較低或較高。由該複數個珠之2個或任2個相鄰珠所產生的結合位置之間的最短距離(例如由最近的邊測量)可為約10^{-9} m至約10^{-4} m或較短或較長。該複數個珠之2個或任2個相鄰珠的中心之間的距離可為約10^{-9} m至約10^{-4} m。該複數個珠之2個或任2個相鄰珠的中心之間的距離可達該2個相鄰珠所產生的結合位置之間的最短距離(例如由最近的邊測量)之至少2倍。

【0048】本揭露包括流通池表面之實施態樣。於某些實施態樣中，該流通池表面包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置。該複數個結合位置之每一者可為環形。該複數個結合位置之每一者可具有中心點和直徑。於某些

情況下，該流通池表面包括至少10,000個有序的結合位置之複數個結合位置，該等結合位置係藉由間斷隔開且該間斷係非預定及/或係經隨機(或不規則)分佈(或排列)。可替代地或另外地，該流通池表面含有至少10,000個有序的結合位置之複數個結合位置，該等結合位置係藉由間斷隔開。該有序的結合位置和該間斷之構形係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。於某些實施態樣中，該流通池表面包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置。該複數個結合位置可包括藉由間斷隔開之第一複數個有序的結合位置和第二複數個有序的結合位置，該間斷係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。該第一複數個有序的結合位置之第一構形與該第二複數個有序的結合位置之第二構形可為不同或相同。

【0049】本揭露提供之流通池表面可包含藉由間斷隔開的至少10,000個結合位置之複數個結合位置。該等結合位置及/或該等間斷可位於非預定之位置。該等結合位置及/或該等間斷可為有序、可為不規則分佈及/或可為隨機分佈。於某些情況下，該等結合位置之構形可非預定。該等間斷可位於非預定之位置。該等間斷(包括任何其中之結合位置)可呈不規則分佈及/或可呈隨機分佈。該複數個結合位置之結合位置可位於非預定之位置。該等結合位置可為有序、不規則分佈(或排列)及/或隨機分佈(或排列)。於某些情況下，該複數個結合位置可包含藉由間斷隔開之第一複數個結合位置和第二複數個結合位置。該間斷之位

置、大小及/或形狀可非預定。該間斷可經隨機分佈。該第一複數個結合位置及/或該第二複數個結合位置之結合位置可位於非預定、可為有序、可為不規則分佈及/或可為隨機分佈之位置。結合位置之子集可具有非預定之構形。構形可包含該結合位置之子集的結合位置之數量及/或該結合位置之子集的結合位置之位置。第一結合位置子集與第二結合位置子集可具有不同(或相同)之構形。

【0050】本揭露之不同實施態樣考量介於任何2個鄰近結合位置之間的不同間隔或間距。由第一結合位置之中心至最近之鄰近結合位置之中心所測量的任何結合位置與任何最近之鄰近結合位置之間的間隔可達該第一結合位置之直徑的至少2倍。可替代地或另外地，由第一結合位置之邊緣至最近之鄰近結合位置之中心所測量的介於任何結合位置與任何最近之鄰近結合位置之間的間隔係達該第一結合位置之直徑的至少2倍。該2個邊緣係比介於第一結合位置之任何其他邊緣與第二結合位置之任何邊緣之間的間隔更為接近(或至少等同接近)。該間隔可達該第一結合位置之直徑的至少2倍、3倍、4倍或更多倍。該間隔可為約10^{-9} m至約10^{-4} m或較短或較長。

【0051】隨機排列於該流通池表面的某些、實質上全部或全部之結合位置係與本揭露一致。例如，該複數個結合位置之至少一部分係隨機排列於該流通池表面。作為另一實例，該複數個結合位置未於預定之區位排列於該流通池表面。例如，該複數個結合位置之至少一部分不共有共

同圖案。作為另一實例，該複數個結合位置包含未圖案化之結合位置。

【0052】該複數個結合位置可包括第一結合位置子集(或複數個)和第二結合位置子集(或複數個)。該第一結合位置子集與該第二結合位置子集可經非預定之間斷隔開。包含該第一複數個結合位置(例如該等結合位置之相對位置)之第一構形與包含該第二複數個有序的結合位置之第二構形可為不同。該第一結合位置子集可於第一晶格或第一不規則陣列。該第二結合位置子集可於第二晶格或第二不規則陣列。該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列可不包含於六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合內的粒子。該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列可不包含於六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合內彼此位於至少閾值距離內的粒子。該閾值距離可為例如5 μm。

【0053】該複數個結合位置(或該等結合位置之子集)之不同的局部密度係與本揭露之方法和流通池表面一致。該複數個結合位置(或該等結合位置之子集)可以約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之局部密度存在。本揭露考量不同數量之結合位置，諸如至少100,000個結合位置、至少1,000,000個結合位置、至少10,000,000個結合位置或更多。

【0054】基於該流通池表面之所欲性質或應用，可選擇該等結合位置之材料。該等結合位置可呈親水性、疏水

性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。基於該流通池表面之所欲性質或應用，可選擇該流通池之材料。該流通池表面之材料包含例如矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。該複數個結合位置可包含複數個核酸。該複數個核酸可包含至少一個串聯的核酸。該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含該複數個核酸之一者或至多一者。該複數個結合位置之至少50%可包含該複數個核酸之至少一核酸及/或該複數個珠之至少一珠。

【0055】複數個核酸可連接複數個珠。該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含該複數個珠之一者或至多一者。可替代地或另外地，該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者包含擴增引子(或夾引子)、自滾環擴增(RCA)之擴增產物、DNA瓦或彼等之組合。該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者可包含能參與點擊化學反應之第一官能部分，諸如甲基四嗪(MTz)。該複數個結合位置之一者、一或更多者或每一者可包含能參與該點擊化學反應之第二官能部分，諸如反式環辛烯(TCO)。該DNA瓦可包含擴增引子(或夾引子)。該擴增引子(或該夾引子)可連接該結合位置。經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應，該擴增引子(或該夾引子)可連接該結合位置。

【0056】本揭露亦包括流通池表面之實施態樣。於某

些實施態樣中，該流通池表面包含第一複數個反應位置(例如結合位置)和相鄰該第一複數個反應位置之第二複數個反應位置。該第一複數個反應位置可包含第一組3個反應位置，每個反應位置係經構形於相同第1等邊三角形之3個頂點。該第二複數個反應位置可包含第二組3個反應位置，每個反應位置係經構形於第2等邊三角形之3個頂點。該第1等邊三角形與該第2等邊三角形不共有平行側。該第1等邊三角形與該第2等邊三角形可為全等(例如具有相同大小和形狀)。

【0057】多種不同之反應位置係與本文所揭露者一致。於某些實施態樣中，該等反應位置包含丙烯酸酯官能性矽烷、醛官能性矽烷、胺基官能性矽烷、酐官能性矽烷、疊氮化物官能性矽烷、羧酸酯官能性矽烷、膦酸酯官能性矽烷、磺酸酯官能性矽烷、環氧基官能性矽烷、硫醇官能性矽烷、酯官能性矽烷、乙烯基官能性矽烷、烯烴官能性矽烷、鹵素官能性矽烷、雙叉鏈矽烷或彼等之組合。例如，該等反應位置包含胺基矽烷、環氧丙氧基矽烷、巰基矽烷或彼等之組合。作為另一實例，該等反應位置包含胺基矽烷。於某些實施態樣中，該等反應位置包含乳糜化聚合酶鏈鎖反應(emPCR)珠。可替代地或另外地，該等反應位置包含核酸多聯體及/或橋式擴增之核酸群落。

【0058】考量反應位置密度之範圍，例如約200k/mm^{2}至約2,000k/mm^{2}之局部密度。反應位置的非限制性之例示性局部密度包括至少600k/mm^2、至少800k/mm^2、至少

1,000k/mm^2、至少2,000k/mm^{2}或更多者。多種不同數量之反應位置係與本文所揭露者一致，諸如至少100,000個反應位置、至少1,000,000個反應位置及至少10,000,000個反應位置。

【0059】該流通池表面之材料可加以變化。該流通池表面之材料可包含矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。該第一組3個反應位置之每個反應位置可藉由10^{-9} m至約10^{-4} m或較短或較長與該第一組3個反應位置之每個其他反應位置隔開。該第二組3個反應位置之每個反應位置可藉由10^{-9} m至約10^{-4} m或較短或較長與該第二組3個反應位置之每個其他反應位置隔開。於某些實施態樣中，該第一複數個反應位置未以預定之構形排列。該第二複數個反應位置未以預定之位置排列。多種不同之反應位置係與本文所揭露者一致。該等反應位置之至少90%可包含僅一個核酸繫繩。該等反應位置之至少90%可每個包含僅一個起始核酸之集落群。該2個反應位置之第一反應位置上的起始核酸與該2個反應位置之第二反應位置上的起始核酸可為不同。

【0060】本揭露包括複數個流通池表面。於某些實施態樣中，複數個流通池表面之每一者包含至少10,000個結合位置。於該複數個流通池表面中，沒有2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含於該複數個流通池表面之每一者上的全部結合位置。可替代

地或另外地，無包含該複數個流通池表面之任何2個流通池表面的該等結合位置之至少5%的對應區域共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含該複數個流通池表面之該等對應區域的每一者上的全部結合位置。可替代地或另外地，該複數個流通池表面之每一者包含一個包含於該流通池表面上之該等結合位置的至少5%之區域，該區域不與該複數個流通池表面之任何其他流通池表面的任何區域共有全等之結合位置構形。該區域之結合位置構形可包含該區域之全部結合位置。

【0061】隨機及/或非預定的多種不同之結合位置構形係與本揭露一致。例如，該複數個流通池表面之2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含比該2個流通池表面之每一者的全部結合位置較少之結合位置。該複數個流通池表面之2個流通池表面可共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含該2個流通池表面之每一者的該等結合位置之至多5%。作為一個實例，流通池表面或每個流通池表面包含複數個至少3個結合位置之至少一者，其不與任何其他流通池表面之複數個至少3個結合位置之任一者全等。作為另一實例，流通池表面或每個流通池表面包含複數個至少10個結合位置之至少一者，其不與任何其他流通池表面之複數個至少10個結合位置之任一者全等。例如，流通池表面或每個流通池表面包含該流通池表面之該複數個結合位置的至少5%，其不與任何其他流通池表面之該複數個結合位置的

任何5%全等。作為一個實例，流通池表面或每個流通池表面包含該流通池表面之該複數個結合位置的至少10%，其不與任何其他流通池表面之該複數個結合位置的任何10%全等。

【0062】隨機及/或非預定的額外之結合位置構形係與本揭露一致。作為一個實例，該複數個流通池表面之第一流通池表面包含第一結合位置陣列，該第一結合位置陣列具有2個第一區域，該2個第一區域各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形且係藉由不規則的或隨機的結合位置陣列構形之第一區域隔開。該複數個流通池表面之第二流通池表面可包含第二結合位置陣列，該第二結合位置陣列具有2個第二區域，該2個第二區域各別具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形且係藉由不規則的或隨機的結合位置陣列構形之第二區域隔開。該第一結合位置陣列與該第二結合位置陣列可為不同。該第一結合位置陣列可包含該第一流通池表面之全部結合位置。該第二結合位置陣列可包含該第二流通池表面之全部結合位置。

【0063】例如，具有第一不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第一區域與具有第二不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第二區域係非全等。具有第一不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第一區域可包含複數個至少3個結合位置之至少一者，其不與具有第二不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第二區域的複數個至少3個

結合位置之任一者全等。具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該2個第一區域的每一者可包含為全等之結合位置。具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該2個第一區域的每一者可包含不為全等之結合位置。該2個第一區域之一者具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形。各別具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該等第二區域之一者可包含為全等之結合位置(例如於相同或實質上相同之相對位置或區位具有結合位置)。各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該2個第一區域之一者與各別具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該等第二區域之一者包含不為全等之結合位置。

【0064】結合位置陣列之區域內的結合位置數量可加以變化。於某些實施態樣中，具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之每個第一區域可包含至少500個結合位置。具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之每個第二區域可包含至少500個結合位置。具有第一不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第一區域可包含至少500個結合位置。具有第二不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第二區域可包含至少500個結合位置。於某些情況下，具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之每個第一區域包含該第一流通池表面之該等結合位置及/或該第一結合陣列的至少5%。

具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之每個第二區域可包含該第一流通池表面之該等結合位置及/或該第一結合陣列的至少5%。具有不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第一區域可包含該第一流通池表面之該等結合位置及/或該第一結合陣列的至少5%。具有不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第二區域可包含該第二流通池表面之該等結合位置及/或該第二結合陣列的至少5%。

【0065】該流通池表面和該等結合位置之不同材料係於本揭露之範圍內。該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者的材料可包含矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。於某些實施態樣中，於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的該複數個結合位置包含複數個核酸。結合位置可呈親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。核酸可為串聯的核酸。該複數個流通池表面之每一者上的該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含該流通池表面上之該複數個結合位置的該複數個核酸之一者或至多一者。該複數個流通池表面之每一者上的該複數個結合位置之該複數個核酸可連接複數個珠。該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含該複數個珠之一者或至多一者。對於流通池表面，該流通池表面上之該複數個結合位置的該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者包含擴增引子(或

夾引子)、自滾環擴增(RCA)之擴增產物、DNA瓦或彼等之組合。該流通池表面上之該複數個結合位置的該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者可包含能參與點擊化學反應之第一官能部分，諸如甲基四嗪(MTz)。該流通池表面上之該複數個結合位置之一者、一或更多者或每一者包含能參與該點擊化學反應之第二官能部分，諸如反式環辛烯(TCO)。該DNA瓦可包含擴增引子或夾引子，可選擇性地該擴增引子或該夾引子連接該結合位置，且可選擇性地該擴增引子或該夾引子經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應連接該結合位置。

【0066】該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的該複數個結合位置之至少50%可包含該複數個核酸之至少一核酸及/或該複數個珠之至少一珠。

【0067】本揭露亦提供具有複數個結合位置之複數個流通池表面(或複數個流通池)的實施態樣，該複數個結合位置具有不同之構形。於某些實施態樣中，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的、不規則的或隨機的結合位置，該等間斷係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面於該流通池表面上包含該等間斷之相同構形。於某些情況下，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的、不規則的或隨機的結合位置。該等有序的、不規則的或隨機的結合位置和該等間斷之構形(例如相對位置或區位)係非預定及/或係經隨機分佈(或排

列)。沒有2個流通池表面包含該等有序的、不規則的或隨機的結合位置和該等間斷之相同構形。其他實施態樣提供每個流通池表面(或流通池表面),其包含至少10,000個有序的、不規則的或隨機的結合位置,該等結合位置係藉由位於非預定之區位及/或經隨機分佈(或排列)之不規則的或隨機的結合位置區域隔開。沒有2個流通池表面於該流通池表面上包含該等不規則的或隨機的區域之相同構形。可替代地或另外地,每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個有序的、不規則的或隨機的結合位置,該等結合位置係藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開。該等有序的、不規則的或隨機的結合位置和該等不規則的或隨機的結合位置區域之構形包含為非預定及/或係有序的、不規則分佈的或隨機分佈(或排列)的結合位置。沒有2個流通池表面包含該等有序的、不規則的或隨機的結合位置和該等不規則的或隨機的結合位置區域之相同構形。於某些情況下,每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個於規則之結合位置區域和與該規則之結合位置區域隔開的不規則或隨機之結合位置區域的結合位置。該等規則之區域和該等不規則或隨機之區域係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面包含該等規則的、不規則的或隨機的區域及/或該等不規則的或隨機的區域之相同構形。

【0068】本揭露包括比對複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中,比對複數個流通池影像之方法係於處

理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域和第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該不規則的或隨機的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。於某些實施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開之規則的、不規則的或隨機的結合位置區域。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該不規則的或隨機的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。於某些實施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面包含藉由間斷隔開之有序的結合位置。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該間斷以比對該複數個流通池影像。該比對可包含相對於第二流通池影像位移一個流通池影像。該比對可包含相對於第二影像旋轉一個影像。

【0069】不同類型之流通池影像和不同數量之流通池影像係與本文所揭露者一致。該複數個流通池影像可包含自第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域、第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域及該不規則的或隨機的結合位置區域之結合位置發出的螢光發射訊號。該複數個流通池影像包含至少20個流通池影像、至少200個流

通池影像或更多。

【0070】本揭露亦提供揀選複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，揀選複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：得到複數個流通池影像。該方法可包含：於該複數個池影像之每一者鑑別藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域和第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域。該方法可包含：揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則的或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。

【0071】於某些實施態樣中，揀選複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：得到複數個流通池影像。該方法可包含：於該複數個流通池影像之每一者鑑別不規則的或隨機的結合位置區域，該不規則的或隨機的結合位置區域隔開於該流通池影像之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域與第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域。該方法可包含：揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則的或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。該方法可包含本揭露之一或更多個額外步驟。例如，該方法可進一步包含定向每個共同組之該複數個流通池影像的流通池影像，使得該每個共同組之該等流通池影像的

第一結合位置經比對，且該每個共同組之該等流通池影像的第二結合位置經比對。具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之流通池影像可被分配至不同組。

【0072】本揭露提供於影像上實施品質評估之方法。於某些實施態樣中，實施品質評估之方法係於處理器之控制下且包含：接收自包含複數個結合位置之表面所收集的影像。該方法可包含：鑑別源自第一結合位置之第一訊號。該方法可包含：鑑別源自第二結合位置之第二訊號。該方法可包含：測定該第一結合位置與該第二結合位置分隔之距離。該方法可包含：若該距離低於閾值，負面評估該影像。

【0073】透過多種不同之方法可達成負面評估該影像。負面評估該影像之非限制性實例包括廢棄該影像；廢棄源自該影像之該第一訊號和該第二訊號；廢棄源自該第一結合位置之任何訊號和源自該第二結合位置之任何訊號；標記該第一結合位置和該第二結合位置中至少一者為失焦者；及，再聚焦該第一結合位置和該第二結合位置中至少一者。該再聚焦可加以變化。再聚焦之非限制性實例包括降低該第一訊號之大小；降低該第一訊號之大小和該第二訊號之大小；增加該第一訊號之強度；增加該第一訊號之強度和該第二訊號之強度；及，降低該第一訊號之大小和該第二訊號之大小且增加該第一訊號之強度和該第二訊號之強度。

【0074】負面評估該影像之另一實例包括測定基於該

距離和該閾值之失焦值。負面評估該影像之其他實例包括測定基於該距離和理想距離之失焦值。該失焦值可為該距離與該閾值之比、該距離與該理想距離閾值之比或彼等之組合。該失焦值可為該距離與該閾值之差、該距離與該理想距離閾值之差或彼等之組合。負面評估該影像可包括：導致基於該失焦值將由該表面收集的再聚焦之影像；及/或，接收基於該失焦值將由該表面收集的再聚焦之影像。負面評估該影像可包括：調整收集基於該失焦值之影像的顯像系統之焦距；及/或，導致該顯像系統基於該失焦值調整該顯像系統之焦距。負面評估該影像可包括：導致將由該表面收集的再聚焦之影像。負面評估該影像可包含：接收將由該表面收集的再聚焦之影像。

【0075】透過多種不同之方法可達成測定該距離。例如，測定該距離包含使用第一結合位置之中心點和第二結合位置之中心點以測量該第一結合位置至該第二結合位置之距離。作為另一實例，測定該距離包含使用第一結合位置之邊緣和第二結合位置之邊緣以測量該第一結合位置至該第二結合位置之距離。

【0076】多種不同之隨機的及/或非預定的結合位置構形係與本揭露一致。例如，至少該複數個結合位置之第一部分係規則地、不規則地或隨機地排列於該流通池表面。至少該複數個結合位置之第二部分可不規則地或隨機地排列於該流通池表面。作為一個實例，該複數個結合位置之至少一部分未排列於該流通池表面之預定區位。作為

另一實例，該複數個結合位置之至少一部分不共有共同圖案。作為進一步之實例，至少該複數個結合位置包含未圖案化之結合位置。例如，該複數個結合位置係經隨機排列。作為一實例，該複數個結合位置係經排列以形成具有規則放置的(或有序的)結合位置之第一區域和具有隨機地(或不規則地)放置的結合位置之第二區域。

【0077】本揭露包括定向複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，定向複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：鑑別該複數個流通池影像共有之複數個群落的不規則或隨機之群落區域。該方法可包含：定向一或更多個該複數個流通池影像，使得於該複數個流通池影像的該不規則或隨機之群落區域經比對。

【0078】該等群落之多種不同的分佈係與本文所揭露者一致。例如，該流通池上之該複數個群落係經分佈，使得沒有2個群落比彼此之最小距離更為接近。例如，該流通池上之該複數個群落係經分佈，使得沒有2個群落自該2個群落各別之中心比彼此之最小距離更為接近。例如，該流通池上之該複數個群落係經分佈，使得沒有2個群落自該2個群落各別之邊緣比彼此之最小距離更為接近。該最小距離可為約10^{-9} m至約10^{-4} m或較短或較長。該複數個群落之一者、一或更多者或每一者的大小可為約10^{-9} m至約10^{-4} m或較短或較長。該大小可為半徑或直徑。該複數個群落之一者與該複數個群落之最近相鄰群落的距離可為約10^{-9} m至約10^{-4} m或較長或較短。該複數個群落之一者與該

複數個群落之最近相鄰群落的距離係達該群落之大小的至少2倍(或更多)。

【0079】本揭露考量多種群落密度和群落數量。例如，該複數個群落係以約200k/mm^{2}至約2,000k/mm^{2}之密度存在。例如，該複數個群落係以至少600k/mm^2、至少800k/mm^2、至少1,000k/mm^{2}或更高之密度存在。例如，該複數個群落包含至少100,000個群落、至少1,000,000個群落、至少10,000,000個群落或更多。

【0080】該複數個流通池影像可自一或更多個流通池收集。例如，該複數個流通池影像係自單一流通池收集。該單一流通池可包含規則地、不規則地或隨機地排列之群落的至少一區域和不規則地或隨機地排列之群落的至少一區域。該複數個流通池影像之缺少該不規則的群落區域之流通池影像可自該複數個流通池影像廢棄。作為另一實例，自複數個流通池收集該複數個流通池影像。該複數個流通池可包含多個流通池，每個流通池具有規則地、不規則地或隨機地排列之群落的至少一區域和不規則地或隨機地排列之群落的至少一區域，且沒有2個流通池共有不規則地或隨機地排列之群落的相同陣列。該方法可包含揀選該複數個影像，使得具有不規則地或隨機地排列之群落的共同區域之影像經組合在一起。該方法可包含：揀選影像，使得缺少不規則地或隨機地排列之群落的共同區域之影像經差異地組合。

【0081】本揭露包括流通池顯像系統。於某些實施態

樣中，流通池顯像系統包含：具有複數個結合位置分佈於其上之流通池，至少某些該等結合位置係經隨機分佈。該流通池顯像系統可包含：於該等結合位置激發螢光團之激發源。該流通池顯像系統可包含：包含複數個像素之影像數位化界面。該複數個結合位置可經分佈，使得沒有2個結合位置產生歸屬於共同像素之發射訊號。可替代地或另外地，至少某些該等結合位置係經規則地、不規則地或隨機地分佈。該複數個結合位置可以多種不同之密度(諸如約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之密度、約200k/mm^{2}至約2,000k/mm^{2}之密度、至少600k/mm^2、至少800k/mm^2、至少1,000k/mm^{2}或更高之密度)存在。結合位置之數量可加以變化，諸如至少100,000個結合位置、至少1,000,000個結合位置、至少10,000,000個結合位置或更多。

【0082】本揭露亦包括核酸瓦，該核酸瓦包含支架核酸和複數個主要的寡核苷酸。該複數個主要的寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者可包含與該支架核酸之不同區域雜交的至少2個結合結構域，因而形成包含該支架核酸和該主要的寡核苷酸之雙交叉模體。該複數個主要的寡核苷酸可包含自該核酸瓦之第一面突出的第一錨寡核苷酸。該核酸瓦可包含去氧核糖核酸(DNA)。該支架核酸可包含DNA。該複數個主要的寡核苷酸可包含多個DNA。

【0083】於某些實施態樣中，該支架核酸藉由該複數個主要的寡核苷酸之雜交以形成偽環。該核酸瓦可呈偽環形之形狀。該支架核酸之長度可為約5千鹼基(kb)至約50

kb。該支架核酸可包含基因體DNA，例如M13mp18噬菌體之基因體DNA。該複數個主要的寡核苷酸可包含自該核酸瓦之第二面突出的第二錨寡核苷酸。該第一錨寡核苷酸和該第二錨寡核苷酸可自該核酸瓦之相反面突出。

【0084】一個錨寡核苷酸可包含夾序列。該夾序列可位於該錨寡核苷酸之3’端。該錨寡核苷酸可包含間隔子序列。該間隔子序列對該夾序列可為5’。該間隔子序列可包含多T序列。該間隔子序列之長度可為約3至約10個核苷酸。該夾序列可包含第一夾序列和第二夾序列。該第一夾序列之解構溫度(Tm)可高於該第二夾序列之Tm。該複數個主要的寡核苷酸可包含複數個捕獲寡核苷酸，每個捕獲寡核苷酸包含第一捕獲序列。該第一捕獲序列可包含該第二夾序列。該捕獲寡核苷酸可不包含該第一夾序列。該複數個捕獲寡核苷酸之捕獲寡核苷酸可為相同。該複數個捕獲寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者可包含可切割位點，諸如可切割之核苷酸。該複數個捕獲寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者可包含第二捕獲序列。

【0085】本揭露包括生成核酸瓦之方法。於某些實施態樣中，生成核酸瓦之方法包含提供主要溶液，該主要溶液包含該複數個主要的寡核苷酸。該方法可包含提供支架溶液，該支架溶液包含支架核酸。該方法可包含結合該主要溶液與該支架溶液以形成反應溶液。該方法可包含令該反應溶液經熱退火，藉以生成該核酸瓦。該反應溶液可為不同。例如，該反應溶液包含約100奈米莫耳(nM)之該複

數個主要的寡核苷酸的每一者、約10毫莫耳(mM)之該支架核酸、約40 mM三羥甲基胺基甲烷(Tris)乙酸鹽、約12.5 mM氯化鎂及/或約0.1 mM EDTA。該反應溶液可具有約50微升(uL)之體積。該方法可包含自不為該核酸瓦之分子的一部分之該支架核酸之分子和該複數個主要的寡核苷酸之分子純化該核酸瓦。該方法可包含純化該核酸瓦，該純化包含基於大小之純化。

【0086】本揭露考量滾環擴增(RCA)之方法。RCA方法可包含提供核酸瓦。該核酸瓦可與如本文描述之結構化表面的結合位置結合。該方法可包含提供標的核酸。該方法可包含使用該核酸瓦之該夾序列使該標的核酸環形化。該方法可包含藉由使用該標的核酸作為模板延伸該夾序列以實施滾環擴增，藉以產生該核酸瓦，每個該核酸瓦包含該標的核酸之串聯的複製。

【0087】RCA方法可包含提供複數個核酸瓦。該方法可包含提供複數個標的核酸。該方法可包含使該複數個標的核酸之每一者與該複數個核酸瓦之核酸瓦的該夾序列雜交。該方法可包含使與該核酸瓦之該夾序列雜交的該標的核酸環形化。該方法可包含藉由使用與該核酸瓦之該夾序列雜交的該標的核酸作為模板以延伸該核酸瓦之該夾序列以實施滾環擴增，藉以產生核酸叢聚，該核酸叢聚包含具有該夾序列之該核酸瓦，該夾序列經延伸以包括該標的核酸之串聯的複製。

【0088】該方法可進一步包含於實施RCA之前沉積該

核酸瓦於流通池表面之結合位置上。該方法可進一步包含於實施RCA之後沉積該核酸叢聚於流通池表面之結合位置上。該複數個結合位置之至少50%可各別包含至多1個核酸瓦(或至多1個核酸叢聚)。

【0089】於某些情況下，該方法進一步包含藉由切割該可切割位點以除去該複數個捕獲寡核苷酸。於某些情況下，該複數個標的核酸之標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該複數個捕獲寡核苷酸之捕獲寡核苷酸的該第一捕獲序列(或該第二夾序列)雜交。該方法可包含使釋出寡核苷酸與該捕獲寡核苷酸雜交。因此，該標的核酸可與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。於某些實施態樣中，該複數個標的核酸之第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該複數個捕獲寡核苷酸之第一捕獲寡核苷酸的該第一捕獲序列(或該第二夾序列)雜交。該複數個標的核酸之第二標的核酸可與該複數個捕獲寡核苷酸之第二捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交。該方法可包含令該核酸瓦經熱循環處理。因此，自該第二捕獲寡核苷酸釋出該第二標的核酸。且，該第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。於某些實施態樣中，第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。該複數個標的核酸之第二標的核酸可與該複數個捕獲寡核苷酸之第二捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交。該方法可進一步包含令該核酸瓦經熱循環處理。因此，自該第二捕獲寡核苷酸釋出該第二標的

核酸。

【0090】於某些情況下，結合多聯體於結構化表面之方法可包括：提供複數個非對稱性DNA瓦；提供複數個多聯體；於溶液中令個別多聯體結合於個別DNA瓦之第一側；及，沉積該DNA瓦於表面上，使得該個別DNA瓦之第二側結合於該表面，同時該個別DNA瓦之該第一側維持與多聯體結合。該DNA瓦可沉積於本揭露之流通池表面的結合位置上。

【0091】本說明書描述之主題的一或更多個實施之細節係示於附隨之圖式和下述之說明。其他特徵、面向及優點由該說明、圖式及申請專利範圍將變得明顯。本發明內容和下述之實施方式皆非意欲界定或限制本發明之主題的範圍。

【圖式簡單說明】

【0092】[圖1A至1B]顯示說明位點(或位置)密度與位點之間的平均距離之反向關係的非限制性之例示性圖。對於任何給定之位點密度，與隨機的位點相比較，有序的位點具有位點之間較短的平均距離。

【0093】[圖2A1]顯示一種對以非預定之方式排列的高密度位點(或位置)之表面結構化的非限制性之例示性方法。[圖2A2]顯示另一種對以非預定之方式排列的高密度位點(或位置)之表面結構化的非限制性之例示性方法。[圖2B和2C]顯示具有高密度之有序的位點(或位置)之結構化

表面(例如流通池表面)的非限制性之例示性掃描電子顯微鏡(SEM)影像，其中使用膠態自行組裝以非預定之方式產生該等有序的位點。

【0094】[圖3A至3D]係粒子與平面結構接觸後顯示藉由間斷隔開之粒子構形的晶格之該平面結構的非限制性之例示性俯視示意圖。

【0095】[圖4A至4D]顯示於例如分別具有如圖3A至3D所示之粒子的平面結構上實施蝕刻程序後，包含結合位置之該平面結構的非限制性之例示性俯視示意圖。

【0096】[圖5A至5D]說明膠態自行組裝。

【0097】[圖6A1至6A2、6B1至6B3、6C1至6C2及6D]說明經膠態珠組裝和該珠、遮罩層及物質/活性位置層之蝕刻後所產生的結構化表面。

【0098】[圖7A至7C和7D1至7D2]說明emPCR珠沉積和定序。

【0099】[圖8]顯示使用(珠數量)比例為2:5之分別為直徑0.8 μm之珠和直徑1.0 μm之珠所產生的結合位置。該等結合位置係不規則地排列，使得典型的六角形格柵(圖8；最左格)不與該等結合位置(圖8；最右格)對準。

【0100】[圖9A]顯示位點密度對無序非顯著敏感。無序的表面顯示自完整有序的陣列至多10至15%減少。[圖9B]顯示由直徑1.0 μm之珠的單分散性、呈1:10比例的直徑0.8 μm之珠和直徑1.0 μm之珠的多分散性及呈2:5比例的直徑0.8 μm之珠和直徑1.0 μm之珠的多分散性所產生之陣列

不規則性。

【0101】[圖10A至10B]顯示多種不同之添加劑可用於改善RCA產物於結構化(規則的或不規則的)表面之沉積。圖10B顯示沉積之叢聚的位點計數和位點強度。位點計數和強度之較高且緊密分佈係較佳的。

【0102】[圖11]顯示用於叢聚產生和沉積之滾環擴增(RCA)的示意圖。

【0103】[圖12]比較於具有活性化學(例如具有連接結合位置之擴增引子)的結合位置與隨機地於具有活性化學的流通池表面之滾環擴增(RCA)產物。DNA叢聚可為多聯體(諸如RCA產物)且可具有介於RCA產物與該表面之間的DNA瓦。

【0104】[圖13]顯示DNA瓦設計(左邊)和環形(或偽環形)DNA瓦之原子力顯微鏡(AFM)影像和高度輪廓(右邊)的示意圖。

【0105】[圖14]顯示表面上結構化叢聚之DNA瓦的概觀。

【0106】[圖15A至15B]比較於非結構化DNA瓦表面(圖15A)和於結構化DNA瓦表面(圖15B)之叢聚。

【0107】[圖16]顯示使用額外之捕獲寡核苷酸改善庫捕獲動力學。

【0108】[圖17]顯示立足點介導之股替代以驅動庫移動至夾。

【0109】[圖18]顯示熱循環以改善捕獲產率。

【0110】[圖19]係說明性計算系統之方塊圖，該說明性計算系統係經構形以實施處理一或更多個流通池影像之任何方法，該方法包括：比對流通池影像、定向流通池影像、揀選流通池影像及於流通池影像上實施品質評估。

【0111】透過該圖式，可再使用參考編號以表示對應之參考元件。提供該圖式以說明本文描述之實例實施態樣且該圖式不欲於限制本揭露之範圍。

【實施方式】

【0112】於下述之詳細說明中，參照附隨之圖式，該圖式係該詳細說明之一部分。於該圖式中，除非內容另有指明，相似符號典型上表示相似組分。該詳細說明、圖式及申請專利範圍所描述之說明性實施態樣非表示限制。於未偏離本文描述之主題的精神或範圍之情況下，可使用其他實施態樣且可作其他變化。當能瞭解的是，如本文所一般描述和如圖式所說明的本揭露之各方面可以廣泛變化之不同構形經排列、取代、組合、分開及設計，所有彼等於本文中經明確考量且為本揭露之一部分。

【0113】對於相關技術，本文所提及之所有專利、公開之專利申請案、其他文獻和GenBank序列及其他資料庫係全部併入本文作為參考。

【0114】本揭露包括於平面結構上特定結合位置之方法。於平面結構上特定結合位置之方法可包含：提供納入液體中之平面結構。該方法可包含：投遞複數個粒子至該

液體之表面。該方法可包含：除去介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該平面結構接觸。於該表面上之該複數個粒子可特定於該平面結構上之複數個結合位置。與該平面結構接觸之該複數個粒子可特定於該平面結構上之複數個結合位置。

【0115】亦提供於平面結構上特定結合位置之方法。於平面結構上特定結合位置之方法可包括：提供納入液體中之複數個平面結構。該方法可包括：投遞複數個粒子至該液體之表面。該方法可包括：除去介於該等粒子與該複數個平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該複數個平面結構接觸。於該表面上及/或與該複數個平面結構接觸之該複數個粒子可特定於該複數個平面結構之每一者上的複數個結合位置。於該複數個平面結構之任2個平面結構上的該複數個結合位置可為不同。

【0116】本揭露提供於平面結構上特定結合位置之方法。於平面結構上特定結合位置之方法可包括下述之一或更多者：提供具有沉積於其上之活性位置層(或物質層)和遮罩層的平面結構。該方法可包括：沉積複數個粒子於該平面結構之該遮罩層上。該方法可包括：暴露該平面結構於蝕刻劑，藉以自未被該複數個珠屏蔽之區域差異地除去該遮罩層。該方法可包括：自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層和該活性位置層。該方法可包含：自被該複數個珠屏蔽之區域除去殘留之遮罩層。該方法因此特定複數個結合位置，其包含殘留之該活性位置

層。

【0117】本文亦揭露於平面結構上特定結合位置之方法。於平面結構上特定結合位置之方法可包含：提供具有沉積於其上之活性位置層(或物質層)和遮罩層的平面結構。該方法可包含：沉積複數個粒子於該平面結構之該遮罩層上。該方法可包含：暴露該平面結構於蝕刻劑。該暴露因此自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層和該活性位置層。該暴露因此自被該複數個珠屏蔽之區域除去殘留之遮罩層。

【0118】本揭露包括流通池表面之實施態樣。於某些實施態樣中，該流通池表面包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置。該複數個結合位置之每一者可為環形。該複數個結合位置之每一者可具有中心點和直徑。於某些情況下，該流通池表面包括至少10,000個有序的結合位置之複數個結合位置，該等結合位置係藉由間斷隔開且該間斷係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。可替代地或另外地，該流通池表面含有至少10,000個有序的結合位置之複數個結合位置，該等結合位置係藉由間斷隔開。該有序的結合位置和該間斷之構形係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。於某些實施態樣中，該流通池表面包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置。該複數個結合位置可包括藉由間斷隔開之第一複數個有序的結合位置和第二複數個有序的結合位置，該間斷係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。該第一複數個有序的結合位置之第一構形與該第

二複數個有序的結合位置之第二構形可為不同或相同。

【0119】本揭露亦包括流通池表面之實施態樣。於某些實施態樣中，該流通池表面包含第一複數個反應位置和相鄰該第一複數個反應位置之第二複數個反應位置。該第一複數個反應位置可包含第一組3個反應位置，每個反應位置係經構形於相同第1等邊三角形之3個頂點。該第二複數個反應位置可包含第二組3個反應位置，每個反應位置係經構形於第2等邊三角形之3個頂點。該第1等邊三角形與該第2等邊三角形不共有平行側。該第1等邊三角形與該第2等邊三角形係全等(例如具有相同大小和形狀)。

【0120】本揭露包括複數個流通池表面。於某些實施態樣中，複數個流通池表面之每一者包含至少10,000個結合位置。於該複數個流通池表面中，沒有2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含於該複數個流通池表面之每一者上的全部結合位置。可替代地或另外地，無包含該複數個流通池表面之任何2個流通池表面的該等結合位置之至少5%的對應區域共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含該複數個流通池表面之該等對應區域的每一者上的全部結合位置。可替代地或另外地，該複數個流通池表面之每一者包含一個包含於該流通池表面上之該等結合位置的至少5%之區域，該區域不與該複數個流通池表面之任何其他流通池表面的任何區域共有全等之結合位置構形。該區域之結合位置構形可包含該區域之全部結合位置。

【0121】亦提供具有複數個結合位置之複數個流通池表面(或複數個流通池)的實施態樣，該複數個結合位置具有不同之構形。於某些實施態樣中，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的結合位置，該等間斷係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面於該流通池表面上包含該等間斷之相同構形。於某些情況下，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的結合位置。該等有序的結合位置和該等間斷之構形(例如相對位置或區位)係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面包含該等有序的結合位置和該等間斷之相同構形。其他實施態樣提供每個流通池表面(或流通池表面)，其包含至少10,000個有序的結合位置，該等結合位置係藉由位於非預定之區位及/或經隨機分佈(或排列)之不規則的結合位置區域隔開。沒有2個流通池表面於該流通池表面上包含該等不規則的區域之相同構形。可替代地或另外地，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個有序的結合位置，該等結合位置係藉由不規則的結合位置區域隔開。該等有序的結合位置和該等不規則的結合位置區域之構形係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面包含該等有序的結合位置和該等不規則的結合位置區域之相同構形。於某些情況下，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個於規則之結合位置區域和與該規則之結合位置區域隔開的不規則之結合位置區域

的結合位置。該等規則之區域和該等不規則之區域係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面包含該等規則之區域及/或該等不規則之區域的相同構形。

【0122】本揭露提供之流通池表面可包含藉由間斷隔開的至少10,000個結合位置之複數個結合位置。該等結合位置及/或該等間斷可位於非預定之位置。該等結合位置及/或該等間斷可為有序、可為不規則分佈及/或可為隨機分佈。於某些情況下，該等結合位置之構形可非預定。該等間斷可位於非預定之位置。該等間斷(包括任何其中之結合位置)可呈不規則分佈及/或可呈隨機分佈。該複數個結合位置之結合位置可位於非預定之位置。該等結合位置可為有序、不規則分佈(或排列)及/或隨機分佈(或排列)。於某些情況下，該複數個結合位置可包含藉由間斷隔開之第一複數個結合位置和第二複數個結合位置。該間斷之位置、大小及/或形狀可非預定。該間斷可經隨機分佈。該第一複數個結合位置及/或該第二複數個結合位置之結合位置可位於非預定、可為有序、可為不規則分佈及/或可為隨機分佈之位置。結合位置之子集可具有非預定之構形。構形可包含該結合位置之子集的結合位置之數量及/或該結合位置之子集的結合位置之位置。第一結合位置子集與第二結合位置子集可具有不同(或相同)之構形。

【0123】本揭露亦包括核酸瓦，該核酸瓦包含支架核酸和複數個主要的寡核苷酸。該複數個主要的寡核苷酸之

一者、一或更多者或每一者可包含與該支架核酸之不同區域雜交的2個結合結構域，因而形成包含該支架核酸和該主要的寡核苷酸之雙交叉模體。該複數個主要的寡核苷酸可包含自該核酸瓦之第一面突出的第一錨寡核苷酸。該核酸瓦可包含去氧核糖核酸(DNA)。該支架核酸可包含DNA。該複數個主要的寡核苷酸可包含DNA。

【0124】本揭露包括生成核酸瓦之方法。於某些實施態樣中，生成核酸瓦之方法包含提供主要溶液，該主要溶液包含該複數個主要的寡核苷酸。該方法可包含提供支架溶液，該支架溶液包含支架核酸。主要的寡核苷酸可包含與該支架之不同區域雜交的複數個結合結構域，諸如至少2個、至少3個或至少5個結合結構域。該主要的寡核苷酸的介於結合結構域之間的部分可呈單股或雙股及/或可包含非核酸聚合間隔子，諸如直鏈或支鏈聚合物。於某些方面，介於結合結構域之間的聚合物間隔子，諸如PEG連接子，可於定序期間改善安定性及/或保護該核酸瓦。該方法可包含結合該主要溶液與該支架溶液以形成反應溶液。該方法可包含令該反應溶液經熱退火，藉以生成該核酸瓦。該反應溶液可為不同。該方法可包含自不為該核酸瓦之分子的一部分之該支架核酸之分子和該複數個主要的寡核苷酸之分子純化該核酸瓦。該方法可包含純化該核酸瓦，該純化包含基於大小之純化。

【0125】本揭露考量滾環擴增(RCA)之方法。RCA方法可包含提供核酸瓦。該方法可包含提供標的核酸。該方

法可包含使用該核酸瓦之該夾序列使該標的核酸環形化。該方法可包含藉由使用該標的核酸作為模板延伸該夾序列以實施滾環擴增，藉以產生該核酸瓦，每個該核酸瓦包含該標的核酸之串聯的複製。RCA方法可包含提供複數個核酸瓦。該方法可包含提供複數個標的核酸。該方法可包含使該複數個標的核酸之每一者與該複數個核酸瓦之核酸瓦的該夾序列雜交。該方法可包含使與該核酸瓦之該夾序列雜交的該標的核酸環形化。該方法可包含藉由使用與該核酸瓦之該夾序列雜交的該標的核酸作為模板以延伸該核酸瓦之該夾序列以實施滾環擴增，藉以產生核酸叢聚，該核酸叢聚包含具有該夾序列之該核酸瓦，該夾序列經延伸以包括該標的核酸之串聯的複製。

【0126】本揭露包括比對複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則的結合位置區域隔開之第一規則的結合位置區域和第二規則的結合位置區域。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該不規則的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。於某些實施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則的結合位置區域隔開之規則的結合位置區域。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該不規則的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。於某些實

施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面包含藉由間斷隔開之有序的結合位置。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該間斷以比對該複數個流通池影像。該比對可包含相對於第二流通池影像位移一個流通池影像。該比對可包含相對於第二影像旋轉一個影像。

【0127】本揭露亦提供揀選複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，揀選複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：得到複數個流通池影像。該方法可包含：於該複數個池影像之每一者鑑別藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域和第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域。該方法可包含：揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則的或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。於某些實施態樣中，揀選複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：得到複數個流通池影像。該方法可包含：於該複數個流通池影像之每一者鑑別不規則的結合位置區域，該不規則的結合位置區域隔開於該流通池影像之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域與第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域。該方法可包含：揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則的或隨機

的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。

【0128】本揭露提供於影像上實施品質評估之方法。於某些實施態樣中，實施品質評估之方法係於處理器之控制下且包含：接收自包含複數個結合位置之表面所收集的影像。該方法可包含：鑑別源自第一結合位置之第一訊號。該方法可包含：鑑別源自第二結合位置之第二訊號。該方法可包含：測定該第一結合位置與該第二結合位置分隔之距離。該方法可包含：若該距離低於閾值，負面評估該影像。

【0129】本揭露包括定向複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，定向複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：鑑別該複數個流通池影像共有之複數個群落的不規則或隨機之群落區域。該方法可包含：定向一或更多個該複數個流通池影像，使得於該複數個流通池影像的該不規則或隨機之群落區域經比對。

【0130】本揭露包括流通池顯像系統。於某些實施態樣中，流通池顯像系統包含：具有複數個結合位置分佈於其上之流通池，至少某些該等結合位置係經隨機分佈。該流通池顯像系統可包含：於該等結合位置激發螢光團之激發源。該流通池顯像系統可包含：包含複數個像素之影像數位化界面。

於平面結構上特定結合位置

【0131】使用表面具有用於聚落形成之分散位點(或位置或墊)的流通池以進行次世代定序。位點密度與位點之間的平均距離存有反向關係(圖1A至1B)。對於任何給予之位點密度，與隨機的位點相比較，有序的位點(諸如規則的六角形陣列之位點)具有位點之間較短的平均距離。對於任何給予之位點密度，不規則的位點(於本文亦稱為多結晶位點)與隨機的位點相比較具有位點之間較短的平均距離且與有序的位點相比較具有位點之間較長的平均距離。製作該表面具有預定且有序的位點之流通池或由上而下微影蝕刻可能是昂貴且耗時的，雖然所產製之流通池的表面具有較高之位點密度(圖1A至1B；上方曲線)。相對地，表面具有非預定且隨機的位點之流通池於製作上可能較為便宜，雖然所產製之流通池的表面具有較低之位點密度。於圖1A至1B，於該等位點(或該等位點之特徵)互相排斥之假設下，產生顯示該隨機的密度之曲線。

【0132】本揭露之某些實施態樣提供使用膠態自行組裝(自下而上)以產生流通池之方法。該流通池之表面可具有以非預定之方式(其可使該流通池以較低之成本製造)產生之有序的位點(其可使具有較高之位點密度且同時維持良好之定序數據品質)。可替代地或另外地，該流通池之表面可具有以非預定之方式(其可使該流通池以較低之成本製造)產生之不規則的位點(其可使具有較高之位點密度且同時維持良好之定序數據品質)。自行組裝之珠層可用

於作為蝕刻遮罩以產生具有高密度的緊密堆積之位點(或位置或墊)。例如，該緊密堆積之位點可具有(或可被描述為使用或具有)六角構形。該等位點可為用於捕獲emPCR珠之胺基矽烷墊。該方法可產生具有位點之有序或不規則分佈(或非規則間距之分佈)之叢聚的結構化流通池表面(或平面結構表面)。使用所產生之該流通池表面以進行次世代定序可導致產生增加之良好位點的表面密度和於超高密度下改善之位點鑑別。該等位點之大小、相鄰位點之間的間距及該等位點之間的最小距離可受該蝕刻程序和該等珠之大小和材料的影響。

【0133】本揭露包括於平面(或實質上平面)結構(或基材或流通池表面)上特定結合位置(於本文亦稱為結合位點或活性位置)之方法。該等結合位置可為有序、不規則分佈或隨機分佈。該等結合位置可用於例如產生用於次世代定序之群落。本揭露的於平面結構上特定結合位置之方法亦稱為膠態自行組裝(自下而上)。圖2A1至2A2顯示於平面結構上特定結合位置之非限制性的例示性方法。參照圖2A1，於平面結構上特定結合位置之方法可包括提供納入液體204中之平面結構202 (圖2A1所示之載玻片；圖2A1，板a)。於動作208a1下，該方法可包括遞送複數個粒子210(圖2A1所示之珠)至該液體204之表面212。該液體之該表面可為該液體之頂端表面，該頂端表面係與另一介質(諸如空氣)接觸。該複數個粒子之某一百分比(例如5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或

更多)可自行組裝成緊密堆積之有序的或不規則的粒子。於動作208a2下，該方法可包括除去介於該等粒子210與該平面結構202之間的該液體204，使得該複數個粒子210與該平面結構202接觸(圖2A1，板b)。於該液體204之該表面212上的該複數個粒子210可於該平面結構202上特定複數個結合位置214 (例如用於聚落形成之複數個位置)。與該平面結構202接觸之複數個粒子208可於該平面結構202上特定該複數個結合位置214。圖2A1顯示一種對以非預定之方式排列的高密度位點(或位置)之表面結構化的非限制性之例示性方法。圖2B和2C顯示具有高密度的位點(或位置)之結構化表面(例如流通池表面)的非限制性之例示性掃描電子顯微鏡(SEM)影像，其中使用膠態自行組裝以非預定之方式產生該等位點。

【0134】於平面結構上特定結合位置(於本文亦稱為結合位點或活性位置)之方法可包括提供納入液體204中之複數個平面結構(圖2A1所示之載玻片202的平面結構)。該方法可包括：於動作208a1下，遞送複數個粒子210 (圖2A1所示之珠)至該液體204之表面212。該液體之該表面可為該液體之頂端表面，該頂端表面係與另一介質(諸如空氣)接觸。於動作208a2下，該方法可包括除去介於該等粒子210與該複數個平面結構之間的該液體204，使得該複數個粒子210與該複數個平面結構接觸(圖2A1，板b)。於該表面212上及/或與該複數個平面結構接觸之該複數個粒子210可於該複數個平面結構之每一者上特定複數個結合位

置214。於任何2個平面結構上，該複數個結合位置(該等結合位置之相對及/或絕對位置或區位)可為不同。使用於該液體204之該表面212上的該複數個粒子210之膠態自行組裝，該方法產生該複數個結合位置214，使得於任何2個平面結構上之該複數個結合位置可為不同。相對地，由上而下微影蝕刻使用微影蝕刻遮罩以產生表面具有相同結合位置之流通池。

【0135】於平面結構202 (圖2A1所示之載玻片)上特定結合位置(於本文亦稱為結合位點或活性位置)之方法可包括提供平面結構202，其具有沉積於其上之活性位置層(或物質層或結合位置層) 216和遮罩層218 (圖2A1，板b)。該方法可包括沉積複數個粒子210 (圖2A1所示之珠)於該平面結構202之該遮罩層218上。於動作208a3下，該方法可包括暴露該平面結構202於蝕刻劑以自未被該複數個珠210屏蔽之區域差異性除去該遮罩層218 (圖2A，板c)。於動作208a3下，該方法可包括自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層218和該活性位置層216 (圖2A1，板c)。於動作208a4下，該方法可包括自被該複數個珠屏蔽之區域除去殘留之遮罩層且於結合位置殘留該活性位置層(圖2A1，板d)。因此，於動作208a5下，該方法特定複數個結合位置214，該等結合位置包含殘留之該活性位置層(圖2A1，板e)。

【0136】於平面結構上特定結合位置(於本文亦稱為結合位點或活性位置)之方法可包括提供平面結構202 (圖

2A1所示之載玻片)，其具有沉積於其上之活性位置層216和遮罩層218 (圖2A1，板a)。於動作208a1下，該方法可包括沉積複數個粒子210 (圖2A1所示之珠)於該平面結構202之該遮罩層218上。於動作208a3下，該方法可包括暴露該平面結構202於蝕刻劑，藉此自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層和該活性位置層(圖2A1，板c)。於動作208a4下，該方法可包括自被該複數個珠屏蔽之區域除去殘留之遮罩層且於該等結合位置殘留該活性位置層(圖2A1，板d)。該方法可包括除去粒子材料和該複數個粒子或每個粒子之殘留的任何部分。因此，於動作208a5下，該方法特定複數個結合位置214，該等結合位置包含殘留之該活性位置層(圖2A1，板e)。

【0137】於該方法之任何步驟(諸如沉積該複數個珠)之前，該平面結構、該活性位置層及/或該遮罩層經常係一致的(或實質上一致的)。於沉積該複數個珠之前，該遮罩層可為一致的。於沉積該複數個珠之前，該活性位置層可為一致的。於沉積該複數個珠之前，該平面結構可為一致的。換言之，通過本文所揭露者，珠可沉積於缺少圖案之平面表面上，該圖案另一方面將指定結合位置之預定陣列。結合位置可經排列成局部規則的分佈，諸如上述和本文其他部分所描述者，但是該局部規則的分佈非由該表面之預定圖案所引起。

遞送粒子

【0138】於該等粒子與該平面結構接觸之前，該等粒子可經遞送至該液體之表面。參照圖2A1，於動作208a1下，遞送該複數個粒子210至該液體204之該表面212可包括藉由某些或所有該複數個粒子以局部飽和(或部分飽和)該液體204之該表面212。參照圖3A至3D，藉由某些或所有該複數個粒子以局部飽和(或部分飽和)該液體之該表面可導致於該表面形成第一晶格302r1。該第一晶格302r1可包含該複數個粒子之第一粒子304r1的第一子集。該第一粒子304r1可為經緊密堆積且有序的(或規則有序的)，雖然該第一粒子304r1之大小和於該基材表面上之位置係非預定。藉由某些或所有該複數個粒子以局部飽和(或部分飽和)該液體之該表面可導致於該表面形成第二晶格302r2。該第二晶格302r2可包含該複數個粒子之第二粒子304r2的第二子集。該第二粒子304r2可為經緊密堆積且有序的，雖然該第二粒子304r2之大小和於該基材表面上之位置係非預定。藉由間斷或裂縫306d，該第二晶格302r2可與該第一晶格分隔。該間斷306d可不包括如圖3A和3B所示之粒子或可包括如圖3C和3D所示之非有序的(或隨機分佈或無序的)粒子306i。該間斷306d之大小和區位及該間斷中存在或不存在該非有序的粒子306i係非預定。該第一晶格302r1與該第二晶格302r2具有不同的位向，使得該2種晶格(或該2種晶格之粒子的子集)藉由旋轉(和移位)彼此相關。晶格亦可稱為局部晶格。

【0139】沉積複數個珠經常包含堆積該複數個珠之珠

成包含藉由局部間斷隔開之第一局部晶格(或第一不規則陣列)和第二局部晶格(或第二不規則陣列)的構形。於某些實施態樣中，遞送複數個粒子至液體之表面可包括藉由某些或所有該複數個粒子以局部飽和(或部分飽和)該液體之該表面。藉由某些或所有該複數個粒子以局部飽和(或部分飽和)該液體之該表面可導致於該表面形成第一不規則陣列。藉由某些或所有該複數個粒子以局部飽和(或部分飽和)該液體之該表面可導致於該表面形成第二不規則陣列。

【0140】於某些實施態樣中，遞送該複數個粒子包含同時及/或依次遞送該複數個粒子之粒子的第一子集至該液體之該表面的第一區位和該複數個粒子之粒子的第二子集至該液體之該表面的第二區位。遞送該複數個粒子可包含同時及/或依次遞送該複數個粒子之粒子的複數個子集(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個子集)至該液體之該表面的不同區位。

液體

【0141】許多液體係與本文所揭露者一致。例如，可使用密度高於該等粒子之密度的液體，使得該等粒子於導入該液體之後係位於該液體之頂端表面。某些適當之液體具有下述特性之一或更多者：適合粒子堆積之表面張力；足以允許除去介於該等粒子與該平面表面之間的該液體而無實質破壞粒子構形之黏度；及，適合蒸發該液體以沉積

該等粒子於該平面表面上而無實質破壞粒子構形之揮發性。該液體經常係親水性，雖然其他液體係與某些實施態樣一致。可使用具有所欲之性質(諸如密度、黏度及表面張力)的液體。該液體可包含緩衝液、鹽溶液、水、有機溶劑、極性溶劑、非極性溶劑、油、天然油、合成油、有機油、礦物油、石蠟油、烴油、非烴油、矽油、揮發性液體或彼等之組合。於本發明提供之該方法的某些實施態樣中，基底油係天然油、合成油或彼等之組合。該油可為烴油或非烴油。該油可為礦物油(具有約10至約60個碳原子之天然烴油的實例)。該油可為矽油(合成之非烴油的實例)。該油可為合成油、有機油、礦物油、石蠟油、石蠟(諸如液體石蠟)、脂肪酸(例如十八酸)、烷類混合物或純烷(諸如癸烷、十一烷、十二烷、十三烷、十四烷、十五烷、十六烷、十七烷、十八烷、十九烷、二十烷或二十一烷)。該液體可呈多種不同之純度。該液體可呈相對高之純度。該液體可低於相對高之純度。

【0142】於某些實施態樣中，該液體包含擴展劑、污染物或彼等之組合。該擴展劑可包含醇，諸如甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、丁醇、異丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇、壬醇及癸醇。該污染物可包含界面活性劑、擁擠劑、蔗糖、尿素、聚丙烯酸、1-甲基吡啶-2-醛肟氯鹽或彼等之組合。該界面活性劑可包含十二烷基硫酸鈉、Tween或彼等之組合。該界面活性劑可為陰離子界面活性劑(例如多庫酯鈉(磺琥珀酸鈉二辛酯)、全氟辛烷磺酸鹽

(PFOS)、全氟丁烷磺酸鹽、烷基芳基醚磷酸鹽及烷基醚磷酸鹽)、陽離子界面活性劑(例如奧替尼啶(octenidine)二鹽酸鹽、溴化十六烷基三甲銨(CTAB)、氯化十六烷基吡啶(CPC)、氯化苯二甲烴銨(BAC)、氯化苯索寧(BZT)、雙十八烷基二甲基氯化銨及雙十八烷基二甲基溴化銨(DODAB))、兩性離子界面活性劑(例如磷脂、磷脂醯絲胺酸、磷脂醯乙醇胺、磷脂醯膽鹼及神經鞘磷脂)或非離子界面活性劑。非離子界面活性劑可為聚氧乙烯醚脂肪醇(例如小範圍聚氧乙烯醚、八乙二醇單十二醚或五乙二醇單十二醚)、烷基酚聚氧乙烯醚(例如壬苯醇醚、Triton X-100)、脂肪酸聚氧乙烯醚、乙氧化胺及/或脂肪醯胺(例如牛脂胺聚氧乙烯醚、椰油醯單乙醇胺、椰油醯二乙醇胺)、末端阻斷之聚氧乙烯醚(例如泊洛沙姆(poloxamer))、多羥基化合物之脂肪酸酯、脂肪酸甘油酯(例如單硬脂酸甘油酯、單月桂酸甘油酯)、山梨糖醇脂肪酸酯(例如山梨醇酯(Span),諸如山梨糖醇酐單油酸酯、山梨糖醇酐單硬脂酸酯、山梨糖醇酐三硬脂酸酯或Tween,諸如Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80)、蔗糖脂肪酸酯、烷基聚葡萄糖苷(例如癸基葡萄糖苷、月桂基葡萄糖苷、辛基葡萄糖苷)。該擁擠劑可包含聚乙二醇(PEG)。該PEG可包含具有約200道爾頓(例如PEG 200)至約8000道爾頓(例如PEG 8000)之平均分子量的PEG,諸如平均分子量為200道爾頓、300道爾頓、800道爾頓、1000道爾頓、1500道爾頓、2000道爾頓、3000道爾頓、4000道爾頓、6000道爾頓

或8000道爾頓之PEG。該擴展劑(或污染物)之濃度可為約1%至約20%；例如，該濃度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。經由包含一或更多種擴展劑及/或一或更多種污染物之該液體，該所生成之結合位置可呈不規則分佈(參照圖10A至10B)。較小之親水性聚合物(諸如PEG 200)可用於RCA產物沉積。圖10A至10B顯示多種不同之添加劑可用於改善RCA產物於結構化(規則的或不規則的)表面之沉積。於沉積緩衝劑不含有添加劑之情況下，可完成於非結構化胺基矽烷表面之RCA產物的沉積。該沉積緩衝劑可與製造該RCA產物為相同之緩衝劑。該沉積緩衝劑不與該結構化表面上之沉積相容。多種添加劑已被鑑定以增加於該結構化表面上之沉積效率。醇(諸如乙醇和異丙醇)和擁擠劑(諸如PEG 200和PEG 8000)已顯示能增加沉積效率。圖10B顯示沉積之叢聚的位點計數和位點強度。位點計數和強度之較高且緊密分佈係較佳的。

【0143】可選擇該液體以具有所欲之密度。該液體之密度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.01 g/cm^3、0.02 g/cm^3、0.03 g/cm^3、0.04 g/cm^3、0.05 g/cm^3、0.06 g/cm^3、0.07 g/cm^3、0.08 g/cm^3、0.09 g/cm^3、0.1 g/cm^3、0.2 g/cm^3、0.3 g/cm^3、0.4 g/cm^3、0.5 g/cm^3、0.6 g/cm^3、0.7 g/cm^3、0.8 g/cm^3、0.9 g/cm^3、1 g/cm^3、1.1

g/cm^3、1.2 g/cm^3、1.3 g/cm^3、1.4 g/cm^3、1.5 g/cm^3、1.6 g/cm^3、1.7 g/cm^3、1.8 g/cm^3、1.9 g/cm^3、2 g/cm^3、2.1 g/cm^3、2.2 g/cm^3、2.3 g/cm^3、2.4 g/cm^3、2.5 g/cm^3、2.6 g/cm^3、2.7 g/cm^3、2.8 g/cm^3、2.9 g/cm^3、3 g/cm^3、3.1 g/cm^3、3.2 g/cm^3、3.3 g/cm^3、3.4 g/cm^3、3.5 g/cm^3、3.6 g/cm^3、3.7 g/cm^3、3.8 g/cm^3、3.9 g/cm^3、4 g/cm3、4.1 g/cm^3、4.2 g/cm^3、4.3 g/cm^3、4.4 g/cm^3、4.5 g/cm^3、4.6 g/cm^3、4.7 g/cm^3、4.8 g/cm^3、4.9 g/cm^3、5 g/cm^3、5.1 g/cm^3、5.2 g/cm^3、5.3 g/cm^3、5.4 g/cm^3、5.5 g/cm^3、5.6 g/cm^3、5.7 g/cm^3、5.8 g/cm^3、5.9 g/cm^3、6 g/cm^3、6.1 g/cm^3、6.2 g/cm^3、6.3 g/cm^3、6.4 g/cm^3、6.5 g/cm^3、6.6 g/cm^3、6.7 g/cm^3、6.8 g/cm^3、6.9 g/cm^3、7 g/cm^3、7.1 g/cm^3、7.2 g/cm^3、7.3 g/cm^3、7.4 g/cm^3、7.5 g/cm^3、7.6 g/cm^3、7.7 g/cm^3、7.8 g/cm^3、7.9 g/cm^3、8 g/cm^3、8.1 g/cm^3、8.2 g/cm^3、8.3 g/cm^3、8.4 g/cm^3、8.5 g/cm^3、8.6 g/cm^3、8.7 g/cm^3、8.8 g/cm^3、8.9 g/cm^3、9 g/cm^3、9.1 g/cm^3、9.2 g/cm^3、9.3 g/cm^3、9.4 g/cm^3、9.5 g/cm^3、9.6 g/cm^3、9.7 g/cm^3、9.8 g/cm^3、9.9 g/cm^3、10 g/cm^3、11 g/cm^3、12 g/cm^3、13 g/cm^3、14 g/cm^3、15 g/cm^3、16 g/cm^3、17 g/cm^3、18 g/cm^3、19 g/cm^3、20 g/cm^{3}或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該液體之密度可為約0.1 g/cm^{3}至約10 g/cm^3。該液體之密度可高於該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之密度，使得該粒子浮於該液體之表面。

【0144】該液體之黏度可加以變化。該液體之黏度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.1毫帕-秒(mPa.s)、0.2 mPa.s、0.3 mPa.s、0.4 mPa.s、0.5 mPa.s、0.6 mPa.s、0.7 mPa.s、0.8 mPa.s、0.9 mPa.s、1 mPa.s、2 mPa.s、3 mPa.s、4 mPa.s、5 mPa.s、6 mPa.s、7 mPa.s、8 mPa.s、9 mPa.s、10 mPa.s、20 mPa.s、30 mPa.s、40 mPa.s、50 mPa.s、60 mPa.s、70 mPa.s、80 mPa.s、90 mPa.s、100 mPa.s、200 mPa.s、300 mPa.s、400 mPa.s、500 mPa.s、600 mPa.s、700 mPa.s、800 mPa.s、900 mPa.s、1000 mPa.s、2,000 mPa.s、3,000 mPa.s、4,000 mPa.s、5,000 mPa.s、6,000 mPa.s、7,000 mPa.s、8,000 mPa.s、9,000 mPa.s、10,000 mPa.s、20,000 mPa.s、30,000 mPa.s、40,000 mPa.s、50,000 mPa.s、60,000 mPa.s、70,000 mPa.s、80,000 mPa.s、90,000 mPa.s、100,000 mPa.s、200,000 mPa.s、300,000 mPa.s、400,000 mPa.s、500,000 mPa.s、600,000 mPa.s、700,000 mPa.s、800,000 mPa.s、900,000 mPa.s、1,000,000 mPa.s、2,000,000 mPa.s、3,000,000 mPa.s、4,000,000 mPa.s、5,000,000 mPa.s、6,000,000 mPa.s、7,000,000 mPa.s、8,000,000 mPa.s、9,000,000 mPa.s、10,000,000 mPa.s、20,000,000 mPa.s、30,000,000 mPa.s、40,000,000 mPa.s、50,000,000 mPa.s、60,000,000 mPa.s、70,000,000 mPa.s、80,000,000 mPa.s、90,000,000 mPa.s、100,000,000 mPa.s或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該液體之黏度係約0.1

mPa.s至約10,000,000 mPa.s。該液體之黏度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10^{-1} 厘泊(cP)、1 cP、10 cP、10^2 cP、10^3 cP、10^4 cP、10^5 cP、10^6 cP、10^7 cP、10^8 cP或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

【0145】可選擇該液體以具有所欲之表面張力(和因此蒸發速率)。該液體之表面張力可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1 $mN.m^{-1}$、2 $mN.m^{-1}$、3 $mN.m^{-1}$、4 $mN.m^{-1}$、5 $mN.m^{-1}$、6 $mN.m^{-1}$、7 $mN.m^{-1}$、8 $mN.m^{-1}$、9 $mN.m^{-1}$、10 $mN.m^{-1}$、11 $mN.m^{-1}$、12 $mN.m^{-1}$、13 $mN.m^{-1}$、14 $mN.m^{-1}$、15 $mN.m^{-1}$、16 $mN.m^{-1}$、17 $mN.m^{-1}$、18 $mN.m^{-1}$、19 $mN.m^{-1}$、20 $mN.m^{-1}$、21 $mN.m^{-1}$、22 $mN.m^{-1}$、23 $mN.m^{-1}$、24 $mN.m^{-1}$、25 $mN.m^{-1}$、26 $mN.m^{-1}$、27 $mN.m^{-1}$、28 $mN.m^{-1}$、29 $mN.m^{-1}$、30 $mN.m^{-1}$、31 $mN.m^{-1}$、32 $mN.m^{-1}$、33 $mN.m^{-1}$、34 $mN.m^{-1}$、35 $mN.m^{-1}$、36 $mN.m^{-1}$、37 $mN.m^{-1}$、38 $mN.m^{-1}$、39 $mN.m^{-1}$、40 $mN.m^{-1}$、41 $mN.m^{-1}$、42 $mN.m^{-1}$、43 $mN.m^{-1}$、44 $mN.m^{-1}$、45 $mN.m^{-1}$、46 $mN.m^{-1}$、47 $mN.m^{-1}$、48 $mN.m^{-1}$、49 $mN.m^{-1}$、50 $mN.m^{-1}$、51 $mN.m^{-1}$、52 $mN.m^{-1}$、53 $mN.m^{-1}$、54 $mN.m^{-1}$、55 $mN.m^{-1}$、56 $mN.m^{-1}$、57 $mN.m^{-1}$、58 $mN.m^{-1}$、59 $mN.m^{-1}$、60 $mN.m^{-1}$、61 $mN.m^{-1}$、62 $mN.m^{-1}$、63 $mN.m^{-1}$、64 $mN.m^{-1}$、65 $mN.m^{-1}$、66 $mN.m^{-1}$、67 $mN.m^{-1}$、68 $mN.m^{-1}$、69 $mN.m^{-1}$、70 $mN.m^{-1}$、71 $mN.m^{-1}$、72 $mN.m^{-1}$、73 $mN.m^{-1}$、74 $mN.m^{-1}$、75 $mN.m^{-1}$、76 $mN.m^{-1}$、77 $mN.m^{-1}$、78 $mN.m^{-1}$、79 $mN.m^{-1}$、80 $mN.m^{-1}$、81 $mN.m^{-1}$、82 $mN.m^{-1}$、83 $mN.m^{-1}$、84 $mN.m^{-1}$、85 $mN.m^{-1}$、86 $mN.m^{-1}$、87 $mN.m^{-1}$、

88 $mN.m^{-1}$、89 $mN.m^{-1}$、90 $mN.m^{-1}$、91 $mN.m^{-1}$、92 $mN.m^{-1}$、93 $mN.m^{-1}$、94 $mN.m^{-1}$、95 $mN.m^{-1}$、96 $mN.m^{-1}$、97 $mN.m^{-1}$、98 $mN.m^{-1}$、99 $mN.m^{-1}$、100 $mN.m^{-1}$、110 $mN.m^{-1}$、120 $mN.m^{-1}$、130 $mN.m^{-1}$、140 $mN.m^{-1}$、150 $mN.m^{-1}$、160 $mN.m^{-1}$、170 $mN.m^{-1}$、180 $mN.m^{-1}$、190 $mN.m^{-1}$、200 $mN.m^{-1}$、210 $mN.m^{-1}$、220 $mN.m^{-1}$、230 $mN.m^{-1}$、240 $mN.m^{-1}$、250 $mN.m^{-1}$、260 $mN.m^{-1}$、270 $mN.m^{-1}$、280 $mN.m^{-1}$、290 $mN.m^{-1}$、300 $mN.m^{-1}$、310 $mN.m^{-1}$、320 $mN.m^{-1}$、330 $mN.m^{-1}$、340 $mN.m^{-1}$、350 $mN.m^{-1}$、360 $mN.m^{-1}$、370 $mN.m^{-1}$、380 $mN.m^{-1}$、390 $mN.m^{-1}$、400 $mN.m^{-1}$、410 $mN.m^{-1}$、420 $mN.m^{-1}$、430 $mN.m^{-1}$、440 $mN.m^{-1}$、450 $mN.m^{-1}$、460 $mN.m^{-1}$、470 $mN.m^{-1}$、480 $mN.m^{-1}$、490 $mN.m^{-1}$、500 $mN.m^{-1}$、550 $mN.m^{-1}$、600 $mN.m^{-1}$、650 $mN.m^{-1}$、700 $mN.m^{-1}$、750 $mN.m^{-1}$、800 $mN.m^{-1}$、850 $mN.m^{-1}$、900 $mN.m^{-1}$、950 $mN.m^{-1}$、1000 $mN.m^{-1}$或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該液體之表面張力係約10 $mN.m^{-1}$至約500 $mN.m^{-1}$。

粒子/珠

【0146】與該平面結構接觸之該複數個粒子(諸如珠)可位於該平面結構(或該平面結構之頂端)上。圖2A1之板b顯示複數個粒子之粒子210係位於該平面結構202上。粒子可具有相同或不同之性質及/或材料。例如，2個粒子(或更多個粒子，諸如該複數個粒子之1%、2%、3%、4%、

5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、70%、80%、90%、99%或更多)可具有相同之材料。每個粒子可具有相同之材料。2個粒子(或更多個粒子，諸如該複數個粒子之1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、70%、80%、90%、99%或更多)可具有不同之材料。該複數個粒子可包含2個具有不同之材料的粒子之子集。每個子集可包括1個粒子、2個粒子或更多個粒子。每個子集可包括該複數個粒子之1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、70%、80%、90%、99%或更多。

【0147】眾多粒子材料係與本文所揭露者一致。例如，該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之材料包含玻璃、瓊脂糖、明膠、水凝膠、陶瓷、塑料、丙烯酸聚合物、金屬、乳膠、纖維素、耐綸、聚矽氧或彼等之組合。該等粒子可具磁性。例如，該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之材料包含聚二甲基矽氧烷(PDMS)、聚對苯二甲酸乙二酯(PET)、聚對苯二甲酸丁二酯(PBT)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚乙烯、聚甲烯、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯 (PS)、聚乙酸乙烯酯、聚胺甲酸酯或彼等之組合。例如，該複數個粒子之一粒子的材料包含奈米材料(例如導電性奈米材料)。例示性奈米材料包括但不限於鋁奈米材料、碳奈米材料、鈷碳塗覆之奈米材料、銅奈米材料、銅奈米材料、銅鋅合金奈米材料、金剛石奈米材料、金奈米材料、鐵奈米材料、鐵鎳合金奈米材料、鉬奈

米材料、鎂奈米材料、鎳奈米材料、鈀奈米材料、鉑奈米材料、銀奈米材料、銀銅合金奈米材料、鉭奈米材料、錫奈米材料、銦摻雜氧化錫奈米材料、鈦奈米材料、氮化鈦奈米材料、鎢奈米材料、鋅奈米材料、氧化鈣奈米材料、氫氧磷灰石奈米材料、鋯奈米材料、二氧化矽奈米材料、矽奈米材料、二氧化矽奈米材料、氮化矽奈米材料、碳化矽奈米材料及類似者。例示性奈米材料亦可包括聚合物，諸如聚乙烯、聚甲烯、聚丙烯或聚苯乙烯，其中該聚合物不與分析物感測器之成分共價共軛。

【0148】該粒子之材料可包含聚烯烴。該聚烯烴可為均聚物(源自單一單體成分)或雜聚物(源自超過1種單體成分)且可為直鏈或支鏈。若該聚烯烴係源自2種(或更多種)單體成分之雜聚物，則該聚烯烴可呈任何共聚物鏈排列，其包括嵌段共聚物或無規共聚物者。例如，該聚烯烴可為聚乙烯(PE)、聚丙烯(PP)、PE與PP之摻合物、或PE及/或PP之多層結構化粒子。

【0149】該粒子之材料可包含聚對苯二甲酸乙二酯(PET)、聚偏二氟乙烯(PVdF)、聚醯胺(耐綸)、聚胺甲酸酯、聚碳酸酯、聚酯、聚醚醚酮(PEEK)、聚醚碸(PES)、聚醯亞胺(PI)、聚醯胺醯亞胺、聚醚、聚甲醛(例如縮醛)、聚對苯二甲酸丁二酯、聚環烷酸乙二酯、聚丁烯、聚烯烴共聚物、丙烯腈-丁二烯-苯乙烯共聚物(ABS)、聚苯乙烯共聚物、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚氯乙烯(PVC)、聚矽氧烷聚合物(諸如聚二甲基矽氧烷(PDMS))、

聚苯并咪唑(PBI)、聚苯并噁唑(PBO)、聚伸苯、聚芳醚酮、聚全氟環丁烷、聚四氟乙烯(PTFE)、聚偏二氟乙烯共聚物和三聚物、聚氯乙烯、聚氟乙烯、液晶聚合物、聚芳醯胺、聚伸苯醚及/或彼等之組合。

【0150】不同的粒子密度係與本文所揭露者一致。粒子之密度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.01 g/cm^3、0.02 g/cm^3、0.03 g/cm^3、0.04 g/cm^3、0.05 g/cm^3、0.06 g/cm^3、0.07 g/cm^3、0.08 g/cm^3、0.09 g/cm^3、0.1 g/cm^3、0.2 g/cm^3、0.3 g/cm^3、0.4 g/cm^3、0.5 g/cm^3、0.6 g/cm^3、0.7 g/cm^3、0.8 g/cm^3、0.9 g/cm^3、1 g/cm^3、1.1 g/cm^3、1.2 g/cm^3、1.3 g/cm^3、1.4 g/cm^3、1.5 g/cm^3、1.6 g/cm^3、1.7 g/cm^3、1.8 g/cm^3、1.9 g/cm^3、2 g/cm^3、2.1 g/cm^3、2.2 g/cm^3、2.3 g/cm^3、2.4 g/cm^3、2.5 g/cm^3、2.6 g/cm^3、2.7 g/cm^3、2.8 g/cm^3、2.9 g/cm^3、3 g/cm^3、3.1 g/cm^3、3.2 g/cm^3、3.3 g/cm^3、3.4 g/cm^3、3.5 g/cm^3、3.6 g/cm^3、3.7 g/cm^3、3.8 g/cm^3、3.9 g/cm^3、4 g/cm3、4.1 g/cm^3、4.2 g/cm^3、4.3 g/cm^3、4.4 g/cm^3、4.5 g/cm^3、4.6 g/cm^3、4.7 g/cm^3、4.8 g/cm^3、4.9 g/cm^3、5 g/cm^3、5.1 g/cm^3、5.2 g/cm^3、5.3 g/cm^3、5.4 g/cm^3、5.5 g/cm^3、5.6 g/cm^3、5.7 g/cm^3、5.8 g/cm^3、5.9 g/cm^3、6 g/cm^3、6.1 g/cm^3、6.2 g/cm^3、6.3 g/cm^3、6.4 g/cm^3、6.5 g/cm^3、6.6 g/cm^3、6.7 g/cm^3、6.8 g/cm^3、6.9 g/cm^3、7 g/cm^3、7.1 g/cm^3、7.2 g/cm^3、7.3 g/cm^3、7.4 g/cm^3、7.5 g/cm^3、7.6 g/cm^3、7.7 g/cm^3、7.8 g/cm^3、7.9 g/cm^3、8

g/cm^3、8.1 g/cm^3、8.2 g/cm^3、8.3 g/cm^3、8.4 g/cm^3、8.5 g/cm^3、8.6 g/cm^3、8.7 g/cm^3、8.8 g/cm^3、8.9 g/cm^3、9 g/cm^3、9.1 g/cm^3、9.2 g/cm^3、9.3 g/cm^3、9.4 g/cm^3、9.5 g/cm^3、9.6 g/cm^3、9.7 g/cm^3、9.8 g/cm^3、9.9 g/cm^3、10 g/cm^3、11 g/cm^3、12 g/cm^3、13 g/cm^3、14 g/cm^3、15 g/cm^3、16 g/cm^3、17 g/cm^3、18 g/cm^3、19 g/cm^3、20 g/cm^3或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該粒子之密度可為約0.1 g/cm^3至約10 g/cm^3。

【0151】可選擇粒子半徑(或直徑)以調節於該平面表面上之最終結合位置的分隔距離(諸如2個結合位置之間的最小分隔距離)、於該平面表面上粒子組裝呈規則或不規則區域或為其他理由。經常選擇粒子，使得該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之半徑(或直徑)係約10^{-9} m至約10^{-4} m。該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之體積可為約10^{-27} m^3至約10^{-12} m^3。某些粒子群具有某些或全部大小均一性，使得該複數個粒子之2個粒子具有相同或約相同之半徑及/或該複數個粒子之每一者具有相同之半徑。

【0152】交替地，某些粒子群係異質的，藉以例如調節呈不規則或隨機的粒子分佈之可能性或比例。粒子群可包括該複數個粒子之1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或更多。粒子群(或該複數個粒子之粒子子集)可具有相同之半徑(或直徑)。例如，第一粒子群可具

有第一相同之半徑(或直徑)。第二粒子群可具有第二相同之半徑(或直徑)。該第一相同半徑與該第二相同半徑可為不同。該複數個粒子中2個粒子群於本文中係指多分散性。該第一相同半徑(或直徑)與該第二相同半徑(或直徑)可差異為、約、至少、至少約、至多或至多約例如0.01 μm、0.02 μm、0.03 μm、0.04 μm、0.05 μm、0.06 μm、0.07 μm、0.08 μm、0.09 μm、0.1 μm、0.11 μm、0.12 μm、0.13 μm、0.14 μm、0.15 μm、0.16 μm、0.17 μm、0.18 μm、0.19 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或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該第一相同半徑與該第二相同半徑可差異為、約、至少、至少約、至多或至多約例如該第一相同半徑(或該第二相同半徑)之1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。該第一相同半徑(或直徑)可大於該第二相同半徑(或直徑)。例如，該第一相同半徑係0.5 μm且該第二相同半徑可為0.4 μm。該第一相同半徑(或直徑)可小於該第二相同半徑(或直徑)。該第一粒子群之數量與該第二粒子群之數量的比率可為約1:100至約100:1。該比率可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1:100、1:99、1:98、1:97、1:96、1:95、1:94、1:93、1:92、1:91、1:90、1:89、1:88、1:87、1:86、1:85、1:84、1:83、1:82、1:81、1:80、1:79、1:78、1:77、1:76、1:75、1:74、1:73、1:72、1:71、

1:70、1:69、1:68、1:67、1:66、1:65、1:64、1:63、1:62、1:61、1:60、1:59、1:58、1:57、1:56、1:55、1:54、1:53、1:52、1:51、1:50、1:49、1:48、1:47、1:46、1:45、1:44、1:43、1:42、1:41、1:40、1:39、1:38、1:37、1:36、1:35、1:34、1:33、1:32、1:31、1:30、1:29、1:28、1:27、1:26、1:25、1:24、1:23、1:22、1:21、1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1、30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、36:1、37:1、38:1、39:1、40:1、41:1、42:1、43:1、44:1、45:1、46:1、47:1、48:1、49:1、50:1、51:1、52:1、53:1、54:1、55:1、56:1、57:1、58:1、59:1、60:1、61:1、62:1、63:1、64:1、65:1、66:1、67:1、68:1、69:1、70:1、71:1、72:1、73:1、74:1、75:1、76:1、77:1、78:1、79:1、80:1、81:1、82:1、83:1、84:1、85:1、86:1、87:1、88:1、89:1、90:1、91:1、92:1、93:1、94:1、95:1、96:1、97:1、98:1、99:1、100:1或介於任何2個該等值之間的數或範圍。珠大小之變異亦可被描述為珠直徑除以平均珠直徑之標準偏差。該變異可為至少0.02、至少0.05、至少0.1或至少0.2，諸如介於0.01與0.2之間或介於0.02與0.1

之間。

【0153】粒子經常係球形的，使得該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者具有球形的形狀，雖然其他形狀亦與本文所揭露者一致。沉積於特定平面表面上之該複數個粒子可包含約10^4個粒子至約10^8個粒子，雖然可使用大於或小於該等值之數量，諸如當使用較小或較大之平面表面或較小或較大之粒子大小時，藉以例如調節結合位置之最小距離或間距。

【0154】一個、一或更多個或每一個粒子之半徑(或直徑)(或2個粒子的中心之間的距離)可加以變化。一個、一或更多個或每一個粒子之半徑(或直徑)(或2個粒子的中心之間的距離)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10奈米(nm)、11 nm、12 nm、13 nm、14 nm、15 nm、16 nm、17 nm、18 nm、19 nm、20 nm、21 nm、22 nm、23 nm、24 nm、25 nm、26 nm、27 nm、28 nm、29 nm、30 nm、31 nm、32 nm、33 nm、34 nm、35 nm、36 nm、37 nm、38 nm、39 nm、40 nm、41 nm、42 nm、43 nm、44 nm、45 nm、46 nm、47 nm、48 nm、49 nm、50 nm、51 nm、52 nm、53 nm、54 nm、55 nm、56 nm、57 nm、58 nm、59 nm、60 nm、61 nm、62 nm、63 nm、64 nm、65 nm、66 nm、67 nm、68 nm、69 nm、70 nm、71 nm、72 nm、73 nm、74 nm、75 nm、76 nm、77 nm、78 nm、79 nm、80 nm、81 nm、82 nm、83 nm、84 nm、85 nm、86 nm、87 nm、88 nm、89 nm、90 nm、91 nm、

92 nm、93 nm、94 nm、95 nm、96 nm、97 nm、98 nm、99 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、250 nm、260 nm、270 nm、280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、610 nm、620 nm、630 nm、640 nm、650 nm、660 nm、670 nm、680 nm、690 nm、700 nm、710 nm、720 nm、730 nm、740 nm、750 nm、760 nm、770 nm、780 nm、790 nm、800 nm、810 nm、820 nm、830 nm、840 nm、850 nm、860 nm、870 nm、880 nm、890 nm、900 nm、910 nm、920 nm、930 nm、940 nm、950 nm、960 nm、970 nm、980 nm、990 nm、1000 nm、2微米(μm)、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm、20 μm、30 μm、40 μm、50 μm、60 μm、70 μm、80 μm、90 μm、100 μm、110 μm、120 μm、130 μm、140 μm、150 μm、160 μm、170 μm、180 μm、190 μm、200 μm、210 μm、220 μm、230 μm、240 μm、250 μm、260 μm、270 μm、280 μm、290 μm、300 μm、310 μm、320 μm、330 μm、340 μm、350 μm、360 μm、370 μm、380 μm、390 μm、400 μm、410 μm、

420 μm、430 μm、440 μm、450 μm、460 μm、470 μm、480 μm、490 μm、500 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之半徑(或直徑)係約1 nm至約100 μm。2個(或更多個，諸如該複數個粒子之1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、70%、80%、90%、99%或更多)粒子具有相同之半徑。該複數個粒子之每一者可具有相同之半徑。該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者具有球形的形狀。本揭露亦考慮其他粒子形狀。

【0155】該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之體積可為不同(或相同)。該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之體積可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1,000 nm^3、10,000 nm^3、10,0000 μm^3、1,000,000 nm^3、10,000,000 nm^3、100,000,000 μm^3、1,000,000,000 nm^3、2 μm^3、3 μm^3、4 μm^3、5 μm^3、6 μm^3、7 μm^3、8 μm^3、9 μm^3、10 μm^3、20 μm^3、30 μm^3、40 μm^3、50 μm^3、60 μm^3、70 μm^3、80 μm^3、90 μm^3、100 μm^3、200 μm^3、300 μm^3、400 μm^3、500 μm^3、600 μm^3、700 μm^3、800 μm^3、900 μm^3、1,000 μm^3、10,000 μm^3、100,000 μm^3、1,000,000 μm^3或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之體積可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1奈升(nl)、2 nl、3 nl、4 nl、5 nl、6 nl、7 nl、8 nl、9

nl、10 nl、11 nl、12 nl、13 nl、14 nl、15 nl、16 nl、17 nl、18 nl、19 nl、20 nl、21 nl、22 nl、23 nl、24 nl、25 nl、26 nl、27 nl、28 nl、29 nl、30 nl、31 nl、32 nl、33 nl、34 nl、35 nl、36 nl、37 nl、38 nl、39 nl、40 nl、41 nl、42 nl、43 nl、44 nl、45 nl、46 nl、47 nl、48 nl、49 nl、50 nl、51 nl、52 nl、53 nl、54 nl、55 nl、56 nl、57 nl、58 nl、59 nl、60 nl、61 nl、62 nl、63 nl、64 nl、65 nl、66 nl、67 nl、68 nl、69 nl、70 nl、71 nl、72 nl、73 nl、74 nl、75 nl、76 nl、77 nl、78 nl、79 nl、80 nl、81 nl、82 nl、83 nl、84 nl、85 nl、86 nl、87 nl、88 nl、89 nl、90 nl、91 nl、92 nl、93 nl、94 nl、95 nl、96 nl、97 nl、98 nl、99 nl、100 nl或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之體積係約1 nm^3至約1,000,000 μm^3。

【0156】本揭露考慮不同數量之粒子。該複數個粒子之粒子數量(或粒子子集之粒子數量)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、10,000,000、20,000,000、30,000,000、

40,000,000、50,000,000、60,000,000、70,000,000、80,000,000、90,000,000、100,000,000、200,000,000、300,000,000、400,000,000、500,000,000、600,000,000、700,000,000、800,000,000、900,000,000或1,000,000,000個或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個粒子之粒子數量係約10,000個粒子至約10,000,000個粒子。

【0157】取決於例如該複數個粒子經遞送至液體之該液體的表面積之大小、經遞送至該液體之粒子的數量及經遞送至該液體之粒子的大小(例如半徑或體積)，該複數個粒子(或粒子子集)可以不同之密度存在。該複數個粒子(或粒子子集)可以為、約、至少、至少約、至多或至多約100k/mm^2、110k/mm^2、120k/mm^2、130k/mm^2、140k/mm^2、150k/mm^2、160k/mm^2、170k/mm^2、180k/mm^2、190k/mm^2、200k/mm^2、300k/mm^2、400k/mm^2、500k/mm^2、600k/mm^2、700k/mm^2、800k/mm^2、900k/mm^2、1000k/mm^2、1100k/mm^2、1200k/mm^2、1300k/mm^2、1400k/mm^2、1,500k/mm^2、1600k/mm^2、1700k/mm^2、1800k/mm^2、1900k/mm^2、2000k/mm^2、2100k/mm^2、2200k/mm^2、2300k/mm^2、2400k/mm^2、2500k/mm^2、2600k/mm^2、2700k/mm^2、2800k/mm^2、2900k/mm^2、3000k/mm^2、3100k/mm^2、3200k/mm^2、3300k/mm^2、3400k/mm^2、3500k/mm^2、3600k/mm^2、3700k/mm^2、3800k/mm^2、3900k/mm^2、

4000k/mm^2、4100k/mm^2、4200k/mm^2、4300k/mm^2、4400k/mm^2、4500k/mm^2、4600k/mm^2、4700k/mm^2、4800k/mm^2、4900k/mm^2、5000k/mm^2、6000k/mm^2、7000k/mm^2、8000k/mm^2、9000k/mm^{2}或10000k/mm^{2}或介於任何2個該等值之間的數或範圍之密度(例如局部密度或平均密度)存在。例如，該複數個粒子係以約200k/mm^{2}至約2,000k/mm^{2}之密度存在。例如，該複數個粒子係以至少600k/mm^2、至少800k/mm^{2}或至少1,000k/mm^{2}之密度存在。

粒子構形

【0158】沉積該複數個粒子於該液體之該表面可包括堆積(例如藉由膠態自行組裝)該複數個珠呈包含於該液體之該表面(和介於該液體之該表面與該平面結構之該表面之間的液體經除去後之該平面結構之該表面)上藉由間斷隔開之第一晶格和第二晶格的構形。該複數個粒子可經堆積以於該液體之該表面上形成具有規則放置/有序之珠的區域和具有隨機不規則放置/非有序之珠的區域。例如，當不充足數量之粒子被導入至該液體之該表面時，該複數個粒子可經隨機地堆積於該液體之該表面上。間斷亦可被稱為局部間斷。

【0159】粒子可呈不同的粒子構形，該不同的粒子構形包含藉由間斷隔開之有序的粒子之晶格。本揭露之任何晶格可具有(或可被描述為使用或具有)諸如六角構形、等邊三角形構形、直線構形及線性構形之構形。該晶格之不

同構形(諸如該等粒子之排列或相對位置或區位和經蝕刻後所生成之結合位置(或活性位置))可以不同之實施態樣存在。每一晶格之大小和區位係非預定，儘管該晶格內之該等粒子係有序的且經緊密堆積。2個晶格可經間斷隔開。參照圖3A，晶格可被描述為具有六角構形308h1或308h2。例如，該第一晶格302r1包含於第1六角構形308h1內之第一粒子304r1的第一子集。該第一晶格302r1可包含該第一子集，每個該第一子集具有於相同第1六角構形(根據旋轉) 308h1內之7個第一粒子304r1。該第1六角構形308h1內之第一粒子的該第一子集之7個第一粒子可位於第1六角形310h1之6個頂點和中心。位於該第1六角形310h1之6個頂點的6個第一粒子之每一者可與位於該第1六角形310h1之中心的第一粒子和位於該第1六角形310h1之頂點的2個其他第一粒子接觸。該第二晶格302r2可包含於第2六角構形308h2內之第二粒子304r2的第二子集。該第2六角構形308h2內之第二粒子的該第二子集之7個第二粒子可位於第2六角形310h2之6個頂點和中心。位於該第2六角形310h2之6個頂點的6個第二粒子之每一者可與位於該第2六角形310h2之中心的第二粒子和位於該第2六角形310h2之頂點的2個其他第二粒子接觸。該第1六角構形與該第2六角構形可具有相同位向。該第1六角形310h1與該第2六角形310h2具有不同位向。如示於圖3A，該第1六角形310h1與該第2六角形310h2係藉由旋轉(和移位)而彼此相關。六角構形內之六角形可共有邊。於不同的六角構形內之六角形

可不共有邊。六角構形內之六角形可為全等(例如具有相同大小和形狀)。不同的六角構形內之六角形可為全等(例如具有相同大小和形狀)或不同。不同的六角構形內之六角形可藉由旋轉(和移位)而相關。不同的六角構形內之六角形可藉由旋轉(和移位)而相關，使得該等六角形具有相同位向。具有六角構形之粒子可以藉由膠態自行組裝產生之非預定之方式經緊密堆積和排列。圖3A所示之該2個晶格302r1和302r2係藉由不含有粒子之間斷306d隔開。

【0160】參照圖3B，晶格可具有(或被描述為具有)等邊三角形構形308t1或308t2。例如，該第一晶格302r1包含於第1等邊三角形構形308t1內之第一粒子304r1的第一子集，使得該第一粒子的第一子集之3個相鄰非共線的第一粒子形成第1等邊三角形310t1。該第二晶格302r2可包含於第2等邊三角形構形308t2內之第二粒子304r2的第二子集，使得該第二粒子的第二子集之任3個相鄰非共線的第二粒子形成第2等邊三角形310t2。該第1等邊三角形構形308t1與該第2等邊三角形構形308t2可為不同。該第1等邊三角形310t1與該第2等邊三角形310t2可具有不同的位向。例如，該第1等邊三角形310t1與該第2等邊三角形310t2係藉由旋轉(和移位)而彼此相關。於等邊三角形構形內之等邊三角形可共有邊。於不同的等邊三角形構形內之等邊三角形可不共有邊。於等邊三角形構形內之等邊三角形可為全等(例如具有相同大小和形狀)。等邊三角形構形可包括等邊三角形之2個子集。於每個子集中之等邊三角形可藉

由移位(非旋轉)而相關。該2個子集之間的等邊三角形係藉由旋轉180°(和移位)而相關。於不同的等邊三角形構形內之等邊三角形可為全等(例如具有相同大小和形狀)或不同。如示於圖3B，於不同的等邊三角形構形內之等邊三角形可藉由旋轉(和移位)而相關。於不同的等邊三角形構形內之等邊三角形可藉由移位(非旋轉)而相關，使得該等等邊三角形對對應之等邊三角形的子集具有相同之位向。具有等邊三角形構形之粒子可以藉由膠態自行組裝產生之非預定之方式經緊密堆積和排列。圖3B所示之該2個晶格302r1和302r2係藉由不含有粒子之間斷306d隔開。

【0161】參照圖3C，晶格可具有(或被描述為具有)直線構形308s1或308s2。於該第一晶格302r1內相鄰第一粒子304r1之間所畫的第一直線310s1與於該第二晶格302r2內相鄰第二粒子304r2之間所畫的任何第二直線310s2係不平行。例如，該第一直線310s1與該第二直線310s2不平行，使得如示於圖3C，該2條線係藉由非60°之整數倍的旋轉(和移位)而彼此相關。作為一個實例，該第一直線310s1與該第二直線310s2不平行，使得該2條線係藉由60°之整數倍的旋轉(和移位)而彼此相關。作為另一實例，該第一直線310s1與該第二直線310s2可具有相同方向/係平行，使得該2條直線係藉由移位(非旋轉)而相關。於不同的直線構形內之直線可具有相同方向/可呈平行，使得該等直線係藉由旋轉(和移位)而相關。於不同的直線構形內之直線可藉由移位(非旋轉)而相關，使得該等直線具有相同方向。

具有該直線構形之粒子可以藉由膠態自行組裝產生之非預定之方式經緊密堆積和排列。於圖3C，分隔該2個晶格302r1和302r2之該間斷306d包括非有序的(或隨機分佈或無序的)粒子306i。

【0162】參照圖3D，晶格可具有(或被描述為具有)線性構形308*l*1或308*l*2。該第一晶格302r1包含排列於第一粒子之第一複數個第一列310*l*1的該第一粒子304r1之第一子集。該第一複數個第一列之每個第一列310*l*1內的第一粒子可經排列呈第一線性構形308*l*1，使得該第一列之第一粒子與相鄰該第一列之該第一粒子的2個第一粒子接觸。該第一列310*l*1之每個第一粒子(非位於列之末端的該第一粒子)可與相鄰該第一列之該第一粒子的2個第一粒子接觸。2個相鄰第一列310*l*1可藉由於該第一線性構形308*l*1之第一方向314d1的該第一線性構形之第一偏距312o1偏移。該第一偏距312o1可與該複數個第一粒子之第一粒子的半徑相同(或實質上相同)。該2個相鄰列310*l*1可藉由於該第一線性構形之第二方向318d1的該第一線性構形之第二偏距316o1 (諸如該複數個粒子之粒子的直徑)偏移。該第二偏距316o1可大於該複數個第一粒子之第一粒子的半徑且小於該複數個第一粒子之第一粒子的直徑，諸如該第一粒子之半徑的3倍之平方根。該第一線性構形之該第二方向318d1可與該第一線性構形之該第一方向314d1垂直。於1個第一列之第一粒子可與相鄰第一列之2個相鄰第一粒子接觸。

【0163】繼續參照圖3D，該第二晶格302r2可包含排列於第二粒子之第二複數個第二列310*l*2的該第二粒子304r2之第二子集。該第二複數個第二列之每個第二列內的第二粒子可經排列呈第二線性構形308*l*2，使得該第二列之第二粒子與相鄰該第二列之該第二粒子的2個第二粒子接觸。該第二列310*l*2之每個第二粒子(非位於列之末端的該第二粒子)可與相鄰該第二列之該第二粒子的2個第二粒子接觸。2個相鄰第二列310*l*2可藉由於該第二線性構形之第一方向314d2的該第二線性構形之第一偏距312o2偏移。該第一偏距312o2可大於該複數個第二粒子之第二粒子的半徑且小於該複數個第二粒子之第二粒子的直徑，諸如該第二粒子之半徑的3倍之平方根。該2個相鄰列310*l*2可藉由於該第二線性構形之第二方向318d2的該第二線性構形之第二偏距316o2 (諸如該複數個第二粒子之該第二粒子的直徑)偏移。該第二線性構形之該第二方向318d2可與該第二線性構形之該第一方向314d2垂直。於1個第二列之第二粒子可與相鄰第二列之2個相鄰第二粒子接觸。於圖3D，分隔該2個晶格302r1和302r2之該間斷306d包括非有序的(或隨機分佈或無序的)粒子306i。

【0164】參照該第一線性構形308*l*1和該第二線性構形308*l*2，所描述之一或更多個參數可為相同或不同。例如，參照該等線性構形所描述之某些或所有參數，該第一線性構形308*l*1與該第二線性構形308*l*2可為不同(或相同)。該等線性構形之位向可為不同(或相同)。該第一線性

構形之該第一方向314d1與該第二線性構形之該第一方向314d2可為不同(或相同)。該第一線性構形之該第二方向318d1與該第二線性構形之該第二方向318d2可為不同(或相同)。該第一線性構形之該第一方向314d1與該第二方向318d1的組合與該第二線性構形之該第一方向314d2與該第二方向318d2的組合可為不同(或相同)。例如，藉由該第一線性構形之該第一方向與該第二方向的交叉所形成之第一角度與藉由該第二線性構形之該第一方向與該第二方向的交叉所形成之第二角度係藉由旋轉(和移位)而彼此相關。圖3D說明藉由該第一線性構形之該第一方向與該第二方向的交叉所形成之第一角度與藉由該第二線性構形之該第一方向與該第二方向的交叉所形成之第二角度係非藉由移位而彼此相關。

【0165】該等線性構形之偏距可為不同(或相同)。該第一線性構形之該第一偏距312o1與該第二線性構形之該第一偏距312o2可為相同或彼此落入某一百分比(%)(或不同)。該第一線性構形之該第二偏距316o1與該第二線性構形之該第二偏距316o2可為相同或彼此落入1或更多個百分比。於不同之實施態樣，對應偏距之間的差異百分比可為不同。該百分比可為、約、至少、至多或至多約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%、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%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

【0166】於某些實施態樣中，於該液體之該表面形成一或更多個不規則陣列。不規則陣列可由例如存在於該液體之該表面上的具有2種不同之大小的粒子之混合物產生且隨後沉積於該平面結構。2種不規則陣列可經間斷隔開。不規則陣列(例如第一不規則陣列或第二不規則陣列)之每個粒子可以閾值距離或大於閾值距離遠離該不規則陣列之粒子的最近相鄰粒子。該閾值距離可為該粒子之半徑。該閾值距離可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。不規則陣列可不包含位於任何六角形之6個頂點和中心的7個相鄰粒子。不規則陣列可不包含環繞第7個粒子之位於六角形的6個頂點之6個相鄰粒子。不規則陣列可包含7個相鄰粒子，其中6個係位於非六角形之六邊形的6個頂點且環繞該7個相鄰粒子之第7個粒子。不規則陣列可不包含位於六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形之粒子。不位於六角構形之粒子表示由該等粒子不能連成六角形格

柵(例如圖3A所示之六角形格柵)。不位於等邊三角形構形之粒子表示由該等粒子不能連成三角形格柵(例如圖3B所示之三角形格柵)。不位於線性構形之粒子表示由該等粒子不能連成線性格柵(例如圖3C所示之線性格柵)。不位於直線構形之粒子表示由該等粒子不能連成直線格柵(例如圖3D所示之直線格柵)。不規則陣列可不包含於六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形內彼此位於至少閾值距離內之粒子。該閾值距離可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

平面結構

【0167】該平面結構可包含足以經受得住該蝕刻程序之耐用持久的表面。該平面結構可為基材或流通池表面。該平面結構(或基材或流通池表面)之材料可包含矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。於某些實施態樣中，該遮罩層之材料包含鋁、氧化銦錫、鉻、銅、砷化鎵、金、鉬、鉑、矽、二氧化矽、氮化矽、銀、鉭、鈦、氮化鈦、鎢或彼等之組合。

【0168】該平面結構(或基材或流通池表面)之材料可全部或部分包含一或更多種聚合材料，諸如聚乙烯或聚乙烯衍生物，諸如環烯烴共聚物(COC)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基矽氧烷(PDMS)、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯、聚四氟乙烯、聚甲醛、聚醚醚酮、聚碳酸酯或聚苯乙烯。該平面結構之材料可全部或部分包含無機材料，諸如矽或其他以二氧化矽為底質之材料，例如玻璃、石英、熔融矽石、硼矽玻璃、金屬及陶瓷。

除去液體

【0169】可藉由多種不同之方法除去介於該等粒子與該平面結構之間的液體。除去介於該等粒子與該平面結構之間的該液體包含自含有該液體之室(或容器)、該平面表面及該等粒子除去該液體。除去介於該等粒子與該平面結構之間的該液體包含自含有該液體之室(或容器)、該平面表面及該等粒子排洩該液體。除去介於該等粒子與該平面結構之間的該液體包含加熱該液體。除去介於該等粒子與該平面結構之間的該液體包含允許介於該等粒子與該平面結構之間的該液體蒸發。可使用具有所欲之性質(諸如表面張力和蒸發速率)的液體。除去介於該等粒子與該平面結構之間的該液體包含蒸發介於該等粒子與該平面結構之間的該液體。除去介於該等粒子與該平面結構之間的該液體包含提升該平面結構至該液體之該表面之上。可除去該

液體而未破壞(或未實質破壞)該粒子構形和該粒子構形之該晶格。藉由除去該液體，於該液體之該表面上的粒子堆積被轉移至未被破壞(或實質上未被破壞)之該平面結構的表面。

蝕刻

【0170】該方法可包含蝕刻程序。許多蝕刻方法係與本文所揭露者一致。該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子遭受蝕刻，藉以例如於經蝕刻之平面表面上復現或映現出作為結合位置之粒子分佈或構形。參照圖4A至4D，該蝕刻程序可包括蝕刻該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子以產生複數個保留區域404r1或404r2，其中該平面表面上之結合位置層(或物質層、反應位置層或活性位置層)於蝕刻之前或期間係(例如直接地或經由遮罩層間接地)與該複數個粒子接觸、被該複數個粒子屏蔽或極接近該複數個粒子且於蝕刻之後係經差異性保留。例如，該平面表面上之該物質層的該複數個保留區域404r1或404r2係與遮罩層之該複數個保留區域404r1或404r2接觸且係經差異性保留，其中該遮罩層係與該複數個粒子接觸。該複數個保留區域404r1或404r2可特定或可包含複數個結合位置(或活性位置或反應位置) 404s1或404s2。該複數個保留區域404r1或404r2可特定或可包含複數個活性位置404s1或404s2。蝕刻該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子可產生複數個經蝕刻之區域405r1或405r2，

其中該物質層未(例如直接地或經由遮罩層間接地)與該複數個粒子接觸、未被該複數個粒子屏蔽或不極接近該複數個粒子且係經差異性除去。例如，該平面表面上之該物質層的該複數個經蝕刻之區域405r1或405r2未與該遮罩層之該複數個經蝕刻之區域405r1或405r2接觸，該遮罩層之該複數個經蝕刻之區域405r1或405r2未與該複數個粒子接觸。該複數個經蝕刻之區域405r1或405r2係經差異性保留。圖4A至4D說明環形(或實質上環形)保留區域。

【0171】保留區域404r1之大小可為例如圖4A所示之環形區域的保留區域之半徑404r1r或直徑404r1d。該複數個保留區域之保留區域404r1的大小可藉由百分比(%)小於該複數個粒子之粒子的大小，該複數個粒子之粒子的大小係諸如圖3A所示之粒子的半徑304r1r或直徑304r1d，其中該複數個粒子之該粒子係於蝕刻之前或該蝕刻程序之後與該保留區域接觸。參照圖4A，該保留區域404r1小於該粒子之百分比(%)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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%、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%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該複數個保留區域之保留區域404r1的大小可藉由百分比(%)大於該複數個粒子之粒子的大小，其中該複數個粒子之該粒子係於該蝕刻程序之後與該保留區域接觸。該保留區域404r1大於該粒子於該蝕刻之後之百分比(%)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1%、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%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

【0172】該蝕刻程序可包含降解該複數個粒子之一個、一或更多個或每一個粒子的一部分。該降解可決定於該平面結構上該複數個結合位置之一個、一或更多個或每一個結合位置的大小，該複數個結合位置之該結合位置對應該複數個保留區域之該保留區域，其中該至少一個粒子係與該平面表面接觸。該降解可決定或影響於該平面結構上該複數個結合位置之2個相鄰結合位置之間的分隔距離420r1。可自該2個相鄰結合位置之最近的邊測量該分隔距離420r1。圖4A所示之該複數個結合位置之2個相鄰結合位

置之間的間距422r1係與圖3A所示之該等粒子的間距322r1相同(或實質上相同)，該間距322r1係由該等粒子之大小決定或受該等粒子之大小影響。該蝕刻程序可包括除去該複數個粒子之任一者或於該蝕刻之後殘留之每個珠的任何部分。

【0173】許多蝕刻方法和蝕刻劑係與本文所揭露者一致。該蝕刻程序可包含電漿蝕刻、反應離子蝕刻(RIE)、電容式RIE、感應式RIE、深度反應離子蝕刻、化學氣相沉積(CVD)、電漿增強CVD (PECVD)或彼等之組合。該蝕刻程序可包含等向性蝕刻、定向性蝕刻、垂直性蝕刻或彼等之組合。該蝕刻程序可包含使用1種氣體或2或更多種氣體之蝕刻，該等氣體選自O_2、CF_4、C_2F_6、C_4F_8、CHF_3、SF_6、NF_3、BCl_3、Cl_2、HBr及Ar。該等氣體可為蝕刻劑。該蝕刻程序可包含使用氧氣、四氟化碳氣體或彼等之組合的蝕刻。該2或更多種氣體之任何2種氣體的比例於不同之實施態樣可為不同。該2或更多種氣體之任何2種氣體的比例可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1:100、1:99、1:98、1:97、1:96、1:95、1:94、1:93、1:92、1:91、1:90、1:89、1:88、1:87、1:86、1:85、1:84、1:83、1:82、1:81、1:80、1:79、1:78、1:77、1:76、1:75、1:74、1:73、1:72、1:71、1:70、1:69、1:68、1:67、1:66、1:65、1:64、1:63、1:62、1:61、1:60、1:59、1:58、1:57、1:56、1:55、1:54、1:53、1:52、1:51、1:50、1:49、1:48、1:47、1:46、1:45、

1:44、1:43、1:42、1:41、1:40、1:39、1:38、1:37、1:36、1:35、1:34、1:33、1:32、1:31、1:30、1:29、1:28、1:27、1:26、1:25、1:24、1:23、1:22、1:21、1:20、1:19、1:18、1:17、1:16、1:15、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、26:1、27:1、28:1、29:1、30:1、31:1、32:1、33:1、34:1、35:1、36:1、37:1、38:1、39:1、40:1、41:1、42:1、43:1、44:1、45:1、46:1、47:1、48:1、49:1、50:1、51:1、52:1、53:1、54:1、55:1、56:1、57:1、58:1、59:1、60:1、61:1、62:1、63:1、64:1、65:1、66:1、67:1、68:1、69:1、70:1、71:1、72:1、73:1、74:1、75:1、76:1、77:1、78:1、79:1、80:1、81:1、82:1、83:1、84:1、85:1、86:1、87:1、88:1、89:1、90:1、91:1、92:1、93:1、94:1、95:1、96:1、97:1、98:1、99:1、100:1或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該2或更多種氣體之任何2種氣體的比例可為約1:100至約100:1。

【0174】可調整該蝕刻程序所使用之任何氣體的質量流速或該蝕刻程序所使用之該2或更多種氣體的全部質量流速。該蝕刻程序所使用之任何氣體的質量流速或該蝕刻程序所使用之該2或更多種氣體的全部質量流速可為、為

約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.1每分鐘的標準立方釐米(sccm)、0.2 sccm、0.3 sccm、0.4 sccm、0.5 sccm、0.6 sccm、0.7 sccm、0.8 sccm、0.9 sccm、1 sccm、2 sccm、3 sccm、4 sccm、5 sccm、6 sccm、7 sccm、8 sccm、9 sccm、10 sccm、11 sccm、12 sccm、13 sccm、14 sccm、15 sccm、16 sccm、17 sccm、18 sccm、19 sccm、20 sccm、21 sccm、22 sccm、23 sccm、24 sccm、25 sccm、26 sccm、27 sccm、28 sccm、29 sccm、30 sccm、31 sccm、32 sccm、33 sccm、34 sccm、35 sccm、36 sccm、37 sccm、38 sccm、39 sccm、40 sccm、41 sccm、42 sccm、43 sccm、44 sccm、45 sccm、46 sccm、47 sccm、48 sccm、49 sccm、50 sccm、51 sccm、52 sccm、53 sccm、54 sccm、55 sccm、56 sccm、57 sccm、58 sccm、59 sccm、60 sccm、61 sccm、62 sccm、63 sccm、64 sccm、65 sccm、66 sccm、67 sccm、68 sccm、69 sccm、70 sccm、71 sccm、72 sccm、73 sccm、74 sccm、75 sccm、76 sccm、77 sccm、78 sccm、79 sccm、80 sccm、81 sccm、82 sccm、83 sccm、84 sccm、85 sccm、86 sccm、87 sccm、88 sccm、89 sccm、90 sccm、91 sccm、92 sccm、93 sccm、94 sccm、95 sccm、96 sccm、97 sccm、98 sccm、99 sccm、100 sccm、120 sccm、130 sccm、140 sccm、150 sccm、160 sccm、170 sccm、180 sccm、190 sccm、200 sccm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該蝕刻程序所使用之任何氣體的質量流速

或該蝕刻程序所使用之該2或更多種氣體的全部質量流速係約1 sccm至約100 sccm。

【0175】該蝕刻程序可包括一或更多個步驟。例如，該蝕刻程序包含實施2或更多個蝕刻步驟。該蝕刻程序可包含實施使用不同之氣體的2或更多個蝕刻步驟。例如，第一蝕刻步驟可使用氧氣且第二蝕刻步驟可使用氧氣和四氟化碳氣體。該蝕刻程序可包含實施2或更多個蝕刻步驟，其中第一蝕刻步驟使用第一氣體且第二蝕刻步驟使用第二氣體。該第一氣體與該第二氣體可為不同。可使用該第一氣體和該第二氣體兩者以實施該第二蝕刻步驟。例如，該第一蝕刻步驟可使用氧氣且該第二蝕刻步驟可使用氧氣和四氟化碳氣體。

【0176】可使用不同的瓦數以實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)。實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)所使用之功率可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1瓦(W)、2 W、3 W、4 W、5 W、6 W、7 W、8 W、9 W、10 W、11 W、12 W、13 W、14 W、15 W、16 W、17 W、18 W、19 W、20 W、21 W、22 W、23 W、24 W、25 W、26 W、27 W、28 W、29 W、30 W、31 W、32 W、33 W、34 W、35 W、36 W、37 W、38 W、39 W、40 W、41 W、42 W、43 W、44 W、45 W、46 W、47 W、48 W、49 W、50 W、51 W、52 W、53 W、54 W、55 W、56 W、57 W、58 W、59 W、60 W、61 W、62 W、63 W、64 W、65 W、66 W、67 W、68 W、69 W、70 W、

71 W、72 W、73 W、74 W、75 W、76 W、77 W、78 W、79 W、80 W、81 W、82 W、83 W、84 W、85 W、86 W、87 W、88 W、89 W、90 W、91 W、92 W、93 W、94 W、95 W、96 W、97 W、98 W、99 W、100 W、110 W、120 W、130 W、140 W、150 W、160 W、170 W、180 W、190 W、200 W或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，於約10 W至約100 W之功率下實施該蝕刻程序。

【0177】可於不同的壓力下實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)。實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)之壓力可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1毫托(mT)、2 mT、3 mT、4 mT、5 mT、6 mT、7 mT、8 mT、9 mT、10 mT、11 mT、12 mT、13 mT、14 mT、15 mT、16 mT、17 mT、18 mT、19 mT、20 mT、21 mT、22 mT、23 mT、24 mT、25 mT、26 mT、27 mT、28 mT、29 mT、30 mT、31 mT、32 mT、33 mT、34 mT、35 mT、36 mT、37 mT、38 mT、39 mT、40 mT、41 mT、42 mT、43 mT、44 mT、45 mT、46 mT、47 mT、48 mT、49 mT、50 mT、51 mT、52 mT、53 mT、54 mT、55 mT、56 mT、57 mT、58 mT、59 mT、60 mT、61 mT、62 mT、63 mT、64 mT、65 mT、66 mT、67 mT、68 mT、69 mT、70 mT、71 mT、72 mT、73 mT、74 mT、75 mT、76 mT、77 mT、78 mT、79 mT、80 mT、81 mT、82 mT、83 mT、84 mT、85 mT、86 mT、87 mT、88 mT、89 mT、90 mT、91 mT、92 mT、93 mT、94 mT、95 mT、96 mT、97

mT、98 mT、99 mT、100 mT、200 mT、300 mT、400 mT、500 mT、600 mT、700 mT、800 mT、900 mT、1000 mT、2000 mT、3000 mT、4000 mT、5000 mT、6000 mT、7000 mT、8000 mT、9000 mT、10000 mT或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，於約1 mT至約5000 mT之壓力下實施該蝕刻程序。

【0178】可於不同的時間期間實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)。實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)可達、達約、達至少、達至少約、達至多或達至多約10秒(secs)、20 secs、30 secs、40 secs、50 secs、1分鐘(min)、2 mins、3 mins、4 mins、5 mins、6 mins、7 mins、8 mins、9 mins、10 mins、11 mins、12 mins、13 mins、14 mins、15 mins、16 mins、17 mins、18 mins、19 mins、20 mins、21 mins、22 mins、23 mins、24 mins、25 mins、26 mins、27 mins、28 mins、29 mins、30 mins、31 mins、32 mins、33 mins、34 mins、35 mins、36 mins、37 mins、38 mins、39 mins、40 mins、41 mins、42 mins、43 mins、44 mins、45 mins、46 mins、47 mins、48 mins、49 mins、50 mins、51 mins、52 mins、53 mins、54 mins、55 mins、56 mins、57 mins、58 mins、59 mins、60 mins或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，可實施該蝕刻程序達約1 min至約10 mins。

【0179】於不同之實施態樣中，可於不同的溫度下實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)。可於為、為

約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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℃、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℃或介於任何2個該等值之間的數或範圍之溫度下實施該蝕刻程序(或該蝕刻程序之任何步驟)。例如，可於約1℃至約20℃之溫度下實施該蝕刻程序。

【0180】該方法可包含除去與經差異性保留之該複數個粒子接觸的該複數個保留區域之該遮罩層。於某些實施態樣中，該複數個經蝕刻之區域可不包含經蝕刻後殘留之物質層和遮罩。可替代地或另外地，該方法可包含鈍化該複數個經蝕刻之區域以產生經鈍化之區域(例如參照圖2A2)。鈍化該複數個經蝕刻之區域可於除去該遮罩層之前發生。該經鈍化之區域可為親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。

結合位置

【0181】該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子遭受蝕刻，藉以例如復現或映現出於該經蝕刻之平面表面上作為結合位置之粒子分佈或構形。參照圖4A至

4D，經該蝕刻程序後，該平面結構可包括結合位置404s1或404s2。該平面結構可包括結合位置404s1 (對應參照圖3A至3D描述之該第一晶格內的該等粒子)之複數個第一區域404r1和結合位置404s2 (對應參照圖3A至3D描述之該第二晶格內的該等粒子)之複數個第二區域404r2。該結合位置404s1之該複數個第一區域404r1與該結合位置404s2之該複數個第二區域404r2係藉由間斷406d分隔。該複數個第一區域404r1之該結合位置404s1和該複數個第二區域404r2之該結合位置404s2係有序的、經充分堆積且具有高密度。如圖4A至4B所示，間斷可不包括結合位置。另一方面，如圖4C至4D所示，間斷可包括一或更多個結合位置406i。與該複數個第一區域404r1之該結合位置404s1和該複數個第二區域404r2之該結合位置404s2相比較，該間斷內之結合位置係較不有序的、較不經充分堆積及/或具有較低密度。

【0182】參照圖4A，於不同之實施態樣中，該複數個結合位置之2個或任2個相鄰結合位置(或活性位置或反應位置或該等結合位置之群落)的間距422r1 (或間隔420r1)可為不同。2個相鄰結合位置(或活性位置或反應位置或該等結合位置之群落)之該間距422r1可為該2個相鄰結合位置之中心之間的距離。2個相鄰結合位置之該間隔420r1可為該2個相鄰結合位置之間的最近的邊之距離。該複數個結合位置之2個或任2個相鄰結合位置之該間距422r1 (或該間隔420r1)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至

多約10奈米(nm)、11 nm、12 nm、13 nm、14 nm、15 nm、16 nm、17 nm、18 nm、19 nm、20 nm、21 nm、22 nm、23 nm、24 nm、25 nm、26 nm、27 nm、28 nm、29 nm、30 nm、31 nm、32 nm、33 nm、34 nm、35 nm、36 nm、37 nm、38 nm、39 nm、40 nm、41 nm、42 nm、43 nm、44 nm、45 nm、46 nm、47 nm、48 nm、49 nm、50 nm、51 nm、52 nm、53 nm、54 nm、55 nm、56 nm、57 nm、58 nm、59 nm、60 nm、61 nm、62 nm、63 nm、64 nm、65 nm、66 nm、67 nm、68 nm、69 nm、70 nm、71 nm、72 nm、73 nm、74 nm、75 nm、76 nm、77 nm、78 nm、79 nm、80 nm、81 nm、82 nm、83 nm、84 nm、85 nm、86 nm、87 nm、88 nm、89 nm、90 nm、91 nm、92 nm、93 nm、94 nm、95 nm、96 nm、97 nm、98 nm、99 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、250 nm、260 nm、270 nm、280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、610 nm、620 nm、630 nm、640 nm、650 nm、660 nm、670 nm、680 nm、690 nm、700 nm、710 nm、720 nm、730 nm、740 nm、750 nm、760

nm、770 nm、780 nm、790 nm、800 nm、810 nm、820 nm、830 nm、840 nm、850 nm、860 nm、870 nm、880 nm、890 nm、900 nm、910 nm、920 nm、930 nm、940 nm、950 nm、960 nm、970 nm、980 nm、990 nm、1000 nm、2微米(μm)、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm、20 μm、30 μm、40 μm、50 μm、60 μm、70 μm、80 μm、90 μm、100 μm、110 μm、120 μm、130 μm、140 μm、150 μm、160 μm、170 μm、180 μm、190 μm、200 μm、210 μm、220 μm、230 μm、240 μm、250 μm、260 μm、270 μm、280 μm、290 μm、300 μm、310 μm、320 μm、330 μm、340 μm、350 μm、360 μm、370 μm、380 μm、390 μm、400 μm、410 μm、420 μm、430 μm、440 μm、450 μm、460 μm、470 μm、480 μm、490 μm、500 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個結合位置之2個或任2個相鄰結合位置之該間距係約1 nm至約100 μm。

【0183】本揭露之方法可達成具有所欲大小之結合位置。可得到該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者之所欲大小(例如半徑404r1r、直徑404r1d、寬度或高度)。該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者之大小可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10奈米(nm)、11 nm、12 nm、13 nm、14 nm、15 nm、16 nm、17 nm、18 nm、19 nm、20 nm、21 nm、22 nm、23 nm、24 nm、25 nm、26 nm、27 nm、28 nm、29 nm、30

nm、31 nm、32 nm、33 nm、34 nm、35 nm、36 nm、37 nm、38 nm、39 nm、40 nm、41 nm、42 nm、43 nm、44 nm、45 nm、46 nm、47 nm、48 nm、49 nm、50 nm、51 nm、52 nm、53 nm、54 nm、55 nm、56 nm、57 nm、58 nm、59 nm、60 nm、61 nm、62 nm、63 nm、64 nm、65 nm、66 nm、67 nm、68 nm、69 nm、70 nm、71 nm、72 nm、73 nm、74 nm、75 nm、76 nm、77 nm、78 nm、79 nm、80 nm、81 nm、82 nm、83 nm、84 nm、85 nm、86 nm、87 nm、88 nm、89 nm、90 nm、91 nm、92 nm、93 nm、94 nm、95 nm、96 nm、97 nm、98 nm、99 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、250 nm、260 nm、270 nm、280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、610 nm、620 nm、630 nm、640 nm、650 nm、660 nm、670 nm、680 nm、690 nm、700 nm、710 nm、720 nm、730 nm、740 nm、750 nm、760 nm、770 nm、780 nm、790 nm、800 nm、810 nm、820 nm、830 nm、840 nm、850 nm、860 nm、870 nm、880 nm、890 nm、900 nm、910 nm、920 nm、930 nm、940

nm、950 nm、960 nm、970 nm、980 nm、990 nm、1000 nm、2微米(μm)、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm、20 μm、30 μm、40 μm、50 μm、60 μm、70 μm、80 μm、90 μm、100 μm、110 μm、120 μm、130 μm、140 μm、150 μm、160 μm、170 μm、180 μm、190 μm、200 μm、210 μm、220 μm、230 μm、240 μm、250 μm、260 μm、270 μm、280 μm、290 μm、300 μm、310 μm、320 μm、330 μm、340 μm、350 μm、360 μm、370 μm、380 μm、390 μm、400 μm、410 μm、420 μm、430 μm、440 μm、450 μm、460 μm、470 μm、480 μm、490 μm、500 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者之大小係約1 nm至約100 μm。

【0184】本揭露考慮多種不同之結合位置形狀。例如，該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者具有環形或圓形。例如，該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者具有橢圓形。例如，該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者具有長方形。例如，該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者具有正方形。其他形狀亦與本文所揭露者一致。

【0185】本揭露之方法於每一平面結構(諸如流通池表面)上可產生高數量之結合位置。該複數個結合位置之結合位置的數量可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、

7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、10,000,000、20,000,000、30,000,000、40,000,000、50,000,000、60,000,000、70,000,000、80,000,000、90,000,000、100,000,000、200,000,000、300,000,000、400,000,000、500,000,000、600,000,000、700,000,000、800,000,000、900,000,000、1,000,000,000個或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個結合位置之結合位置的數量係約10,000個結合位置至約10,000,000個結合位置。

結合位置構形

【0186】可除去介於該等粒子與該平面表面之間的該液體而未實質破壞該液體內之粒子構形。該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子遭受蝕刻，藉以例如復現或映現出於該經蝕刻之平面表面上作為結合位置之粒子分佈或構形。於是，該結合位置構形可映現出(例如相同或實質上相同之)粒子構形。例如，該等結合位置可具有(或可被描述為使用或具有)參照圖3A至3D所示之該等粒子的六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形。

【0187】參照圖4A至4D，該複數個第一區域404r1可

特定該平面結構上之該複數個結合位置(或活性位置或反應位置) 404s1。該複數個第一區域404r1如同第一晶格可為有序的或於規則結合位置陣列之第一區域402r1。該複數個第一區域404r1可包含(或特定)於該平面結構上之該複數個結合位置404s1。該複數個第二區域404r2如同第二晶格可為有序的或於規則結合位置陣列之第二區域402r2。該複數個第二區域404r2可特定於該平面結構上之該複數個結合位置404s2。該複數個第一區域404r1 (和特定之該結合位置404s1)可藉由間斷406d與該複數個第二區域404r2(和特定之該結合位置404s2)分隔。

【0188】參照圖4A，該等結合位置可具有(或可被描述為使用或具有)六角構形408h1。該複數個第一區域404r1可包含該複數個結合位置之7個第一結合位置的第一子集，該第一子集經構形呈第1六角形410h1之6個頂點和中心。該複數個第二區域404r2可包含(或特定)該複數個結合位置之7個第二結合位置的第二子集，該第二子集經構形呈第2六角形410h2之6個頂點和中心。該第1六角形410h1與該第2六角形410h2可不共有邊。該第1六角形410h1與該第2六角形410h2可具有相同之位向，使得該第1六角形與該第2六角形係藉由移位而非旋轉相關。該第1六角形410h1與該第2六角形410h2可具有不同之位向，使得如圖4A所示，該第1六角形與該第2六角形係藉由旋轉(和移位)相關。六角構形內之六角形可共有邊。不同的六角構形內之六角形可不共有邊。六角構形內之六角形可為全

等(例如具有相同大小和形狀)。不同的六角構形內之六角形可為全等(例如具有相同大小和形狀)或不同。不同的六角構形內之六角形可藉由旋轉(和移位)為相關。不同的六角構形內之六角形可藉由移位(非旋轉)為相關，使得該等六角形具有相同之位向。具有六角構形之結合位置可呈經緊密堆積、充分分隔及以所產生的非預定之方式排列。

【0189】參照圖4B，該等結合位置可具有(或可被描述為使用或具有)等邊三角形構形408t1或408t2。該複數個第一區域404r1可包含(或特定)該複數個結合位置404s1之3個第一結合位置的第一子集，該等結合位置經構形呈第1等邊三角形410t1之3個頂點。該複數個第二區域404r2可包含該複數個結合位置404s2之3個第二結合位置的第二子集，該等結合位置經構形呈第2等邊三角形410t2之3個頂點。該第1等邊三角形410t1與該第2等邊三角形410t2可不共有邊。如圖4B所示，該第1等邊三角形410t1與該第2等邊三角形410t2可為全等(例如具有相同大小和形狀)。該第1等邊三角形410t1與該第2等邊三角形410t2可具有相同之位向，使得該第1等邊三角形與該第2等邊三角形係藉由移位(非旋轉)而相關。該第1等邊三角形410t1與該第2等邊三角形410t2可藉由旋轉(和移位)為相關。如圖4B所示，該第1等邊三角形410t1與該第2等邊三角形410t2可具有不同之位向。於等邊三角形構形之該等等邊三角形可共有邊。於不同的等邊三角形構形之該等等邊三角形可不共有邊。於等邊三角形構形之該等等邊三角形可為全等(例如具有

相同大小和形狀)。等邊三角形構形可包括等邊三角形之2個子集。於每一子集之等邊三角形可藉由移位(非旋轉)為相關。該2個子集之間的等邊三角形係藉由旋轉180°(和移位)而相關。於不同的等邊三角形構形之該等等邊三角形可為全等(例如具有相同大小和形狀)或不同。如圖4B所示，於不同的等邊三角形構形之該等等邊三角形可藉由旋轉(和移位)為相關。於不同的等邊三角形構形之該等等邊三角形可藉由移位(非旋轉)為相關，使得該等等邊三角形對等邊三角形之對應子集具有相同之位向。具有等邊三角形構形之粒子可呈經緊密堆積、充分分隔及以非預定之方式排列。

【0190】參照圖4C，該等結合位置可具有(或可被描述為使用或具有)直線構形408s1或408s2。於該蝕刻程序後，於該平面結構上之該複數個第一區域404r1可包含該複數個結合位置404s1之2個相鄰第一結合位置。該複數個第二區域404r2可包含該複數個結合位置404s2之2個相鄰第二結合位置。該2個相鄰第一結合位置之間所畫的第一直線410s1與該2個相鄰第二結合位置之間所畫的第二直線410s2具有相同之方向/係平行。該第一直線410s1與該第二直線410s2可相交呈一角度，該角度係60°之整數倍。該第一直線410s1與該第二直線410s2可具有不同之方向。該第一直線與該第二直線可藉由旋轉(和移位)而非旋轉60°之整數倍為相關。於不同的直線構形之該等直線可呈平行，使得該等直線係藉由旋轉(和移位)而相關。於不同的直線構

形之該等直線可藉由移位(非旋轉)為相關，使得該等直線具有相同之方向。具有直線構形之粒子可呈經緊密堆積、充分分隔及以非預定之方式排列。

【0191】參照圖4D，該等結合位置可具有(或可被描述為使用或具有)線性構形。該複數個第一區域404r1可包含該複數個結合位置404s1之第一結合位置，該等第一結合位置經排列呈第一結合位置之複數個第一列410*l*1。於該複數個第一列410*l*1之每個第一列的第一結合位置404s1可經排列呈第一線性構形408*l*1，使得於該第一列之第一結合位置係與相鄰該第一列之第一結合位置的2個第一結合位置接觸。非為位於該第一列之末端的第一結合位置之每個第一結合位置係與相鄰該第一列之第一結合位置的2個第一結合位置接觸。2個相鄰第一列410*l*1可藉由於該第一線性構形之第一方向414d1的第一偏距412o1偏位。該偏距412o1可超過該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之粒子的直徑，諸如該粒子的半徑乘以3之平方根。該2個相鄰第一列410*l*1可藉由該第一線性構形之第二偏距416o1(例如於該第一線性構形之第二方向418d1上的該複數個粒子之粒子的直徑)偏位。該第一線性構形之該第二方向418d1可與該第一線性構形之該第一方向414d1垂直。於一第一列之第一粒子可與相鄰第一列之2個相鄰第一粒子接觸。

【0192】該複數個第二區域404r2可包含排列於第二結合位置之複數個第二列410*l*2的該複數個結合位置之第

二結合位置404s2。於該複數個第二列410*l*2之每個第二列的第二結合位置404s2可排列呈第二線性構形408*l*2，使得於該第二列之第二結合位置係與相鄰該第二列之第二結合位置之2個第二結合位置接觸。非為位於該第二列之末端的第二結合位置之每個第二結合位置係與相鄰該第二列之第二結合位置的2個第二結合位置接觸。2個相鄰第二列410*l*2可藉由於該第二線性構形之第一方向424d2的第一偏距412o2偏位。該偏距412o2可超過該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之粒子的直徑，諸如該粒子的半徑乘以3之平方根。該2個相鄰第二列可藉由該第二線性構形之第二偏距416o2(例如於該第二線性構形之第二方向418d2上的該複數個粒子之粒子的直徑)偏位。該第二線性構形之該第二方向418d2可與該第二線性構形之該第一方向414d2垂直。於一第二列之第二粒子可與相鄰第二列之2個相鄰第二粒子接觸。具有線性構形之粒子可呈經緊密堆積、充分分隔及以非預定之方式排列。

【0193】該第一線性構形之該第一偏距412o1與該第二線性構形之該第一偏距412o2可為相同或彼此落入1個百分比。該第一線性構形之該第二偏距416o1與該第二線性構形之該第二偏距416o2可為相同或彼此落入1或更多個百分比。於不同之實施態樣，該百分比可為不同。該百分比可為、約、至少、至多或至多約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%、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%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

【0194】參照該第一線性構形408*l*1和該第二線性構形408*l*2之一或更多個參數可為相同或不同。該第一線性構形408*l*1與該第二線性構形408*l*2可為不同(或相同)，例如參照該等線性構形所描述之某些或所有參數。該等線性構形之位向可為不同(或相同)。該第一線性構形之該第一方向414d1與該第二線性構形之該第一方向414d2可為不同(或相同)。該第一線性構形之該第二方向418d1與該第二線性構形之該第二方向418d2可為不同(或相同)。該第一線性構形之該第一方向414d1與該第二方向418d1之組合與該第二線性構形之該第一方向414d2與該第二方向418d2之組合可為不同(或相同)。例如，由該第一線性構形之該第一方向414d1與該第二方向418d1交叉所形成之第一角與由該第二線性構形之該第一方向414d2與該第二方向418d2交叉所形成之第二角係藉由旋轉(和移位)而彼此相關。

【0195】該複數個結合位置可包含於晶格或不規則陣列內之該複數個結合位置的結合位置之子集。藉由具有多分散性之粒子(例如具有2種不同大小之粒子)可產生結合位置之不規則陣列。於該蝕刻步驟之前，當於該液體之表面形成粒子之不規則陣列(或粒子之不規則陣列沉積於該

平面結構上)時，可產生結合位置之不規則陣列。不規則陣列可由例如存在於該液體之表面及/或沉積於該平面結構的具有2種不同大小之粒子的混合物產生。圖8顯示使用(珠數量)比例為2:5之具有直徑0.8 μm的珠與具有直徑1.0 μm的珠所產生之結合位置。該等結合位置係經不規則排列，其表示該等結合位置具有非規則之間距。如圖8所示，典型的六角形格柵(圖8；最左格)不與該等結合位置對準或不與該等結合位置之中心對準(圖8；最右格)。該典型的六角形格柵代表六角構形。圖9A顯示位點密度對無序非顯著敏感。無序的表面顯示自完整有序的陣列至多10至15%減少。圖9B顯示由直徑1.0 μm之珠的單分散性、呈1:10比例的直徑0.8 μm之珠與直徑1.0 μm之珠的多分散性及呈2:5比例的直徑0.8 μm之珠與直徑1.0 μm之珠的多分散性所產生之陣列不規則性。

【0196】該複數個結合位置可包含於晶格(例如第一晶格和第二晶格)或不規則陣列(例如第一不規則陣列和第二不規則陣列)內之該複數個結合位置之結合位置的2個子集(或群)。該2個晶格(或不規則陣列)可經間斷隔開。晶格與不規則陣列可藉由間斷隔開。於某些實施態樣中，晶格係呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合。不呈六角構形之結合位置表示該等結合位置不能對準六角形格柵(例如圖4A所示之六角形格柵)。不呈等邊三角形構形之結合位置表示該等結合位置不能對準三角形格柵(例如圖4B所示之三角形格柵)。不呈線性構形之

結合位置表示該等結合位置不能對準線性格柵(例如圖4C所示之線性格柵)。不呈直線構形之結合位置表示該等結合位置不能對準直線格柵(例如圖4D所示之直線格柵)。於某些實施態樣中，不規則陣列不包含於六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合的結合位置。不規則陣列可不包含於六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合內彼此位於至少閾值距離內的粒子。該閾值距離可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。2個流通池表面可共有全等之結合位置構形，若於該2個流通池表面之每一者上該等構形包含該等結合位置之至多1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%或超過10%。

【0197】介於1個結合位置與2個鄰近(或相鄰)結合位置之間的間距可為不同。例如，於直線(或實質上直線)上之3個連續的結合位置可於2對連續的結合位置之間具有不同的間距。中間結合位置與一個鄰近結合位置之間的間距與該中間結合位置與另一個鄰近結合位置之間的間距可為不同。例如，結合位置可具有多個鄰近結合位置(例如2、3、4、5或6個鄰近結合位置)。該結合位置與2個(或3、

4、5或6個)鄰近結合位置之間的間距可不同地為、約、至少、至少約、至多或至多約例如0.01 μm、0.02 μm、0.03 μm、0.04 μm、0.05 μm、0.06 μm、0.07 μm、0.08 μm、0.09 μm、0.1 μm、0.11 μm、0.12 μm、0.13 μm、0.14 μm、0.15 μm、0.16 μm、0.17 μm、0.18 μm、0.19 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或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

【0198】本揭露提供之流通池表面可包含藉由間斷隔開之複數個結合位置。該等結合位置及/或該等間斷可位於非預定之位置。該等結合位置及/或該等間斷可為有序、可為不規則分佈及/或可為隨機分佈。於某些情況下，該等結合位置之構形可非預定。該等間斷可位於非預定之位置。該等間斷(包括任何其中之結合位置)可呈不規則分佈及/或可呈隨機分佈。該複數個結合位置之結合位置可位於非預定之位置。該等結合位置可為有序、不規則分佈(或排列)及/或隨機分佈(或排列)。於某些情況下，該複數個結合位置可包含藉由間斷隔開之第一複數個結合位置和第二複數個結合位置。該間斷之位置、大小及/或形狀可非預定。該間斷可經隨機分佈。該第一複數個結合位置及/或該第二複數個結合位置之結合位置可位於非預定、可為有序、可為不規則分佈及/或可為隨機分佈之位置。結合位置之子集可具有非預定之構形。構形可包含該結合位置之子集的結合位置之數量及/或該結合位置之子集的結合位置之位置。第一結合位置子集與第二結合位置

子集可具有不同(或相同)之構形。

無序

【0199】關於所生成之結構的秩序，本文所描述之膠態方法與傳統之由上而下奈米製造方法存有主要差異。儘管能於表面上達幾乎最大堆積密度且顯現說明性秩序，但是經數學產生之格柵或晶格不能擬合藉由使用本文所描述之方法所產生的表面上之位點圖案，且根據該晶格之原點不能外推該表面上之任何位點的座標。圖8顯示套疊經數學產生之座標格柵以評估晶體微結構的有序程度之方法，該座標格柵描繪於具有假定之高結晶度和秩序的晶體之一部分的掃描式電子顯微鏡(SEM)影像上具有晶格常數為1 μm之六角緊密堆積晶格。使用數學模型呈假定之微球的1 μm聚苯乙烯，該結晶陣列係經自行組裝。該墊之結晶陣列與該典型之六角形格柵即使於遠離該2者格柵之假定的原點約5 μm之範圍仍顯現顯著之錯配。與自下而上製造策略(諸如自行組裝)有關之固有隨機性表示缺陷存在於所生成之結晶結構中，該缺陷偏離任何預測之長或短範圍秩序。

【0200】為控制表面上DNA叢聚之密度，該墊之秩序可經調整。為偏離長範圍且高度有序之結晶，包括空位、晶格錯配、錯位及晶粒界之缺陷的密度必須增加，該缺陷的密度將直接影響個別晶體之大小和整體樣品之結構和秩序。存有不同之策略以增加結晶之缺陷和瑕疵：

【0201】(1)於結晶程序中，使用聚苯乙烯微/毫微球(1 μm和800 nm聚苯乙烯珠)之二元混合物替代珠(僅1 μm微球)之單分散懸浮液以進行自行組裝，藉以產生高密度之缺陷和因此高度無序之結晶結構。增加取代珠(800 nm毫微球)之濃度抑制長範圍秩序並產生較小之晶體。

【0202】(2)於該珠懸浮液中增加包括乙醇和異丁醇之擴展劑的濃度以干擾珠於該液體-空氣界面之自行組裝程序。該干擾於形成良好之結晶結構上係顯著的，該良好之結晶結構具有廣大小範圍的極小之結晶。

【0203】(3)藉由溶解界面活性劑(十二烷基硫酸鈉和Tween)、聚乙二醇、蔗糖、尿素及聚丙烯酸於亞相中亦可干擾珠之自行組裝。該等反應劑作為阻礙長範圍自行組裝和結晶之污染物。藉由較強之酸和鹼調整該浴之pH亦影響該液體-空氣界面之珠轉移，該珠轉移改變隨後之結晶的秩序程度。

【0204】(4)於自行組裝和結晶期間之該液體-空氣界面的最小擾亂係達成長範圍秩序之主要要求。因此，結晶波前之控制性中斷可管控結晶之缺陷密度。具有多重注射點(以替代一個)。

結合位置層

【0205】於該方法之任何步驟(諸如沉積該複數個珠和該蝕刻程序)之前，該平面結構、該結合位置層及/或該遮罩層經常係一致的(或實質上一致的)。於沉積該複數個

珠或該蝕刻程序之前，該平面結構可為一致的。於沉積該複數個珠和該蝕刻程序之前，該結合位置層(或物質層、反應位置層或活性位置層)可為一致的。於沉積該複數個珠或該蝕刻程序之前，該遮罩層可為一致的。

結合位置功能化

【0206】該結合位置層(或物質層、反應位置層或活性位置層)可功能化該平面結構。該經功能化之平面結構可用於定序，其包括次世代定序。例如，該結合位置可包含用於捕獲emPCR珠之胺基矽烷。該結合位置層可包含丙烯酸酯官能性矽烷、醛官能性矽烷、胺基官能性矽烷、酐官能性矽烷、疊氮化物官能性矽烷、羧酸酯官能性矽烷、膦酸酯官能性矽烷、磺酸酯官能性矽烷、環氧基官能性矽烷、硫醇官能性矽烷、酯官能性矽烷、乙烯基官能性矽烷、烯烴官能性矽烷、鹵素官能性矽烷、雙叉鏈矽烷或彼等之組合。於某些實施態樣中，該結合位置層包含胺基矽烷、環氧丙氧基矽烷、巰基矽烷或彼等之組合。胺基矽烷可為(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。環氧丙氧基矽烷可為(3-環氧丙氧基丙基)-二甲基-乙氧基矽烷。巰基矽烷可為(3-巰基丙基)-三甲氧基矽烷或(3-巰基丙基)-甲基-二甲氧基矽烷。於某些實施態樣中，該結合位置層包含胺基矽烷。該結合位置層可為親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼

等之組合。該結合位置層可包含用於共價連結之官能基，諸如能參與該點擊化學反應之官能基。該結合位置層可用於連結生物分子至結構化表面之結合位置，其中該生物分子本身結合DNA瓦、多聯體或其他核酸。該生物分子可為親和性生物分子，該親和性生物分子特異性結合存在於該DNA瓦、多聯體或其他核酸上之親和性伴。例如，該生物分子可為生物素，其中該親和性伴係抗生物素蛋白(例如卵白素)，或該生物分子可為抗生物素蛋白(例如卵白素)，其中該親和性伴係生物素。可替代地，該生物分子可為寡核苷酸，該寡核苷酸特異性雜交該DNA瓦、多聯體或其他核酸。例如，該寡核苷酸可為引子，諸如允許自該表面進行滾環擴增以形成共價連接多聯體之夾引子。該結合位置可結合中間體核酸(諸如DNA瓦)，該中間體核酸進而結合該核酸(例如待定序之核酸，諸如多聯體)。該中間體核酸可具有一或更多個與該結合位置連結之連結點且可藉由親和性、雜交或共價與該結合位置結合。該中間體核酸可與該待定序之核酸雜交或可具有與該待定序之核酸結合之官能基。本文描述之表面化學可用於連結該生物分子至結構化表面之結合位置。如此，本申請案之流通池可包含具有上述特徵之一者或組合的結合位置。

共價表面化學

【0207】為於該表面(諸如結構化表面之結合位置)上捕獲並固定DNA叢聚，可使用該表面和該叢聚上之互補性

官能基以使該表面與該叢聚共價連結。可使用化學氣相沉積(CVD)，諸如電漿增強化學氣相沉積(PECVD)，以使未積垢骨架嫁接高度分支之聚合性薄膜。於起泡器中且於升高溫度(50至150℃)和低壓(10至200 mTorr)下，令包括醇、環氧丙醇及縮水甘油醚之單體溶液蒸發並將蒸汽注入室以作為前體。隨後藉由施加呈連續和脈衝型式之射頻(RF)以自該前體產生電漿環境。藉由調整控制電漿條件之參數，其包括RF源(連續相對脈衝)、RF功率、脈衝頻率、製程壓力、前體濃度、溫度和流速及基材溫度，可控制於該聚合性薄膜上之聚合和末端官能基。直接自PECVD製程獲得包括羥基、羧基、胺及環氧化物之官能基。通過包括對甲苯磺醯基、甲磺酸酯基及三氟甲磺酸酯基之取代的浴轉化化學，藉由PECVD達成之官能化表面被轉化為其他官能基，其包括MTZ、TCO、硫醇、順丁烯二醯亞胺、疊氮化物及DBCO。例如使用環氧氯丙烷之隨後氣相處理該聚合性薄膜亦用於改變官能基。可替代地，可自該CVD/PECVD製程出現直接官能化捕獲表面。於另一方法中，使用矽烷化學將表面官能基嫁接於該基材表面上。令官能化矽烷前體與玻璃基材上經活化之矽烷醇反應並於該表面上提供官能基。使用氣相化學氣相沉積(CVD)和浴製程兩者以進行矽烷化學。該CVD製程與已被描述之該PECVD製程極為相似。將前體(典型上矽烷-間隔子-官能基或單體溶液)導入至於低壓(30至250 mTorr)和高溫(50至250℃)下經置入呈蒸汽形式之樣品的室。將所欲之官能基

嫁接至具有短聚合性骨架之該表面上。藉由調整製程參數以制定該表面之官能基密度，藉以調整該基材表面上之共價DNA叢聚捕獲和固定化。

【0208】可製備固體表面(下文稱為捕獲表面)以藉由多種不同之方法使能共價捕獲感興趣之生物分子，該等方法包括於該捕獲表面安裝“點擊”化學反應伴、安裝具有可誘導之反應性的基團(例如經光活化之捕獲基團)或此等方法與使該感興趣之生物分子接近用於共價捕獲之反應基團(例如互補性DNA捕獲探針或親和性相互作用伴，諸如抗體交互作用或生物素-抗生物素蛋白交互作用)的特徵之組合。若感興趣之生物分子係經點擊化學基團標記，則該等基團可特異地與具有共軛反應伴之捕獲表面反應。可替代地，捕獲表面可藉由經光誘導之交聯劑(諸如補骨脂素)或可經化學誘導之交聯劑(諸如於適當之氧化劑(諸如N-溴琥珀醯亞胺)的存在下經氧化之懸垂呋喃)非特異地捕獲生物分子。當經由例如互補性DNA之鹼基配對、廣泛氫鍵結及/或親和性結合交互作用誘導交聯反應時，藉由接近該感興趣之生物分子可改善該等非特異性交聯反應之效率。藉由數種塗覆方法(其包括浸塗、化學氣相沉積、電漿增強化學氣相沉積及/或自適當之官能化聚合物嫁接或嫁接至適當之官能化聚合物)，可製備共價捕獲表面。藉由矽烷浸塗所製備之表面的例示性圖式可參見所附圖式中3者，且薄電漿聚合之水凝膠表面的例示性圖式可參見所附圖式中4者，該二者皆經代表性點擊化學反應伴甲基四嗪功能

化。

填隙化學

【0209】經該蝕刻步驟後，介於該等聚苯乙烯珠(亦稱為空隙)之間的區域上的該聚合物遮罩層係經除去且下層之無遮蔽的玻璃暴露。為使DNA與玻璃之間的不利之交互作用最小化，可使用PECVD使該等空隙經薄聚合物膜塗覆。可使用單體(其包括醇、環氧丙醇及縮水甘油醚)以嫁接經交聯之薄膜於玻璃上。調整製程參數以得到包括羥基和羧基之親水性官能基。藉由調整PECVD製程參數，可保留其他官能基以維持該等空隙作為活性表面。此種製造策略能於結構化表面上呈現特定之表面化學。可使用其他塗覆(例如無機塗覆)以替代薄聚合物膜。

【0210】為進一步利用二元性表面化學，於諸如無遮蔽的玻璃之表面經該遮罩層塗覆並經蝕刻後，使用氣相CVD和PECVD製程使所欲之鈍化化學(例如防止核酸結合之基團，諸如聚合物)嫁接於該等空隙，同時該等珠防止嫁接於未來之結合位置。於空隙官能化並隨後除去聚合物遮罩層且暴露無遮蔽的玻璃後，使用第二個CVD製程以嫁接DNA共價捕獲所需要之活性化學於結構化墊上。雖然該等空隙經設計係呈鈍化，但是可使用進一步之浴功能化以轉化該等空隙為用於其他化學製程之化學活性部分。通常，該空隙空間可與聚合物(諸如親水性聚合物，諸如PEG)鍵結，該聚合物防止於該製程或其他製程中核酸之結

合。

核酸

【0211】該複數個結合位置可用於次世代定序，諸如合成式定序或結合式定序。如此，本文描述之方法可進一步包括核酸(例如多聯體，諸如RCA產物)之定序，該多聯體(諸如RCA產物)係直接或間接地鍵結於本文描述之表面。本揭露之方法可包括遞送複數個核酸至該複數個結合位置。該複數個核酸之每一者可被遞送至該複數個結合位置之不同的結合位置。該複數個核酸包含至少一個多聯體(或串聯的核酸)。該複數個核酸可為DNA摺疊。該DNA摺疊可為DNA瓦。該複數個核酸可被分佈於複數個珠，諸如乳糜化PCR珠。該複數個核酸之每一者可被分佈至該複數個珠之不同的珠。

【0212】串聯的核酸於次世代之用途業已描述於2020年3月3日提出申請之標題為“用於定序雙股核酸之方法和組成物”的美國臨時申請案號62/984,438，該申請案之全部內容併入本文作為參考。簡言之，當用於參照核酸分子時，術語“多聯體”表示含有經系列連接之共同序列的多個複製之連續核酸分子。相似地，當用於參照核苷酸序列時，術語“多聯體”表示含有經系列連接之共同序列的多個複製之連續核苷酸序列。該序列之每一複製可被稱為該多聯體之“序列單位”。序列單位可具有至少10個鹼基、50個鹼基、100個鹼基、250個鹼基、500個鹼基或更多鹼基之

長度。多聯體可包括至少2、5、10、50、100或更多個序列單位。序列單位可包括多種不同功能的任一者之亞區，諸如引子結合區、標的序列區、標籤區、獨特分子標記(UMI)或類似者。使用多聯體以實施次世代定序之方法可包括：(a)提供連接固體撐體之核酸叢聚，其中該核酸叢聚包括多聯體之有義股和該多聯體之反義股，其中該多聯體包括經系列連接之序列單位的多個複製，其中該序列單位包括標的序列和引子結合位置。該方法可包括：(b)令引子與該叢聚中該反義股之序列單位的引子結合位置雜交；和(c)沿該反義股延伸該引子以自該反義股之標的序列的至少一部分決定該序列。另外地，該方法可包括：(d)令第二引子與該有義股之序列單位的引子結合位置雜交；和(e)沿該有義股延伸該第二引子以自該有義股之標的序列的至少一部分決定該序列。多聯體可包含有義股，該有義股可選擇性地與一或更多個反義股雜交。例如，當使用滾環擴增以產生多聯體(即具有有義股)時，引子可與該多聯體雜交且於多個股替代擴增中被延伸，該多個股替代擴增產生包含多個反義股之多聯體，該多個反義股係至少部分與該有義股雜交。

【0213】於不同之實施態樣中，包含該複數個核酸之至少一個核酸(或該複數個珠之至少一珠)的該複數個結合位置之百分比(%)可為不同。包含該複數個核酸之至少一個核酸(或該複數個珠之至少一珠)的該複數個結合位置之百分比(%)為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至

多約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%、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%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個結合位置之至少50%包含該複數個核酸之至少一個核酸及/或該複數個珠之至少一珠。

【0214】次世代定序可包括於該複數個結合位置實施聚落形成，諸如橋式放大或滾環擴增。次世代定序可包括遞送激發能至至少某些該等結合位置。次世代定序可包括自至少某些該等結合位置收集發射能。雖然參照次世代定序該結合位置之應用已被描述，但是該參照僅係說明性且不欲為限制。

【0215】可替代地或另外地，可於溶液中或於該複數個位置實施滾環擴增(RCA)。例如，可使用與該複數個結合位置之一者、一或更多者或每一者連接之擴增引子(或夾引子)於該複數個結合位置實施滾環擴增(參閱圖12說

明)。圖12比較於具有活性化學(例如具有連接結合位置之擴增引子)的結合位置和隨機地於具有活性化學的流通池表面之滾環擴增(RCA)。於該等結合位置所生成之擴增產物可呈規則地或不規則地排列。當於溶液中實施RCA時，所生成之多聯體(RCA產物)可隨後與本文描述之結合位置鍵結。

【0216】該擴增引子(或該夾引子)可連接該結合位置。該擴增引子(或該夾引子)可包含能參與點擊化學反應之第一官能部分。該第一官能部分可包含例如甲基四嗪(MTz)。該物質層可包含能參與該點擊化學反應之第二官能部分。該第二官能部分可包含反式環辛烯(TCO)。該擴增引子或該夾引子可經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應連接該結合位置。滾環產物可共價連接固體表面(例如本文描述之流通池的結合位置)，藉以多種不同之方式進行定序。於滾環擴增中慣常使用高度前進性DNA聚合酶Phi29以進行擴增且已知於擴增期間些許允許併入鹼基經修飾之非天然核苷酸。該擴增反應所包括之天然核苷酸與具有鹼基修飾之核苷酸的混合物將使滾環產物於該滾環產物之整體結構中具有某些隨機併入的經修飾之核苷酸。若該核苷酸修飾係例如屬於點擊化學反應家族之基團(例如疊氮化物、應變不飽和環(諸如反式環辛烯(TCO)或二苯並環辛炔(DBCO))、任何烯或炔、硫醇等)，則可使用該滾環產物內之隨機鹼基的此等懸垂修飾與經適當共軛之固體表面反應。可替代地，滾環產物可同

樣地經鹼基修飾之核苷酸修飾，該鹼基修飾之核苷酸藉由使用某些聚合酶(著名地包括末端去氧核苷酸轉移酶(TdT))之非尋常活性能共價連結以進行非模板之3’延伸。已知TdT於該核苷酸修飾極具允許性而能併入核苷酸於DNA之自由3’端。感興趣之核苷酸修飾係如同上述者，例如疊氮化物、應變不飽和環(諸如反式環辛烯(TCO)或二苯並環辛炔(DBCO))、任何烯或炔、硫醇等。此將產生經修飾之核苷酸，該經修飾之核苷酸僅被併入該滾環產物之3’端。該等經修飾之核苷酸可被共價地固定於經對給定之反應基團的共軛反應伴所製備之任何表面。如此，RCA可用於併入經官能化以結合本文描述之流通池的結合位置之核苷酸，使得所生成之多聯體可經沉積。

【0217】於某些實施態樣中，該點擊化學反應包含經銅催化之疊氮化物-炔環加成反應(CuAAC)。共價連接可包含三唑基。該CuAAC可包含Cu(I)安定化配體。該Cu(I)安定化配體可選自下述者：3-[4-({雙[(1-三級丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺基}甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]丙醇(BTTP)、硫酸氫3-[4-({雙[(1-三級丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺基}甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]丙酯(BTTPS)、硫酸氫2-[4-({雙[(1-三級丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺基}甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]乙酯(BTTES)、2-[4-{(雙[(1-三級丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]胺基)甲基}-1H-1,2,3-三唑-1-基]-乙酸(BTTAA)、紅菲咯啉二磺酸二鈉鹽(BPS)、N,N,N′,N′′,N′′-五甲基二乙烯三胺(PMDETA)、三-

((1-苄基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基)胺(TBTA)、三(3-羥基丙基三唑基甲基)胺(THPTA)、Nε-((1R,2R)-2-疊氮基環戊氧基)羰基)-L-離胺酸(ACPK)及4-N,N-二甲基胺基-1,8-萘二甲醯亞胺(4-DMN)。

【0218】於某些實施態樣中，該點擊化學反應包含應變促進的疊氮化物-炔環加成反應(SPAAC)。共價連接可包含環辛-三唑基。於某些實施態樣中，該點擊化學反應包含炔硫氫化。共價連接可包含硫化烯基。於某些實施態樣中，該點擊化學反應包含烯硫氫化。共價連接可包含硫化烷基。於某些實施態樣中，該點擊化學反應包含應變促進的炔-硝酮環加成反應(SPANC)。共價連接可包含八氫環辛-異噁唑基。該環辛炔基可為二苄基環辛炔(DBCO)或其衍生物。於某些實施態樣中，該點擊化學反應係生物相容的。

【0219】於某些實施態樣中，複數個DNA瓦可經遞送至該複數個結合位置(參閱圖14說明)。該複數個結合位置之每一者可包含該複數個DNA瓦之至多1個DNA瓦。該複數個結合位置之2個結合位置可包含該複數個DNA瓦之2個不同的DNA瓦。該複數個DNA瓦之一或更多個DNA瓦的每一者可包含擴增引子(或夾引子)。藉由使用複數個模板核酸作為模板以延伸與該2或更多個DNA瓦之每一者連接的該擴增引子(或該夾引子)，該方法可包含於該複數個結合位置進一步實施滾環擴增(RCA)。該滾環擴增可於該等結合位置實施。

【0220】可替代地或另外地，滾環擴增(RCA)可於溶液實施(參閱圖11說明)且擴增產物係經遞送至該複數個結合位置(參閱圖12說明)。於某些方面，RCA可併入經官能化以結合該結合位置之核苷酸。該核苷酸可藉由諸如點擊化學經官能化以進行共價結合(例如為5-DBCO-PEG4-dUTP或5-TCO-PEG4-dUTP之核苷酸)。該複數個結合位置之每一者可包含至多1個擴增產物。該複數個結合位置之2個結合位置可包含2個不同的擴增產物。於遞送該複數個核酸至該複數個結合位置之前，該滾環擴增可包含使用複數個模板核酸作為模板以延伸擴增引子(或夾引子)，藉以產生該複數個核酸。該擴增引子(或該夾引子)可為DNA瓦之一部分。

連續活性化學

【0221】DNA叢聚係形成或捕獲於且隨機地固定於連續官能化表面，該連續官能化表面構成用於定序極接近之叢聚的主要障礙。藉由創造捕獲和擴增庫或共價固定化DNA叢聚所需要之活性化學墊，本文揭露之方法提供針對該關鍵問題之解決方案。因為藉由自行組裝之聚苯乙烯珠的遮光罩製造該墊，依據DNA叢聚大小可調整該墊之中心至中心的平均距離和平均墊直徑以確保該表面之DNA特徵間的最小距離。DNA叢聚僅可存在於指定之該活性化學墊且不存在於該等墊之間的空隙(圖12)。

流通池表面

【0222】本揭露包括流通池表面之實施態樣。使用本文揭露之任何方法可產生該流通池表面。與由上而下微影蝕刻相比較，使用本文描述之粒子的膠態自行組裝(自下而上)可產生該流通池表面。於某些實施態樣中，該流通池表面包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置(或反應位置或活性位置)。該複數個結合位置之每一者可呈環形、圓形、橢圓形、長方形或正方形。本揭露亦考慮其他形狀。該複數個結合位置之每一者可具有中心點和直徑。於某些情況下，該流通池表面包括藉由間斷(例如5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多個間斷)隔開的至少10,000個有序、充分堆積及/或高密度之結合位置的複數個結合位置，該等間斷係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。可替代地或另外地，該流通池表面含有藉由間斷隔開的至少10,000個有序、充分堆積及/或高密度之結合位置的複數個結合位置。該等有序之結合位置及/或該等間斷的構形可為非預定及/或可為隨機分佈(或排列)。於某些情況下，該流通池表面包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置。該複數個結合位置可包括藉由間斷隔開的第一複數個有序之結合位置和第二複數個有序之結合位置，該間斷係非預定及/或係經隨機分佈或排列(參閱例如圖4A至4D)。該第一複數個有序之結合位置的第一構形與該第二複數個有序之結合位置的第二構形可為不同(參閱例如圖4A至4D)或相同。於流通池表面上之結合位置可為

有序、充分堆積及/或具有高密度。於該流通池表面上之該等結合位置的位置(或區位)可為隨機且非預定。於該流通池表面上之該等間斷的大小和區位可為隨機且非預定。

【0223】本揭露之不同實施態樣考量任何2個鄰近結合位置之間的不同間隔或間距。由第一結合位置之中心至最近之鄰近結合位置之中心所測量的任何結合位置與任何最近之鄰近結合位置之間的間距可為該第一結合位置之直徑的至少2倍(參閱例如圖4A)。由第一結合位置之邊緣至最近之鄰近結合位置之中心所測量的任何結合位置與任何最近之鄰近結合位置之間的間隔可為該第一結合位置之直徑的至少2倍(參閱例如圖4A)。該2個邊緣比第一結合位置之任何其他邊緣與第二結合位置之任何邊緣之間的距離更為接近(或至少同樣接近)。

【0224】可獲得所欲之間距(或間隔),使得該等結合位置(或位點)係經充分分隔,該充分分隔可例如改善超高密度之結合位置的鑑別。該間距(或間隔)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約該第一結合位置之直徑的1倍(X)、1.1 X、1.2 X、1.3 X、1.4 X、1.5 X、1.6 X、1.7 X、1.8 X、1.9 X、2 X、2.1 X、2.2 X、2.3 X、2.4 X、2.5 X、2.6 X、2.7 X、2.8 X、2.9 X、3 X、3.1 X、3.2 X、3.3 X、3.4 X、3.5 X、3.6 X、3.7 X、3.8 X、3.9 X、4 X、4.1 X、4.2 X、4.3 X、4.4 X、4.5 X、4.6 X、4.7 X、4.8 X、4.9 X、5 X、5.1 X、5.2 X、5.3 X、5.4 X、5.5 X、5.6 X、5.7 X、5.8 X、5.9 X、6 X、6.1 X、6.2 X、6.3 X、6.4

X、6.5 X、6.6 X、6.7 X、6.8 X、6.9 X、7 X、7.1 X、7.2 X、7.3 X、7.4 X、7.5 X、7.6 X、7.7 X、7.8 X、7.9 X、8 X、8.1 X、8.2 X、8.3 X、8.4 X、8.5 X、8.6 X、8.7 X、8.8 X、8.9 X、9 X、9.1 X、9.2 X、9.3 X、9.4 X、9.5 X、9.6 X、9.7 X、9.8 X、9.9 X、10 X或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該間隔係該第一結合位置之直徑的至少3倍。

【0225】流通池表面上之該等結合位置的某些百分比(%)(諸如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或更多)可為有序、充分堆積及/或高密度。使用本文揭露之任何方法，該複數個結合位置(諸如該等結合位置之實質上全部或全部)之至少一部分(諸如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或更多)可隨機地排列於該流通池表面上。使用本文揭露之任何方法，該複數個結合位置(或該等結合位置的某一百分比(%)，諸如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或更多)可不排列於該流通池之表面上的預定之區位。該複數個結合位置之至少一部分(諸如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或更多)不共有共同圖案。圖案可包括該圖案內該等結合位置之位置或相對位置。圖案可包

括該圖案內該等粒子之一或更多種構形(諸如本文描述之六角構形、等邊三角形構形、直線構形及線性構形)。該複數個結合位置或該等結合位置的某一百分比(%)(諸如1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或更多)可包含未圖案化之結合位置。比較上，使用由上而下微影蝕刻之經排列的流通池表面包括於預定區位具有預定圖案之結合位置和共有共同圖案之結合位置的區域。

【0226】藉由如上述於該流通池表面上之該等結合位置，該流通池表面可經官能化。該複數個結合位置可包含複數個核酸，諸如串聯核酸或核酸繫繩。該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含該複數個核酸之一者或至多一者。該複數個核酸可連接複數個珠，諸如emPCR珠。該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含該複數個珠之一者或至多一者。該複數個核酸可包含複數個串聯核酸(諸如DNA瓦)和自滾環擴增(RCA)之擴增產物。

【0227】本揭露考量該複數個反應位置之不同百分比(%)，每個反應位置僅包含一個核酸(諸如核酸繫繩)。僅包含一個核酸的該複數個反應位置之每個百分比可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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%、99.9%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該等反應位置之至少90%僅包含一個核酸。

【0228】使用該流通池表面可實施集落擴增以於該結合位置上或於該結合位置產生集落群。於不同實施態樣中，該複數個反應位置之每個包含僅一個起始核酸之集落群的位置之百分比(%)可為不同。於某些實施態樣中，該複數個反應位置之每個包含僅一個起始核酸之集落群的位置之百分比(%)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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%、99.9%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該等反應位置之至少90%包含每個僅一個起始核酸之集落群。

【0229】2個反應位置之第一反應位置上的起始核酸

與該2個反應位置之第二反應位置上的起始核酸可為不同。於不同實施態樣中，該複數個反應位置之具有不同的起始核酸之反應位置的數量可為不同。該複數個反應位置之具有不同的起始核酸之反應位置的數量可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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%、99.9%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

【0230】本揭露之方法可用於產生流通池表面。複數個流通池表面之每一者可包含至少10,000個結合位置(或活性位置或反應位置)。於該複數個流通池表面中，沒有2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含於該複數個流通池表面之每一者上的全部結合位置。於某些實施態樣中，該複數個流通池表面之2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形於該2個流通池表面之每一者上包含低於全部之結合位置。

【0231】流通池表面或每個流通池表面可包含某些結

合位置之結合位置構形，該結合位置構形不與任何其他流通池表面之相同數量的結合位置或任何其他流通池表面之對應區域的結合位置之結合位置構形全等(例如相同)。該結合位置之數量可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000個或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，流通池表面或每個流通池表面包含至少呈等邊三角形構形之3個鄰近結合位置，該等邊三角形構形不與任何其他流通池表面之任何3個鄰近結合位置的等邊三角形構形全等。例如，流通池表面或每個流通池表面包含至少10個結合位置，該至少10個結合位置不與任何其他流通池表面之任何至少10個結合位置全等。

【0232】流通池表面或每個流通池表面可包含該流通池表面之該複數個結合位置的至少某一百分比(%)，該至少某一百分比(%)不與任何其他流通池表面之該複數個結

合位置的該百分比(%)全等。該百分比(%)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，流通池表面或每個流通池表面包含該流通池表面之該複數個結合位置的至少5%，該5%不與任何其他流通池表面之該複數個結合位置的任何5%全等。例如，流通池表面或每個流通池表面包含該流通池表面之該複數個結合位置的至少10%，該10%不與任何其他流通池表面之該複數個結合位置的任何10%全等。

【0233】該複數個流通池表面之第一流通池表面可包含第一結合位置陣列，該第一結合位置陣列具有藉由第一間斷隔開的規則結合位置陣列構形之第一區域和規則結合位置陣列構形之第二區域，該第一間斷係諸如不規則結合位置陣列構形之第一區域。該複數個流通池表面之第二流通池表面可包含第二結合位置陣列，該第二結合位置陣列具有藉由第二間斷隔開的規則結合位置陣列構形之第一區域和規則結合位置陣列構形之第二區域，該第二間斷係諸如不規則結合位置陣列構形之第二區域。該第一結合位置陣列與該第二結合位置陣列可為不同。圖4A至4D各別說明具有2個不同的結合位置陣列構形之不同的結合位置陣列。該第一結合位置陣列可包含該第一流通池表面之該等

結合位置的5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99.9%或全部。該第二結合位置陣列可包含該第二流通池表面之該等結合位置的5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99.9%或全部。結合位置陣列構形可包含該結合位置陣列構形之全部結合位置。

【0234】該第一間斷與該第二間斷可為不同。該不規則結合位置陣列構形之第一區域與該不規則結合位置陣列構形之第二區域可為全等或可不為全等。例如，該不規則結合位置陣列構形之第一區域可包含至少3個結合位置，該至少3個結合位置不與該不規則結合位置陣列構形之第二區域的任何3個結合位置全等。該第一結合位置陣列的該規則結合位置陣列構形之第一區域和該規則結合位置陣列構形之第二區域可包含可為全等或可不為全等之結合位置。該第二結合位置陣列的該規則結合位置陣列構形之第一區域和該規則結合位置陣列構形之第二區域可包含可為全等或可不為全等之結合位置。該第一結合位置陣列之該規則結合位置陣列構形之第一區域與該第二結合位置陣列之該規則結合位置陣列構形之第一區域可為全等或可不為全等。該第一結合位置陣列之該規則結合位置陣列構形之第二區域與該第二結合位置陣列之該規則結合位置陣列構形之第二區域可為全等或可不為全等。

【0235】於結合位置陣列、規則結合位置陣列構形之區域、間斷或不規則結合位置陣列構形之區域的結合位置

之數量可為非預定。於結合位置陣列、規則結合位置陣列構形之區域、間斷或不規則結合位置陣列構形之區域的該結合位置之數量可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000個或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該規則結合位置陣列構形之第一區域包含至少500個結合位置。該規則結合位置陣列構形之第二區域可包含至少500個結合位置。該不規則結合位置陣列構形之第一區域可包含至少50個結合位置。該不規則結合位置陣列構形之第二區域可包含至少50個結合位置。

【0236】該規則結合位置陣列構形之第一區域可包含於該第一流通池表面上及/或該第一結合陣列(或於該第一流通池表面上及/或該第一結合陣列)之結合位置的某一百分比(%)。該規則結合位置陣列構形之第二區域可包含於該第一流通池表面上及/或該第一結合陣列(或於該第一流通池表面上及/或該第一結合陣列)之結合位置的某一百分比(%)。該不規則結合位置陣列構形之第一區域可包含於該第一流通池表面上及/或該第一結合陣列之結合位置的

某一百分比(%)。該不規則結合位置陣列構形之第二區域可包含於該第二流通池表面上及/或該第二結合陣列之結合位置的某一百分比(%)。該規則結合位置陣列構形之第一區域、該規則結合位置陣列構形之第二區域、該不規則結合位置陣列構形之第一區域及該不規則結合位置陣列構形之第二區域的任二者(或全部)的該百分比(%)可為相同或不同。該百分比(%)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約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%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該規則結合位置陣列構形之第一區域包含該第一流通池表面之該等結合位置的至少5%。該規則結合位置陣列構形之第二區域可包含該第二流通池表面之該等結合位置的至少5%。該不規則結合位置陣列構形之第一區域可包含該第一流通池表面之該等結合位置的至少0.5%。該不規則結合位置陣列構形之第二區域可包含該第二流通池表面之該等結合位置的至少0.5%。

【0237】於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的該複數個結合位置可包含複數個核酸，諸如串聯核酸、核酸繫繩、擴增引子(或夾引子)、擴增之核酸(例如使用RCA擴增之標的核酸)及DNA瓦。於該複數個流通池表面之每一者上的該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含於該流通池表面上該複數個結合位置所

包含之該複數個核酸之一者或至多一者。於該複數個流通池表面之每一者上的該複數個結合位置所包含之該複數個核酸可連接複數個珠，諸如emPCR珠。該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者可包含該複數個珠之一者或至多一者。

【0238】對於流通池表面，於該流通池表面上之該複數個結合位置的該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者包含擴增引子(或夾引子)、自滾環擴增(RCA)之擴增產物、DNA瓦或彼等之組合。於該流通池表面上之該複數個結合位置的該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者可包含能參與點擊化學反應之第一官能部分，諸如甲基四嗪(MTz)。於該流通池表面上之該複數個結合位置一者、一或更多者或每一者包含能參與該點擊化學反應之第二官能部分，諸如反式環辛烯(TCO)。該DNA瓦可包含擴增引子或夾引子，可選擇性地該擴增引子或該夾引子連接該結合位置，且可選擇性地該擴增引子或該夾引子係經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應連接該結合位置。

【0239】於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的包含該複數個核酸之至少一核酸及/或該複數個珠之至少一珠的該複數個結合位置之百分比(%)可為不同。於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的包含該複數個核酸之至少一核酸及/或該複數個珠之至少一珠的該複數個結合位置之百分比(%)可為、為

約、為至少、為至多或為至多約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%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的該複數個結合位置之至少50%包含該複數個核酸之至少一核酸及/或該複數個珠之至少一珠。

【0240】於某些實施態樣中，複數個流通池表面(或複數個流通池)可包含具有不同構形之結合位置。於某些實施態樣中，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的結合位置，該等間斷係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面於該流通池表面上包含該等間斷之相同構形。於某些情況下，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的結合位置。該等有序的結合位置和該等間斷之構形(例如相對位置或區位)係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面可包含該等有序的結合位置和該等間斷之相同構形。其他實施態樣提供每個流通池表面(或流通池表面)，其包含至少

10,000個有序的結合位置，該等結合位置係藉由位於非預定之區位及/或經隨機分佈(或排列)之不規則的結合位置區域隔開。沒有2個流通池表面於該流通池表面可包含該等不規則區域之相同構形。可替代地或另外地，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個有序的結合位置，該等結合位置係藉由不規則的結合位置區域隔開。該等有序的結合位置和該等不規則的結合位置區域之構形係非預定及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面可包含該等有序的結合位置與該等不規則的結合位置區域之相同構形。於某些情況下，每個流通池表面(或流通池表面)包含至少10,000個於規則之結合位置區域和與該規則之結合位置區域隔開的不規則之結合位置區域的結合位置。該等規則之區域和該等不規則之區域係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈(或排列)。沒有2個流通池表面可包含該等規則的區域及/或該等不規則的區域之相同構形。

滾環擴增

【0241】本揭露於溶液(參閱圖11說明)中或於該等結合位置(參閱圖14說明)考慮滾環擴增(RCA)之方法。圖11顯示用於叢聚產生和隨機組裝之珠的結構化膠態陣列(SCARAB)沉積之滾環擴增(RCA)的示意說明。DNA庫係首先經變性並隨後轉接子末端與夾寡核苷酸雜交以形成環。該庫末端經接合。於某些實施態樣中，藉由末端核酸酶除去殘留之線性DNA。環DNA係與延伸引子雜交以起始

藉由DNA聚合酶之延伸。經延伸後，所生成之叢聚沉積於SCARAB表面。

【0242】於某些實施態樣中，經變性庫(本文亦稱為標的核酸)並令該經變性之庫與夾貼合後，標的核酸經環形化。可選擇性地，可除去該夾。使用擴增引子可實施RCA。RCA可於溶液中進行。該擴增產物可沉積於結合位置。上述方法之任何步驟可於反應溶液中進行。反應溶液可包括標的核酸、夾、引子、Tri HCl、NaCl、MgCl、KCl、dNTPs、EDTA、DTT、NAD、ATP、蔗糖、甜菜鹼、PEG 200、TritonX100、Tween n80、Taq接合酶、T4 PNK、ExoI、ExoIII、Phi29或彼等之組合。反應溶液之成分的濃度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.1 nM、0.2 nM、0.3 nM、0.4 nM、0.5 nM、0.6 nM、0.7 nM、0.8 nM、0.9 nM、1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、7 nM、8 nM、9 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、1 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μM、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、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10 mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、

100 mM或介於任何2個該等值之間的數或範圍。反應溶液之成分的濃度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。反應溶液之成分的濃度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.01 U/μL、0.02 U/μL、0.03 U/μL、0.04 U/μL、0.05 U/μL、0.06 U/μL、0.07 U/μL、0.08 U/μL、0.09 U/μL、0.1 U/μL、0.2 U/μL、0.3 U/μL、0.4 U/μL、0.5 U/μL、0.6 U/μL、0.7 U/μL、0.8 U/μL、0.9 U/μL、1 U/μL或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該反應溶液之體積可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10微升(μL)、20 μL、30 μL、40 μL、50 μL、60 μL、70 μL、80 μL、90 μL、100 μL、0.2毫升(mL)、0.3 mL、0. 4 mL、0.5 mL、0.6 mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL、10 mL或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

核酸瓦

【0243】對於結構化表面上之表面上叢聚的一個要求係高單株佔據，其係定義為由單一單株叢聚佔據之墊的部分。達高單株佔據之一個途徑係使捕獲並擴增單一庫分子

之該墊的部分最大化。由含有許多夾引子之結構化墊所構成之表面將本質上受卜松(Poisson)分配限制，即約37%的最大預期之單株佔據。若夾引子之數量可降低至1個夾引子/墊，則該卜松限制應被緩和。於某些方面，該單株佔據可為至少50%、至少80%或至少90%。

【0244】為進行上述方法，本文揭露使用自行組裝之環形DNA瓦以置單一DNA夾於每個墊之中心。如圖13所示，於每一側含有單一夾之DNA瓦被靜電捕獲於每個帶正電荷墊上。藉由該等墊和瓦之相對大小的匹配且藉由空隙表面塗覆最適化以抑制該墊以外之瓦的吸附，通過立體排阻達成單一佔據。隨後該DNA瓦提供對該夾之基礎，該夾係用於捕獲並擴增每個墊上之單一庫分子。支架可為基因體DNA，諸如本發明之實施例所使用之M13mp18噬菌體之基因體DNA。不同的DNA摺疊結構可見於文獻Rothemund, P. W. (2006). Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, *440*(7082), 297-302；Ke, Y., Lindsay, S., Chang, Y., Liu, Y., & Yan, H. (2008). Self-assembled water-soluble nucleic acid probe tiles for label-free RNA hybridization assays. *Science*, *319*(5860), 180-183；Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., ... & Kjems, J., et al. (2009). Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, *459*(7243), 73-76及Douglas, S. M., Marblestone, A. H., Teerapittayanon, S., Vazquez, A., Church, G. M., & Shih, W. M. (2009). Rapid

prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. *Nucleic acids research*, *37*(15), 5001-5006，彼等之全部內容併入本文作為參考。用於組裝DNA摺疊之可替代的支架之實例係描述於文獻Yang, Y., Han, D., Nangreave, J., Liu, Y., & Yan, H. (2012). DNA origami with double-stranded DNA as a unified scaffold. *ACS nano*, *6*(9), 8209-8215和Erkelenz, M., Bauer, D. M., Meyer, R., Gatsogiannis, C., Raunser, S., Saccà, B., & Niemeyer, C. M. (2014). A Facile Method for Preparation of Tailored Scafolds for DNA-Origami. *Small*, *10*(1), 73-77，彼等之全部內容併入本文作為參考。

DNA瓦

【0245】環形DNA摺疊瓦係用於每個墊上放置單一DNA捕獲引子。如於他處所描述者，該DNA摺疊方法使用一組稱為“釘(staple)”的合成之短DNA寡核苷酸以藉由鹼基配對折疊長(5至50 kb)單股DNA“支架”成預定之幾何形狀。每個釘含有多個結合結構域，每個結合結構域結合該支架之不同區域以形成雙交叉模體。該整組釘雜交該支架之統合功效係約束該支架之該幾何形狀以遵守所設計之幾何形狀。

【0246】此處該瓦幾何形狀係經設計以近似該表面墊之環形形狀，且單一捕獲股係併入該瓦之每一側。為達成此，使用源自該M13mp18噬菌體之7249個核苷酸(nt)單股基因體DNA作為支架。於該設計中，該支架係經反覆格柵

以形成偽環，其中該釘股排列呈適當之圖案以界定如圖X所示之標的幾何形狀。為於該瓦之每一側的中心放置單一捕獲位置，選擇接近該中心之2個釘作為錨，且隨後將該夾序列加入至每個錨釘之3'端。該等錨釘之5'端的區位係經調整以確保該2個捕獲股將由該瓦之另一面突出。可將短多T間隔子區域(3至10 nt)置於該釘與捕獲序列之間以促進有效捕獲該庫分子。亦將相似之短多T區域併入位於該瓦之邊緣的釘以使因鈍端堆疊所引起之瓦聚集最小化。

【0247】使用下述之一般方案組裝DNA摺疊瓦。將等莫耳濃度之該等DNA釘寡核苷酸集中以生成主要釘混合物。該主要釘混合物隨後於折疊緩衝液與該支架DNA組合，其中於最終體積(50 uL)中，於超純水中最終濃度為100 nM釘DNA (每序列)、10 nM支架DNA、40 mM Tris乙酸鹽、12.5 mM氯化鎂及0.1 mM EDTA。該折疊反應隨後經熱退火處理。使用微離心純化管柱(Amicon Ultra, 100 kDa MWCO)純化經折疊之DNA瓦。

【0248】藉由令經純化之瓦溶液與該表面培育0.5至24小時數次並隨後經含有40 mM Tris乙酸鹽、12.5 mM氯化鎂及0.1 mM EDTA之緩衝液輕洗，使經純化之DNA瓦沉積於該表面(參閱圖14說明)。

【0249】隨後藉由培育該表面與含有與該捕獲股互補之尾的DNA庫分子之溶液，捕獲該庫分子於該DNA瓦上。如於他處所描述者，隨後進行經捕獲之庫DNA的環形化和表面上擴增。圖15A至15B比較於非結構化DNA瓦表面(圖

15A)和於結構化DNA瓦表面(圖15B)之叢聚。

DNA組(DNAnemone)瓦

【0250】當依賴單一捕獲寡核苷酸/瓦時，實施庫捕獲動力學。藉由於溶液中結合庫分子(例如多聯體或環形化核酸)與非對稱性DNA瓦，可改善捕獲動力學，其中一側結合該庫分子且另一側係經官能化以隨後與結合位置結合。非對稱性DNA瓦之實例係描述於美國專利公開案號US 2015/0298090，彼之全部內容併入本文作為參考。此利用非對稱性DNA瓦之策略的變異可被用於首先捕獲溶液中之該庫分子並隨後選擇性地固定該瓦於基材上。於此方法中，該非對稱性瓦具有“頂”面和”底”面，該頂面捕獲該庫分子以進行環形化和擴增且該底面係於庫捕獲後選擇性地固定於該基材上。於基材固定化之前，於溶液中實施該庫捕獲步驟可藉由擴散改善該捕獲動力學，但亦要求該瓦選擇性地固定於遠離該基材之該頂面。為達成此，該瓦之該頂面可顯示夾序列，該夾序列再次與該瓦之中心釘之3’端串聯。該瓦之相對底面可顯示許多表面錨基團之任一者，該表面錨基團可選擇性地與該基材之該墊上的互補基團反應或結合以固定該瓦於特定之面朝上位向。例如，該底面可顯示與卵白素官能化基材反應之生物素基團、與N-羥基琥珀醯亞胺官能化基材反應之胺基、與炔官能化基材反應之硫醇基、與疊氮化物官能化基材反應之二苯並環辛炔(DBCO)基、與四嗪官能化基材反應之反式環辛烯(TCO)

基、或藉由與該基材上顯示之互補序列雜交而被捕獲之特定DNA序列。該等表面錨基團可藉由長1至10 nm由額外的核苷酸構成之適當間隔子及/或聚合物間隔子(諸如聚乙二醇)與特定釘之末端串聯，使得該等表面錨基團自該瓦之該底面突出。使用諸如本文描述之組裝方案，令含有該夾和表面錨基團之該非對稱性瓦經組裝和純化。該瓦隨後可於介於20至40℃之適當溫度下與該庫分子經培育數十分鐘。經該庫雜交步驟後，該瓦可與於該墊上含有適當化學官能基之結構化基材經培育數十分鐘以選擇性地固定該瓦於該墊上。經培育後，使用過量體積之緩衝液沖洗除去任何未結合之瓦。該DNA摺疊瓦之另一變異包括如上所述之單一夾序列，該夾序列係由能與經變性之庫分子雜交的許多額外之捕獲寡核苷酸環繞(參閱圖16說明；於本文稱為DNA組)。藉由增加該DNA瓦上之捕獲寡核苷酸的數量，即使當該DNA瓦係固定於表面時，將增進該庫捕獲動力學(例如於沉積庫分子之前與結合位置結合)。

【0251】該夾寡核苷酸含有序列A和序列B，雖然該額外之捕獲寡核苷酸僅含有序列B。序列A之解構溫度(Tm)大於序列B之Tm。該額外之捕獲寡核苷酸的變異包括於該序列中使用可切割位點(參閱圖16說明)和加入額外之序列C，該序列C藉由與序列B和序列C互補的額外之釋出寡核苷酸允許立足點介導之股替代(參閱圖17說明)。經允許庫分子與該瓦雜交後，將存有多個群之瓦，其中1個庫分子可與該夾上之序列A、該夾上之序列B及該額外之捕

獲寡核苷酸上之序列B的某些組合雜交。取決於所使用之捕獲寡核苷酸的該變異，該捕獲寡核苷酸可隨後經切割(使用該序列中可切割之鹼基)或經立足點介導之股替代(藉由加入該釋出寡核苷酸)。該切割或股替代與增加該溫度至高於序列B之Tm但低於序列A之Tm的組合允許與該捕獲寡核苷酸雜交之庫分子的釋出。與序列A雜交之庫分子將維持雜交。可使用流體交換以除去切割產物和未雜交之庫分子。降低該溫度至低於序列B之Tm將允許與序列A雜交之殘留庫分子亦與該夾上之序列B雜交。該庫分子可隨後進行如於他處所描述之叢聚處理。

【0252】該DNA組雜交之一個變異涉及溫度循環(參閱圖18說明)。經起始庫分子雜交後，該溫度可於介於高於序列B之Tm但低於序列A之Tm的溫度與低於序列B之Tm的溫度之間重複地循環。此溫度循環允許僅與該額外之捕獲寡核苷酸上的序列B雜交之庫分子去雜交並填充其他瓦。

【0253】本揭露亦包括核酸瓦，該核酸瓦包含支架核酸和複數個主要的寡核苷酸(參閱圖13說明)。該複數個主要的寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者可包含與該支架核酸之不同區域雜交的2個結合結構域，因而形成包含該支架核酸和該主要的寡核苷酸之雙交叉模體。該主要的寡核苷酸之數量可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、

200、250、300、350、400、450、500個或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該複數個主要的寡核苷酸可包含自該核酸瓦之第一面突出的第一錨寡核苷酸(參閱圖13說明)。該核酸瓦可包含去氧核糖核酸(DNA)。該支架核酸可包含DNA。該複數個主要的寡核苷酸可包含多個DNA。

【0254】於某些實施態樣中，該支架核酸藉由該複數個主要的寡核苷酸之雜交以形成偽環。該核酸瓦之形狀可呈偽環形。該核酸瓦之大小(例如寬度、半徑或直徑)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10奈米(nm)、11 nm、12 nm、13 nm、14 nm、15 nm、16 nm、17 nm、18 nm、19 nm、20 nm、21 nm、22 nm、23 nm、24 nm、25 nm、26 nm、27 nm、28 nm、29 nm、30 nm、31 nm、32 nm、33 nm、34 nm、35 nm、36 nm、37 nm、38 nm、39 nm、40 nm、41 nm、42 nm、43 nm、44 nm、45 nm、46 nm、47 nm、48 nm、49 nm、50 nm、51 nm、52 nm、53 nm、54 nm、55 nm、56 nm、57 nm、58 nm、59 nm、60 nm、61 nm、62 nm、63 nm、64 nm、65 nm、66 nm、67 nm、68 nm、69 nm、70 nm、71 nm、72 nm、73 nm、74 nm、75 nm、76 nm、77 nm、78 nm、79 nm、80 nm、81 nm、82 nm、83 nm、84 nm、85 nm、86 nm、87 nm、88 nm、89 nm、90 nm、91 nm、92 nm、93 nm、94 nm、95 nm、96 nm、97 nm、98 nm、99 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230

nm、240 nm、250 nm、260 nm、270 nm、280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、610 nm、620 nm、630 nm、640 nm、650 nm、660 nm、670 nm、680 nm、690 nm、700 nm、710 nm、720 nm、730 nm、740 nm、750 nm、760 nm、770 nm、780 nm、790 nm、800 nm、810 nm、820 nm、830 nm、840 nm、850 nm、860 nm、870 nm、880 nm、890 nm、900 nm、910 nm、920 nm、930 nm、940 nm、950 nm、960 nm、970 nm、980 nm、990 nm、1000 nm、2微米(μm)、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm、20 μm、30 μm、40 μm、50 μm、60 μm、70 μm、80 μm、90 μm、100 μm、110 μm、120 μm、130 μm、140 μm、150 μm、160 μm、170 μm、180 μm、190 μm、200 μm、210 μm、220 μm、230 μm、240 μm、250 μm、260 μm、270 μm、280 μm、290 μm、300 μm、310 μm、320 μm、330 μm、340 μm、350 μm、360 μm、370 μm、380 μm、390 μm、400 μm、410 μm、420 μm、430 μm、440 μm、450 μm、460 μm、470 μm、480 μm、490 μm、500 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個結合位置之2個或任2個相鄰結合位置的該間距係約1 nm至

約100 μm。該支架核酸之長度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1千鹼基(kb)、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb、10 kb、15 kb、20 kb、25 kb、30 kb、35 kb、40 kb、45 kb、50 kb、60 kb、70 kb、80 kb、90 kb、100 kb或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該支架核酸可包含基因體DNA，諸如M13mp18噬菌體之基因體DNA。該複數個主要的寡核苷酸可包含自該核酸瓦之第二面突出的第二錨寡核苷酸。該第一錨寡核苷酸與該第二錨寡核苷酸可自該核酸瓦之相反面突出(參閱圖13說明)。

【0255】一個錨寡核苷酸可包含夾序列(參閱圖16說明)。該夾序列可位於該錨寡核苷酸之3'端。該錨寡核苷酸可包含間隔子序列。該間隔子序列可為該夾序列之5'端。該間隔子序列可包含多T序列。該間隔子序列之長度可為、為約、為至少、為至多或為至多約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50個核苷酸或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該夾序列可包含第一夾序列和第二夾序列(例如圖16分別所示之序列A和序列B)。該第一夾序列之解構溫度(Tm)可高於該第二夾序列之Tm。該複數個主要的寡核苷酸可包含複數個捕獲寡核苷酸，該複數個捕獲寡核苷酸之每一者包含第一捕獲序列。該第一捕獲序列可包含該第二夾序列(例如圖16所示之序列B)。該捕獲寡核苷酸可不包含該第一夾序列。該複數個捕獲寡核苷酸之捕獲寡核苷酸可為相同。該複數個捕獲寡核苷酸

之一者、一或更多者或每一者可包含可切割位點(參閱圖16說明)，諸如可切割之核苷酸。該捕獲寡核苷酸可用於改善庫捕獲動力學(參閱圖16說明；於本文稱為DNA組)。於某些實施態樣中，該複數個捕獲寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者可包含第二捕獲序列(例如圖17所示之序列C)。

【0256】本揭露包括生成核酸瓦之方法。於某些實施態樣中，生成核酸瓦之方法包含提供主要溶液，該主要溶液包含該複數個主要的寡核苷酸。該方法可包含提供支架溶液，該支架溶液包含支架核酸。該方法可包含結合該主要溶液與該支架溶液以形成反應溶液。該方法可包含令該反應溶液經熱退火，藉以生成該核酸瓦。該反應溶液可為不同。該反應溶液之成分的濃度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.1 nM、0.2 nM、0.3 nM、0.4 nM、0.5 nM、0.6 nM、0.7 nM、0.8 nM、0.9 nM、1 nM、2 nM、3 nM、4 nM、5 nM、6 nM、7 nM、8 nM、9 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、60 nM、70 nM、80 nM、90 nM、100 nM、200 nM、300 nM、400 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、1 μM、2 μM、3 μM、4 μM、5 μM、6 μM、7 μM、8 μM、9 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、100 μM、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、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10

mM、20 mM、30 mM、40 mM、50 mM、60 mM、70 mM、80 mM、90 mM、100 mM或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該反應溶液包含約100奈米莫耳(nM)之該複數個主要的寡核苷酸的每一者、約10毫莫耳(mM)之該支架核酸、約40 mM之Tris乙酸鹽、約12.5 mM之氯化鎂及/或約0.1 mM之EDTA。反應溶液之成分的濃度可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約0.001%、0.002%、0.003%、0.004%、0.005%、0.006%、0.007%、0.008%、0.009%、0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07%、0.08%、0.09%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該反應溶液之體積可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10微升(μL)、20 μL、30 μL、40 μL、50 μL、60 μL、70 μL、80 μL、90 μL、100 μL、0.2毫升(mL)、0.3 mL、0. 4 mL、0.5 mL、0.6 mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL、10 mL或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該反應溶液之體積可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10微升(μL)、20 μL、30 μL、40 μL、50 μL、60 μL、70 μL、80 μL、90 μL、100 μL、0.2毫升(mL)、0.3 mL、0. 4 mL、0.5 mL、0.6 mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL、1 mL、2 mL、3 mL、4 mL、5 mL、6 mL、7 mL、8 mL、9 mL、10 mL、20 mL、30 mL、40 mL、50 mL、100 mL、1000 mL、2升

(L)、3L、4L、5L、6L、7L、8L、9L、10L或介於任何2個該等值之間的數或範圍。該方法可包含自不為該核酸瓦之分子的一部分之該支架核酸之分子和該複數個主要的寡核苷酸之分子純化該核酸瓦。該方法可包含純化該核酸瓦，該純化包含基於大小之純化。

【0257】本發明於溶液中或於該等結合位置考慮滾環擴增(RCA)之方法。RCA方法可包含提供核酸瓦。該方法可包含提供標的核酸。該方法可包含使用該核酸瓦之該夾序列以使該標的核酸環形化。該方法可包含藉由使用該標的核酸作為模板延伸該夾序列以產生該核酸瓦藉以實施滾環擴增，每個該核酸瓦包含該標的核酸之串聯複製(參閱圖14說明)。

【0258】RCA方法可包含提供複數個核酸瓦。該方法可包含提供複數個標的核酸。該方法可包含使該複數個標的核酸之每一者與該複數個核酸瓦之核酸瓦的該夾序列雜交。該方法可包含使與該核酸瓦之該夾序列雜交的該標的核酸環形化。該方法可包含藉由使用與該核酸瓦之該夾序列雜交的該標的核酸作為模板以延伸該核酸瓦之該夾序列以實施滾環擴增藉以產生核酸叢聚，該核酸叢聚包含具有該夾序列之該核酸瓦，該夾序列經延伸以包括該標的核酸之串聯複製。圖15A至15B比較於非結構化DNA瓦表面(圖15A)和於結構化DNA瓦表面(圖15B)之叢聚。

【0259】該方法可進一步包含沉積該核酸瓦於流通池表面之結合位置上。藉由該帶正電荷結合位置與該帶負電

荷核酸瓦之間的吸引，該核酸瓦可沉積於該結合位置。可替代地，結合位置可經生物分子官能化，該生物分子結合(例如藉由親和性或雜交)多聯體或核酸瓦(例如該核酸瓦進而結合多聯體)。該方法可進一步包含於實施RCA之前沉積該核酸瓦於流通池表面之結合位置上(參閱圖14說明)。藉由該帶正電荷結合位置與該帶負電荷核酸瓦之間的吸引，該核酸瓦可沉積於該結合位置。該方法可進一步包含於實施RCA之後沉積該核酸叢聚於流通池表面之結合位置上。每個包含至多1個核酸瓦(或至多1個核酸叢聚)之該複數個結合位置的百分比(%)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、99%或介於任何2個該等值之間的數或範圍。

【0260】於某些情況下，該方法進一步包含藉由切割該可切割位點以除去該複數個捕獲寡核苷酸(參閱圖16說明)。於某些情況下，該複數個標的核酸之標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該複數個捕獲寡核苷酸之捕獲寡核苷酸的該第一捕獲序列(或該第二夾序列)雜交(參閱圖17說明)。該方法可包含使釋出寡核苷酸與該捕獲寡核苷酸雜交。因此，該標的核酸可與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。

【0261】於某些實施態樣中，該複數個標的核酸之第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該複數個

捕獲寡核苷酸之第一捕獲寡核苷酸的該第一捕獲序列(或該第二夾序列)雜交(參閱圖18說明)。該複數個標的核酸之第二標的核酸可與該複數個捕獲寡核苷酸之第二捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交。該方法可包含令該核酸瓦經熱循環處理。因此，自該第二捕獲寡核苷酸釋出該第二標的核酸。且，該第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。於某些實施態樣中，第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。該複數個標的核酸之第二標的核酸可與該複數個捕獲寡核苷酸之第二捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交。該方法可進一步包含令該核酸瓦經熱循環處理。因此，自該第二捕獲寡核苷酸釋出該第二標的核酸。

比對流通池影像

【0262】本揭露包括比對複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則或隨機的結合位置區域隔開之第一規則或不規則的結合位置區域和第二規則或不規則的結合位置區域。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該不規則或隨機的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。於某些實施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則或隨機的

結合位置區域隔開之規則或不規則的結合位置區域。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該不規則或隨機的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。於某些實施態樣中，比對複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面包含藉由間斷隔開之有序的結合位置。該方法可包含：比對該複數個流通池影像之該間斷以比對該複數個流通池影像。該比對可包含相對於第二流通池影像位移一個流通池影像。該比對可包含相對於第二影像旋轉一個影像。本文所描述之該結構化表面的不規則性可用於比對流通池影像及/或通過定序循環以鑑別個別之叢聚。

【0263】不同類型之流通池影像和不同數量之流通池影像係與本文所揭露者一致。該複數個流通池影像可包含自該第一規則或不規則的結合位置區域、該第二規則或不規則的結合位置區域及該不規則或隨機的結合位置區域之結合位置發出之螢光發射訊號。該複數個流通池影像可包含、包含約、包含至少、包含至少約、包含至多或包含至多約5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500個或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個流通池影像包含至少20個流通池影像。例如，該複數個流通池影像包含至少200個流通池影像。

定向流通池影像

【0264】本揭露包括定向複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，定向複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：鑑別該複數個流通池影像共有之複數個群落的不規則或隨機之群落區域。該等流通池影像可自本揭露之一或更多個流通池表面收集。不規則或隨機的群落區域可對應間斷或不規則或隨機的結合位置陣列之區域(參閱圖4C至4D之406d)。該方法可包含：定向一或更多個該複數個流通池影像，使得於該複數個流通池影像的該不規則或隨機之群落區域經比對。該流通池上之該複數個群落可經分佈，使得沒有2個群落比彼此之最小距離(諸如產生該2個群落的結合位置之間的間距或間隔)更為接近。該等群落可於該流通池表面上之結合位置藉由擴增於該結合位置之核酸產生。

【0265】可自單一流通池收集該複數個流通池影像。該單一流通池可包含規則或不規則陣列群落之至少一區域(於規則或不規則陣列之結合位置的一區域(諸如規則結合位置陣列之區域(參閱圖4A至4D之402r1))產生)和不規則或隨機排列之群落的至少一區域(於不規則或隨機排列之結合位置的一區域(諸如間斷或隨機之結合位置陣列的一區域(參閱圖4C至4D之406d))產生)。缺少該不規則或隨機之群落區域的該複數個流通池影像之流通池影像可自該複數個流通池影像廢棄。可自複數個流通池收集該複數個流通池影像。該複數個流通池可包含多個流通池，其中每個流

通池具有規則或不規則陣列群落之至少一區域(於規則或不規則陣列結合位置之一區域產生)和不規則或隨機排列之群落的至少一區域(於不規則或隨機排列的結合位置之一區域產生)。沒有2個流通池可共有不規則或隨機排列之群落的相同陣列。該複數個影像可經揀選，使得具有不規則或隨機排列之群落的共同區域之影像經組合在一起。該複數個影像可經揀選，使得缺少不規則或隨機排列之群落的共同區域之影像經差異地組合。

群落

【0266】於不同實施態樣中，該複數個群落之2個或任何2個相鄰群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)的間距(或間隔)可為不同。該2個相鄰群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)之間距可為該2個相鄰位置的中心之間的距離。該2個相鄰群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)之間隔可為該2個相鄰群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)之最近的邊之間的距離。該複數個群落之2個或任何2個相鄰群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)的間距(或間隔)可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10奈米(nm)、11 nm、12 nm、13 nm、14 nm、15 nm、16 nm、17 nm、18 nm、19 nm、20 nm、21 nm、22 nm、23 nm、24 nm、25 nm、26 nm、27 nm、28 nm、29 nm、30 nm、31 nm、32 nm、33 nm、34 nm、

35 nm、36 nm、37 nm、38 nm、39 nm、40 nm、41 nm、42 nm、43 nm、44 nm、45 nm、46 nm、47 nm、48 nm、49 nm、50 nm、51 nm、52 nm、53 nm、54 nm、55 nm、56 nm、57 nm、58 nm、59 nm、60 nm、61 nm、62 nm、63 nm、64 nm、65 nm、66 nm、67 nm、68 nm、69 nm、70 nm、71 nm、72 nm、73 nm、74 nm、75 nm、76 nm、77 nm、78 nm、79 nm、80 nm、81 nm、82 nm、83 nm、84 nm、85 nm、86 nm、87 nm、88 nm、89 nm、90 nm、91 nm、92 nm、93 nm、94 nm、95 nm、96 nm、97 nm、98 nm、99 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、250 nm、260 nm、270 nm、280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、610 nm、620 nm、630 nm、640 nm、650 nm、660 nm、670 nm、680 nm、690 nm、700 nm、710 nm、720 nm、730 nm、740 nm、750 nm、760 nm、770 nm、780 nm、790 nm、800 nm、810 nm、820 nm、830 nm、840 nm、850 nm、860 nm、870 nm、880 nm、890 nm、900 nm、910 nm、920 nm、930 nm、940 nm、950 nm、960 nm、970 nm、980

nm、990 nm、1000 nm、2微米(μm)、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm、20 μm、30 μm、40 μm、50 μm、60 μm、70 μm、80 μm、90 μm、100 μm、110 μm、120 μm、130 μm、140 μm、150 μm、160 μm、170 μm、180 μm、190 μm、200 μm、210 μm、220 μm、230 μm、240 μm、250 μm、260 μm、270 μm、280 μm、290 μm、300 μm、310 μm、320 μm、330 μm、340 μm、350 μm、360 μm、370 μm、380 μm、390 μm、400 μm、410 μm、420 μm、430 μm、440 μm、450 μm、460 μm、470 μm、480 μm、490 μm、500 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個群落之2個或任何2個相鄰群落之間距係約1 nm至約100 μm。

【0267】該複數個群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)之一者、一或更多者或每一者的大小(例如半徑、直徑、寬度或高度)可加以變化。該複數個群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)之一者、一或更多者或每一者的大小可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約10奈米(nm)、11 nm、12 nm、13 nm、14 nm、15 nm、16 nm、17 nm、18 nm、19 nm、20 nm、21 nm、22 nm、23 nm、24 nm、25 nm、26 nm、27 nm、28 nm、29 nm、30 nm、31 nm、32 nm、33 nm、34 nm、35 nm、36 nm、37 nm、38 nm、39 nm、40 nm、41 nm、42 nm、43 nm、44 nm、45 nm、46 nm、47 nm、48 nm、49 nm、50 nm、51 nm、52 nm、53 nm、54

nm、55 nm、56 nm、57 nm、58 nm、59 nm、60 nm、61 nm、62 nm、63 nm、64 nm、65 nm、66 nm、67 nm、68 nm、69 nm、70 nm、71 nm、72 nm、73 nm、74 nm、75 nm、76 nm、77 nm、78 nm、79 nm、80 nm、81 nm、82 nm、83 nm、84 nm、85 nm、86 nm、87 nm、88 nm、89 nm、90 nm、91 nm、92 nm、93 nm、94 nm、95 nm、96 nm、97 nm、98 nm、99 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、250 nm、260 nm、270 nm、280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、610 nm、620 nm、630 nm、640 nm、650 nm、660 nm、670 nm、680 nm、690 nm、700 nm、710 nm、720 nm、730 nm、740 nm、750 nm、760 nm、770 nm、780 nm、790 nm、800 nm、810 nm、820 nm、830 nm、840 nm、850 nm、860 nm、870 nm、880 nm、890 nm、900 nm、910 nm、920 nm、930 nm、940 nm、950 nm、960 nm、970 nm、980 nm、990 nm、1000 nm、2微米(μm)、3 μm、4 μm、5 μm、6 μm、7 μm、8 μm、9 μm、10 μm、20 μm、30 μm、40 μm、50 μm、60 μm、70 μm、80 μm、90 μm、

100 μm、110 μm、120 μm、130 μm、140 μm、150 μm、160 μm、170 μm、180 μm、190 μm、200 μm、210 μm、220 μm、230 μm、240 μm、250 μm、260 μm、270 μm、280 μm、290 μm、300 μm、310 μm、320 μm、330 μm、340 μm、350 μm、360 μm、370 μm、380 μm、390 μm、400 μm、410 μm、420 μm、430 μm、440 μm、450 μm、460 μm、470 μm、480 μm、490 μm、500 μm或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個群落之一者、一或更多者或每一者的大小係約1 nm至約100 μm。

【0268】該複數個群落之群落數量可取決於或相似於群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置的數量。該複數個群落(或群落所位於之結合位置、反應位置或活性位置)之群落數量可為、為約、為至少、為至少約、為至多或為至多約1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000、2,000,000、3,000,000、4,000,000、5,000,000、6,000,000、7,000,000、8,000,000、9,000,000、10,000,000、20,000,000、30,000,000、40,000,000、50,000,000、60,000,000、70,000,000、80,000,000、90,000,000、100,000,000、200,000,000、300,000,000、400,000,000、500,000,000、600,000,000、700,000,000、

800,000,000、900,000,000、1,000,000,000個或介於任何2個該等值之間的數或範圍。例如，該複數個群落之群落數量係約10,000個群落至約10,000,000個群落。

揀選流通池影像

【0269】本揭露亦提供揀選複數個流通池影像之方法。於某些實施態樣中，揀選複數個流通池影像之方法可於處理器之控制下且包含：得到複數個流通池影像。該方法可包含：對於該複數個池影像之每一者，鑑別藉由不規則或隨機的結合位置區域(或間斷)隔開之第一規則或不規則的結合位置區域和第二規則或不規則的結合位置區域。可自本揭露之一或更多個流通池表面收集該等流通池影像。流通池影像之該第一和規則或不規則的結合位置區域可對應該等規則的結合位置陣列(參閱圖4A至4D之402r1和402r2)。流通池影像之該規則或不規則的結合位置區域可對應間斷或隨機的結合位置陣列之一區域(參閱圖4C至4D之406d)。該方法可包含：揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。

【0270】可替代地或另外地，揀選複數個流通池影像之方法係於處理器之控制下且包含：得到複數個流通池影像。可自本揭露之一或更多個流通池表面收集該等流通池影像。該方法可包含：於該複數個流通池影像之每一者鑑

別不規則或隨機的結合位置區域，該不規則或隨機的結合位置區域於該流通池影像隔開第一規則或不規則的結合位置區域與第二規則或不規則的結合位置區域。該方法可包含：揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。該方法可包含本揭露之一或更多個額外步驟。例如，該方法可包含定向每個共同組之該複數個流通池影像的流通池影像，使得該每個共同組之該等流通池影像的第一結合位置經比對且該每個共同組之該等流通池影像的第二結合位置經比對。具有不同之不規則或隨機的結合位置區域之流通池影像可被分配至不同組。

實施品質評估

【0271】本揭露提供於影像上實施品質評估之方法。於某些實施態樣中，實施品質評估之方法係於處理器之控制下且包含：接收自包含複數個結合位置之表面(諸如流通池表面)所收集之影像。該等結合位置可包含群落。該方法可包含：鑑別源自第一結合位置(或於其上之群落)之第一訊號。該方法可包含：鑑別源自第二結合位置(或於其上之群落)之第二訊號。該方法可包含：測定該第一結合位置與該第二結合位置分隔之距離。該方法可包含：若該距離低於閾值，負面評估該影像。該閾值可為於該表面上介於2個鄰近結合位置之間的預期距離。

【0272】通過多種不同之方法可完成負面評估該影像。負面評估該影像之非限制性實例包括廢棄該影像、廢棄源自該影像之該第一訊號和該第二訊號、廢棄源自該第一結合位置之任何訊號和源自該第二結合位置之任何訊號、標記該第一結合位置和該第二結合位置中至少一者為失焦者、及再聚焦該第一結合位置和該第二結合位置中至少一者。該再聚焦可加以變化。再聚焦之非限制性實例包括降低該第一訊號之大小、降低該第一訊號之大小和該第二訊號之大小、增加該第一訊號之強度、增加該第一訊號之強度和該第二訊號之強度、及降低該第一訊號之大小和該第二訊號之大小且增加該第一訊號之強度和該第二訊號之強度。

【0273】負面評估該影像之另一實例包括測定基於該距離和該閾值之失焦值。負面評估該影像之其他實例包括測定基於該距離和理想距離之失焦值。該失焦值可為該距離與該閾值之比、該距離與該理想距離閾值之比或彼等之組合。該失焦值可為該距離與該閾值之差、該距離與該理想距離閾值之差或彼等之組合。負面評估該影像可包括：導致基於該失焦值將由該表面收集的再聚焦之影像及/或接收基於該失焦值將由該表面收集的再聚焦之影像。負面評估該影像可包括：調整收集基於該失焦值之影像的顯像系統之焦距及/或導致該顯像系統基於該失焦值調整該顯像系統之焦距。負面評估該影像可包括：導致將由該表面收集的再聚焦之影像。負面評估該影像可包含接收將由該

表面收集的再聚焦之影像。

【0274】通過多種不同之方法可完成測定該距離。例如，測定該距離包含使用第一結合位置之中心點和第二結合位置之中心點以測量該第一結合位置至該第二結合位置之距離。作為另一實例，測定該距離包含使用第一結合位置之邊緣和第二結合位置之邊緣以測量該第一結合位置至該第二結合位置之距離。

【0275】多種不同之隨機及/或非預定的結合位置構形係與本揭露一致。例如，該複數個結合位置之至少一部分係隨機排列於該流通池表面。作為一個實例，該複數個結合位置之至少一部分未排列於該流通池表面之預定區位。作為另一實例，該複數個結合位置之至少一部分不共有共同圖案。作為進一步之實例，至少該複數個結合位置包含未圖案化之結合位置。例如，該複數個結合位置係經隨機排列。作為一個實例，該複數個結合位置係經排列以形成具有規則或不規則放置(或有序)之結合位置的第一區域和具有隨機放置之結合位置的第二區域。

流通池顯像系統

【0276】本揭露包括流通池顯像系統。流通池顯像系統包含：具有複數個結合位置分佈於其上之流通池，其中至少某些該等結合位置係經隨機分佈。該流通池可具有經使用本揭露之任何方法所產生的流通池表面。該流通池顯像系統可包含：於該等結合位置激發螢光團之激發源。該

流通池顯像系統可包含：包含複數個像素之影像數位化界面。該複數個結合位置可經分佈，使得沒有2個結合位置產生歸屬於共同像素之發射訊號。可替代地或另外地，至少某些該等結合位置係規則或不規則分佈。該複數個結合位置可以多種不同之密度存在，諸如以約200 k/mm^{2}至約2,000 k/mm^{2}之密度存在或以至少600 k/mm^2、至少800 k/mm^2、至少1,000 k/mm^{2}或更高之密度存在。結合位置之數量可加以變化，諸如至少100,000個結合位置、至少1,000,000個結合位置、至少10,000,000個結合位置或更多。

結合式定序

【0277】“結合式定序”係指一種定序技術，其中使用聚合酶和同源核苷酸與預先準備之模板核酸的特異性結合以鑑別下一個正確之核苷酸，該正確之核苷酸將被併入該預先準備之模板核酸的引子股。該特異性結合交互作用不需導致該核苷酸化學併入該引子。該特異性結合交互作用可先於該核苷酸化學併入該引子股或可先於類似的下一個正確之核苷酸化學併入該引子。因此，於未併入下一個正確之核苷酸下，可進行該下一個正確之核苷酸的鑑別。

【0278】結合式定序(SBB)業已描述於美國專利號10,443,098、美國專利號10,246,744及美國專利申請案公開號2018/0044727，彼等各別之全部內容併入本文作為參考。簡言之，於SBB中，於反應之個別步驟期間，該聚合

酶進行打開與關閉構形之間的構形轉變。於一步驟中，該聚合酶結合預先準備之模板核酸以形成二元複合物(於本文亦稱為預插入構形)。於隨後之步驟中，進來的核苷酸結合且聚合酶指關閉以形成包含該聚合酶、預先準備之模板核酸及核苷酸之預化學構形，其中該結合之核苷酸尚未併入。此步驟(於本文亦稱為檢驗步驟)之後可為化學併入步驟，其中伴隨自該核苷酸切割焦磷酸酯形成磷酸二酯鍵(核苷酸併入)。該聚合酶、預先準備之模板核酸及新併入之核苷酸產生後化學之預轉譯構形。當該預化學構形和該預轉譯構形兩者包含聚合酶、預先準備之模板核酸及核苷酸時，其中該聚合酶係呈關閉狀態，該等構形之任一者於本文可稱為三元複合物。於檢驗步驟期間可監測該聚合酶構形及/或與核酸之交互作用以鑑別該核酸序列中下一個正確之鹼基。於併入之前或之後，可轉變反應條件以自該預先準備之模板核酸脫離該聚合酶且可再次轉變反應條件以自該局部環境除去抑制聚合酶結合之任何反應劑。

【0279】一般而言，該SBB方法包括“檢驗”步驟和可選擇性地“併入”步驟，其中該“檢驗”步驟鑑別下一個模板鹼基且該“併入”步驟加入一或更多個互補核苷酸至該預先準備之模板核酸的引子成分之3’端。下一個待加入之正確的核苷酸之鑑別係於無該核苷酸與該引子之3’端通過共價鍵的化學連接或於該核苷酸與該引子之3’端通過共價鍵的化學連接之前決定。該檢驗步驟可涉及提供於該方法中將被使用的預先準備之模板核酸並使該預先準備之模板核酸

與聚合酶(例如DNA聚合酶)和一或更多個測試核苷酸接觸，該一或更多個測試核苷酸被調查為可能的下一個正確之核苷酸。進一步，存在涉及於該測試核苷酸之存在下監控或測量該聚合酶與該預先準備之模板核酸之間的交互作用之步驟。

【0280】檢驗步驟一般包括下述之子步驟：(1)提供預先準備之模板核酸(即與引子雜交之模板核酸分子，該引子可選擇性地自彼之3'端的延伸被阻斷)；(2)令該預先準備之模板核酸與反應混合物接觸，該反應混合物包括聚合酶和至少一種核苷酸；(3)於該(等)核苷酸之存在下且無任何核苷酸化學併入該預先準備之模板核酸的情況下監控該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的交互作用；及(4)自該受監控之交互作用測定該模板核酸中下一個鹼基(即下一個正確之核苷酸)之鑑別。

【0281】該檢驗步驟可受控制，使得核苷酸併入被減弱或完成。若核苷酸併入被減弱，可實施分隔之併入步驟。若於該檢驗步驟期間業已鑑別該鹼基，無需監控即可完成該分隔之併入步驟。若於檢驗期間進行核苷酸併入，藉由安定劑可使隨後之核苷酸併入減弱，該安定劑於併入後困住該核酸上之該聚合酶。於該併入步驟可使用可逆性中止之核苷酸以防止於單一循環期間加入超過1個核苷酸。

【0282】該結合式定序方法允許模板核酸鹼基之控制性測定而無需經標記之核苷酸，如同該聚合酶與該模板核

酸之間的該交互作用可受監控而無需該核苷酸上之標記。該受控制之核苷酸併入亦可提供重複且均聚區域之準確的序列資訊而無需使用經標記之核苷酸。再者，模板核酸分子可於檢驗條件下經定序，該檢驗條件不需要模板核酸或聚合酶連接固相撐體。然而，於某些較佳實施態樣中，待定序之預先準備之模板核酸係與固體撐體(諸如流通池之內部表面)連接。

【0283】藉由提供反應條件以防止核苷酸之化學併入並同時允許於該預先準備之模板核酸分子上的下一個正確之鹼基的鑑別測定，該檢驗步驟可部分地受控制。該反應條件可稱為檢驗反應條件。

【0284】檢驗一般涉及偵測聚合酶與模板核酸之交互作用。偵測可包括光學、電學、熱能、聲學、化學及機械手段。通常，該檢驗步驟涉及於包含一或更多個核苷酸之反應混合物中使聚合酶結合預先準備之模板核酸的聚合起始位置並監控該交互作用。於該併入步驟之前，該定序反應之該檢驗步驟可經重複1、2、3、4或更多次。該檢驗和併入步驟可經重複直至獲得該模板核酸之所欲序列。

【0285】SBB涉及該預先準備之模板核酸分子與包括聚合酶和一或更多個核苷酸分子之反應混合物接觸，該接觸較佳地於安定該三元複合物之形成且使二元複合物之形成不安定的條件下發生。可使用該三元複合物之形成或該安定之三元複合物以確保於每一定序循環僅有1個核苷酸被加入至該模板核酸引子，其中該被加入之核苷酸被隔絕

於該三元複合物內。每一定序循環之單一核苷酸的受控制之併入增加包含均聚物重複之核酸區域的定序準確性。

【0286】於SBB中，用於該檢驗步驟之反應混合物可包括1、2、3或4類核苷酸分子。該等核苷酸可選自dATP、dTTP (或dUTP)、dCTP及dGTP。該反應混合物可包含一或更多個核苷酸三磷酸和一或更多個核苷酸二磷酸。可由該預先準備之模板核酸、該聚合酶及該4類核苷酸分子之任一者形成三元複合物，使得可形成4類三元複合物。

【0287】於核苷酸分子之存在下，可以許多不同之方式完成監控或測量該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的該交互作用。例如，監控可包括測量該預先準備之模板核酸、該聚合酶及該4類核苷酸分子之任一者的彼此間之交互作用的結合動力學。於核苷酸分子之存在下，監控該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的交互作用可包括測量該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子之間的平衡結合常數(即於該4類核苷酸之任一者的存在下該聚合酶與該模板核酸之平衡結合常數)。因此，例如，該監控包括於該4類核苷酸之任一者的存在下測量該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的平衡結合常數。於核苷酸分子之存在下，監控該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的該交互作用包括於該4類核苷酸之任一者的存在下測量該聚合酶自該預先準備之模板核酸的解離動力學。

【0288】於該第一核苷酸分子未化學併入該預先準備

之模板核酸分子的該引子之情況下，該監控步驟可包括於該第一核苷酸分子之存在下監控該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的穩態交互作用。於該第一核苷酸分子未化學併入該預先準備之模板核酸分子的該引子之情況下，該監控可包括於該第一核苷酸分子之存在下監控該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的解離。於該第一核苷酸分子未化學併入該預先準備之模板核酸分子的該引子之情況下，該監控可包括於該第一核苷酸分子之存在下監控該聚合酶與該預先準備之模板核酸分子的結合。再次，於該等方法之測試核苷酸可為天然核苷酸(即未經標記)、經標記之核苷酸(例如經螢光標記之核苷酸)或核苷酸類似物(例如經修飾以包括可逆性終止子部分之核苷酸)。

【0289】於SBB中，該預先準備之模板核酸分子的該引子之3’核苷酸上的化學區塊(例如該核苷酸之鹼基或糖上的可逆性終止子部分)或該反應混合物缺少催化性金屬離子或該聚合酶的該活性位置缺少催化性金屬離子能防止該核苷酸化學併入該預先準備之模板核酸分子的該引子。

【0290】藉由監控該三元複合物之存在、形成及/或解離，可測定下一個正確之鹼基或核苷酸的鑑別。於未化學併入下一個正確之核苷酸至該引子之3’端的情況下，可測定下一個鹼基之鑑別。於被加入之核苷酸的存在下，藉由監控該聚合酶與該預先準備之核酸模板的親和性，可測定下一個鹼基之鑑別。

【0291】SBB可包括併入步驟。該併入步驟涉及於與

模板核酸結合之引子的3'端化學併入一或更多個核苷酸。可藉由併入反應混合物促進該併入反應。該併入反應混合物可含有與該檢驗反應不同的核苷酸組成。例如，該檢驗反應可包括一類核苷酸且該併入反應可包括另一類核苷酸。藉由另一實例，該檢驗反應包含1類核苷酸且該併入反應包含4類核苷酸或反之亦然。該檢驗反應混合物可經改變或經該併入反應混合物替代。

【0292】存在於該反應混合物但未被隔絕於三元複合物之核苷酸可引起多個核苷酸插入。於該化學併入步驟之前，可使用沖洗步驟以確保僅有被隔絕於陷獲之三元複合物的核苷酸可於該併入步驟供併入。該陷獲之聚合酶複合物可為三元複合物、安定之三元複合物、或涉及該聚合酶、預先準備之模板核酸及下一個正確之核苷酸的三元複合物。

合成式定序

【0293】合成式定序通常涉及通過針對與該引子雜交之模板股的核苷酸之重複加入的新生引子之酶催化性延伸。簡言之，SBS可藉由使與流通池之位置連接的標的核酸與一或更多個經標記之核苷酸、DNA聚合酶等接觸被起始。使用該標的核酸作為模板以延伸引子之該等位置將併入可被偵測的經標記之核苷酸。偵測可包括使用本文描述之方法或裝置進行掃描。可選擇性地，該經標記之核苷酸可進一步包括可逆性終止性質，該可逆性終止性質終止一

旦核苷酸已被加入至引子時之進一步引子延伸。例如，具有可逆性終止子部分之核苷酸類似物可被加入至引子，使得隨後之延伸不能發生直至去阻斷劑經遞送以除去該可逆性終止子部分。因此，對使用可逆性終止之實施態樣，去阻斷劑可經遞送至該池(於偵測發生之前或之後)。於多個不同之遞送步驟之間可進行沖洗。該循環可實施n次以藉由n個核苷酸延伸該引子，藉以偵測長度n之序列。可方便地適用於本揭露之方法、系統或裝置的例示性SBS方法、反應劑及偵測成分係描述於例如文獻Bentley et al., *Nature* 456: 53-59 (2008)；WO 04/018497；WO 91/06678；WO 07/123744；美國專利號7,057,026、7,329,492、7,211,414、7,315,019或7,405,281；及美國專利申請案公開號2008/0108082 A1，彼等之每一者併入本文作為參考。亦可使用可自Illumina, Inc. (San Diego, 加州)商業取得之SBS方法。SBS方法使用之一或更多種反應劑可選擇性地經由混合相流體(例如流體泡沫、流體漿泥或流體乳化液)遞送、與混合相流體接觸及/或藉由混合相流體除去。於SBS方法中，可自用於偵測之流通池除去混合相流體。

乳糜化PCR

【0294】於以多重NGS為基礎之定序平台中，乳糜化PCR (EmPCR)係供模板擴增之慣常使用的方法。emPCR之基本原理係於油包水乳化液之水滴中的模板分子之稀釋和分室化。理想上，該稀釋係達每一滴含有單一模板分子並

功能作為微PCR反應器之程度。

【0295】乳糜化PCR可包含於油包水乳化液中之配接子側面的霰彈槍DNA庫之PCR擴增。該PCR係多模板PCR；於特定實施態樣中，僅使用單一引子對。該等PCR引子之一者被束縛於微量珠之表面(5'連接)。低模板濃度導致大部分含有珠之乳化微囊泡具有0或1個模板分子存在。於富有成效之乳化微囊泡(存有珠和模板分子兩者之乳化微囊泡)中，PCR擴增子可被捕獲於該珠之該表面。經乳糜破裂後，含有擴增產物之珠可被選擇地富增。每個經群落擴增之珠於其表面具有PCR產物，該PCR產物對應該模板庫之單一分子的擴增。隨後該等珠可被陣列於流通池表面以進行定序。乳糜化PCR方法的各種不同之實施態樣係描述於文獻Dressman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8817-8822 (2003)；PCT專利申請案公開號WO 05/010145；美國專利申請案公開號2005/0130173、2005/0064460及2005/0042648，彼等之每一者的全部內容併入本文作為參考。

【0296】珠可經構形以進行多重核酸之平行定序。於多重格式(其中多重核酸係經平行定序)中，經群落擴增之標的序列(例如經由乳糜化PCR (emPCR)或橋式放大)一般係共價固定於基材上。例如，當實施乳糜化PCR時，感興趣之標的被固定於珠基材上，然而經群落擴增之標的被固定於以流通池為基礎之基材的通道或以陣列或晶片為基礎之基材的特定區位。

實施例

【0297】上述之實施態樣的某些面向係進一步詳細地揭露於下述之實施例中，該等實施例於任何方面皆不欲限制本揭露之範圍。

實施例1

膠態自行組裝

【0298】圖5A顯示如本文描述之表面上負載珠的該表面之影像。珠被導入至液體並以膠態自行組裝之方式堆積。該等堆積之珠負載於表面上。於該表面之不同區域的珠具有不同的特性(參閱圖5A之表面的放大影像)。圖5B1至5B3之熱圖和繪圖顯示於該表面之不同區域的該等堆積之珠的粒徑和結晶度。圖5B4之繪圖顯示該等堆積之珠的珠結晶度(有序、規則放置之、充分堆積之珠)與該等堆積之珠的粒徑之間存在關連性，使得達成具有高珠結晶度之大粒徑。圖5C1顯示如本文描述之負載於表面上的珠之影像，其中放大之區域顯示珠結晶度之變化。圖5C2係顯示如圖5C1所顯示的該放大之區域的珠結晶度之變化的熱圖。圖5D1係顯示負載於該表面上之該等珠的特性之繪圖。圖5D2係顯示負載於該表面上之該等珠的結晶度分佈之條形圖。圖5顯示之粒徑係長度尺寸，該長度尺寸反映諸如圖5A所示之顯微鏡影像的單晶疇之特性(平均)粒徑。單位係以珠直徑表示(r/σ，其中σ係珠直徑)，且因為於圖

5A中該等珠之大小係1 μm，據此該粒徑之單位係μm。此測度源自如圖5D1所示之繪圖，其中該粒徑係以該長度尺寸(r/σ)界定，且位向關連性(捕獲長範圍有序之質量的測度)降低至0.5。應注意的是，某些顯微鏡影像僅含有1個單一晶疇並因此該位向關連性從未衰退低於0.5而導致無限粒徑，隨後於300 μm封頂，因為300 μm係該顯微鏡影像之對角線長度(於該顯微鏡影像之視野中可測量的最大長度)。

實施例2

蝕刻

【0299】圖6A至6B顯示藉由使用氧電漿蝕刻於該平面表面變化之蝕刻速率。

【0300】圖6B1至6B3之SEM影像顯示使用100%氧(圖6B1)、50%氧和50%四氟化碳(圖6B2)及100%四氟化碳(圖6B3)之該等蝕刻氣體於反應離子蝕刻(50 W；10 mT；8分鐘；10℃)之功效。顯示於各別結構之頂端的環形區域係源自該珠之殘餘聚苯乙烯，且下方之平台係AZ光阻層(AZ1500系列係MicroChemicals GmbH販售之光阻劑)。該功能層經該AZ光阻層覆蓋且環繞區域係暴露之玻璃(可能具有該光阻層之殘餘物)。雖然此圖之影像顯示AZ1500光阻層之蝕刻，但是當能瞭解的是，其他阻層(例如光阻層)可依據本文描述之方法經蝕刻。圖6C1和6C2之SEM影像顯示射頻(RF)功率於使用100%氧(圖6C1)及50%氧和50%四氟

化碳(圖6C2)之反應離子蝕刻(10 mT；8分鐘；10℃)之功效。圖6D之SEM影像顯示使用2步驟蝕刻程序之該平面表面的結果：

【0301】(1)較各向同性(調PS ϕ)：50 W；20 mT；10 sccm O_2；4分鐘；10℃；

【0302】(2)較各向異性(通過AZ蝕刻且降低ϕ)：50 W；10 mT；10 sccm O_2：10 sccm CF_4；4分鐘；10℃。

【0303】該第一蝕刻步驟未實施較久，因為O_2蝕刻AZ比PS較快(底切蝕刻)。為於相同時間具有外側和垂直蝕刻，該第二蝕刻步驟不僅使用CF_4作為蝕刻劑。

實施例3

emPCR珠沉積和定序

【0304】圖7A之螢光顯微鏡影像比較吸附於1.5 μm間距的結構化胺基矽烷表面(左邊影像)和非結構化表面(右邊影像)上之emPCR珠的定序。圖7B至7C之螢光影像比較吸附於2 μm間距的結構化胺基矽烷表面(左邊影像)和非結構化表面(右邊影像)上之emPCR珠的定序。圖7D1和7D2之繪圖和螢光影像比較吸附於2 μm間距的結構化胺基矽烷表面(圖7D1)和非結構化表面(圖7D2)上之emPCR珠的定序。圖7A至7C和7D1至7D2顯示經由結構化胺基矽烷表面，該等emPCR珠之螢光訊號係較有序、經緊密堆積且較佳分隔，且該定序結果較佳。

實施環境

【0305】圖19說明例示性計算裝置1900之一般結構，該例示性計算裝置1900係經構形以實施本文描述之方法和特徵。圖19說明之該計算裝置1900之一般結構包括電腦硬體和軟體組件之排列。該計算裝置1900可包括比圖19所示者較多(或較少)之元件。然而，為提供可實施之揭露，不需要顯示所有一般慣用之元件。如圖示說明者，該計算裝置1900包括處理單元1910、網路介面1920、電腦可讀式媒體驅動器1930、輸入/輸出裝置介面1940、顯示器1950及輸入裝置1960，所有該等組件彼此可藉由匯流排連通。該網路介面1920可提供與一或更多個網路或計算系統之連結。該處理單元1910可經由網路接收其他計算系統或服務之資訊和指令。該處理單元1910亦可與記憶體1970輸入/輸出連結且經由該輸入/輸出裝置介面1940進一步提供於可選擇之顯示器1950的輸出資訊。該輸入/輸出裝置介面1940亦可接收該可選擇之輸入裝置1960 (諸如鍵盤、滑鼠、數位筆、麥克風、觸控螢幕、姿態辨識系統、語音辨識系統、遊戲台、加速計、迴轉儀或其他輸入裝置)之輸入。

【0306】該記憶體1970可含有該處理單元1910執行之電腦程式指令(於某些實施態樣中呈模組或組件聚集)以實施一或更多個實施態樣。該記憶體1970一般包括RAM、ROM及/或其他持續性、輔助性或非暫時性電腦可讀式媒體。該記憶體1970可儲存操作系統1972，該操作系統1972

提供電腦程式指令以供該處理單元1910使用於該計算裝置1900之一般管理和操作。該記憶體1970可進一步包括用於執行本揭露之多個面向的電腦程式指令和其他資料。

【0307】例如，於一實施態樣中，該記憶體1970包括用於處理一或更多個流通池影像(諸如比對流通池影像、定向流通池影像、揀選流通池影像及於流通池影像上實施品質評估)之流通池影像處理模組1974。此外，該記憶體1970可包括或連通該數據儲存器1990及/或儲存該流通池影像、經處理之流通池影像或定序結果的一或更多個其他數據儲存器。

額外考量

【0308】於至少某些上述之實施態樣中，於一實施態樣中使用之一或更多個元件可被互換地使用於另一實施態樣中，除非該替代於技術上不能實施。熟習此技術之人士當能瞭解的是，於未偏離本案所請之標的的範圍下，對上述之該等方法和結構可進行多種不同之其他省略、加入及修飾。如所附之申請專利範圍所界定者，所有該等修飾和改變將落入該等標的的範圍。

【0309】對本揭露之程序和方法及其他程序和方法，熟習此技術之人士當能瞭解的是，該等程序和方法所實施之功能可以不同之順序執行。進一步，所概述之步驟和操作僅係作為實例，且於未對所揭露之實施態樣的實質產生不利之影響的情況下，某些該等步驟和操作可為可選擇

的、經組合成較少之步驟和操作或擴增成額外之步驟和操作。

【0310】關於本揭露所使用之實質上任何多數及/或單數術語，熟習此技術之人士當能於本揭露及/或本申請案中適當地自該多數翻譯為該單數及/或自該單數翻譯為該多數。為明確起見，本揭露清楚地描述多種不同之單數/複數置換。除非另有明確說明，本說明書和所附之申請專利範圍所使用之單數型式“一”和“該”包括複數含義。於是，諸如敘述“經構形之裝置”包括一或更多個所述之裝置。該一或更多個所述之裝置亦可集體經構形以實施所述之態樣。例如，“經構形以實施態樣A、B及C之處理器”可包括經構形以實施態樣A之第一處理器與經構形以實施態樣B和C之第二處理器的組合。除非另有說明，本揭露之用語“或”包含“及/或”。

【0311】熟習此技術之人士當能瞭解的是，一般而言，本說明書和特別地所附之申請專利範圍(例如所附之申請專利範圍的主體)所使用之用語係“開放式”用語(例如“包括”應被解釋為“包括但不限於”，“具有”應被解釋為“具有至少”，“包含”應被解釋為“包含但不限於”等)。進一步，熟習此技術之人士當能瞭解的是，若請求項欲記載特定數量，則該特定數量將會明確地記載於該請求項，且於缺少該特定記載之情況下，該特定記載係不存在。例如，為有助於瞭解，所附之申請專利範圍可含有使用“至少一”和“一或更多”。然而，該“至少一”和“一或更多”不應被解

釋為表示請求項記載之不定冠詞“一”被限定為僅含有該“一”之實施態樣，甚至當相同請求項包括該“一或更多”或“至少一”和不定冠詞諸如“一”時(例如“一”應被解釋為表示“至少一”或“一或更多”)；相同情況適用於請求項記載之定冠詞。此外，即使請求項明確記載特定數量，熟習此技術之人士當能瞭解的是，該特定數量之記載應被解釋為表示至少所述之數量(例如簡單記載“2個敘述”而無其他修飾表示至少2個敘述或2或更多個敘述)。進一步，於使用類似於敘述“A、B及C等之至少一者”的情況，一般而言，熟習此技術之人士當能瞭解該情況之意義(例如“具有A、B及C之至少一者的系統”將包括但不限於僅具有A、僅具有B、僅具有C、具有A和B、具有A和C、具有B和C及/或具有A、B及C等之系統)。於使用類似於敘述“A、B或C等之至少一者”的情況，一般而言，熟習此技術之人士當能瞭解該情況之意義(例如“具有A、B或C之至少一者的系統”將包括但不限於僅具有A、僅具有B、僅具有C、具有A和B、具有A和C、具有B和C及/或具有A、B及C等之系統)。熟習此技術之人士當能進一步瞭解的是，呈現2或更多個可替代之術語的實質上任何分離用語及/或片語，無論記載於說明書、申請專利範圍或圖式，應被瞭解為考量包括該等術語之一者、該等術語之任一者或兩者之可能性。例如，片語“A或B”將被瞭解為包括“A”或“B”或“A和B”之可能性。

【0312】此外，當本揭露之特徵或方面係以馬庫西

(Markush)群組描述時，熟習此技術之人士當能瞭解該揭露亦以該馬庫西群組之任何個別成員或更多個成員之子群描述。

【0313】熟習此技術之人士當能瞭解的是，對於任何和所有目的，諸如於提供之文字敘述上，本文揭露之所有範圍亦包含任何和所有可能之子範圍和彼等之子範圍的組合。任何例示之範圍可輕易地被確認為充分描述並賦與經切割成至少1/2、1/3、1/4、1/5、1/10等之相同範圍。作為一非限制性實例，本文描述之每一個範圍可輕易地經切割為下1/3、中間1/3及上1/3等。熟習此技術之人士亦當能瞭解的是，諸如“達(至)”、“至少”、“大(多或高)於”、“小(少或低)於”及類似者之所有敘述包括所述之數量且所指之範圍可隨後經切割成如上述之子範圍。最後，熟習此技術之人士當能瞭解的是，範圍包括每一個個別成員。因此，例如，具有1至3個成員之群組係指具有1、2或3個成員之群組。同樣地，具有1至5個成員之群組係指具有1、2、3、4或5個成員之群組等。

【0314】當能瞭解的是，本揭露的各種不同之實施態樣業已描述於本文以供說明，且於未偏離本揭露之範圍和精神之情況下可進行多種不同之修飾。於是，本揭露的各種不同之實施態樣非欲為限制，且本揭露之真正範圍和精神係記載於所附之申請專利範圍。

【0315】當能瞭解的是，所有目標或優點可非必要地依據本揭露之任一特定實施態樣達成。因此，例如，熟習

此技術之人士當能瞭解的是，某些實施態樣可經構形以能達成或最適化本揭露教示之一個優點或一組優點而無須達成本揭露教示或建議之其他目標或優點的方式操作。

【0316】本文描述之所有方法可經由計算系統執行之軟體碼模組實施且完全自動化，該計算系統包括一或更多個電腦或處理器。該碼模組可儲存於任何形式之非暫時性電腦可讀式媒體或其他電腦儲存裝置。某些或所有該等方法可由特定之電腦硬體實施。

【0317】非本文描述之許多其他變異由本揭露將是顯然的。例如，取決於實施態樣，本文描述之任何演算法的某些動作、事件或功能可以不同的順序實施、可被加入、合併或一起被排除(例如，非所有描述之動作或事件於實施該演算法係必要的)。再者，於某些實施態樣中，動作或事件可經由例如多線程處理、中斷處理、多個處理器或處理器核心或其他平行結構被同時實施而非依序實施。此外，不同的工作或程序可藉由能一起發生作用之不同的機器及/或計算系統實施。

【0318】本文使用之描述數量的“約”字係指該數量之+/-10%的範圍，且本文使用之描述範圍的“約”字係指涵蓋所述之端點的+/-10%的延伸範圍。

【0319】本文使用之“平面”係指局部平滑或可替代地具有局部界定之切線的表面。本揭露之許多實施態樣考慮使用涉及平坦表面，藉以例如於未改變焦距下促進自該表面傳訊影像，即使該表面相對於顯像裝置係經轉換或滑

動。然而，於所有情況下，該“平面”不應受限於該等實施態樣，因為於某些情況下該“平面”亦與局部平面但呈球形的表面(諸如珠)或局部平面但連接非一致平滑的表面(諸如於表面平滑性上具有孔、峰、角或其他不連續的表面)一致。

【0320】與本揭露之實施態樣連結的所描述之多種不同的說明性邏輯單元和模組可藉由機器(諸如經設計以實施本文所描述之功能的處理單元或處理器、數位訊號處理器(DSP)、特定應用積體電路(ASIC)、現場可程式化邏輯閘陣列(FPGA)或其他可程式化邏輯裝置、分散閘或電晶體邏輯、分散硬體組件或彼等之任何組合)執行或實施。處理器可為微處理器，但可替代地該處理器可為控制器、微控制器、狀態機、相同者之組合或類似者。處理器可包括經構形以處理電腦可執行之指令的電路。於另一實施態樣中，處理器包括實施邏輯操作但未處理電腦可執行之指令的FPGA或其他可程式化裝置。處理器亦可為多個計算裝置之組合，例如DSP與微處理器之組合、複數個微處理器之組合、一或更多個微處理器與DSP核心連結或任何其他該等構形。雖然本揭露主要關於數位技術，但是處理器亦可包括主要類比組件。例如，本文描述之某些或所有訊號處理演算法可以類比電路或混合類比和數位電路實施。計算環境可包括任何類型之電腦系統，其包括但不限於基於僅舉幾例之微處理器、大型電腦、數位訊號處理器、可攜帶式計算裝置、裝置控制器或電器內之計算引擎為基礎的

電腦系統。

【0321】本文描述及/或圖式所示之流程圖中的任何方法敘述、元件或單元應被理解為可能之代表性模組、片段或編碼部分，其包括用於執行該方法之特定邏輯功能或元件的一或更多個可執行之指令。本文描述之實施態樣的範圍包括可替代性實施，其中元件或功能可被刪除、以非所示之順利實施或被討論，包括實質上同時或以相反之順序實施，其取決於涉及如熟習此技術之人士所瞭解的功能性。

【0322】應強調的是，對上述之實施態樣可進行多種變化和修飾，該等實施態樣之元件應被理解為存在於其他可接受之實例。所有該等修飾和變化將被包括於本揭露之範圍且被下述之申請專利範圍保護。

【符號說明】

【0323】

202:平面結構(載玻片)

204:液體

208a1:動作

210:粒子

212:表面

208a2:動作

214:結合位置

208:粒子

216:活性位置層

218:遮罩層

208a3:動作

208a4:動作

208a5:動作

302r1:第一晶格

304r1:第一粒子

302r2:第二晶格

304r2:第二粒子

306d:間斷

306i:非有序的粒子

308h1:第1六角構形

308h2:第2六角構形

310h1:第1六角形

310h2:第2六角形

308t1:第1等邊三角形構形

308t2:第2等邊三角形構形

310t1:第1等邊三角形

310t2:第2等邊三角形

308s1:第一直線構形

308s2:第二直線構形

308*l*1:第一線性構形

308*l*2:第二線性構形

310s1:第一直線

310s2:第二直線

310*l*1:第一列

310*l*2:第二列

312o1:第一偏距

312o2:第一偏距

314d1:第一方向

314d2:第一方向

316o1:第二偏距

316o2:第二偏距

318d1:第二方向

318d2:第二方向

404r1:保留區域

404r2:保留區域

404s1:結合位置

404s2:結合位置

405r1:經蝕刻之區域

405r2:經蝕刻之區域

404r1r:保留區域之半徑

404r1d:保留區域之直徑

304r1r:粒子半徑

304r1d:粒子直徑

420r1:分隔距離

422r1:間距

322r1:間距

406d:間斷

406i:結合位置

402r1:規則結合位置陣列之第一區域

402r2:規則結合位置陣列之第二區域

408h1:六角構形

408h2:六角構形

410h1:第1六角形

410h2:第2六角形

408t1:等邊三角形構形

408t2:等邊三角形構形

410t1:第1等邊三角形

410t2:第2等邊三角形

408s1:直線構形

408s2:直線構形

410s1:第一直線

410s2:第二直線

410*l*1:第一列

410*l*2:第二列

408*l*1:第一線性構形

408*l*2:第二線性構形

412o1:第一偏距

416o1:第二偏距

414d1:第一方向

418d1:第二方向

424d2:第一方向

412o2:第一偏距

416o2:第二偏距

418d2:第二方向

414d2:第一方向

1900:計算裝置

1910:處理單元

1920:網路介面

1930:電腦可讀式媒體驅動器

1940:輸入/輸出裝置介面

1950:顯示器

1960:輸入裝置

1970:記憶體

1972:操作系統

1974:流通池影像處理模組

1990:數據儲存器

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種於平面結構上特定結合位置之方法，其包含：

提供納入液體中之平面結構；

投遞複數個粒子至該液體之表面；及

除去介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該平面結構接觸，其中於該表面上及/或與該平面結構接觸之該複數個粒子特定於該平面結構上之複數個結合位置。

【請求項2】一種於複數個平面結構上特定結合位置之方法，其包含：

提供納入液體中之複數個平面結構；

投遞複數個粒子至該液體之表面；及

除去介於該複數個粒子與該複數個平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該複數個平面結構接觸，其中於該表面上及/或與該複數個平面結構接觸之該複數個粒子特定於該複數個平面結構之每一者上之複數個結合位置，且其中於該複數個平面結構之任2個平面結構上的該複數個結合位置係不同。

【請求項3】一種於複數個平面結構上特定結合位置之方法，其包含：

對複數個平面結構之每一者，

提供納入液體中之平面結構；

投遞複數個粒子至該液體之表面；及

除去介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體，使得該複數個粒子與該平面結構接觸，其中於該表面上及/或與該平面結構接觸之該複數個粒子特定於該平面結構上之複數個結合位置，且其中於該複數個平面結構之任2個平面結構上的該複數個結合位置係不同。

【請求項4】如請求項1至3中任一項之方法，其中該液體包含各別於某一濃度之擴展劑、污染物或彼等之組合，可選擇性地其中該污染物包含界面活性劑、擁擠劑、蔗糖、尿素、聚丙烯酸、1-甲基吡啶-2-醛肟氯鹽或彼等之組合，可選擇性地其中該擴展劑包含醇，可選擇性地其中該醇包含乙醇、異丙醇、異丁醇或彼等之組合，可選擇性地其中該界面活性劑包含十二烷基硫酸鈉、Tween或彼等之組合，可選擇性地其中該擁擠劑包含聚乙二醇(PEG)，可選擇性地其中該PEG包含自PEG 200至PEG 8000之PEG，可選擇性地其中該濃度包含約1%至約20%。

【請求項5】如請求項1至3中任一項之方法，其中該除去包含自含有該液體、該平面表面及該複數個粒子之室除去該液體。

【請求項6】如請求項1至4中任一項之方法，其中該除去包含自含有該液體、該平面表面及該複數個粒子之室排洩該液體。

【請求項7】如請求項1至6中任一項之方法，其中該除去包含加熱該液體。

【請求項8】如請求項1至7中任一項之方法，其中該

除去包含提升該平面結構高於該液體之表面。

【請求項9】如請求項1至8中任一項之方法，其中該除去包含允許介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體蒸發。

【請求項10】如請求項1至9中任一項之方法，其中該除去包含蒸發介於該複數個粒子與該平面結構之間的該液體。

【請求項11】如請求項1至10中任一項之方法，其中該液體包含緩衝液、鹽溶液、水、有機溶劑、極性溶劑、非極性溶劑、油、天然油、合成油、有機油、礦物油、石蠟油、烴油、非烴油、矽油、揮發性液體或彼等之組合。

【請求項12】如請求項1至11中任一項之方法，其中該液體之密度係約0.1 g/cm^3至約10 g/cm^3。

【請求項13】如請求項1至12中任一項之方法，其中該液體之密度係高於該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之密度。

【請求項14】如請求項1至13中任一項之方法，其中該液體之黏度係約10^{-1}毫帕-秒(mPa.s)至約10^7 mPa.s。

【請求項15】如請求項1至14中任一項之方法，其中該液體之表面張力係約10 $mN.m^{-1}$至約500 $mN.m^{-1}$。

【請求項16】如請求項1至15中任一項之方法，其中與該平面結構接觸之該複數個粒子係於該平面結構上。

【請求項17】如請求項1至16中任一項之方法，其中該複數個粒子包含具有相同材質之2種粒子。

【請求項18】如請求項1至16中任一項之方法，其中該複數個粒子之每個粒子包含相同材質。

【請求項19】如請求項1至16中任一項之方法，其中該複數個粒子包含具有不同材質之2種粒子。

【請求項20】如請求項1至16中任一項之方法，其中該複數個粒子包含2個具有不同材質之粒子子集。

【請求項21】如請求項1至16中任一項之方法，其中該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之材質包含聚二甲基矽氧烷(PDMS)、聚對苯二甲酸乙二酯(PET)、聚對苯二甲酸丁二酯(PBT)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚乙烯、聚甲烯、聚丙烯(PP)、聚苯乙烯(PS)、聚乙酸乙烯酯、聚胺甲酸酯或彼等之組合。

【請求項22】如請求項1至21中任一項之方法，其中該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之半徑或直徑係約10^{-9} m至約10^{-4} m。

【請求項23】如請求項1至22中任一項之方法，其中該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者之體積係約10^{-27} m^3至約10^{-12} m^3。

【請求項24】如請求項1至23中任一項之方法，其中該複數個粒子之二者具有相同之半徑及/或其中該複數個粒子之每一者具有相同之半徑。

【請求項25】如請求項1至23中任一項之方法，其中該複數個粒子包含具有第一相同半徑之的第一粒子子集和具有第二相同半徑之的第二粒子子集，且其中該第一相同

半徑與該第二相同半徑係不同。

【請求項26】如請求項25之方法，其中該第一相同半徑與該第二相同半徑差異至少0.1 μm及/或其中該第一相同半徑與該第二相同半徑差異至少10%。

【請求項27】如請求項25至26中任一項之方法，其中該第一相同半徑係大於該第二相同半徑，可選擇性地其中該第一相同半徑係0.5 μm，且可選擇性地其中該第二相同半徑係0.4 μm。

【請求項28】如請求項25至27中任一項之方法，其中該第一粒子子集之數量與該第二粒子子集之數量的比例係約1:100至約100:1。

【請求項29】如請求項1至28中任一項之方法，其中該複數個粒子之一者、一或更多者或每一者具有球形之形狀。

【請求項30】如請求項1至29中任一項之方法，其中該複數個粒子包含約10^4個粒子至約10^8個粒子，其中該第一粒子子集包含約10^4個粒子至約10^8個粒子及/或其中該第二粒子子集包含約10^4個粒子至約10^8個粒子。

【請求項31】如請求項1至30中任一項之方法，其中該複數個粒子係以約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之密度存在於該液體之該表面上，其中該第一粒子子集係以約2k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之密度存在於該液體之該表面上及/或其中該第二粒子子集係以約8k/mm^{2}至約2,000k/mm^{2}之密度存在於該液體之該表面上。

【請求項32】如請求項1至30中任一項之方法，其中該複數個粒子、該第一粒子子集及/或該第二粒子子集係以至少600k/mm^{2}之密度存在於該液體之該表面上。

【請求項33】如請求項1至30中任一項之方法，其中該複數個粒子、該第一粒子子集及/或該第二粒子子集係以至少800k/mm^{2}之密度存在於該液體之該表面上。

【請求項34】如請求項1至30中任一項之方法，其中該複數個粒子、該第一粒子子集及/或該第二粒子子集係以至少1,000k/mm^{2}之密度存在於該液體之該表面上。

【請求項35】如請求項1至34中任一項之方法，

其中該複數個結合位置之2個或任2個相鄰結合位置的間距係約10^{-9} m至約10^{-4} m；及/或

其中該複數個結合位置包含3個連續結合位置，使得第二結合位置係介於第一結合位置與第三結合位置之間，且其中介於該第一結合位置與該第二結合位置之間的間距與介於該第二結合位置與該第三結合位置之間的間距係不同。

【請求項36】如請求項1至35中任一項之方法，其中該複數個結合位置之一者或一或更多者或每一者的大小係約10^{-9} m至約10^{-4} m，可選擇性地其中該大小係寬度或半徑。

【請求項37】如請求項1至36中任一項之方法，其中該複數個結合位置之一者、一或更多者或每一者具有環形形狀。

【請求項38】如請求項1至37中任一項之方法，其中該複數個結合位置包含約10^4個結合位置至約10^8個結合位置。

【請求項39】如請求項1至38中任一項之方法，其中遞送該複數個粒子至該液體之該表面包含藉由該複數個粒子局部飽和該液體之表面，使得該表面包含：包含該複數個粒子之第一粒子子集的第一晶格及/或第一不規則陣列。

【請求項40】如請求項39之方法，其中該複數個粒子及/或該第一粒子子集係以約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項41】如請求項39之方法，其中該複數個粒子及/或該第一粒子子集係以至少600k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項42】如請求項39之方法，其中該複數個粒子及/或該第一粒子子集係以至少800k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項43】如請求項39之方法，其中該複數個粒子及/或該第一粒子子集係以至少1,000k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項44】如請求項39至43中任一項之方法，其中該第一晶格之該第一粒子子集係呈第1六角構形，其中呈該第1六角構形之該第一晶格的該第一粒子子集之7個粒子係位於第1六角形之6個頂點和中心，且其中位於該第1六

角形之該6個頂點的該6個粒子之每一者係與位於該第1六角形之該中心的粒子和位於該第1六角形之該等頂點的2個其他粒子接觸。

【請求項45】如請求項39至43中任一項之方法，其中該第一晶格之該第一粒子子集係呈第1等邊三角形構形，使得該第一晶格之該第一粒子子集的3個相鄰非共線粒子形成第1等邊三角形。

【請求項46】如請求項39至43中任一項之方法，其中該第一晶格包含排列成複數個第一列粒子之該第一粒子子集，其中該複數列之每個第一列的粒子排列呈第一線性構形，使得該第一列粒子與該第一列內相鄰於該粒子之2個粒子接觸，其中2個相鄰第一列係於第一方向藉由大於該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之該粒子的直徑偏位，且其中該2個相鄰列係於與該第一方向垂直之第二方向藉由該複數個粒子之該粒子的直徑偏位，使得一第一列之粒子與其他第一列之2個相鄰粒子接觸。

【請求項47】如請求項39至46中任一項之方法，其中遞送該複數個粒子至該液體之該表面包含藉由該複數個粒子局部飽和該液體之表面，使得該表面包含：包含該複數個粒子之第二粒子子集的第二晶格或第二不規則陣列，該第二晶格或該第二不規則陣列係藉由間斷與該第一晶格或該第一不規則陣列隔開。

【請求項48】如請求項47之方法，其中該第二晶格之該第二粒子子集係呈第2六角構形，其中呈該第2六角構形

之該第二晶格的該第二粒子子集之7個粒子係位於第2六角形之6個頂點和中心，且其中位於該第2六角形之該6個頂點的該6個粒子之每一者係與位於該第2六角形之該中心的粒子和位於該第2六角形之該等頂點的2個其他粒子接觸。

【請求項49】如請求項48之方法，其中該第1六角構形與該第2六角構形具有不同的位向。

【請求項50】如請求項48之方法，其中該第1六角構形與該第2六角構形具有相同的位向。

【請求項51】如請求項47之方法，其中該第二晶格之該第二粒子子集係呈第2等邊三角形構形，使得該第二晶格之該第二粒子子集的3個相鄰非共線粒子形成第2等邊三角形。

【請求項52】如請求項51之方法，其中該第1等邊三角形構形與該第2等邊三角形構形具有不同的位向。

【請求項53】如請求項51之方法，其中該第1等邊三角形構形與該第2等邊三角形構形具有相同的位向。

【請求項54】如請求項47之方法，其中該第一晶格內相鄰粒子之間所畫的第一直線與該第二晶格內相鄰粒子之間所畫的任何第二直線不平行。

【請求項55】如請求項47之方法，其中該第一晶格內相鄰粒子之間所畫的第一直線與該第二晶格內相鄰粒子之間所畫的一第二直線平行。

【請求項56】如請求項39至55中任一項之方法，其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列之該第一粒子

子集的每個粒子係以閾值距離或超過閾值距離遠離該粒子之最近相鄰粒子，可選擇性地其中該閾值距離係該粒子之半徑。

【請求項57】如請求項56之方法，

其中該第一不規則陣列之該第一粒子子集及/或該第二不規則陣列之該第二粒子子集不包含位於任何六角形之6個頂點和中心的7個相鄰粒子；

其中該第一不規則陣列之該第一粒子子集及/或該第二不規則陣列之該第二粒子子集不包含環繞位於六角形之6個頂點的第7個粒子之6個相鄰粒子；及/或

其中該第一不規則陣列之該第一粒子子集及/或該第二不規則陣列之該第二粒子子集包含7個相鄰粒子，其中該7個相鄰粒子之6者係位於非為六角形之六面形狀的6個頂點且環繞該7個相鄰粒子之第7個粒子。

【請求項58】如請求項56至57中任一項之方法，

其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形之粒子；及/或

其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形的彼此位於至少閾值距離內之粒子，可選擇性地其中該閾值距離係5 μm。

【請求項59】如請求項1至58中任一項之方法，其中遞送該複數個粒子包含同時及/或依次遞送該複數個粒子

之第一粒子子集至該液體表面之第一區位和該複數個粒子之第二粒子子集至該液體表面之第二區位。

【請求項60】如請求項1至59中任一項之方法，其中遞送該複數個粒子包含同時及/或依次遞送該複數個粒子之複數個粒子子集至該液體表面之不同區位，可選擇性地其中該複數個粒子子集包含至少5個粒子子集。

【請求項61】如請求項1至59中任一項之方法，其進一步包含蝕刻該平面結構和與該平面結構接觸之該複數個粒子以產生：

複數個保留區域，其中該平面表面上之物質層係與該複數個粒子接觸且係經差異性保留；和

複數個經蝕刻之區域，其中該物質層未與該複數個粒子接觸且係經差異性除去；

可選擇性地其中該物質層係親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。

【請求項62】如請求項61之方法，其中該遮罩層係位於該物質層上，其中於該複數個保留區域之該平面表面上的該物質層係經由該複數個保留區域之該遮罩層與該複數個粒子接觸，其中該複數個保留區域之該遮罩層係與該複數個粒子接觸且係經差異性保留，且其中該複數個經蝕刻之區域的該遮罩層未與該複數個粒子接觸且經差異性除去；可選擇性地對該等空隙施用鈍化化學，同時該等珠防止該等官能基嫁接於未來之結合位置；且可選擇性地進一步除去聚合物遮罩層且暴露無遮蔽的玻璃，使用第二個

CVD製程以嫁接DNA共價捕獲所需要之活性化學於結構化墊上。

【請求項63】如請求項61至62中任一項之方法，其中該複數個保留區域之保留區域的大小係小於經該蝕刻前及/或經該蝕刻後與該保留區域接觸的該複數個粒子之粒子的大小。

【請求項64】如請求項61至63中任一項之方法，其中該複數個保留區域之保留區域的大小係大於經該蝕刻後與該保留區域接觸的該複數個粒子之粒子的大小。

【請求項65】如請求項61至64中任一項之方法，其中該蝕刻包含降解該複數個粒子之至少1個粒子的一部分。

【請求項66】如請求項65之方法，其中該降解決定於該結合位置上該複數個結合位置之結合位置的大小，該結合位置對應該複數個保留區域之保留區域。

【請求項67】如請求項65至66中任一項之方法，其中該降解決定於該平面結構上該複數個結合位置之2個相鄰結合位置之間的分隔距離，該分隔距離係由該2個相鄰結合位置之邊測量。

【請求項68】如請求項61至67中任一項之方法，其中該蝕刻包含電漿蝕刻、反應離子蝕刻(RIE)、電容式RIE、感應式RIE、深度反應離子蝕刻或彼等之組合。

【請求項69】如請求項61至68中任一項之方法，其中該蝕刻包含等向性蝕刻、定向性蝕刻、垂直性蝕刻或彼等之組合。

【請求項70】如請求項61至69中任一項之方法，其中該蝕刻包含使用1種氣體或2或更多種氣體之蝕刻，該等氣體選自O_2、CF_4、C_2F_6、C_4F_8、CHF_3、SF_6、NF_3、BCl_3、Cl_2、HBr及Ar所組成之群組。

【請求項71】如請求項70之方法，其中該2或更多種氣體之任2者的比例係約1:100至約100:1。

【請求項72】如請求項70至71中任一項之方法，其中該1種氣體之質量流速、該2或更多種氣體的每一者之質量流速或該2或更多種氣體之整體質量流速係約1每分鐘的標準立方釐米(sccm)至約100 sccm。

【請求項73】如請求項61至69中任一項之方法，其中該蝕刻包含使用氧氣、四氟化碳氣體或彼等之組合的蝕刻。

【請求項74】如請求項61至73中任一項之方法，其中該蝕刻包含實施2或更多個蝕刻步驟。

【請求項75】如請求項61至74中任一項之方法，其中該蝕刻包含於約10瓦(W)至約100 W之功率下的蝕刻。

【請求項76】如請求項61至75中任一項之方法，其中該蝕刻包含於約1毫托(mT)至約5000 mT之壓力下的蝕刻。

【請求項77】如請求項61至76中任一項之方法，其中該蝕刻包含約1分鐘(min)至約10 mins之蝕刻。

【請求項78】如請求項61至77中任一項之方法，其中該蝕刻包含於約1℃至約20℃之溫度下的蝕刻。

【請求項79】如請求項61至78中任一項之方法，其包

含於該蝕刻後除去任何該複數個粒子或保留之任何每個粒子的任何部分及/或除去經差異性保留之與該複數個粒子接觸的該複數個保留區域之該遮罩層。

【請求項80】如請求項61至79中任一項之方法，其包含鈍化該複數個經蝕刻之區域以產生經鈍化之區域，可選擇性地其中該鈍化於該除去之前發生，且可選擇性地其中該經鈍化之區域係親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。

【請求項81】如請求項61至80中任一項之方法，其中該物質層經差異性保留之該複數個保留區域特定於該平面結構上之該複數個結合位置。

【請求項82】如請求項61至81中任一項之方法，其中該物質層經差異性除去之該複數個經蝕刻之區域特定於該平面結構上之該複數個結合位置。

【請求項83】如請求項81至82中任一項之方法，其中該複數個保留區域包含位於第1六角形之6個頂點和中心的該複數個結合位置之第一組7個結合位置和位於第2六角形之6個頂點和中心的該複數個結合位置之第二組7個結合位置，可選擇性地其中該第1六角形與該第2六角形不共有邊。

【請求項84】如請求項81至82中任一項之方法，其中該複數個保留區域包含經構形呈第1等邊三角形之3個頂點的該複數個結合位置之第一組3個結合位置和經構形呈第2等邊三角形之3個頂點的該複數個結合位置之第二組3個結

合位置，可選擇性地其中該第1等邊三角形與該第2等邊三角形不共有邊。

【請求項85】如請求項81至82中任一項之方法，其中該複數個保留區域包含排列於複數個第一列結合位置的該複數個結合位置之結合位置，其中於該複數個第一列之每個第一列的結合位置係排列呈第一線性構形，使得於該第一列之結合位置與相鄰於該第一列之該結合位置的2個結合位置接觸，且其中該複數個第一列之2個相鄰第一列係於該複數個第一列之第一方向藉由超過該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之該粒子的直徑偏位，且其中該2個相鄰第一列係於與該第一方向垂直之該複數個第一列之第二方向藉由該複數個粒子之該粒子的直徑偏位。

【請求項86】如請求項85之方法，其中該複數個保留區域包含排列於複數個第二列結合位置之該複數個結合位置的結合位置，其中於該複數個第二列之每個第二列的該結合位置係排列呈第二線性構形，使得於該第二列之結合位置與相鄰於該第二列的該結合位置之2個結合位置接觸，且其中該複數個第二列之2個相鄰第二列係於該複數個第二列之第一方向藉由超過該複數個粒子之粒子的半徑且小於該複數個粒子之該粒子的直徑偏位，其中該2個相鄰第二列係於與該第一方向垂直之該複數個第二列之第二方向藉由該複數個粒子之該粒子的直徑偏位，且其中無第一列與第二列平行及/或無第一列與第二列接觸。

【請求項87】如請求項61至80中任一項之方法，其中

該複數個結合位置包含呈第一晶格或第一不規則陣列之該複數個結合位置之結合位置的第一子集，可選擇性地其中該複數個結合位置包含藉由間斷與該結合位置之第一子集隔開的該複數個結合位置之結合位置的第二子集。

【請求項88】如請求項87之方法，其中該第一晶格係呈第1六角構形、第1等邊三角形構形、第一線性構形或彼等之組合及/或其中該第二晶格係呈第2六角構形、第2等邊三角形構形、第二線性構形或彼等之組合。

【請求項89】如請求項87至88中任一項之方法，

其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合的結合位置；及/或

其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合的彼此位於至少閾值距離內的結合位置，可選擇性地其中該閾值距離係5 μm。

【請求項90】如請求項1至86中任一項之方法，其進一步包含遞送複數個核酸至該複數個結合位置，可選擇性地其中該複數個核酸之每一者係經遞送至該複數個結合位置之不同的結合位置。

【請求項91】如請求項90之方法，其中該複數個核酸包含至少1個串聯的核酸。

【請求項92】如請求項90至91中任一項之方法，其進一步包含於該複數個結合位置實施橋式放大。

【請求項93】如請求項90至92中任一項之方法，其中該複數個核酸被分佈於複數個珠上，可選擇性地其中該複數個核酸之每一者被分佈至該複數個珠之不同珠。

【請求項94】如請求項90至91中任一項之方法，其進一步包含藉由使用擴增引子或夾引子(splint primer)於該複數個結合位置實施滾環擴增(RCA)，該擴增引子或夾引子連接該複數個結合位置之一者、一或更多者或每一者，可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子連接該結合位置，可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子藉由點擊化學反應連接該結合位置，可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應連接該結合位置。

【請求項95】如請求項90至91中任一項之方法，其進一步包含遞送複數個DNA瓦至該複數個結合位置，可選擇性地其中該複數個結合位置之每一者包含該複數個DNA瓦之至多1個DNA瓦，可選擇性地其中該複數個結合位置之2個結合位置包含該複數個DNA瓦之2個不同的DNA瓦，其中該複數個DNA瓦之2或更多個DNA瓦各別包含擴增引子或夾引子，其中該方法進一步包含藉由使用複數個模板核酸作為模板以延伸與該2或更多個DNA瓦之每一者連接的該擴增引子或該夾引子以於該複數個結合位置實施滾環擴增(RCA)。

【請求項96】如請求項90至91中任一項之方法，其進一步包含藉由使用複數個模板核酸作為模板以延伸該擴增

引子或該夾引子以於溶液中實施滾環擴增(RCA)，藉以於遞送該複數個核酸至該複數個結合位置之前產生該複數個核酸，可選擇性地其中DNA瓦包含該擴增引子或該夾引子，或可選擇性地其中於溶液中該RCA併入經功能化以與流通池之結合位置結合的核苷酸。

【請求項97】如請求項1至96中任一項之方法，其進一步包含遞送激發能至至少某些該等結合位置。

【請求項98】如請求項1至97中任一項之方法，其進一步包含自至少某些該等結合位置收集發射能。

【請求項99】一種流通池表面，其包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置，其中該複數個結合位置之每一者係環形且具有中心點和直徑，其中由第一結合位置之中心至最近之鄰近結合位置之中心所測量的任何結合位置與任何最近之鄰近結合位置之間的間隔係該第一結合位置之直徑的至少2倍。

【請求項100】一種流通池表面，其包含藉由間斷隔開的至少10,000個結合位置之複數個結合位置，其中該等結合位置及/或該等間斷係位於非預定、有序、不規則分佈及/或隨機分佈之位置。

【請求項101】一種流通池表面，其包含藉由間斷隔開的至少10,000個結合位置之複數個結合位置，其中該等結合位置之構形係非預定，且其中該等間斷係位於非預定、不規則分佈及/或隨機分佈之位置。

【請求項102】如請求項101之流通池表面，其中該複

數個結合位置之結合位置係位於非預定、有序、不規則分佈及/或隨機分佈之位置。

【請求項103】一種流通池表面，其包含至少10,000個結合位置之複數個結合位置，其中該複數個結合位置包含藉由間斷隔開之第一結合位置子集和第二結合位置子集，其中該間斷之位置、大小及/或形狀係非預定及/或該間斷係經隨機分佈。

【請求項104】如請求項103之流通池表面，其中該第一結合位置子集及/或該第二結合位置子集之結合位置係位於非預定、有序、不規則分佈及/或隨機分佈之位置，及/或其中該第一結合位置子集之第一構形和該第二結合位置子集之第二構形係非預定，可選擇性地其中該第一構形包含複數個該第一結合位置子集及/或該第一結合位置子集之位置，且可選擇性地其中該第二構形包含複數個該第二結合位置子集及/或該第二複數個結合位置之位置。

【請求項105】如請求項103之流通池表面，其中該第一複數個結合位置之第一構形與該第二複數個結合位置之第二構形係不同。

【請求項106】如請求項103之流通池表面，其中該第一複數個結合位置之第一構形與該第二複數個結合位置之第二構形係相同。

【請求項107】如請求項99至106中任一項之流通池表面，其中介於任何結合位置與任何最近之鄰近結合位置之間的間隔係該結合位置之直徑的至少3倍大。

【請求項108】如請求項99至107中任一項之流通池表面，其中介於任何結合位置與任何最近之鄰近結合位置之間的間隔係約10^{-9} m至約10^{-4} m。

【請求項109】如請求項99至108中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置之至少一部分係隨機排列於該流通池表面上。

【請求項110】如請求項99至109中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置未排列於該流通池表面上之預定區位集。

【請求項111】如請求項99至110中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置之至少一部分不共有共同圖案。

【請求項112】如請求項99至111中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置包含未圖案化之結合位置。

【請求項113】如請求項99至112中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置包含藉由非預定之間斷隔開的第一複數個結合位置和第二複數個結合位置，且可選擇性地其中該第一複數個有序的結合位置之第一構形與該第二複數個有序的結合位置之第二構形係不同。

【請求項114】如請求項99至112中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置包含於第一晶格或第一不規則陣列的該複數個結合位置之第一結合位置子集，其中該複數個結合位置包含於第二晶格或第二不規則陣列的該複數個結合位置之第二結合位置子集，可選擇性地其中該第一

不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合的粒子，且可選擇性地其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合的彼此位於至少閾值距離內的粒子，且可選擇性地其中該閾值距離係5 μm。

【請求項115】如請求項99至114中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置係以約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項116】如請求項99至114中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置包含至少100,000個結合位置。

【請求項117】如請求項99至114中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置包含至少1,000,000個結合位置。

【請求項118】如請求項99至114中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置包含至少10,000,000個結合位置。

【請求項119】如請求項99至118中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置之結合位置係親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組合。

【請求項120】如請求項99至119中任一項之流通池表面，其中該流通池表面之材料包含矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶

瓷、塑料或彼等之組合。

【請求項121】如請求項99至120中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置包含複數個核酸。

【請求項122】如請求項121之流通池表面，其中該複數個核酸包含至少一個串聯的核酸。

【請求項123】如請求項121至122中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者包含該複數個核酸之一者或至多一者。

【請求項124】如請求項121至123中任一項之流通池表面，其中該複數個核酸連接複數個珠，且其中該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者包含該複數個珠之一者或至多一者。

【請求項125】如請求項121至124中任一項之流通池表面，其中該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者包含擴增引子或夾引子、自滾環擴增(RCA)之擴增產物、DNA瓦或彼等之組合，可選擇性地其中該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者係藉由點擊化學反應與該等結合位置結合，可選擇性地其中該DNA瓦包含擴增引子或夾引子，可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子連接該結合位置，且可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應連接該結合位置。

【請求項126】如請求項121至124中任一項之流通池表面，其中該複數個結合位置之至少50%包含該複數個核

酸之至少一核酸及/或該複數個珠之至少一珠。

【請求項127】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個結合位置，其中於該複數個流通池表面中，沒有2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含於該複數個流通池表面之每一者上的全部結合位置。

【請求項128】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個結合位置，其中無包含該複數個流通池表面之任何2個流通池表面的該等結合位置之至少5%的對應區域共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含該複數個流通池表面之該等對應區域的每一者上的全部結合位置。

【請求項129】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個結合位置，其中該複數個流通池表面之每一者包含一個包含於該流通池表面上之該等結合位置的至少5%之區域，該區域不與該複數個流通池表面之任何其他流通池表面的任何區域共有全等之結合位置構形，且其中該區域之結合位置構形包含該區域之全部結合位置。

【請求項130】如請求項127至129中任一項之複數個流通池表面，其中該複數個流通池表面之2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含比該2個流通池表面之每一者的全部結合位置為少之結合位置，及/或其中該複數個流通池表面之2個流通池表面共有全等之結合位置構形，該全等之結合位置構形包含該2個

流通池表面之每一者的該等結合位置之至多5%。

【請求項131】如請求項127至129中任一項之複數個流通池表面，其中流通池表面或每個流通池表面包含複數個至少3個結合位置之至少一者，其不與任何其他流通池表面上之複數個至少3個結合位置之任一者全等。

【請求項132】如請求項127至129中任一項之複數個流通池表面，其中流通池表面或每個流通池表面包含複數個至少10個結合位置之至少一者，其不與任何其他流通池表面上之複數個至少10個結合位置之任一者全等。

【請求項133】如請求項127至129中任一項之複數個流通池表面，其中流通池表面或每個流通池表面包含該流通池表面上之該複數個結合位置的至少5%，其不與任何其他流通池表面上之該複數個結合位置的任何5%全等。

【請求項134】如請求項127至129中任一項之複數個流通池表面，其中流通池表面或每個流通池表面包含該流通池表面之該複數個結合位置的至少10%，其不與任何其他流通池表面之該複數個結合位置的任何10%全等。

【請求項135】如請求項127至134中任一項之複數個流通池表面，

其中該複數個流通池表面之第一流通池表面包含第一結合位置陣列，該第一結合位置陣列具有2個第一區域，該2個第一區域各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形且係藉由具有第一不規則的或隨機的結合位置陣列構形之第一區域隔開；

其中該複數個流通池表面之第二流通池表面包含第二結合位置陣列，該第二結合位置陣列具有2個第二區域，該2個第二區域各別具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形且係藉由具有第二不規則的或隨機的結合位置陣列構形之第二區域隔開；且

其中該第一結合位置陣列與該第二結合位置陣列係不同。

【請求項136】如請求項135之複數個流通池表面，其中具有該第一不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第一區域與具有該第二不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第二區域係非全等。

【請求項137】如請求項135之複數個流通池表面，其中具有該第一不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第一區域包含複數個至少3個結合位置之至少一者，其不與具有該第二不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第二區域的複數個至少3個結合位置之任一者全等。

【請求項138】如請求項135至137中任一項之複數個流通池表面，其中各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該2個第一區域包含為全等之結合位置。

【請求項139】如請求項135至137中任一項之複數個流通池表面，其中各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該2個第一區域包含不為全等之結合位置。

【請求項140】如請求項135至137中任一項之複數個流通池表面，其中各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該2個第一區域之一者與各別具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該等第二區域之一者包含為全等之結合位置。

【請求項141】如請求項135至137中任一項之複數個流通池表面，其中各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該2個第一區域之一者與各別具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該等第二區域之一者包含不為全等之結合位置。

【請求項142】如請求項135至141中任一項之複數個流通池表面，

其中各別具有第一規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該等第一區域之一或兩者包含至少500個結合位置；

其中各別具有第二規則的、不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該等第二區域之一或兩者包含至少500個結合位置；及/或

其中具有該第一不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第一區域及/或具有該第二不規則的或隨機的結合位置陣列構形之該第二區域包含至少500個結合位置。

【請求項143】如請求項135至141中任一項之複數個流通池表面，

其中各別具有第一規則的結合位置陣列構形之該等第

一區域之一或兩者包含該第一流通池表面上之該等結合位置的至少5%及/或該第一結合陣列的至少5%；

其中各別具有第二規則的結合位置陣列構形之該等第二區域之一或兩者包含該第二流通池表面上之該等結合位置的至少5%及/或該第二結合陣列的至少5%；

其中具有該第一不規則的結合位置陣列構形之該第一區域包含該第一流通池表面上之該等結合位置的至少5%及/或該第一結合陣列的至少5%；及/或

其中具有該第二不規則的結合位置陣列構形之該第二區域包含該第二流通池表面上之該等結合位置的至少5%及/或該第二結合陣列的至少5%。

【請求項144】如請求項135至140中任一項之複數個流通池表面，其中該第一結合位置陣列包含該第一流通池表面上之全部結合位置，及/或其中該第二結合位置陣列包含該第二流通池表面上之全部結合位置。

【請求項145】如請求項127至144中任一項之複數個流通池表面，其中該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者的材料包含矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。

【請求項146】如請求項127至145中任一項之複數個流通池表面，其中於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的該複數個結合位置之結合位置係親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷、未帶電荷或彼等之組

合。

【請求項147】如請求項127至145中任一項之複數個流通池表面，其中於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的該複數個結合位置包含複數個核酸。

【請求項148】如請求項147之複數個流通池表面，其中該複數個核酸包含至少一個串聯的核酸。

【請求項149】如請求項127至148中任一項之複數個流通池表面，其中該複數個流通池表面之每一者上的該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者包含該流通池表面上之該複數個結合位置的該複數個核酸之一者或至多一者。

【請求項150】如請求項127至149中任一項之複數個流通池表面，其中該複數個流通池表面之每一者上的該複數個結合位置之該複數個核酸連接複數個珠，且其中該複數個結合位置之一者、至少一者或每一者包含該複數個珠之一者或至多一者。

【請求項151】如請求項127至150中任一項之複數個流通池表面，其中對於該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者：

該流通池表面上之該複數個結合位置的該複數個核酸之一者、一或更多者或每一者包含擴增引子或夾引子、自滾環擴增(RCA)之擴增產物、DNA瓦或彼等之組合；

可選擇性地其中該等核酸藉由點擊化學反應之產物連接該等結合位置，可選擇性地其中該應變促進之點擊化學

反應係介於該核酸上之反式環辛烯(TCO)與該結合位置所呈現之甲基四嗪(MTz)之間；

可選擇性地其中該DNA瓦包含擴增引子或夾引子，可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子連接該結合位置，且可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應連接該結合位置。

【請求項152】如請求項127至151中任一項之複數個流通池表面，其中該複數個流通池表面之一者、一或更多者或每一者上的該複數個結合位置之至少50%包含該複數個核酸之至少一核酸及/或該複數個珠之至少一珠。

【請求項153】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的、不規則的或隨機的結合位置，該等間斷係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈，其中沒有2個流通池表面於該流通池表面上包含該等間斷之相同構形。

【請求項154】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個藉由間斷隔開之有序的、不規則的或隨機的結合位置，其中該等結合位置和該等間斷之構形包含位於非預定之區位及/或係經隨機分佈之該等結合位置和該等間斷，且其中沒有2個流通池表面包含該等結合位置和間斷之相同構形。

【請求項155】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個有序的、不規則的或隨機的結合位置，該

等結合位置係藉由位於非預定之區位及/或係經隨機分佈之不規則的或隨機的結合位置之區域隔開，其中沒有2個流通池表面於該流通池表面上包含該等不規則的區域之相同構形。

【請求項156】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個有序的、不規則的或隨機的結合位置，該等結合位置係藉由不規則的或隨機的結合位置之區域隔開，其中該流通池表面之該有序的、不規則的或隨機的結合位置之構形包含位於非預定及/或係經有序的、不規則分佈的或隨機分佈的區位之結合位置，其中該流通池表面上之該不規則的或隨機的結合位置之構形包含位於非預定及/或係不規則分佈的或隨機分佈的區位之結合位置，且其中沒有2個流通池表面包含該等有序的結合位置和該等不規則的結合位置區域之相同構形。

【請求項157】一種複數個流通池表面，每一表面包含至少10,000個結合位置，該等結合位置係於結合位置之規則或不規則區域和隔開該結合位置之規則或不規則區域的結合位置之不規則或隨機區域，其中該規則或不規則區域和該不規則或隨機區域係位於非預定之區位及/或係經隨機分佈，且其中沒有2個流通池表面包含該等規則或不規則區域及/或該等不規則或隨機區域之相同構形。

【請求項158】一種比對複數個流通池影像之方法，其包含：

於處理器之控制下：

a) 自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域和第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域；和

b) 比對該複數個流通池影像之該第二不規則的或隨機的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。

【請求項159】一種比對複數個流通池影像之方法，其包含：

於處理器之控制下：

a) 自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面具有藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開之規則的、不規則的或隨機的結合位置區域；和

b) 比對該複數個流通池影像之該第二不規則的或隨機的結合位置區域以比對該複數個流通池影像。

【請求項160】一種比對複數個流通池影像之方法，其包含：

於處理器之控制下：

a) 自流通池表面得到複數個流通池影像，該流通池表面包含藉由間斷隔開之有序的、無序的或隨機的結合位置；和

b) 比對該複數個流通池影像之該間斷以比對該複數個流通池影像。

【請求項161】如請求項158至160中任一項之方法，其中該複數個流通池影像包含自該規則的、不規則的或隨

機的結合位置區域和該不規則的或隨機的結合位置區域發出之螢光發射訊號。

【請求項162】如請求項158至161中任一項之方法，其中該複數個流通池影像包含至少20個流通池影像。

【請求項163】如請求項158至161中任一項之方法，其中該複數個流通池影像包含至少200個流通池影像。

【請求項164】如請求項158至163中任一項之方法，其中該比對包含相對於第二流通池影像位移一個流通池影像。

【請求項165】如請求項158至164中任一項之方法，其中該比對包含相對於第二影像旋轉一個影像。

【請求項166】一種揀選複數個流通池影像之方法，其包含：

於處理器之控制下：

a) 得到複數個流通池影像；

b) 於該複數個池影像之每一者鑑別藉由不規則的或隨機的結合位置區域隔開之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域和第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域；及

c) 揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則的或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。

【請求項167】一種揀選複數個流通池影像之方法，

其包含：

於處理器之控制下：

a) 得到複數個流通池影像；

b) 於該複數個流通池影像之每一者鑑別不規則的或隨機的結合位置區域，該不規則的或隨機的結合位置區域隔開於該流通池影像之第一規則的、不規則的或隨機的結合位置區域與第二規則的、不規則的或隨機的結合位置區域；及

c) 揀選該複數個流通池影像，使得具有相同之不規則的或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至共同組，且具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之2個流通池影像被分配至不同的共同組。

【請求項168】如請求項166至167中任一項之方法，其包含定向每個共同組之該複數個流通池影像的流通池影像，使得該每個共同組之該等流通池影像的第一結合位置經比對，且該每個共同組之該等流通池影像的第二結合位置經比對。

【請求項169】如請求項166至168中任一項之方法，其中具有不同之不規則的或隨機的結合位置區域之流通池影像被分配至不同組。

【請求項170】一種流通池顯像系統，其包含：

a) 具有複數個結合位置分佈於其上之流通池，其中至少某些該等結合位置係位於為非預定及/或為經隨機分佈之位置；

b) 於該等結合位置激發螢光團之激發源；及

c) 包含複數個像素之影像數位化界面；

其中該複數個結合位置係經分佈，使得沒有2個結合位置產生歸屬於共同像素之發射訊號。

【請求項171】如請求項170之流通池顯像系統，其中至少某些該等結合位置係經規則地、不規則地或隨機地分佈及/或其中至少某些該等結合位置係經不規則地或隨機地分佈。

【請求項172】如請求項170至171中任一項之流通池顯像系統，其中該複數個結合位置包含至少100,000個結合位置。

【請求項173】如請求項170至171中任一項之流通池顯像系統，其中該複數個結合位置包含至少1,000,000個結合位置。

【請求項174】如請求項170至171中任一項之流通池顯像系統，其中該複數個結合位置包含至少10,000,000個結合位置。

【請求項175】一種流通池表面，其包含第一複數個反應位置和相鄰該第一複數個反應位置之第二複數個反應位置，其中該第一複數個反應位置包含第一組3個反應位置，每個反應位置係經構形於相同第1等邊三角形之3個頂點，其中該第二複數個反應位置包含第二組3個反應位置，每個反應位置係經構形於第2等邊三角形之3個頂點，且其中該第1等邊三角形與該第2等邊三角形不共有平行

側，可選擇性地其中該第1等邊三角形與該第2等邊三角形係全等。

【請求項176】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置包含丙烯酸酯官能性矽烷、醛官能性矽烷、胺基官能性矽烷、酐官能性矽烷、疊氮化物官能性矽烷、羧酸酯官能性矽烷、膦酸酯官能性矽烷、磺酸酯官能性矽烷、環氧基官能性矽烷、硫醇官能性矽烷、酯官能性矽烷、乙烯基官能性矽烷、烯烴官能性矽烷、鹵素官能性矽烷、雙叉鏈矽烷、能參與該點擊化學反應之官能性部分、反式環辛烯(TCO)、甲基四嗪(MTz)或彼等之組合。

【請求項177】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置包含胺基矽烷、環氧丙氧基矽烷、巰基矽烷或彼等之組合。

【請求項178】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置包含胺基矽烷。

【請求項179】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置包含乳糜化聚合酶鏈鎖反應(emPCR)珠。

【請求項180】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置包含核酸，可選擇性地其中該等核酸之一者、一或更多者或每一者包含擴增引子或夾引子、自滾環擴增之擴增產物、DNA瓦或彼等之組合，可選擇性地其中該等核酸之一者、一或更多者或每一者藉由點擊化學反應連接該等反應位置，可選擇性地其中該DNA瓦包含擴增引子或夾引子，可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子連接該反應

位置，且可選擇性地其中該擴增引子或該夾引子經由涉及該第一官能部分和該第二官能部分之該點擊化學反應連接該反應位置。

【請求項181】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置包含核酸多聯體。

【請求項182】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置包含橋式擴增之核酸群落。

【請求項183】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置之至少90%包含僅一個核酸繫繩、擴增引子或夾引子。

【請求項184】如請求項175之流通池表面，其中該等反應位置之至少90%各別包含僅一個起始核酸之集落群，且其中2個反應之起始核酸係不同，可選擇性地其中該等集落群各別係自滾環擴增(RCA)之擴增產物。

【請求項185】如請求項175至182中任一項之流通池表面，其中該等反應位置係以約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項186】如請求項175至182中任一項之流通池表面，其中該等反應位置係以至少600k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項187】如請求項175至182中任一項之流通池表面，其中該等反應位置係以至少800k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項188】如請求項175至182中任一項之流通池

表面，其中該等反應位置係以至少1,000k/mm^{2}之局部密度存在。

【請求項189】如請求項175至182中任一項之流通池表面，其中該等反應位置包含至少100,000個反應位置。

【請求項190】如請求項175至182中任一項之流通池表面，其中該等反應位置包含至少1,000,000個反應位置。

【請求項191】如請求項175至182中任一項之流通池表面，其中該等反應位置包含至少10,000,000個反應位置。

【請求項192】如請求項175至191中任一項之流通池表面，其中該流通池表面之材料包含矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。

【請求項193】如請求項175至192中任一項之流通池表面，其中該第一組3個反應位置之每個反應位置係藉由10^{-9} m至約10^{-4} m與該第一組3個反應位置之每個其他反應位置隔開，及/或其中該第二組3個反應位置之每個反應位置係藉由10^{-9} m至約10^{-4} m與該第二組3個反應位置之每個其他反應位置隔開。

【請求項194】如請求項175至193中任一項之流通池表面，其中該第一複數個反應位置未以預定之構形排列，及/或其中該第一複數個反應位置之反應位置係呈有序、不規則分佈或隨機分佈。

【請求項195】如請求項175至194中任一項之流通池

表面，其中該第二複數個反應位置未以預定之位置排列，及/或其中該第二複數個反應位置之反應位置係呈有序、不規則分佈或隨機分佈。

【請求項196】一種於平面結構上特定結合位置之方法，其包含：

提供平面結構，該平面結構具有沉積於其上之活性位置層和遮罩層；

沉積複數個珠於該平面結構之該遮罩層上；

暴露該平面結構於蝕刻劑，藉以自未被該複數個珠屏蔽之區域差異地除去該遮罩層；

自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層和該活性位置層；及

自被該複數個珠屏蔽之區域除去任何殘留之遮罩層，藉以特定包含殘留之該活性位置層的複數個結合位置。

【請求項197】一種於平面結構上特定結合位置之方法，其包含：

提供平面結構，該平面結構具有沉積於其上之活性位置層和遮罩層；

沉積複數個珠於該平面結構之該遮罩層上；及

暴露該平面結構於蝕刻劑，藉以自未被該複數個珠屏蔽之該蝕刻層的區域除去該遮罩層和該活性位置層，且自被該複數個珠屏蔽之區域除去任何殘留之遮罩層，

藉以特定包含殘留之該活性位置層的複數個結合位置。

【請求項198】如請求項196至197中任一項之方法，其中於沉積該複數個珠之前，該活性位置層係一致的。

【請求項199】如請求項196至198中任一項之方法，其中於沉積該複數個珠之前，該遮罩層係一致的。

【請求項200】如請求項196至199中任一項之方法，其中於沉積該複數個珠之前，該平面結構係一致的。

【請求項201】如請求項196至200中任一項之方法，其中該複數個珠於沉積於該平面結構之該遮罩層之前係於液體中，其中沉積該複數個珠於該平面結構之該遮罩層上包含除去介於該複數個珠與該平面結構之該遮罩層之間的該液體。

【請求項202】如請求項201之方法，其中該液體包含各別於某一濃度之擴展劑、污染物或彼等之組合，可選擇性地其中該污染物包含界面活性劑、擁擠劑、蔗糖、尿素、聚丙烯酸、1-甲基吡啶-2-醛肟氯鹽或彼等之組合，可選擇性地其中該擴展劑包含醇，可選擇性地其中該醇包含乙醇、異丙醇、異丁醇或彼等之組合，可選擇性地其中該界面活性劑包含十二烷基硫酸鈉、Tween或彼等之組合，可選擇性地其中該擁擠劑包含聚乙二醇(PEG)，可選擇性地其中該PEG包含自PEG 200至PEG 8000之PEG，可選擇性地其中該濃度包含約1%至約20%。

【請求項203】如請求項196至202中任一項之方法，其中該蝕刻劑包含1種氣體或2或更多種氣體，該等氣體係選自 O_2、CF_4、C_2F_6、C_4F_8、CHF_3、SF_6、NF_3、NF_5、

BCl_3、Cl_2、CCl_2F_2、HBr及Ar所組成之群組的氣體。

【請求項204】如請求項203之方法，其中該2或更多種氣體之任2者的比例係約1:100至約100:1。

【請求項205】如請求項203至204中任一項之方法，其中該1種氣體之質量流速、該2或更多種氣體的每一者之質量流速或該2或更多種氣體之整體質量流速係約1每分鐘的標準立方釐米(sccm)至約100 sccm。

【請求項206】如請求項196至200中任一項之方法，其中該蝕刻劑包含氧氣。

【請求項207】如請求項196至200中任一項之方法，其中該蝕刻劑包含四氟化碳氣體。

【請求項208】如請求項196至207中任一項之方法，其中該蝕刻包含實施2或更多個蝕刻步驟。

【請求項209】如請求項196至208中任一項之方法，其中該暴露包含於約10瓦(W)至約100 W之功率下暴露該平面結構於該蝕刻劑。

【請求項210】如請求項196至209中任一項之方法，其中該暴露包含於約1毫托(mT)至約5000 mT之壓力下暴露該平面結構於該蝕刻劑。

【請求項211】如請求項196至210中任一項之方法，其中該暴露包含暴露該平面結構於該蝕刻劑達約1分鐘(min)至約10 mins。

【請求項212】如請求項196至211中任一項之方法，其中該暴露包含於約1℃至約20℃之溫度下暴露該平面結

構於該蝕刻劑。

【請求項213】如請求項196至212中任一項之方法，其中該平面表面之材料包括矽、氮化矽玻璃、硼矽玻璃、石英、熔融石英、二氧化矽、熔融矽石、金屬、陶瓷、塑料或彼等之組合。

【請求項214】如請求項196至213中任一項之方法，其中該遮罩層之材料包含鋁、氧化銦錫、鉻、銅、砷化鎵、金、鉬、鉑、矽、二氧化矽、氮化矽、銀、鉭、鈦、氮化鈦、鎢或彼等之組合。

【請求項215】如請求項196至214中任一項之方法，其中該活性位置層包含丙烯酸酯官能性矽烷、醛官能性矽烷、胺基官能性矽烷、酐官能性矽烷、疊氮化物官能性矽烷、羧酸酯官能性矽烷、膦酸酯官能性矽烷、磺酸酯官能性矽烷、環氧基官能性矽烷、硫醇官能性矽烷、酯官能性矽烷、乙烯基官能性矽烷、烯烴官能性矽烷、鹵素官能性矽烷、雙叉鏈矽烷、能參與該點擊化學反應之官能性部分、反式環辛烯(TCO)、甲基四嗪(MTz)或彼等之組合。

【請求項216】如請求項196至214中任一項之方法，其中該活性位置層包含胺基矽烷、環氧丙氧基矽烷、巰基矽烷或彼等之組合。

【請求項217】如請求項196至214中任一項之方法，其中該活性位置層包含胺基矽烷。

【請求項218】如請求項196至217中任一項之方法，其中沉積複數個珠包含堆積該複數個珠之珠呈包含藉由局

部間斷隔開之第一局部晶格和第二局部晶格或第一不規則陣列和第二不規則陣列之構形。

【請求項219】如請求項218之方法，其中堆積該複數個珠包含以約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之密度陣列該複數個珠。

【請求項220】如請求項218之方法，其中堆積該複數個珠包含以至少600k/mm^{2}之密度陣列該複數個珠。

【請求項221】如請求項218之方法，其中堆積該複數個珠包含以至少800k/mm^{2}之密度陣列該複數個珠。

【請求項222】如請求項218之方法，其中堆積該複數個珠包含以至少1,000k/mm^{2}之密度陣列該複數個珠。

【請求項223】如請求項218之方法，其中該複數個珠包含至少100,000個珠。

【請求項224】如請求項218之方法，其中該複數個珠包含至少1,000,000個珠。

【請求項225】如請求項218之方法，其中該複數個珠包含至少10,000,000個珠。

【請求項226】如請求項218至225中任一項之方法，

其中該第一局部晶格包含呈第1六角構形的該複數個珠之第1珠的子集，其中呈該第1六角構形之該第1珠的子集之7個第1珠係位於第1六角形之6個頂點和中心，且其中位於該第1六角形之該6個頂點的該6個第1珠之每一者係與位於該第1六角形之該中心的第1珠和位於該第1六角形之該等頂點的2個其他第1珠接觸；

其中該第二局部晶格包含呈第2六角構形的該複數個珠之第2珠的第2子集，其中呈該第2六角構形之該第2珠的子集之7個第2珠係位於第2六角形之6個頂點和中心，且其中位於該第2六角形之該6個頂點的該6個第2珠之每一者係與位於該第2六角形之該中心的第2珠和位於該第2六角形之該等頂點的2個其他第2珠接觸；且

其中該第1六角構形與該第2六角構形具有不同的位向，及/或該第1六角形與該第2六角形具有不同的位向。

【請求項227】如請求項218至225中任一項之方法，其中該第一局部晶格包含呈第1等邊三角形構形之該複數個珠之第1珠的子集，使得3個相鄰之非共線第1珠形成第1等邊三角形，其中該第二晶格包含呈第2等邊三角形構形之該複數個珠之第2珠的子集，使得3個相鄰之非共線第2珠形成第2等邊三角形，其中該第1等邊三角形與該第2等邊三角形不共有邊。

【請求項228】如請求項218至225中任一項之方法，其中該第一局部晶格內相鄰珠之間所畫的第一直線與該第二局部晶格內相鄰珠之間所畫的任何第二直線係不平行。

【請求項229】如請求項218至225中任一項之方法，

其中該第一晶格包含排列於第1珠之複數個第一列的該複數個珠之第1珠的子集，其中該複數個第一列之每個第一列的第1珠係排列呈第一線性構形，使得該第一列之第1珠與相鄰於該第一列之該第1珠的2個第1珠接觸，且其中2個相鄰第一列係於該第一線性構形之第一方向藉由第

一偏距偏位且係於與該第一線性構形之該第一方向垂直該第一線性構形之第二方向藉由第二偏距偏位；

其中該第二晶格包含排列於第2珠之複數個第二列的該複數個珠之第2珠的子集，其中該複數個第一列之每個第一列的第2珠係排列呈第二線性構形，使得該第二列之第2珠與相鄰於該第二列之該第2珠的2個第2珠接觸，且其中2個相鄰第二列係於該第二線性構形之第一方向藉由第一偏距偏位且係於與該第二線性構形之該第一方向垂直的該第二線性構形之第二方向藉由第二偏距偏位；且

其中該第一線性構形之該第一方向與該第二線性構形之該第一方向係不同，且其中該第一線性構形之該第二方向與該第二線性構形之該第二方向係不同。

【請求項230】如請求項229之方法，其中該第一偏距係超過該複數個珠之該珠的半徑且小於該複數個珠之該珠的直徑，且其中該第二偏距該複數個珠之該珠的直徑。

【請求項231】如請求項218至225中任一項之方法，其中該第一不規則陣列內之每個珠係以閾值距離或超過閾值距離遠離該第一不規則陣列之該珠的最近相鄰之珠，及/或其中該第二不規則陣列內之每個珠係以閾值距離或超過閾值距離遠離該第二不規則陣列之該珠的最近相鄰之珠，可選擇性地其中該閾值距離係該珠之半徑。

【請求項232】如請求項231之方法，

其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形或線性構形或

彼等之組合的珠；及/或

其中該第一不規則陣列及/或該第二不規則陣列不包含呈六角構形、等邊三角形構形、直線構形、線性構形或彼等之組合的彼此位於至少閾值距離內的珠，可選擇性地其中該閾值距離係5 μm。

【請求項233】如請求項196至232中任一項之方法，其中沉積該複數個珠包含同時及/或依次遞送該複數個珠之珠的複數個子集至位於該平面結構之該遮罩層的不同區位，可選擇性地其中該珠的複數個子集包含該珠的至少5個子集。

【請求項234】如請求項196至233中任一項之方法，其中該複數個珠係經隨機沉積。

【請求項235】如請求項196至234中任一項之方法，其中該複數個珠係經沉積以形成具有規則放置之珠的第一區域和具有隨機放置之珠的第二區域。

【請求項236】如請求項196至235中任一項之方法，其中除去該遮罩層和該活性位置層包含除去珠材質和該複數個珠或殘留之每個珠的任何部分。

【請求項237】如請求項218至236中任一項之方法，其中該複數個珠之一者、一或更多者或每一者的半徑或直徑係約10^{-9} m至約10^{-4} m。

【請求項238】如請求項218至237中任一項之方法，其中該複數個珠之一者、一或更多者或每一者的體積係約10^{-27} m^3至約10^{-12} m^3。

【請求項239】如請求項218至238中任一項之方法，其中該複數個結合位置之對應2個或任2個相鄰珠的結合位置之間的最短距離係約10^{-9} m至約10^{-4} m。

【請求項240】如請求項218至239中任一項之方法，其中該複數個珠之2個或任2個相鄰珠的中心之間的距離係約10^{-9} m至約10^{-4} m。

【請求項241】如請求項218至239中任一項之方法，其中該複數個珠之2個或任2個相鄰珠的中心之間的距離係該2個對應之結合位置之間的最短距離之至少2倍大。

【請求項242】一種於自包含複數個結合位置之表面所收集的影像上實施品質評估之方法，該方法包含：

於處理器之控制下：

接收自包含複數個結合位置之表面所收集的影像；

鑑別源自第一結合位置之第一訊號；

鑑別源自第二結合位置之第二訊號；

測定該第一結合位置與該第二結合位置分隔之距離；及

若該距離低於閾值，則負面評估該影像。

【請求項243】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含廢棄該影像。

【請求項244】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含廢棄源自該影像之該第一訊號和該第二訊號。

【請求項245】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含廢棄源自該第一結合位置之任何訊號和源自該第

二結合位置之任何訊號。

【請求項246】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含標記該第一結合位置和該第二結合位置中至少一者為失焦者。

【請求項247】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含再聚焦該第一結合位置和該第二結合位置中至少一者。

【請求項248】如請求項247之方法，其中該再聚焦包含降低該第一訊號之大小。

【請求項249】如請求項248之方法，其中該再聚焦包含降低該第一訊號之大小和該第二訊號之大小。

【請求項250】如請求項247之方法，其中該再聚焦包含增加該第一訊號之強度。

【請求項251】如請求項250之方法，其中該再聚焦包含增加該第一訊號之強度和該第二訊號之強度。

【請求項252】如請求項247之方法，其中該再聚焦包含降低該第一訊號之大小和該第二訊號之大小且增加該第一訊號之強度和該第二訊號之強度。

【請求項253】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含測定基於該距離和該閾值之失焦值。

【請求項254】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含測定基於該距離和理想距離之失焦值。

【請求項255】如請求項253至254中任一項之方法，其中該失焦值係該距離與該閾值之比、該距離與該理想距

離閾值之比或彼等之組合。

【請求項256】如請求項253至254中任一項之方法，其中該失焦值係該距離與該閾值之差、該距離與該理想距離閾值之差或彼等之組合。

【請求項257】如請求項253至254中任一項之方法，其中負面評估該影像包含：導致基於該失焦值將自該表面收集再聚焦之影像；及/或接收基於該失焦值自該表面收集的再聚焦之影像。

【請求項258】如請求項253至254中任一項之方法，其中負面評估該影像包含：調整基於該失焦值收集影像的顯像系統之焦距；及/或導致該顯像系統基於該失焦值調整該顯像系統之焦距。

【請求項259】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含導致將自該表面收集的再聚焦之影像。

【請求項260】如請求項242之方法，其中負面評估該影像包含接收自該表面收集的再聚焦之影像。

【請求項261】如請求項242至260中任一項之方法，其中測定該距離包含使用第一結合位置之中心點和第二結合位置之中心點以測量該第一結合位置至該第二結合位置之距離。

【請求項262】如請求項242至260中任一項之方法，其中測定該距離包含使用第一結合位置之邊緣和第二結合位置之邊緣以測量該第一結合位置至該第二結合位置之距離。

【請求項263】如請求項242至262中任一項之方法，其中該複數個結合位置之至少第一部分係規則地、不規則地或隨機地排列於該流通池表面上；及/或，其中該複數個結合位置之至少第二部分係不規則地或隨機地排列於該流通池表面上。

【請求項264】如請求項242至262中任一項之方法，其中該複數個結合位置之至少一部分未排列於該流通池表面上之預定區位集。

【請求項265】如請求項242至262中任一項之方法，其中該複數個結合位置之至少一部分不共有共同圖案。

【請求項266】如請求項242至262中任一項之方法，其中該複數個結合位置包含未圖案化之結合位置。

【請求項267】如請求項242至262中任一項之方法，其中該複數個結合位置係經隨機排列。

【請求項268】如請求項242至262中任一項之方法，其中該複數個結合位置係經排列以形成具有規則地、不規則地或隨機地放置之結合位置的第一區域和具有不規則地或隨機地放置之結合位置的第二區域。

【請求項269】一種定向複數個流通池影像之方法，其包含：

於處理器之控制下：

鑑別該複數個流通池影像共有之複數個群落的不規則或隨機之群落區域；和

定向一或更多個該複數個流通池影像，使得於該複數

個流通池影像的該不規則或隨機之群落區域經比對。

【請求項270】如請求項269之方法，其中該流通池上之該等群落係經分佈，使得沒有2個群落比彼此之最小距離更為接近。

【請求項271】如請求項270之方法，其中該流通池上之該等群落係經分佈，使得沒有2個群落自該2個群落各別之中心比彼此之最小距離更為接近。

【請求項272】如請求項270之方法，其中該流通池上之該等群落係經分佈，使得沒有2個群落自該2個群落各別之邊緣比彼此之最小距離更為接近。

【請求項273】如請求項270至272中任一項之方法，其中該最小距離係約10^{-9} m至約10^{-4} m。

【請求項274】如請求項269至272中任一項之方法，其中該等群落之一者、一或更多者或每一者的大小係約10^{-9} m至約10^{-4} m，可選擇性地其中該大小係半徑或直徑。

【請求項275】如請求項269至272中任一項之方法，其中該等群落之一者與最近相鄰群落的距離係約10^{-9} m至約10^{-4} m。

【請求項276】如請求項269至272中任一項之方法，其中該等群落之一者與最近相鄰群落的距離係該群落之大小的至少2倍大。

【請求項277】如請求項269至276中任一項之方法，其中該等群落係以約200k/mm^{2}至約8,000k/mm^{2}之密度存在。

【請求項278】如請求項269至276中任一項之方法，其中該等群落係以至少600k/mm^{2}之密度存在。

【請求項279】如請求項269至276中任一項之方法，其中該等群落係以至少800k/mm^{2}之密度存在。

【請求項280】如請求項269至276中任一項之方法，其中該等群落係以至少1,000k/mm^{2}之密度存在。

【請求項281】如請求項269至276中任一項之方法，其中該等群落包含至少100,000個群落。

【請求項282】如請求項269至276中任一項之方法，其中該等群落包含至少1,000,000個群落。

【請求項283】如請求項269至276中任一項之方法，其中該等群落包含至少10,000,000個群落。

【請求項284】如請求項269至283中任一項之方法，其中該複數個流通池影像係自單一流通池收集。

【請求項285】如請求項284之方法，其中該單一流通池包含規則地、不規則地或隨機地排列之群落的至少一區域和不規則地或隨機地排列之群落的至少一區域。

【請求項286】如請求項284之方法，其中該複數個流通池影像之缺少該不規則或隨機的群落區域之流通池影像係自該複數個流通池影像廢棄。

【請求項287】如請求項269至276中任一項之方法，其中該複數個流通池影像係自複數個流通池收集。

【請求項288】如請求項287之方法，其中該複數個流通池包含多個流通池，每個流通池具有規則地、不規則地

或隨機地排列之群落的至少一區域和不規則地或隨機地排列之群落的至少一區域，且其中沒有2個流通池共有不規則地排列之群落的相同陣列。

【請求項289】如請求項287之方法，其包含揀選該複數個影像，使得具有不規則地或隨機地排列之群落的共同區域之影像經分組在一起。

【請求項290】如請求項287之方法，其包含揀選影像，使得缺少不規則地或隨機地排列之群落的共同區域之影像經差異地分組。

【請求項291】一種核酸瓦，該核酸瓦包含支架核酸和複數個主要的寡核苷酸，其中該複數個主要的寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者包含與該支架核酸之不同區域雜交的至少2個結合結構域，藉以形成雙交叉模體，其中該複數個主要的寡核苷酸包含自該核酸瓦之第一面突出的第一錨寡核苷酸。

【請求項292】如請求項291之核酸瓦，其中該核酸瓦包含去氧核糖核酸(DNA)，其中該支架核酸包含DNA，及/或其中該複數個主要的寡核苷酸包含DNA。

【請求項293】如請求項291至292中任一項之核酸瓦，其中該支架核酸藉由該複數個主要的寡核苷酸之雜交以形成偽環，及/或其中該核酸瓦係呈偽環形之形狀。

【請求項294】如請求項291至293中任一項之核酸瓦，其中該支架核酸之長度係約5千鹼基(kb)至約50 kb，可選擇性地其中該支架核酸包含M13mp18噬菌體之基因體

DNA。

【請求項295】如請求項291至294中任一項之核酸瓦，其中該複數個主要的寡核苷酸包含自該核酸瓦之第二面突出的第二錨寡核苷酸，且其中該第一錨寡核苷酸和該第二錨寡核苷酸係自該核酸瓦之相反面突出。

【請求項296】如請求項291至295中任一項之核酸瓦，其中該第一錨寡核苷酸及/或該第二錨寡核苷酸包含夾序列，可選擇性地其中該夾序列係位於該錨寡核苷酸之3’端，可選擇性地其中該錨寡核苷酸包含間隔子序列，可選擇性地其中該間隔子序列對該夾序列係5’，可選擇性地其中該間隔子序列包含多T序列，可選擇性地其中該間隔子序列之長度係約3至約10個核苷酸。

【請求項297】如請求項296之核酸瓦，其中該夾序列包含第一夾序列和第二夾序列，可選擇性地其中該第一夾序列之解構溫度(Tm)係高於該第二夾序列之Tm，其中該複數個主要的寡核苷酸包含複數個捕獲寡核苷酸，每個捕獲寡核苷酸包含第一捕獲序列，該第一捕獲序列包含該第二夾序列且不包含該第一夾序列，可選擇性地其中該複數個捕獲寡核苷酸之捕獲寡核苷酸係相同。

【請求項298】如請求項297之核酸瓦，其中該複數個捕獲寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者包含可切割位點，可選擇性地其中該可切割位點包含可切割之核苷酸。

【請求項299】如請求項297之核酸瓦，其中該複數個捕獲寡核苷酸之一者、一或更多者或每一者包含第二捕獲

序列。

【請求項300】一種生成如請求項291至299中任一項之核酸瓦之方法，其包含：

提供主要溶液，該主要溶液包含如請求項291至299中任一項所述之複數個主要的寡核苷酸；

提供支架溶液，該支架溶液包含如請求項291至299中任一項所述之支架核酸；

組合該主要溶液與該支架溶液以形成反應溶液；及

令該反應溶液經熱退火，藉以生成該核酸瓦。

【請求項301】如請求項300之方法，其中該反應溶液包含約100奈米莫耳濃度(nM)之該複數個主要的寡核苷酸的每一者、約10毫莫耳濃度(mM)之該支架核酸、約40 mM三羥甲基胺基甲烷(Tris)乙酸鹽、約12.5 mM氯化鎂及/或約0.1 mM EDTA，及/或其中該反應溶液具有約50微升(uL)之體積。

【請求項302】如請求項300至301中任一項之方法，其進一步包含自不為該核酸瓦之分子的一部分之該支架核酸之分子和該複數個主要的寡核苷酸之分子純化該核酸瓦，可選擇性地其中純化該核酸瓦包含基於大小之純化。

【請求項303】一種滾環擴增(RCA)之方法，其包含：

提供如請求項291至299中任一項之核酸瓦；

提供標的核酸；

使用該核酸瓦之該夾序列以使該標的核酸環形化；及

藉由使用該標的核酸作為模板延伸該夾序列以實施滾

環擴增，藉以產生該核酸瓦，每個該核酸瓦包含該標的核酸之串聯的複製。

【請求項304】一種滾環擴增(RCA)之方法，其包含：

提供如請求項291至299中任一項之核酸瓦；

提供複數個標的核酸；

使該複數個標的核酸之每一者與該核酸瓦之分子的該夾序列雜交；

使與該核酸瓦之分子的該夾序列雜交的該複數個標的核酸環形化；及

藉由使用該複數個標的核酸作為模板以延伸該核酸瓦之分子的該夾序列以實施滾環擴增，藉以產生核酸叢聚，該核酸叢聚之每一者包含具有該夾序列之該核酸瓦的分子，該夾序列經延伸以包括該複數個標的核酸之標的核酸之串聯的複製。

【請求項305】如請求項304之方法，其進一步包含沉積該核酸瓦之分子或該核酸叢聚於如請求項99至126中任一項之流通池表面的結合位置上，可選擇性地其中該複數個結合位置之至少50%包含至多1個該核酸瓦之分子或至多1個該核酸叢聚。

【請求項306】如請求項305之方法，其中該沉積於該實施之後發生。

【請求項307】如請求項305之方法，其中該沉積於該實施之前發生。

【請求項308】如請求項304至307中任一項之方法，

其進一步包含藉由切割該可切割位點以除去該複數個捕獲寡核苷酸。

【請求項309】如請求項304至307中任一項之方法，其中該複數個標的核酸之標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該複數個捕獲寡核苷酸之捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交，其中該方法進一步包含使釋出寡核苷酸與該捕獲寡核苷酸雜交，藉以使該標的核酸與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。

【請求項310】如請求項304至307中任一項之方法，其中(a1)該複數個標的核酸之第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該複數個捕獲寡核苷酸之第一捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交，其中(b)該複數個標的核酸之第二標的核酸係與該複數個捕獲寡核苷酸之第二捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交，其中該方法進一步包含令該核酸瓦經熱循環處理，藉以自該第二捕獲寡核苷酸釋出該第二標的核酸且使該第一標的核酸與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交。

【請求項311】如請求項304至307中任一項之方法，其中(a2)第一標的核酸係與該錨寡核苷酸之該第一夾序列和該第二夾序列雜交，其中(b)該複數個標的核酸之第二標的核酸係與該複數個捕獲寡核苷酸之第二捕獲寡核苷酸的該第二夾序列雜交，其中該方法進一步包含令該核酸瓦經熱循環處理，藉以自該第二捕獲寡核苷酸釋出該第二標的核酸。

【請求項312】一種結合多聯體於結構化表面之方法，其包含：

提供複數個非對稱性DNA瓦；

提供複數個多聯體；

於溶液中令個別多聯體結合於個別DNA瓦之第一側；及

沉積該DNA瓦於表面上，使得 該個別DNA瓦之第二側結合於該表面，同時該個別DNA瓦之該第一側維持與多聯體結合。

【請求項313】如請求項312之方法，其中該DNA瓦沉積於如請求項99至126中任一項之流通池表面的結合位置上。

【請求項314】如請求項99至150和175至192中任一項之複數個流通池表面，其中該流通池之結合位置係親水性、疏水性、帶正電荷、帶負電荷或未帶電荷；該流通池之結合位置包含用於共價連結之官能部分，可選擇性地其中該官能部分能參與點擊化學反應；該流通池之結合位置包含親和性生物分子，可選擇性地其中該親和性生物分子係生物素或卵白素；該流通池之結合位置包含中間體核酸或彼等之組合。

【請求項315】一種方法，其包含沉積多聯體於如請求項314所述之該流通池之結合位置上，可選擇性地其中該多聯體係滾環擴增(RCA)產物。

【請求項316】如請求項315之方法，其進一步包含於

沉積該多聯體之前，藉由使用複數個模板作為模板以延伸擴增引子或夾引子以於溶液中實施滾環擴增(RCA)以產生該多聯體。

【請求項317】如請求項316之方法，其中該RCA包含併入經官能化以共價結合該流通池之該結合位置的核苷酸，可選擇性地其中該等核苷酸包含能參與點擊化學反應之官能部分。

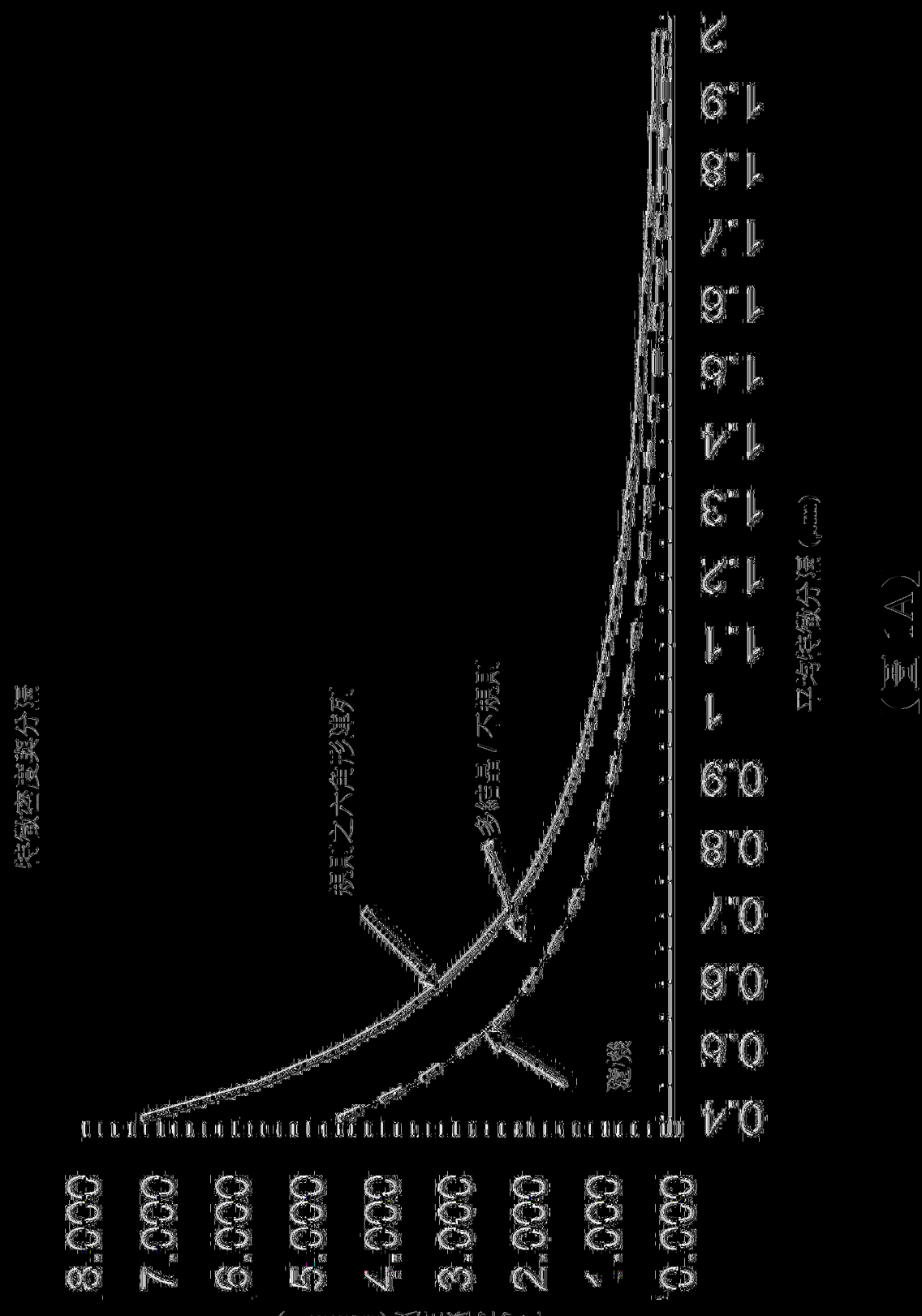
【請求項318】如請求項316之方法，其中該擴增引子或夾引子係經官能化以共價結合該等結合位置。

【請求項319】如請求項315或316之方法，其中該經沉積之多聯體係藉由與該等結合位置結合之中間體核酸共價結合或雜交而與該等結合位置結合，可選擇性地其中該中間體核酸係與該等結合位置共價結合，且可選擇性地其中該中間體核酸係DNA瓦。

【請求項320】一種方法，其包含於如請求項314所述之流通池之該結合位置上形成多聯體，可選擇性地其中該多聯體係滾環擴增(RCA)產物。

【請求項321】如請求項320之方法，其中該等多聯體係藉由自共價連接該等結合位置或與該等結合位置結合的DNA瓦所呈現之夾引子序列的滾環擴增(RCA)形成。

【請求項322】如請求項315至321中任一項之方法，其進一步包含定序該多聯體。


0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2
空穴結合分率（%）
8,000
7,000
6,000
5,000
4,000
3,000
2,000
1,000
0
水性結合強度（N/mm²）
未添加
添加之本色彩膠分
添加之本色彩膠分
未添加之本色彩膠分

（圖A）

894079

0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9

(圖2A)

圖2A2
資料庫
顯示
偵測
處理
攝像
物體
人臉
警報

圖2

WL
WL
WL

（圖3A）

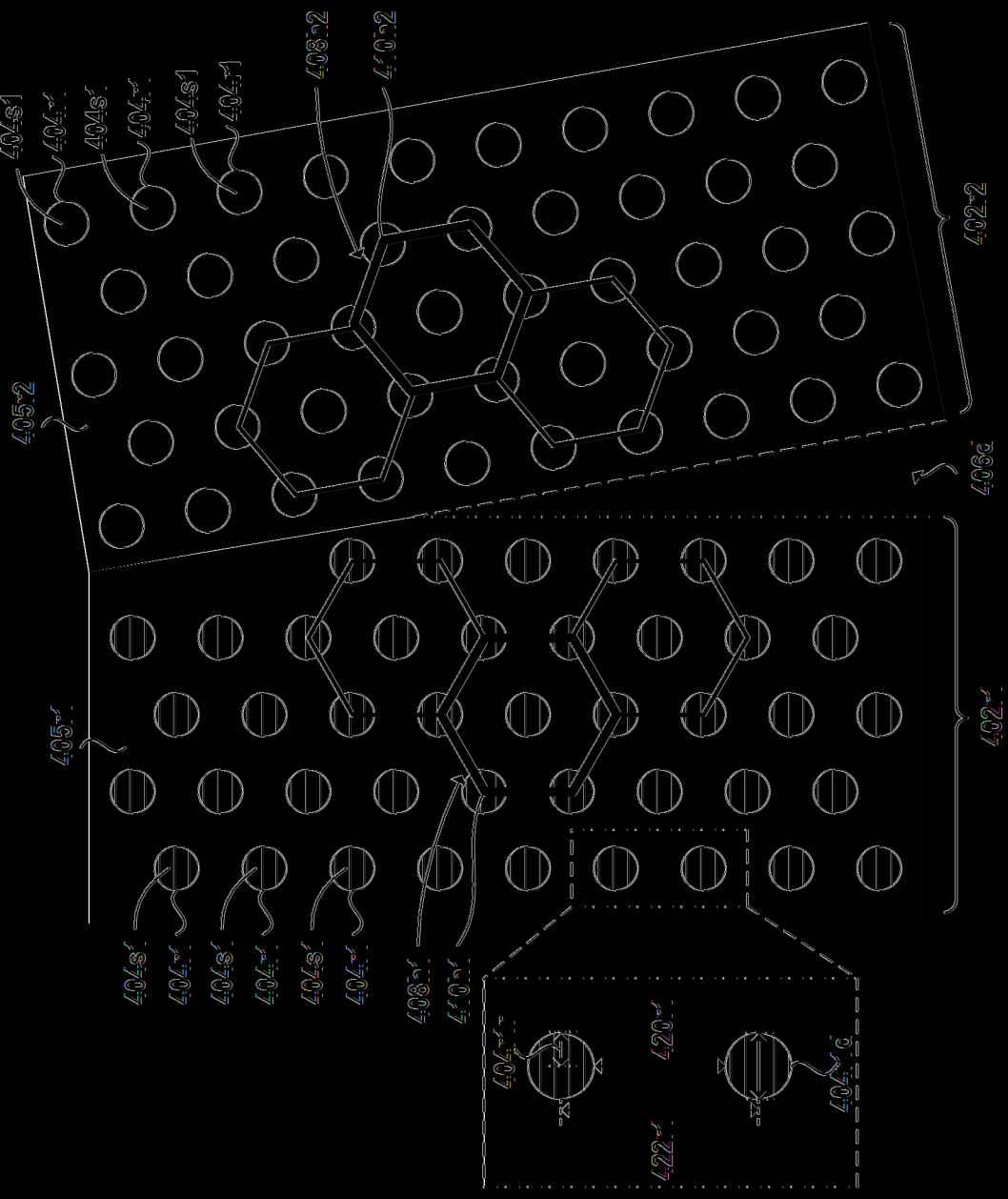
(圖3B)

308c2
310c2
306c
306'
306"
306'''
308c'
310c'
306c'
306'
306"
306'''
304-2
304-2
304-2
302-2
304'
304'
304'
302'

(圖3C)

3'01'
3'60'
3'20'
3'40'
3'80'
306'
304'
308'
302'
306''
308'2
302'2
3'012
3'602
3'202
3'402
3'802
304'2
306'2

圖3D

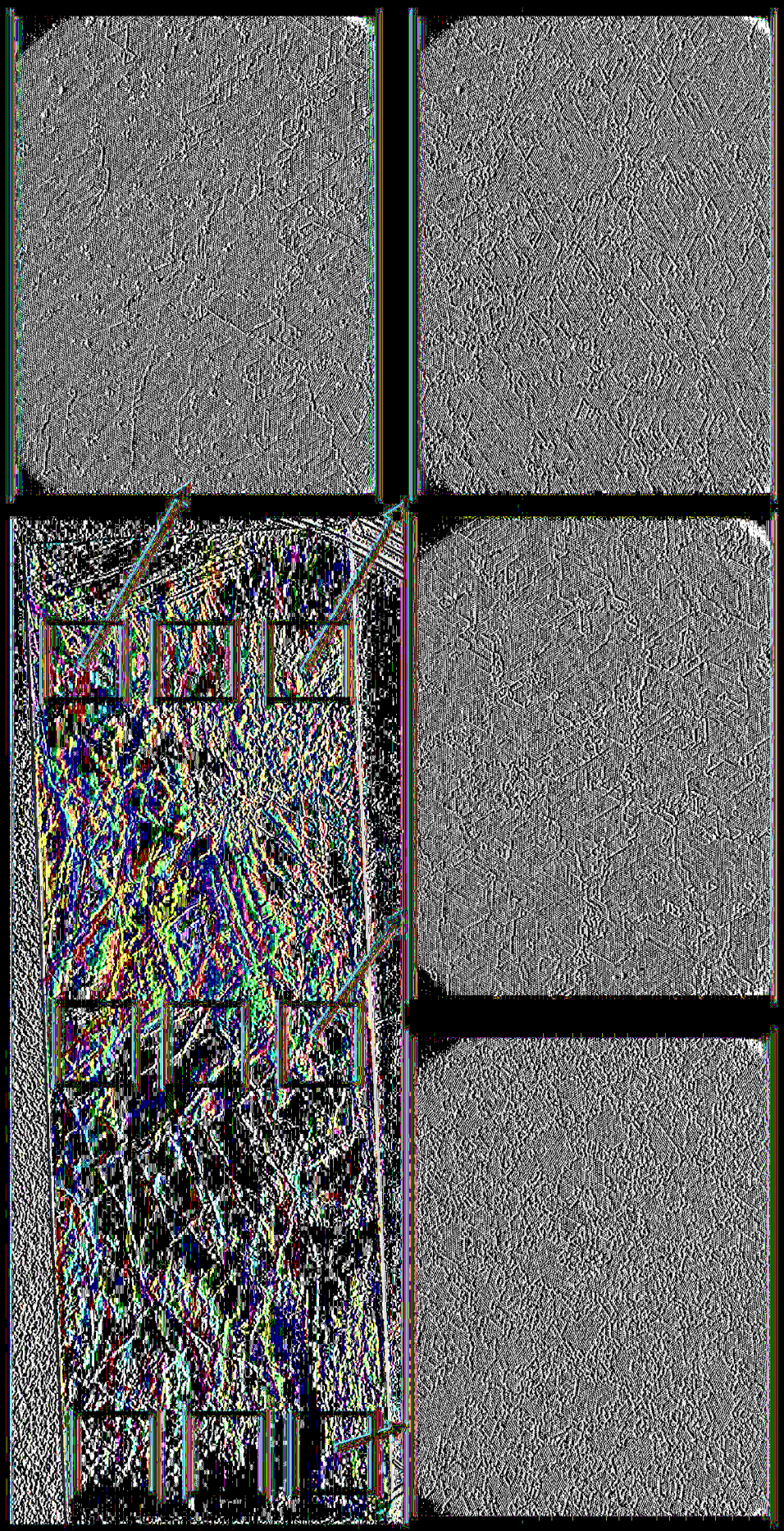

404s1
404
404s
404
404s1
404-1
408-2
410-2
402-2
405-2
406c
405
402
404s
404
404s
404
404s
404
408
410
407
420
407
422

（圖4A）

圖 3

4'01'
4'02'
4'2c2'
4'8c2'
4'4c2'
405'2
405'
407'
406'
406c'
408'2
402'2
402'
404'2
404'
4'8c'
4'4c'
4'01
4'02
4'2c2
4'8c2
4'4c2
405-2
405
407
406
406c
408-2
402-2
402
404-2
404

圖 7



(532)
(534)
(533)
(533)

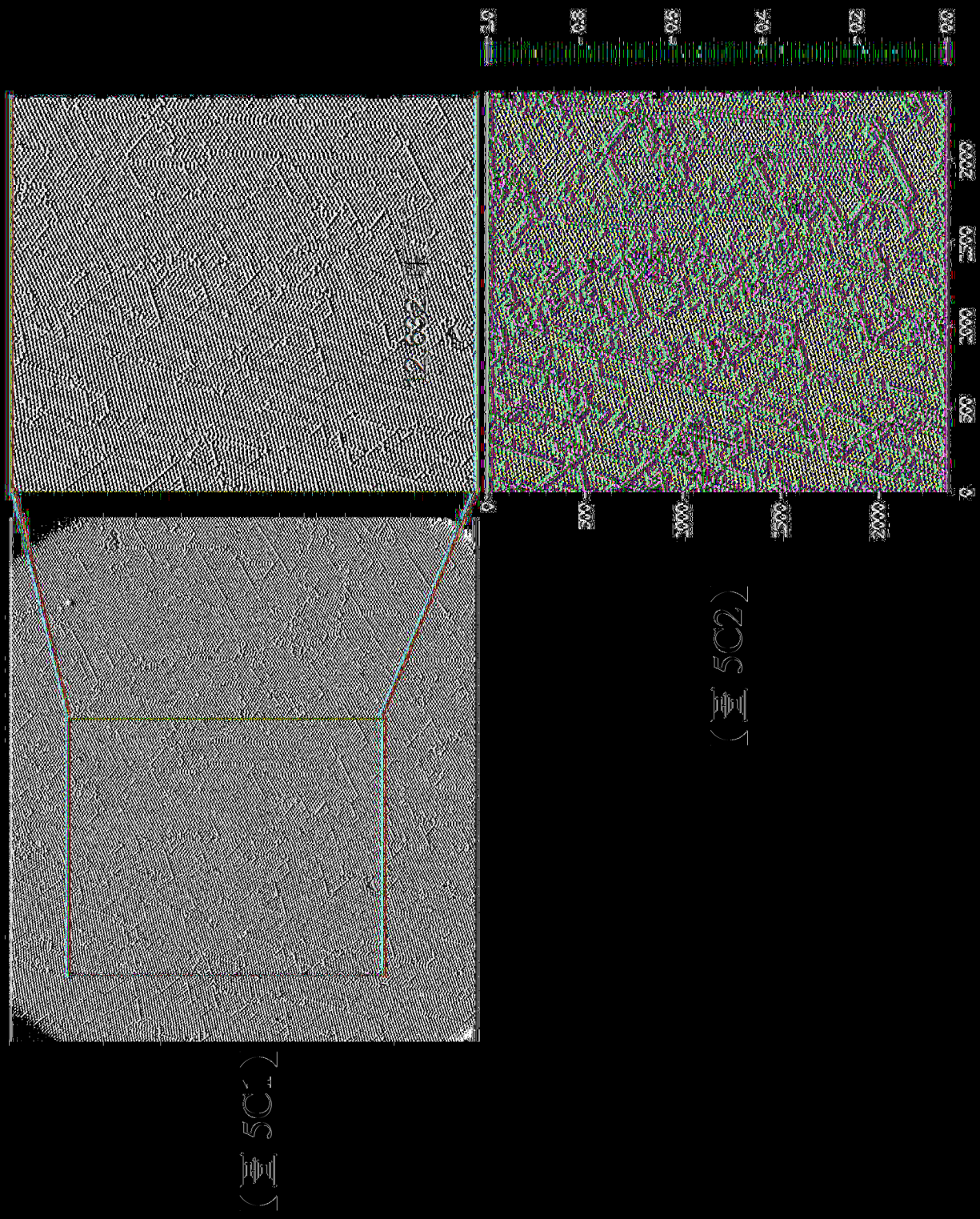
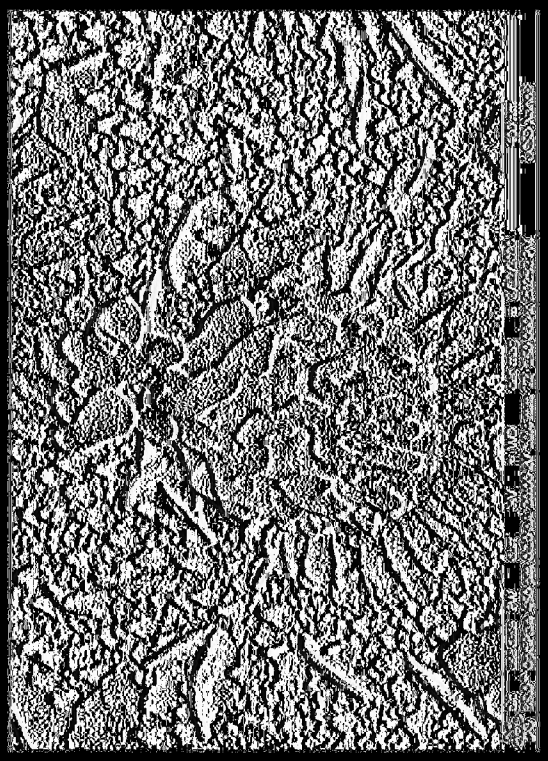
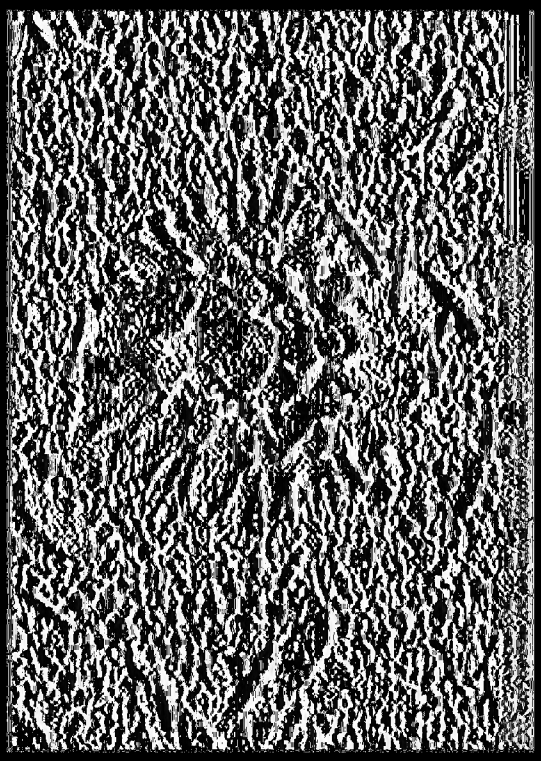

1.38 公分
3.03 公分
3.03 公分

圖3C
圖3B
圖3A

5% O2, 5% CO2
95% O2
圖 6C2
40% O2
60% O2
圖 6C1





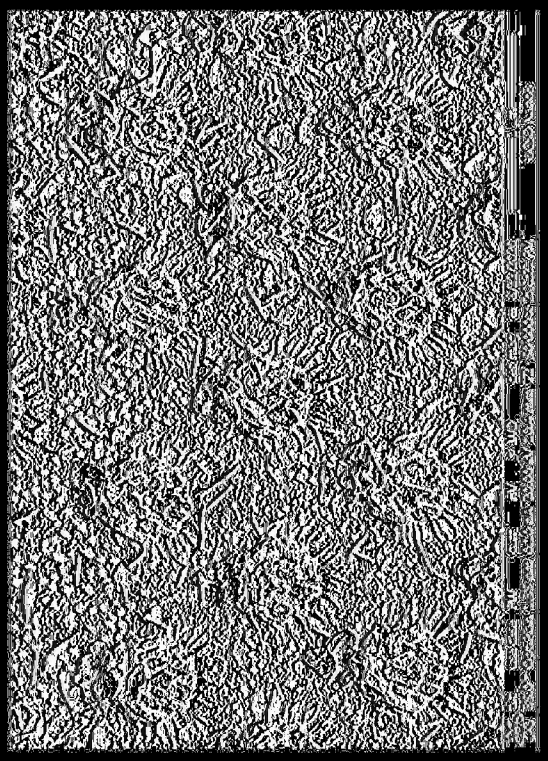




圖 2

(圖7A)

圖3

圖 6(C)

圖 3

(mm) 0.25
(mm) 0.25
(mm) 0.25

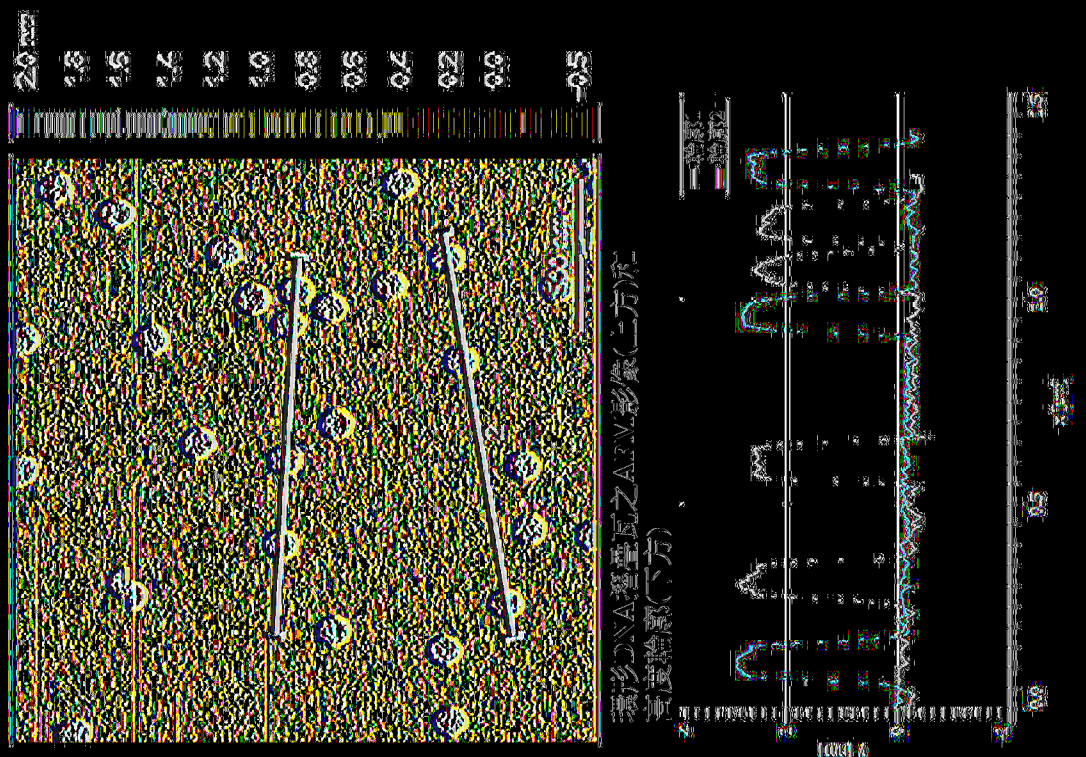
圖3

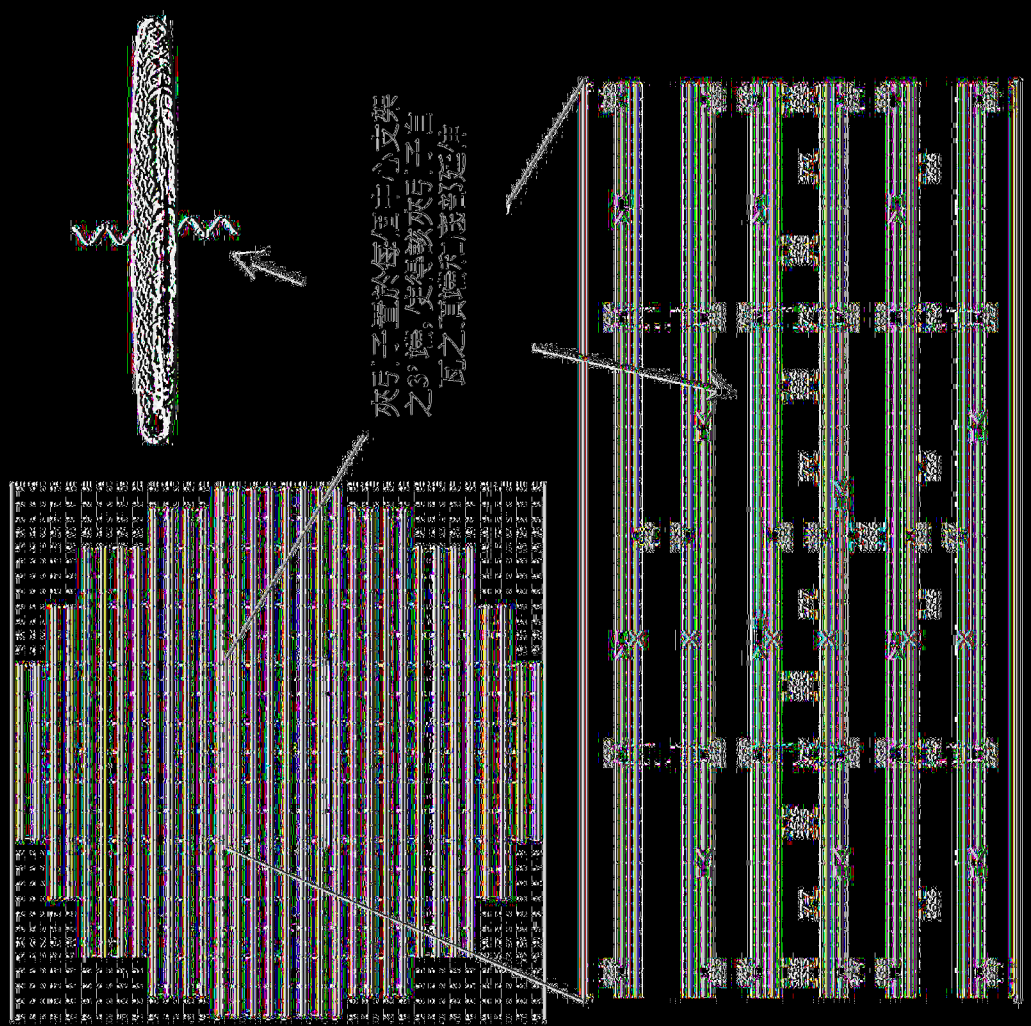
圖 6A

PEG8000 15%
PEG8000 10%
PEG8000 5%
PEG200 30%
PEG200 20%
PEG200 10%
IPA 30%
IPA 20%
IPA 10%
EtOH 30%
EtOH 20%
EtOH 10%
PAMA 30%
PAMA 20%
PAMA 10%
未調製
(c-03)
150000
100000
50000
0
200
150
100
50
0
沉澱物_PSO存在_蛋白質濃度
沉澱物_PSO存在_蛋白質濃度
沉澱物_PSO存在_蛋白質濃度

DNA基於S'端經磷酸化並隨後經接合酶處理
(單一反應混合)
DNA基於S'端經磷酸化並隨後經接合酶處理
(單一反應混合)
RCA擴增經過濾器於SCARA3表面上
分離緩衝液
RCA擴增經過濾器於SCARA3表面上
分離緩衝液
DNA基於S'端經磷酸化並隨後經接合酶處理
(單一反應混合)

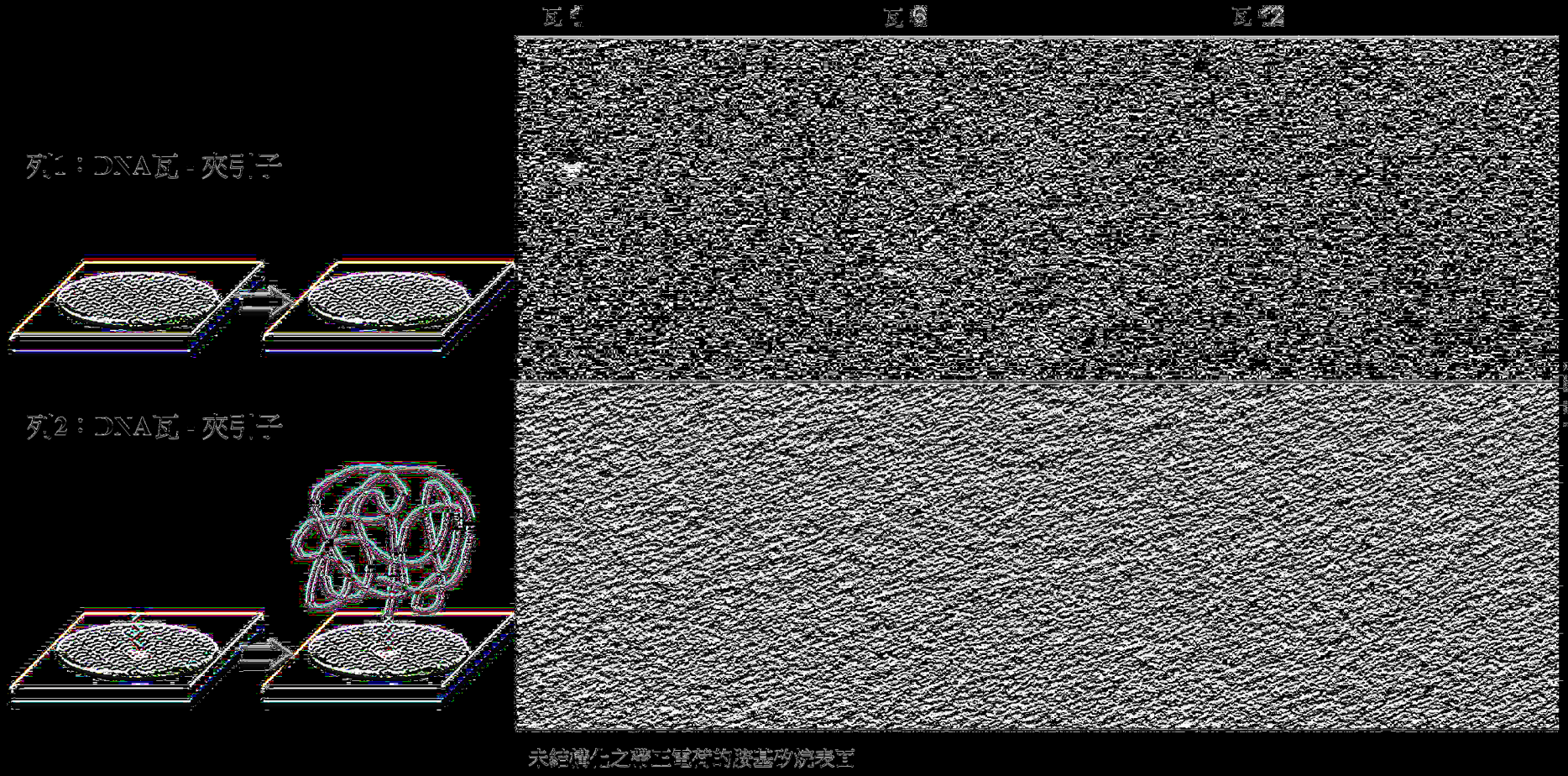
(図2)





基板
無電解銅層
光阻
曝光
顯影
電鍍銅層
蝕刻
剝膜
基板
無電解銅層
光阻
曝光
顯影
電鍍銅層
蝕刻
剝膜
基板
無電解銅層
光阻
曝光
顯影
電鍍銅層
蝕刻
剝膜

（圖7）



（圖 15A）

圖 3C
第一表現載體
第二表現載體
第一表現載體
第二表現載體
第一表現載體
第二表現載體
第一表現載體
第二表現載體

圖 6
無細胞
細胞
DNA
無細胞
細胞
DNA
A
A'
無細胞
細胞
DNA

(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
(k)
(l)
(m)
(n)
(o)
(p)
(q)
(r)
(s)
(t)
(u)
(v)
(w)
(x)
(y)
(z)
(aa)
(ab)
(ac)
(ad)
(ae)
(af)
(ag)
(ah)
(ai)
(aj)
(ak)
(al)
(am)
(an)
(ao)
(ap)
(aq)
(ar)
(as)
(at)
(au)
(av)
(aw)
(ax)
(ay)
(az)
(ba)
(bb)
(bc)
(bd)
(be)
(bf)
(bg)
(bh)
(bi)
(bj)
(bk)
(bl)
(bm)
(bn)
(bo)
(bp)
(bq)
(br)
(bs)
(bt)
(bu)
(bv)
(bw)
(bx)
(by)
(bz)
(ca)
(cb)
(cc)
(cd)
(ce)
(cf)
(cg)
(ch)
(ci)
(cj)
(ck)
(cl)
(cm)
(cn)
(co)
(cp)
(cq)
(cr)
(cs)
(ct)
(cu)
(cv)
(cw)
(cx)
(cy)
(cz)
(da)
(db)
(dc)
(dd)
(de)
(df)
(dg)
(dh)
(di)
(dj)
(dk)
(dl)
(dm)
(dn)
(do)
(dp)
(dq)
(dr)
(ds)
(dt)
(du)
(dv)
(dw)
(dx)
(dy)
(dz)
(ea)
(eb)
(ec)
(ed)
(ee)
(ef)
(eg)
(eh)
(ei)
(ej)
(ek)
(el)
(em)
(en)
(eo)
(ep)
(eq)
(er)
(es)
(et)
(eu)
(ev)
(ew)
(ex)
(ey)
(ez)
(fa)
(fb)
(fc)
(fd)
(fe)
(ff)
(fg)
(fh)
(fi)
(fj)
(fk)
(fl)
(fm)
(fn)
(fo)
(fp)
(fq)
(fr)
(fs)
(ft)
(fu)
(fv)
(fw)
(fx)
(fy)
(fz)
(ga)
(gb)
(gc)
(gd)
(ge)
(gf)
(gg)
(gh)
(gi)
(gj)
(gk)
(gl)
(gm)
(gn)
(go)
(gp)
(gq)
(gr)
(gs)
(gt)
(gu)
(gv)
(gw)
(gx)
(gy)
(gz)
(ha)
(hb)
(hc)
(hd)
(he)
(hf)
(hg)
(hh)
(hi)
(hj)
(hk)
(hl)
(hm)
(hn)
(ho)
(hp)
(hq)
(hr)
(hs)
(ht)
(hu)
(hv)
(hw)
(hx)
(hy)
(hz)
(ia)
(ib)
(ic)
(id)
(ie)
(if)
(ig)
(ih)
(ii)
(ij)
(ik)
(il)
(im)
(in)
(io)
(ip)
(iq)
(ir)
(is)
(it)
(iu)
(iv)
(iw)
(ix)
(iy)
(iz)
(ja)
(jb)
(jc)
(jd)
(je)
(jf)
(jg)
(jh)
(ji)
(jj)
(jk)
(jl)
(jm)
(jn)
(jo)
(jp)
(jq)
(jr)
(js)
(jt)
(ju)
(jv)
(jw)
(jx)
(jy)
(jz)
(ka)
(kb)
(kc)
(kd)
(ke)
(kf)
(kg)
(kh)
(ki)
(kj)
(kk)
(kl)
(km)
(kn)
(ko)
(kp)
(kq)
(kr)
(ks)
(kt)
(ku)
(kv)
(kw)
(kx)
(ky)
(kz)
(la)
(lb)
(lc)
(ld)
(le)
(lf)
(lg)
(lh)
(li)
(lj)
(lk)
(ll)
(lm)
(ln)
(lo)
(lp)
(lq)
(lr)
(ls)
(lt)
(lu)
(lv)
(lw)
(lx)
(ly)
(lz)
(ma)
(mb)
(mc)
(md)
(me)
(mf)
(mg)
(mh)
(mi)
(mj)
(mk)
(ml)
(mm)
(mn)
(mo)
(mp)
(mq)
(mr)
(ms)
(mt)
(mu)
(mv)
(mw)
(mx)
(my)
(mz)
(na)
(nb)
(nc)
(nd)
(ne)
(nf)
(ng)
(nh)
(ni)
(nj)
(nk)
(nl)
(nm)
(nn)
(no)
(np)
(nq)
(nr)
(ns)
(nt)
(nu)
(nv)
(nw)
(nx)
(ny)
(nz)
(oa)
(ob)
(oc)
(od)
(oe)
(of)
(og)
(oh)
(oi)
(oj)
(ok)
(ol)
(om)
(on)
(oo)
(op)
(oq)
(or)
(os)
(ot)
(ou)
(ov)
(ow)
(ox)
(oy)
(oz)
(pa)
(pb)
(pc)
(pd)
(pe)
(pf)
(pg)
(ph)
(pi)
(pj)
(pk)
(pl)
(pm)
(pn)
(po)
(pp)
(pq)
(pr)
(ps)
(pt)
(pu)
(pv)
(pw)
(px)
(py)
(pz)
(qa)
(qb)
(qc)
(qd)
(qe)
(qf)
(qg)
(qh)
(qi)
(qj)
(qk)
(ql)
(qm)
(qn)
(qo)
(qp)
(qq)
(qr)
(qs)
(qt)
(qu)
(qv)
(qw)
(qx)
(qy)
(qz)
(ra)
(rb)
(rc)
(rd)
(re)
(rf)
(rg)
(rh)
(ri)
(rj)
(rk)
(rl)
(rm)
(rn)
(ro)
(rp)
(rq)
(rr)
(rs)
(rt)
(ru)
(rv)
(rw)
(rx)
(ry)
(rz)
(sa)
(sb)
(sc)
(sd)
(se)
(sf)
(sg)
(sh)
(si)
(sj)
(sk)
(sl)
(sm)
(sn)
(so)
(sp)
(sq)
(sr)
(ss)
(st)
(su)
(sv)
(sw)
(sx)
(sy)
(sz)
(ta)
(tb)
(tc)
(td)
(te)
(tf)
(tg)
(th)
(ti)
(tj)
(tk)
(tl)
(tm)
(tn)
(to)
(tp)
(tq)
(tr)
(ts)
(tt)
(tu)
(tv)
(tw)
(tx)
(ty)
(tz)
(ua)
(ub)
(uc)
(ud)
(ue)
(uf)
(ug)
(uh)
(ui)
(uj)
(uk)
(ul)
(um)
(un)
(uo)
(up)
(uq)
(ur)
(us)
(ut)
(uu)
(uv)
(uw)
(ux)
(uy)
(uz)
(va)
(vb)
(vc)
(vd)
(ve)
(vf)
(vg)
(vh)
(vi)
(vj)
(vk)
(vl)
(vm)
(vn)
(vo)
(vp)
(vq)
(vr)
(vs)
(vt)
(vu)
(vv)
(vw)
(vx)
(vy)
(vz)
(wa)
(wb)
(wc)
(wd)
(we)
(wf)
(wg)
(wh)
(wi)
(wj)
(wk)
(wl)
(wm)
(wn)
(wo)
(wp)
(wq)
(wr)
(ws)
(wt)
(wu)
(wv)
(ww)
(wx)
(wy)
(wz)
(xa)
(xb)
(xc)
(xd)
(xe)
(xf)
(xg)
(xh)
(xi)
(xj)
(xk)
(xl)
(xm)
(xn)
(xo)
(xp)
(xq)
(xr)
(xs)
(xt)
(xu)
(xv)
(xw)
(xx)
(xy)
(xz)
(ya)
(yb)
(yc)
(yd)
(ye)
(yf)
(yg)
(yh)
(yi)
(yj)
(yk)
(yl)
(ym)
(yn)
(yo)
(yp)
(yq)
(yr)
(ys)
(yt)
(yu)
(yv)
(yw)
(yx)
(yy)
(yz)
(za)
(zb)
(zc)
(zd)
(ze)
(zf)
(zg)
(zh)
(zi)
(zj)
(zk)
(zl)
(zm)
(zn)
(zo)
(zp)
(zq)
(zr)
(zs)
(zt)
(zu)
(zv)
(zw)
(zx)
(zy)
(zz)

圖8

圖 6
900
處理器
960
輸入裝置
950
顯示器
940
輸入處理器
930
圖形處理單元
920
I/O介面
910
計時器
970
記憶體
972
作業系統
974
資料儲存裝置
980
匯流排