



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104508060 B

(45)授权公告日 2018.01.30

(21)申请号 201380037594.7

(22)申请日 2013.06.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104508060 A

(43)申请公布日 2015.04.08

(30)优先权数据

61/657,508 2012.06.08 US

61/753,833 2013.01.17 US

13/784,368 2013.03.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.01.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/044305 2013.06.05

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/184796 EN 2013.12.12

(73)专利权人 ILLUMINA公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 韦恩·N·乔治 丹尼尔·布拉顿
安德鲁·A·布朗 任洪吉
赖安·C·史密斯

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C09D 133/26(2006.01)

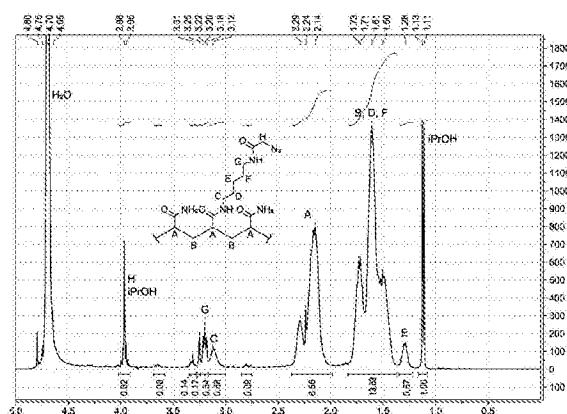
(56)对比文件
US 2001/0014448 A1, 2001.08.16,
审查员 钟燕妮

(54)发明名称

聚合物包被

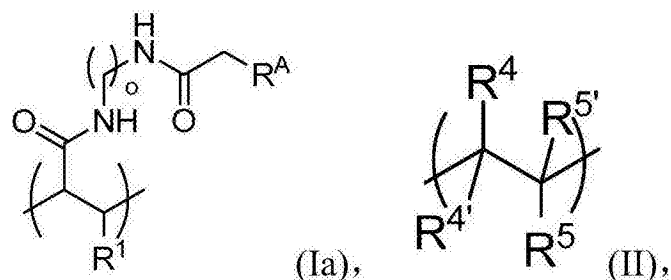
(57)摘要

本公开内容涉及与基质表面共价连接的聚合物包被,以及在形成和操作基质(例如分子阵列和流动池)中制备所述聚合物包被,如(N-(5-叠氨基乙酰胺基苯基)丙烯酰胺-丙烯酰胺)共聚物(PAZAM)。本公开内容还涉及通过使用包覆有共价连接的聚合物如PAZAM的珠子来准备基质表面的方法,以及确定结合至本文描述的基质表面的多核苷酸的核苷酸序列的方法。



权利要求书4页 说明书40页 附图22页

1. 基质, 其具有表面, 所述表面包含与之共价连接的聚合物包被, 其中所述聚合物包被包含式 (Ia) 所示的重复单元和式 (II) 所示的重复单元:



其中:

R^1 选自氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

R^A 为叠氮基;

R^4 选自 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 和 $-NR^7R^8$;

R^5 选自 H、OH、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

R^4' 和 R^5' 均为 H;

R^6 选自 H、OH、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

每个 R^7 和 R^8 独立地为 H 或烷基, 或者 R^7 和 R^8 以与它们连接的原子结合在一起形成杂环,

每个 $-(CH_2)_o$ 可被任选取代; 并且

o 为 1-50 的整数。

2. 如权利要求 1 所述的基质, 其中 R^5 为羟基烷基或其任选取代的变体。

3. 如权利要求 1 所述的基质, 其中 R^6 为羟基烷基或其任选取代的变体。

4. 如权利要求 1 所述的基质, 其中 R^1 是 H 或烷基。

5. 如权利要求 1 所述的基质, 其中 R^1 是氢, 并且 o 是 5。

6. 如权利要求 1 所述的基质, 其中

R^1 为 H 或烷基;

R^4 为 $-C(O)NH_2$;

R^5 为 H 或烷基; 并且

R^4' 和 R^5' 均为 H。

7. 如权利要求 6 所述的基质, 其中

R^1 和 R^5 均为 H; 并且

o 是 5。

8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的基质, 其中所述聚合物包被与结合至所述表面的官能团共价结合, 其中所述官能团选自烯烃、炔烃、氮烯、醛、肼、活化酯、缩水甘油醚、胺、马来酰亚胺, 以及邻位上具有用于施陶丁格连接的膦取代基的苯甲酰基酯。

9. 如权利要求 8 所述的基质, 其中所述官能团包括炔烃。

10. 如权利要求 8 所述的基质, 其中所述官能团包括烯烃。

11. 如权利要求 8 所述的基质, 其中所述官能团包括活化酯。

12. 如权利要求 1-7 中任一项所述的基质, 其中所述表面包含聚合物包覆的区域和惰性区域。

13. 如权利要求 12 所述的基质, 其中所述惰性区域选自玻璃区域、金属区域、遮蔽区域

和间隙区域。

14. 如权利要求12所述的基质,其中所述惰性区域包含玻璃。

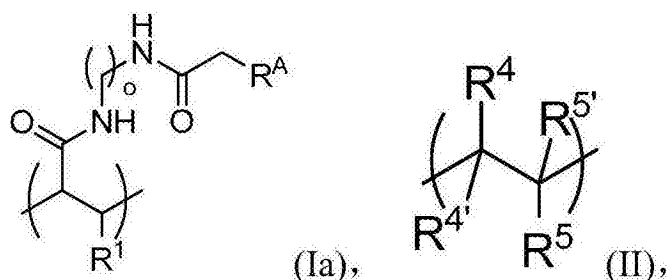
15. 如权利要求1-7中任一项所述的基质,其中所述基质表面包含开放的小井。

16. 如权利要求1-7中任一项所述的基质,其中所述基质是珠子。

17. 制备固定至基质表面的聚合物包被的方法,所述方法包括:

将聚合物与基质表面接触,其中所述表面包含多个官能团,从而在所述表面上形成聚合物包被,并且其中所述聚合物包被与所述表面上的所述官能团共价结合,

其中所述聚合物包被包含式 (Ia) 的重复单元和式 (II) 所示的重复单元:



其中:

R^1 选自氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

R^A 为叠氮基;

R^4 选自 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 和 $-NR^7R^8$;

R^5 选自H、OH、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

$R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 均为H;

R^6 选自H、OH、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;并且每个 R^7 和 R^8 独立地为H或烷基,或者 R^7 和 R^8 以与它们连接的原子结合在一起形成杂环,每个 $-(CH_2)_o$ 可被任选取代;并且

o 为1-50的整数。

18. 如权利要求17所述的方法,其中 R^5 为羟基烷基或其任选取代的变体。

19. 如权利要求17所述的方法,其中 R^6 为羟基烷基或其任选取代的变体。

20. 如权利要求17所述的方法,其中

R^1 为H或烷基;

R^4 为 $-C(O)NH_2$;

R^5 选自H或烷基;并且

$R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 均为H。

21. 如权利要求20所述的方法,其中

R^1 和 R^5 均为H;并且

o 是5。

22. 如权利要求17-21中任一项所述的方法,其中所述基质表面上的所述官能团包括可光活化的叠氮化物。

23. 如权利要求17-21中任一项所述的方法,其中所述基质表面上的所述官能团包括任选取代的苯基叠氮化物。

24. 如权利要求23所述的方法,其中通过将所述基质表面上的胺基与N-羟基磺基琥珀

酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯反应来制备所述苯基叠氮化物。

25. 如权利要求23所述的方法,其中在将所述聚合物与所述基质表面接触之前,光活化所述苯基叠氮化物。

26. 如权利要求22所述的方法,其中所述聚合物包被经所述官能团的光活化与所述官能团共价结合。

27. 如权利要求17-21中任一项所述的方法,其中所述基质表面上的所述官能团包括炔基。

28. 如权利要求27所述的方法,其中在铜催化剂存在下将聚合物包被与所述官能团共价结合。

29. 如权利要求17-21中任一项所述的方法,其中所述基质表面上的所述官能团包括烯烃或丙烯酰胺基。

30. 如权利要求29所述的方法,其中通过将胺官能化的表面与选自活化的丙烯酸酯或丙烯酸氯化物的丙烯酰基反应来制备所述丙烯酰胺基。

31. 如权利要求30所述的方法,其中通过用3-氨基丙基三甲氧基硅烷处理所述表面来制备所述胺官能化的表面。

32. 如权利要求30所述的方法,其中所述活化的丙烯酸酯是丙烯酸N-羟基琥珀酰亚胺酯。

33. 如权利要求17-21中任一项所述的方法,其中将多个官能团设置在所述基质表面上,从而在聚合物层包被在所述表面上后形成多个聚合物包覆的区域和多个惰性区域。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述惰性区域选自玻璃区域、金属区域、遮蔽区域和间隙区域。

35. 如权利要求33所述的方法,其中所述惰性区域包含玻璃。

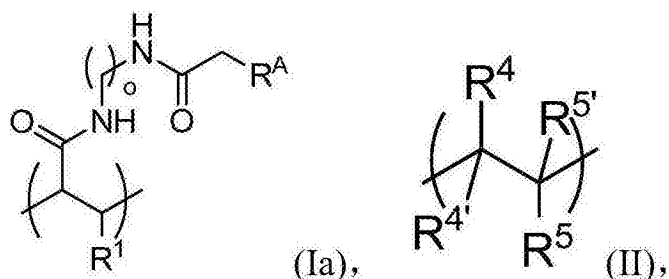
36. 如权利要求33所述的方法,其中在所述表面上设置所述多个聚合物包覆的区域和所述多个惰性区域,以形成图案。

37. 如权利要求17-21中任一项所述的方法,其中所述基质是珠子。

38. 制备珠子阵列的方法,其包括:

在一个或多个珠子表面上形成多个官能团;以及

将聚合物包被与所述珠子接触以在所述珠子的表面上形成聚合物包被,其中所述聚合物包被与所述珠子表面上的所述官能团共价结合,其中所述聚合物包被包含式(Ia)所示的重复单元和式(II)所示的重复单元:



其中:

R^1 选自氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

R^A 为叠氮基;

R^4 选自 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 和 $-NR^7R^8$;

R^5 选自H、OH、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

$R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 均为H;

R^6 选自H、OH、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基和以上基团的任选取代的变体;

每个 R^7 和 R^8 独立地为H或烷基,或者 R^7 和 R^8 以与它们连接的原子结合在一起形成杂环,每个 $-(CH_2)_o$ 可被任选取代;并且

o 为1-50的整数。

39. 如权利要求38所述的方法,其中 R^5 为羟基烷基或其任选取代的变体。

40. 如权利要求38所述的方法,其中 R^6 为羟基烷基或其任选取代的变体。

41. 如权利要求38所述的方法,其中

R^1 为H或烷基;

R^4 为 $-C(O)NH_2$;

R^5 为H或烷基;并且

$R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 均为H。

42. 如权利要求41所述的方法,其中

R^1 和 R^5 均为H;并且

o 是5。

43. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中所述珠子表面上的所述官能团包括烯烃或丙烯酰胺。

44. 如权利要求43所述的方法,其中通过将所述珠子表面与官能化的硅烷直接接触来制备所述烯烃或丙烯酰胺基团。

45. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中在与所述聚合物包被接触之前,将预处理的珠子暴露于包含聚合抑制剂的溶液。

46. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中所述珠子表面上的所述官能团包括任选取代的苯基叠氮基。

47. 如权利要求46所述的方法,其中通过将所述珠子表面上的胺基与N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯反应来制备所述苯基叠氮化物。

48. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中所述聚合物包被经所述官能团的光活化与所述珠子表面上的官能团共价结合。

49. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中在升高的温度下将所述聚合物包被与所述珠子表面上的所述官能团共价结合。

50. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,其中所述珠子表面上的所述官能团包括炔基。

51. 如权利要求50所述的方法,其中在铜催化剂存在下将聚合物包被与所述官能团共价结合。

52. 如权利要求38-42中任一项所述的方法,还包括将所述聚合物包覆的珠子附着至基质表面。

聚合物包被

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2012年6月8日提交的美国申请第61/657,508号;于2013年1月17日提交的美国申请第61/753,833号;以及与2013年3月4日提交的美国申请第13/784,368号的优先权权益,所有这些文件都通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 总体而言,本发明涉及化学、生物学和材料科学领域。更具体地,本发明涉及共价连接至用于检测和/或分析诸如核酸和蛋白质的分子的基质表面的聚合物包被。

[0004] 发明背景

[0005] 聚合物包覆的基质被用于许多技术应用中。例如,可用生物学惰性的聚合物包覆可植入式医疗装置。在另一个实例中,聚合物包覆的基质被用于制备和/或分析生物分子。分子分析如某些核酸测序方法,依赖于核酸链与聚合物包覆的基质表面的结合。然后,可通过本领域公知的许多不同的方法来确定所结合的核酸链的序列。

[0006] 在某些合成测序方法中,用结合有核酸的聚合物包覆流动池(flow cell)的一个或多个表面。当前的用于包覆流动池的程序包括,将聚合性混合物转移至流动池上的通道中,并孵育固定的时间。该程序简单,并且产生始终能够支持包括桥式扩增和测序在内的所有下游化学处理步骤的可靠包被。

[0007] 然而,许多当前使用的表面聚合物包被存在着一些限制。例如,(i)当前的一些方法由于需要空气敏感的聚合物混合物而限制了可用于包覆表面的方法;(ii)一些形成的包被必须以“湿润”状态储存,例如,储存于水溶液中;以及(iii)常常需要优化接枝条件以避免强度梯度。

[0008] 此外,还需要制造具有周期性间隔的限定特征的模式化流动池。一种制造模式化流动池的方法是通过化学的方式改性珠子,然后将该珠子施用至预先排列好的表面,所述表面包含可容纳所述珠子的开放小井(well)。可在将珠子加载至小井前,用能够支持基于簇生长的测序的聚合物包覆所述珠子。由于包被引起的聚集以及在包覆后需要将珠子储存于水性缓冲剂中,可用于平面阵列表面上的聚合物包被可能不方便用于包覆珠子。这导致商业应用中的一些限制。因此,需要在用于包覆珠子时没有现有聚合物包被的一种或多种缺点的新聚合物包被。

[0009] 发明概述

[0010] 本文描述的组合物的一些实施方案涉及具有包含改进的聚合物包被的一个或多个表面的基质。在一些实施方案中,所述基质是流动池,并且将所述聚合物包被施用于所述流动池的一条或多条泳道的一个或多个表面。

[0011] 本文描述的组合物的一些实施方案涉及包含表面的基质,其中聚合物包被共价连接至所述表面。本文描述的组合物的另一些实施方案涉及包含功能化表面的基质,其中聚合物包被与所述表面上的一系列官能团共价连接,并且其中所述官能团选自烯烃、炔烃、氮烯、醛、肼、活化酯、缩水甘油醚、胺、马来酰亚胺,以及邻位上具有用于施陶丁格连接的磷取

代基的苯甲酰基酯。还有另一些实施方案提供了包含具有聚合物包被的表面的基质,所述聚合物包被包含式(I)和(II)所示的重复单元。在某些实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia)。在其他实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ib)。在一些实施方案中,所述聚合物包被包含式(III)或(III')所示的聚合物。在一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(IIIa)所示的聚合物。在一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(IIIb)所示的聚合物。在另一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(IV)所示的聚合物。

[0012] 本文描述的方法的一些实施方案涉及制备固定至基质表面的聚合物包被。在一些实施方案中,所述方法包括,将聚合物与基质表面接触,其中所述表面包含多个官能团,从而在所述表面上形成聚合物包被。在一些实施方案中,将所述聚合物包被共价结合至所述基质表面上的官能团。在一些实施方案中,通过在所述基质表面上聚合可聚物质,从而在所述基质表面上原位形成所述聚合物。在一些其他的实施方案中,在与所述基质表面接触之前预先形成所述聚合物。在某些实施方案中,所述官能团选自烯烃、炔烃、氮烯、醛、肼、活化酯、缩水甘油醚、胺、马来酰亚胺,以及邻位上具有用于施陶丁格连接的磷取代基的苯甲酰基酯。在某些实施方案中,所述基质表面上的官能团包含任选取代的苯基叠氮化物基团。在其他实施方案中,所述基质表面上的官能团包含炔基。在其他实施方案中,所述基质表面上的官能团包含烯基。在某些实施方案中,所述聚合物包被包含式(I)和(II)所示的重复单元。在某些实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia)。在某些实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ib)。在一些实施方案中,所述聚合物包被包含式(III)或(III')所示的聚合物。在一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(IIIa)所示的聚合物。在一个实施方案中,式(III')所示的聚合物也表示为式(IIIb)。在另一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(IV)所示的聚合物。在一些实施方案中,在与所述表面上的官能团共价结合之前,将所述聚合物包被溶解于水溶液中。

[0013] 本文描述的方法的其他实施方案涉及制备多核苷酸阵列。在这样的实施方案中,所述方法可包括以下步骤:使多个寡核苷酸与本文描述的任意组合物的聚合物包被或通过本文描述的任何方法制备的聚合物包被中存在的反应性位点反应;将结合至所述聚合物包被的所述多个寡核苷酸与待扩增模板接触,每个模板包含能够与所述寡核苷酸杂交的序列;以及使用所述寡核苷酸扩增所述模板从而产生成簇的多核苷酸阵列。在一些实施方案中,可使用两条引物,其中之一或二者可结合至所述聚合物包被。例如,所述方法可包括以下步骤:使多个第一寡核苷酸与本文描述的任意组合物的聚合物包被或通过本文描述的任何方法制备的聚合物包被中存在的反应性位点反应;将结合至所述聚合物包被的所述多个第一寡核苷酸与待扩增模板接触,每种模板在3'端包含能够与所述第一寡核苷酸杂交的序列,且在5'端包含能够与第二寡核苷酸杂交的互补序列;以及使用所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸扩增所述模板从而产生成簇的多核苷酸阵列,其中所述第二寡核苷酸任选结合至所述聚合物包被。在这样的方法的一些实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的叠氮基反应的炔基。在这样的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被中存在的氰尿酸基反应的胺基。在这样的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的诸如肼基或胍基的活化胺基反应的醛基。在这样的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的硫氰酸基或羧

酸基团反应的胺基。在这样的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的缩水甘油基反应的胺基。在这样的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将通过二醛连接子与所述聚合物包被的胺基反应的胺基。在这样的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被中存在的活化酯或环氧基反应的胺基。在这样的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被中存在的氧胺基反应的醛基。在这样的方法的一些实施方案中,在与多个所述第一股核苷酸以及多个所述第二寡核苷酸反应前,用水或水性缓冲剂洗涤所述聚合物包被。在一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(III)所示的聚合物。在另一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(III')所示的聚合物。

[0014] 本文描述的组合物的一些实施方案涉及包含任一种本文描述的所述基质组合物的流动池。一些这样的实施方案还包含通过所述聚合物结合至所述基质表面的多核苷酸。在一些实施方案中,所述多核苷酸存在为多核苷酸簇。在一些这样的实施方案中,单个多核苷酸簇内的多核苷酸具有相同的核苷酸序列。簇中的各多核苷酸可在一端或两端结合至所述聚合物。所述结合可为通过所述多核苷酸链的5'端和/或3'端。不同多核苷酸簇的多核苷酸通常具有不同的核苷酸序列,但这并非在所有实施方案中均为必需的。

[0015] 本文描述的方法的一些实施方案涉及测定多核苷酸的核苷酸序列。一些这样的实施方案包括以下步骤:(a) 将多核苷酸聚合酶与经所述聚合物结合至任一种本文描述的组合物表面的多核苷酸簇接触;(b) 向所述基质表面提供核苷酸从而在所述多核苷酸聚合酶利用一个或多个核苷酸时生成可检测信号;(c) 检测一个或多个多核苷酸簇处的信号;以及(d) 重复步骤(b)和(c),从而确定所述一个或多个多核苷酸簇处存在的多核苷酸的核苷酸序列。在一些这样的实施方案中,所述基质表面存在于流动池内。在一些这样的实施方案中,在单个流步骤期间,在所述流动池中仅存在单一类型的核苷酸。在这样的实施方案中,所述核苷酸可选自dATP、dCTP、dGTP、dTTP及其类似物。在确定多核苷酸的核苷酸序列的方法的其他实施方案中,在单个流步骤期间,在所述流动池中存在多种不同类型的核苷酸。在这样的实施方案中,所述核苷酸可选自dATP、dCTP、dGTP、dTTP及其类似物。在确定多核苷酸的核苷酸序列的方法的其他实施方案中,所述可检测信号包括光学信号。在其他实施方案中,所述可检测信号包括非光学信号。在这样的实施方案中,所述非光学信号可为pH变化或焦磷酸盐浓度变化。

[0016] 本文描述的一些实施方案涉及制备珠阵列的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:在一个或多个珠子的表面上形成多个官能团;将本发明描述的聚合物包被与所述珠子接触,以在所述珠子的表面上形成聚合物包被,其中所述聚合物包被共价结合至所述珠子表面上的官能团。可在包覆之前或之后将所述聚合物包覆的珠子加载至基质表面上。在一些实施方案中,所述表面可包含开放的小井,并且每个小井可具有容纳一个或多个珠子的尺寸(即,在一些实施方案中,所述小井仅能容纳不多于单个的珠子)。在一些实施方案中,所述珠子表面上的所述官能团包含丙烯酰胺基。在一些实施方案中,所述珠子表面上的官能团包含任选取代的苯基叠氮化物基团。在一些实施方案中,所述珠子表面上的官能团包含炔基。在某些实施方案中,所述聚合物包被包含式(I)和(II)所示的重复单元。在某些实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia)。在某些实施方案中,式(I)所示的重复

单元也表示为式 (Ib)。在一些实施方案中,所述聚合物包被包含式 (III) 或 (III') 所示的聚合物。在一个实施方案中,式 (III) 所示的聚合物也表示为式 (IIIa)。在一个实施方案中,式 (III') 所示的聚合物也表示为式 (IIIb)。在另一个实施方案中,所述聚合物包被包含式 (IV) 所示的聚合物。在某些实施方案中,用本文描述的聚合物包被完全包覆所述珠子。在其他实施方案中,用本文描述的聚合物包被部分地包覆所述珠子。在一些实施方案中,在升高的温度下将所述聚合物包被共价结合至所述珠子表面。在一些其他的实施方案中,可经光活化来将所述聚合物包被共价结合至所述珠子表面。在一些其他的实施方案,将珠子预先排列于小井中,然后将聚合物包被共价结合至所排列的珠子。

[0017] 可通过化学力、物理吸附力或这两种力将所述珠子附着至基质的表面(例如,流动池或小井)。在一些实施方案中,通过将所述聚合物包覆的珠子加载至所述基质表面上的开放小井中,将所述聚合物包覆的珠子附着至所述基质的表面。可选地或此外,通过共价结合至所述基质表面上的官能团,将所述聚合物包覆的珠子附着至所述基质的表面。在某些实施方案中,本文描述的方法还包括在将所述珠子加载至所述基质表面之前洗涤所述聚合物包覆的珠子以去除过量的未结合聚合物包被。在某些实施方案中,在与所述预处理的珠子接触之前,将所述聚合物包被溶解于溶液中。在一些实施方案中,将所述聚合物包被溶解于水溶液中。在某些实施方案中,本文描述的方法还包括使用与本文所描述的方法相似的方法来形成排列的多核苷酸的额外步骤。在一些实施方案中,所述基质表面排布有小井、垫或其他特征。

[0018] 本文描述的一些优选实施方案涉及具有表面的基质,所述表面包含与之共价连接的聚合物包被,其中所述聚合物包被包含式 (III) 或 (III') 所示的聚合物。在一个实施方案中,式 (III) 所示的聚合物也表示为式 (IIIa)。在一个实施方案中,式 (III') 所示的聚合物也表示为式 (IIIb)。在一个实施方案中,所述基质是珠子。

[0019] 本文描述的一些优选实施方案涉及制备基质表面的方法,包括:在所述基质表面上形成多个官能团,将式 (III) 或 (III') 所示的聚合物与所述基质表面接触以在所述基质表面上形成聚合物包被,其中所述聚合物包被共价结合至所述基质表面上的官能团。在一个实施方案中,式 (III) 所示的聚合物也表示为式 (IIIa)。在一个实施方案中,式 (III') 所示的聚合物也表示为式 (IIIb)。在一些实施方案中,所述基质表面上的官能团选自烯烃、炔烃或任选取代的苯基叠氮化物。在一些实施方案中,在升高的温度下将所述聚合物包被共价结合至所述烯基。在一个实施方案中,所述烯基是丙烯酰胺基。在一个实施方案中,所述基质是珠子。

附图说明

[0020] 图1A示出了(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-丙烯酰胺)共聚物(PAZAM)的¹H NMR谱。

[0021] 图1B示出了计算的PAZAM的分子量分布。

[0022] 图1C示出了轻度交联的PAZAM的¹H NMR谱。

[0023] 图2A和2B示出了使用PAZAM包覆的典型玻璃流动池的Typhoon扫描(图2B)以及沿着流动池的8条泳道的中值Typhoon强度(图2A)。

[0024] 图3A和3B示出了使用PAZAM包覆的HiSeq玻璃流动池的Typhoon扫描。图3A示出了

与互补的包含染料的寡核苷酸序列杂交的接枝表面的Typhoon荧光图像。示出了原位PAZAM的中值Typhoon强度的图表。

[0025] 图4A和4B示出了使用PAZAM旋涂的玻璃基质的Typhoon扫描。图4A示出了与互补的包含染料的寡核苷酸序列杂交的接枝表面的Typhoon荧光图像。图4B示出了旋涂的PAZAM的中值Typhoon强度的图表。

[0026] 图5A至5C示出了流涂的PAZAM表面上的簇。图5A是通道的UV照射区的放大版。图5B和图5C示出了通道的簇数目和簇过滤强度。

[0027] 图6A至6C示出了旋涂的PAZAM表面上的簇。图6A示出了HiSeq流动池上的旋涂的PAZAM的中值Typhoon强度的图表。图6B示出了与互补的包含染料的寡核苷酸序列杂交的接枝表面的Typhoon荧光图像。图6C示出第3泳道和第5泳道上的簇的放大图像。

[0028] 图7A和7B示出了典型的流动池图像(图7B)和沿着流动池的8条泳道的中值强度(图7A)。

[0029] 图8A-I示出了流涂的PAZAM混合物上的多核苷酸的簇和测序,以及所得到的数据。

[0030] 图9示出了用与互补的荧光寡核苷酸杂交的炔烃寡核苷酸(oligo)官能化的旋涂基质。

[0031] 图10A和10B示出了可选的光活性交联剂的筛选结果。图10A示出了中值Typhoon强度相对于Photo XL的图表。图10B示出了不同交联剂的UV时间相对于Photo XL的图表。

[0032] 图11A-11B示出了光活性的模式化表面和聚合物锁定。

[0033] 图12示出了在室温下于低于10%的湿度储存六天后仍然存留于热交联的PAZAM层上的表面的百分比。

[0034] 图13A示出了在热交联的PAZAM表面上的使用5PhiX模板生长的簇。

[0035] 图13B示出了在热交联的流动池上运行2×26个循环后的测序度量。

[0036] 图14示出了通过使PAZAM热交联至模式化的硅烷贴片(patch)而制成的模式化阵列上生长的簇。

[0037] 图15示出了由PAZAM包覆的珠子制备的模式化的PAZAM阵列。

[0038] 图16示出了使用光活性聚合物的分离和组合方法。

[0039] 发明详述

[0040] 本公开内容涉及包含这样的表面的基质,所述表面包覆有与之共价结合的聚合物。这样的基质的优选实施方案包含(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-丙烯酰胺)共聚物(又称PAZAM或DASFA)包被。这些聚合物包被共价地连接至基质的官能化表面,例如流动池表面或分子阵列表面。本公开内容还涉及制备这样的聚合物包覆的表面的方法,以及使用包含这样的聚合物包覆的表面的基质的方法。在优选的实施方案中,使用具有PAZAM包覆的表面的基质来确定多核苷酸的核苷酸序列。

[0041] 该新聚合物包被和方法产生了空气稳定的材料,其克服了当前已知的聚合物包被的许多限制。

[0042] 定义

[0043] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术术语和科学术语都具有与本领域技术人员所通常理解的相同的含义。术语“包括(including,以及其他形式如include、includes和included)”的使用是非限制性的。术语“具有(having,以及其他形式如have、has和had)”的

使用是非限制性的。如在本说明书中所用的,无论是在权利要求的过渡阶段还是在权利要求的主体中,术语“包含(comprise(s)和comprising)”应被理解为具有开放含义。即,上述术语应被理解为与短语“至少具有”或“至少包括”同义。例如,当用于方法的上下文中时,术语“包括”意为所述方法至少包括所记载的步骤,但是可包括另外的步骤。当用于化合物、组合物或装置的上下文中时,术语“包含”意为所述化合物、组合物或装置至少包含所记载的特征或组分,但是还可包含另外的特征或组分。

[0044] 本文所用的常见有机缩写词定义如下:

[0045]	Ac	乙酰基
[0046]	Ac ₂ O	乙酸酐
[0047]	APTS	氨基丙基硅烷
[0048]	APTES	(3-氨基丙基) 三乙氧基硅烷
[0049]	APTMS	(3-氨基丙基) 三甲氧基硅烷
[0050]	aq.	水性的
[0051]	Azapa	N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基) 丙烯酰胺
[0052]	APTMS	3-氨基丙基三甲氧基硅烷
[0053]	BHT	丁基化羟基甲苯
[0054]	Bn	苄基
[0055]	Brapa或BRAPA	N-(5-溴乙酰胺基戊基) 丙烯酰胺
[0056]	Bz	苯甲酰基
[0057]	BOC或Boc	叔丁氧羰基
[0058]	Bu	正丁基
[0059]	cat.	催化的
[0060]	Cbz	羰基苄氧基
[0061]	CyCl	氰尿酸氯
[0062]	°C	摄氏度温度
[0063]	dATP	脱氧腺苷三磷酸
[0064]	dCTP	脱氧胞苷三磷酸
[0065]	dGTP	脱氧鸟苷三磷酸
[0066]	dTTP	脱氧胸苷三磷酸
[0067]	DBU	1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一-7-烯
[0068]	DCA	二氯乙酸
[0069]	DCE	1,2-二氯乙烷
[0070]	DCM	二氯甲烷
[0071]	DIEA	二异丙基乙胺
[0072]	DMA	二甲基乙酰胺
[0073]	DME	二甲氧基乙烷
[0074]	DMF	N,N'-二甲基甲酰胺
[0075]	DMSO	二甲基亚砷
[0076]	DPPA	二苯基磷酰基叠氮化物

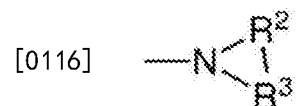
[0077]	Et	乙基
[0078]	EtOAc	乙酸乙酯
[0079]	g	克
[0080]	GPC	凝胶渗透色谱
[0081]	h或hr	小时
[0082]	iPr	异丙基
[0083]	KPi	pH7.0的10mM磷酸钾缓冲液
[0084]	KPS	过硫酸钾
[0085]	IPA	异丙醇
[0086]	IPHA.HCl	盐酸N-异丙基羟基胺
[0087]	LCMS	液相色谱-质谱
[0088]	LDA	二异丙基酰胺锂
[0089]	m或min	分钟
[0090]	mCPBA	间氯过氧苯甲酸
[0091]	MeOH	甲醇
[0092]	MeCN	乙腈
[0093]	mL	毫升
[0094]	MTBE	甲基叔丁基醚
[0095]	NaN ₃	叠氮化钠
[0096]	NHS	N-羟基琥珀酰亚胺
[0097]	PAZAM	任意丙烯酰胺与Azapa比率的 (N-(5-叠氨基乙酰胺基戊基) 丙烯酰胺-丙烯酰胺) 共聚物
[0098]	PG	保护基团
[0099]	Ph	苯基
[0100]	ppt	沉淀
[0101]	rt	室温
[0102]	SFA	美国专利公开第2011/0059865号中定义的不含硅烷的丙烯酰胺
[0103]	磺基-HSAB或SHSAB	N-羟基硫代琥珀酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯
[0104]	TEA	三乙胺
[0105]	TEMPO	(2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基) 氧基
[0106]	TCDI	1,1'-硫代羰基二咪唑
[0107]	Tert, t	叔
[0108]	TFA	三氟乙酸
[0109]	THF	四氢呋喃
[0110]	TEMED	四甲基亚乙二胺
[0111]	μL	微升
[0112]	本文所用术语“阵列”是指这样的不同的探针分子群,其与一种或多种底物结合,使得所述不同的探针分子可根据相对位置而彼此区分开来。阵列可包含不同的探针分子,每一个探针分子位于基质上的不同的可寻址位置。可选地或此外,阵列可包含分开的基质,	

每个基质携带着不同的探针分子,其中可根据所述基质在所述基质所结合的表面上的位置或可根据所述基质在液体中的位置来鉴定所述不同的探针分子。其中分开的基质位于表面上的示例性阵列包括但不限于,包含例如在美国专利第6,355,431B1号、US 2002/0102578和PCT公开第W0 00/63437号中描述的小井中的珠子的阵列。可用于本发明以区分液体阵列中的珠子的示例性格式,例如,使用微流体装置,如荧光活化的细胞分选器(FACS),描述于录入美国专利第6,524,793号中。可用于本发明的阵列的其他实例包括但不限于在以下文献中描述的阵列:美国专利第5,429,807;5,436,327;5,561,071;5,583,211;5,658,734;5,837,858;5,874,219;5,919,523;6,136,269;6,287,768;6,287,776;6,288,220;6,297,006;6,291,193;6,346,413;6,416,949;6,482,591;6,514,751和6,610,482号;以及W0 93/17126;W0 95/11995;W0 95/35505;EP 742287;以及EP 799897。

[0113] 本文所用术语“共价连接”或“共价结合”是指形成这样的化学键,其特征在于原子间共用成对的电子。例如,共价连接的聚合物包被是指相比通过其他方式如粘附或静电相互作用与表面的结合,与基质的官能化表面形成化学键的聚合物包被。应理解,共价结合至表面的聚合物还可经除共价连接以外的方式来连接。

[0114] 本文所用术语“聚合物锁定”是指这样的过程,其中基质表面上的官能团与聚合物包被反应以使得所述聚合物包被共价结合至所述表面。

[0115] 本文所用的任意“R”基团,诸如但不限于, R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 和 R^8 表示可与所示原子结合的取代基。R基团可为取代的或未取代的。如果两个“R”基团被描述为“一起考虑”,则所述R基团以及它们所结合的原子可形成环烷基、芳基、杂芳基或杂环。例如但非限制性地,如果 R^2 和 R^3 ,或者 R^2 、 R^3 或 R^4 ,以及其所结合的原子被指示为“一起考虑”或“接合到一起”,则其表示它们彼此共价结合形成环,其实例记载如下:



[0117] 当基团被描述为被“任选取代”时,该基团可为未取代的或被一个或多个所示的取代基取代。同样地,当基团被描述为“未取代的或取代的”时,如果为取代的,则取代基可选自一个或多个所示的取代基。如果没有指出取代基,则其意为所示的“任选取代的”或“取代的”基团可被一个或多个基团个别地和独立地取代,所述一个或多个基团独立地选自包括但不限于以下的官能团组:烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基)烷基、羟基、保护的羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、巯基、烷基硫代、芳基硫代、氰基、卤素、硫代羰基、O-氨甲酰基、N-氨甲酰基、O-硫代氨甲酰基、N-硫代氨甲酰基、C-酰胺基、N-酰胺基、S-磺酰胺基、N-磺酰胺基、C-羧基、保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸基、硫代氰酸基、异硫代氰酸基、硝基、甲硅烷基、次磺酰基、亚磺酰基、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤代甲烷磺酰基、三卤代甲烷磺酰胺基、氨基、单取代的氨基、双取代的氨基及其被保护的衍生物。

[0118] 本文所用“烷基”是指包含完全饱和(没有双键或三键)的烃基的直链或支链烃链。在一些实施方案中,所述烷基可具有1至20个碳原子(当其在本文中出现时,数字范围如“1至20”指包括端点在内的给定范围内的每个整数;例如,“1至20个碳原子”意指所述烷基可由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等,多达并且包括20个碳原子组成,尽管该定义还涵盖

术语“烷基”的出现,其中未指明其数字范围。所述烷基还可为具有约7至约10个碳原子的中等大小的烷基。所述烷基还可为具有1至6个碳原子的低级烷基。化合物的烷基可称为“C₁-C₄烷基”或类似的命名。仅作为例子,“C₁-C₄烷基”是指在烷基链中存在一个至四个碳原子,即,所述烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。典型的烷基包括但绝不限于:甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。所述烷基可为取代的或未取代的。

[0119] 本文所用“烯基”是指在直链或支链烃链中包含一个或多个双键的烷基。烯基可为未取代的或取代的。

[0120] 本文所用“炔基”是指在直链或支链烃链中包含一个或多个三键的烷基。炔基可为未取代的或取代的。

[0121] 本文所用“环烷基”是指完全饱和(无双键或三键)的单环或多环烃环系。当由两个或更多个环组成时,这些环可以稠环形式连接到一起。环烷基的环中可包含3至10个原子。在一些实施方案中,环烷基的环中可包含3至8个原子。环烷基可为未取代的或取代的。典型的环烷基包括但绝不限于:环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0122] 本文所用术语“环烯基”是指在至少一个环中包含一个或多个双键的单环或多环烃环系;尽管如果存在多于一个双键,则这些双键不能形成遍布于所有环中的完全离域的 π 电子系(否则如在本文中定义的,该基团被称为“芳基”)。当由两个或更多个环组成时,这些环可以稠环形式连接到一起。环烯基可为未取代的或取代的。

[0123] 本文所用“环炔基”是指在至少一个环中包含一个或多个三键的单环或多环烃环系。如果存在多于一个三键,则这些三键不能形成遍布于所有环的完全离域的 π 电子系。当由两个或更多个环组成时,这些环可以稠环形式连接到一起。环炔基可为未取代的或取代的。

[0124] 本文所用“芳基”是指碳环型(所有碳)的单环或多环芳环系(包括例如,稠环、桥环或螺环环系,其中两个碳环共用一个化学键,例如,具有一个或多个芳基的一个或多个芳环,或非芳环),其具有遍布于至少一个环中的完全离域的 π 电子系。芳基中的碳原子数可不等。例如,在一些实施方案中,所述芳基可为 C_6 - C_{14} 芳基、 C_6 - C_{10} 芳基或 C_6 芳基。芳基的实例包括但不限于苯、萘和甘菊环。芳基可为取代的或未取代的。

[0125] 本文所用“杂环基”是指包含至少一个杂原子(例如O、N、S)的环系。这样的环系可为不饱和的,或可包含一些不饱和,或者可包含一些芳族部分,或可全为芳族的。杂环基可为未取代的或取代的。

[0126] 本文所用“杂芳基”是指单环的或多环的芳环系(包含至少一个具有完全离域的 π 电子系的环的环系),其包含一个或多个杂原子,即,除了碳以外的元素,包括但不限于氮、氧和硫,并且包含至少一个芳环。杂芳基的环中的原子数可不等。例如,在一些实施方案中,杂芳基的环中可包含4至14个原子、环中可包含5至10个原子或环中可包含5至6个原子。此外,术语“杂芳基”还包括其中两个环(例如至少一个芳基环和至少一个杂芳基环,或至少两个杂芳基环)共用至少一个化学键的稠环环系。杂芳基环的实例包括但不限于:呋喃、咪唑、噻吩、苯并噻吩、酞嗪、吡咯、恶唑、苯并恶唑、1,2,3-恶二唑、1,2,4-恶二唑、噻唑、1,2,3-噻二唑、1,2,4-噻二唑、苯并噻唑、咪唑、苯并咪唑、吡啶、吡啶、吡啶、苯并吡啶、异恶唑、苯并异恶唑、异噻唑、三唑、苯并三唑、噻二唑、四唑、吡啶、哒嗪、嘧啶、吡嗪、嘌呤、蝶啶、喹啉、异

喹啉、喹唑啉、喹恶啉、噌啉和三嗪。杂芳基可为取代的或未取代的。

[0127] 本文所用“杂脂环”或“杂脂环基”是指三元、四元、五元、六元、七元、八元、九元、十元,最多至18元的单环、二环和三环环系,其中碳原子与1至5个杂原子一起构成所述环系。但是,杂环可任选包含以这样的方式设置的一个或多个不饱和键,其使得在遍布所有环中不存在完全离域的 π 电子系。所述杂原子独立地选自氧、硫和氮。杂环还可包含一个或多个羰基或硫代羰基官能团,从而使得该定义包括氧代环系和硫代环系,例如内酰胺、内酯、环状亚胺、环状硫代亚胺和环状氨基甲酸酯。当由两个或更多个环组成时,这些环可以稠环形式连接到一起。此外,杂脂环中的任何氮可为季碱化的(quaternized)。杂脂环基或杂脂环基团可为未取代的或取代的。这样的“杂脂环”或“杂脂环基”基团的实例包括但不限于1,3-二恶英、1,3-二恶烷、1,4-二恶烷、1,2-二氧戊环、1,3-二氧戊环、1,4-二氧戊环、1,3-氧硫杂环己烷(oxathiane)、1,4-氧硫杂环己二烯(oxathiin)、1,3-氧硫杂环戊烷(oxathiolane)、1,3-二硫杂环戊二烯(dithiole)、1,3-二硫戊环、1,4-氧硫杂环己烷、四氢-1,4-噻嗪、2H-1,2-恶嗪、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、巴比土酸、硫代巴比土酸、二氧嘧啶、海因、二氢尿嘧啶、三氧杂环己烷、六氢-1,3,5-三嗪、咪唑啉、咪唑啉啟、异恶唑啉、异恶唑啉啟、恶唑啉、恶唑啉啟、恶唑烷酮、噻唑啉、噻唑烷、吗啉、环氧乙烷、哌啶N-氧化物、哌啶、哌嗪、吡咯烷、吡咯烷酮、吡咯烷酮(pyrrolidione)、4-哌啶酮、吡唑啉、吡唑烷、2-氧代吡唑烷、四氢吡喃、4H-吡喃、四氢噻喃、硫吗啉、硫吗啉亚砷、硫吗啉砷及其苯并稠环类似物(例如苯并咪唑烷酮、四氢喹啉、3,4-亚甲基二氧苯基)。

[0128] 本文所用“芳烷基”和“芳基(烷基)”是指经低级亚烷基连接的作为取代基的芳基。芳烷基的低级亚烷基和芳基可为取代的或未取代的。实例包括但不限于苄基、2-苯基烷基、3-苯基烷基和萘基烷基。

[0129] 本文所用“杂芳烷基”和“杂芳基(烷基)”是指经低级亚烷基连接的作为取代基的杂芳基。杂芳烷基的低级亚烷基和杂芳基可为取代的或未取代的。实例包括但不限于2-噻吩基烷基、3-噻吩基烷基、呋喃基烷基、噻吩基烷基、吡咯基烷基、吡啶基烷基、异恶唑基烷基和咪唑基烷基,以及其苯并稠环类似物。

[0130] “(杂脂环基)烷基”是作为取代基经低级亚烷基连接的杂脂环基。(杂脂环基)烷基的低级亚烷基和杂环或杂环基可为取代的或未取代的。实例包括但不限于四氢-2H-吡喃-4-基)甲基、(哌啶-4-基)乙基、(哌啶-4-基)丙基、(四氢-2H-噻喃-4-基)甲基和(1,3-噻嗪烷(thiazinan)-4-基)甲基。

[0131] 本文所用“烷氧基”是指式-OR,其中R是如上文定义的烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基或环炔基。烷氧基的非限制列表是:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基(异丙氧基)、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基和叔丁氧基。烷氧基可为取代的或未取代的。

[0132] 本文所用“羟基烷基”是指其中一个或多个氢原子被羟基取代的烷基。示例性的羟基烷基包括但不限于2-羟乙基、3-羟丙基、2-羟丙基和2,2-二羟乙基。羟基烷基可为取代的或未取代的。

[0133] 本文所用“烷基氨基”是指其中一个或多个氢原子被氨基取代的烷基。示例性的烷基氨基包括但不限于氨基甲基、2-氨基乙基、3-氨基乙基。烷基氨基可为取代的或未取代的。

[0134] 本文所用“烷基酰胺基”是指其中一个或多个氢原子被C-酰胺基或N-酰胺基取代

的烷基。烷基酰胺基可为取代的或未取代的。

[0135] 本文所用“烷基硫代”是指 $RS-$ ，其中R是烷基。烷基硫代可为取代的或未取代的。

[0136] 本文所用“C-酰胺基”是指“ $-C(=O)N(R_aR_b)$ ”基团，其中 R_a 和 R_b 可独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基或(杂脂环基)烷基。C-酰胺基可为取代的或未取代的。

[0137] 本文所用“N-酰胺基”是指“ $RC(=O)N(R_a)-$ ”基团，其中R和 R_a 可独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基或(杂脂环基)烷基。N-酰胺基可为取代的或未取代的。

[0138] 本文所用术语“卤素原子”、“卤素”或“卤代”意为元素周期表第7族的放射性稳定的原子中的任一种，例如氟、氯、溴和碘。

[0139] 本文所用术语“胺”是指 $-NH_2$ 基，其中一个或多个氢可被R基团任选取代。R可独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基或(杂脂环基)烷基。

[0140] 本文所用术语“醛”是指 $-R_c-C(=O)H$ 基团，其中 R_c 可不存在，或者独立地选自亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚环烯基、亚环炔基、亚芳基、亚杂芳基、亚杂脂环基、亚芳烷基或(杂脂环基)亚烷基。

[0141] 本文所用术语“活化酯”是指自发与亲核试剂反应的酯，例如NHS酯、五氟苯基酯或硝基苯基酯。

[0142] 本文所用“氮烯”是指碳烯的氮类似物，其中氮原子被夺去六个价电子。

[0143] 本文所用术语“氨基”是指 $-NH_2$ 基团。

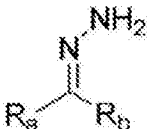
[0144] 本文所用术语“羟基”是指 $-OH$ 基团。

[0145] 本文所用术语“氰基”是指“ $-CN$ ”基团。

[0146] 本文所用术语“叠氮基”是指 $-N_3$ 基团。

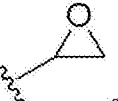
[0147] 本文所用术语“巯基”是指 $-SH$ 基团。

[0148] 本文所用术语“胼基”是指 $-NHNH_2$ 基团。

[0149] 本文所用术语“胍基”是指  基团。

[0150] 本文所用术语“甲酰基”是指 $-C(=O)H$ 基团。

[0151] 本文所用术语“缩水甘油基”或“缩水甘油醚”是指 。

[0152] 本文所用术语“环氧基”是指 。

[0153] 本文所用术语“羧酸”是指 $-C(=O)OH$ 。

[0154] 本文所用术语“硫氰酸基”是指 $-S-C\equiv N$ 基团。

[0155] 本文所用术语“氧代胺”是指 $-O-NH_2$ 基团，其中 $-NH_2$ 的一个或多个氢可任选被R基团取代。R可独立地为氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、

芳烷基或(杂脂环基)烷基。

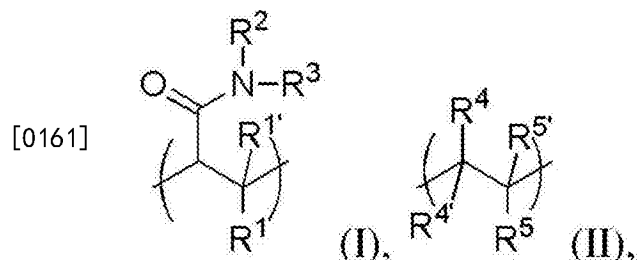
[0156] 本文所用前缀“光”或“光-”意为与光辐射或电磁辐射有关。该术语可涵盖全部或部分的电磁谱,包括但不限于通常称为光谱的无线电、微波、红外光、可见光、紫外光、X射线或伽马射线部分的一个或多个范围。该光谱部分可为被表面的金属区如本文所记载的那些金属阻挡的部分。可选地或此外,该光谱部分可为穿过表面的间隙区如由玻璃、塑料、二氧化硅或本文所记载的其他材料制成的区域的部分。在具体的实施方案中,可使用能够穿过金属的辐射。可选地或此外,可使用被玻璃、塑料、二氧化硅或本文所记载的其他材料遮蔽的辐射。

[0157] 本文所用术语“反应位点”是指本文描述的聚合物包被上可用于通过化学反应或分子相互作用的方式结合一个或多个分子的位点。可经共价键或通过其他结合或相互作用力来进行这样的结合。

[0158] 本文所用术语“%剩余表面”可指使用TET qc对P5/P7表面引物进行染色所测得的强度。所述P5和P7引物用于由Illumina Inc.销售的市售流动池的表面上,用于基于HiSeq、MiSeq和Genome Analyzer平台的测序。所述引物序列在美国专利公开第2011/0059865 A1号中有描述,通过引用将其引入本文。TET是染料标记的、具有与P5/P7引物互补的序列的寡核苷酸。TET可杂交至表面上的P5/P7引物;可将过量的TET洗掉,并可通过荧光检测使用诸如Typhoon扫描仪(General Electric)的扫描工具测量所结合的染料的浓度。

[0159] 具有被聚合物包覆的表面的基质组合物

[0160] 本文描述的组合物的第一个方面涉及包含具有与之共价连接的聚合物包被的表面的基质。在优选的实施方案中,所述聚合物包括PAZAM。在一些实施方案中,所述聚合物包被包含式(I)所示的重复单元和式(II)所示的重复单元:



[0162] 其中:每个 R^1 和 $R^{1'}$ 独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基或以上基团的任选取代的变体;

[0163] 每个 R^2 和 R^3 都独立地选自氢、烷基、烷基氨基、烷基酰胺基、烷基巯基、芳基或以上基团的任选取代的变体;每个 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 和 $R^{5'}$ 独立地选自H、 R^6 、 OR^6 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 或 $-NR^7R^8$;

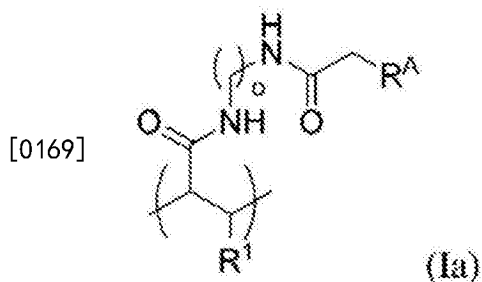
[0164] R^6 独立地选自H、OH、烷基、环烷基、羟基烷基、芳基、杂芳基、杂环基或以上基团的任选取代的变体;

[0165] 每个 R^7 和 R^8 独立地选自H或烷基,或者 R^7 和 R^8 以与它们连接的一个或多个原子结合在一起形成杂环。

[0166] 在这样的组合物的一些实施方案中, R^2 是H,并且 R^3 是任选取代的烷基。

[0167] 在这样的组合物的一些实施方案中, R^3 是被N-酰胺基取代的烷基。

[0168] 在本文描述的组合物的一些实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia):



[0170] 其中 R^1 是H或烷基； R^A 选自氢、胺、任选取代的烯烃、任选取代的炔烃、氧代胺、叠氮基、甲酰基、卤素、羟基、胍基、脲基、氰尿酸酯、硫氰酸酯、羧酸、缩水甘油基、活化酯、环氧基、氮杂环丙烷、三唑啉和巯基；每个 $-(CH_2)_o-$ 可为任选取代的； o 为1-50的整数；并且前提是当 R^1 是H并且 R^A 是卤素时， R^A 不可以是溴基。

[0171] 在一些这样的实施方案中， o 是5并且 R^A 是叠氮基。

[0172] 在其他实施方案中， R^1 是氢。

[0173] 在其他实施方案中， R^4 是 $-C(O)NR^7R^8$ ，其中每个 R^7 和 R^8 独立地选自氢、烷基或羟基烷基。

[0174] 在这样的聚合物组合物的一些实施方案中， R^4 是 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHCH_3$ 或 $-C(O)N(CH_3)_2$ 。

[0175] 在其他实施方案中， R^4 是 $-C(O)NH(CH_2)_2OH$ 或 $-C(O)N(CH_3)(CH_2)_2OH$ 。

[0176] 在其他实施方案中， R^4 是 NR^7R^8 ，其中 R^7 和 R^8 以与它们连接的原子结合在一起形成五元杂环。

[0177] 在包含五元杂环的优选实施方案中，所述五元杂环是任选取代的吡咯烷。

[0178] 在其他实施方案中， R^4 是 $-C(O)OR^6$ ，其中 R^6 选自氢、烷基和羟基烷基。

[0179] 在一个优选的实施方案中， R^6 是氢。

[0180] 在另一个优选的实施方案中， R^6 是甲基。

[0181] 在又一个优选的实施方案中， R^6 是羟乙基。

[0182] 在其他优选的实施方案中， $R^{4'}$ 是氢。

[0183] 在其他优选的实施方案中， $R^{4'}$ 是烷基。

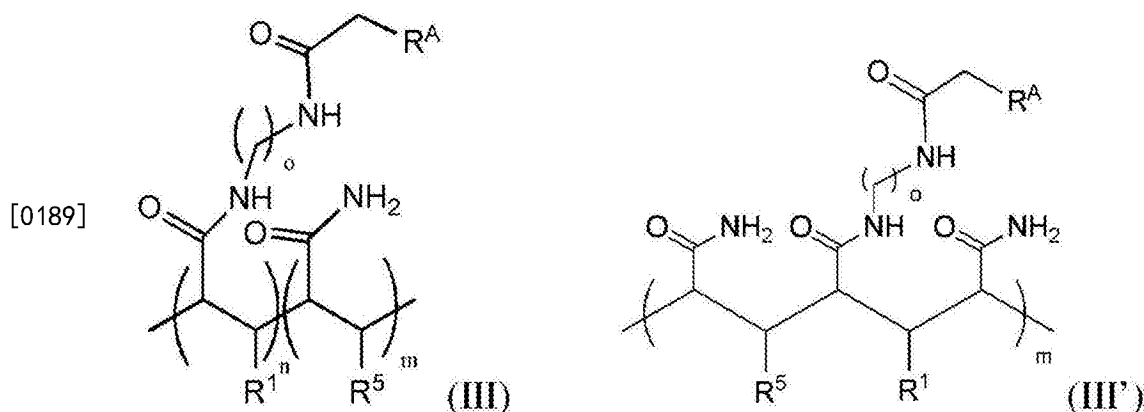
[0184] 在其他优选的实施方案中， $R^{4'}$ 是甲基。

[0185] 在一些优选的实施方案中， $R^{5'}$ 是氢。

[0186] 在另外的优选的实施方案中， $R^{5'}$ 是烷基。

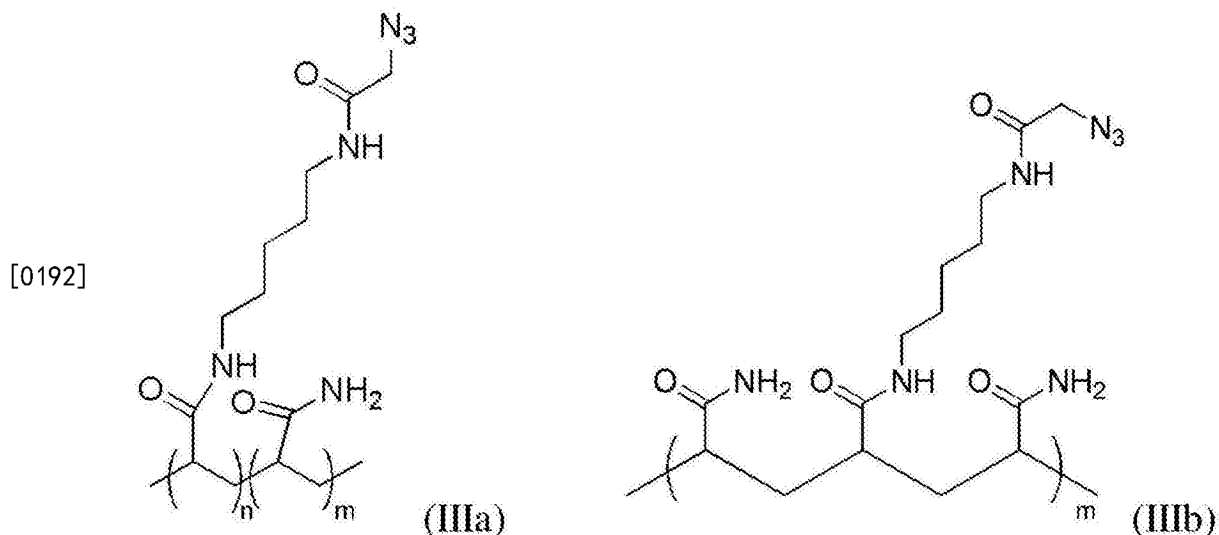
[0187] 在其他优选的实施方案中， $R^{5'}$ 是甲基。

[0188] 在本文描述的包含聚合物包覆表面的基质的又一个实施方案中，所述聚合物包被包含式(III)或(III')所示的聚合物。



[0190] 其中 R^1 选自H或烷基； R^A 选自氢、胺、任选取代的烯烃、任选取代的炔烃、氧代胺、叠氮基、甲酰基、卤素、羟基、肼基、腈基、氰尿酰氯、硫氰酸酯、羧酸、缩水甘油基、活化酯、环氧基、氮杂环丙烷、三唑啉和巯基；每个 $-(CH_2)_o-$ 可为任选取代的； o 为1-50范围内的整数； R^5 选自H或烷基； n 是1-50,000范围内的整数；并且 n 是1-50,000范围内的整数；前提是当 R^1 和 R^5 是H， o 是5时，则 R^A 不可以是溴基。在一些实施方案中， o 是5。

[0191] 在一个实施方案中，式(III)或(III')所示的聚合物也表示为(IIIa)或(IIIb)：



[0193] 其中 n 是1-20,000范围内的整数，并且 m 为1-100,000范围内的整数。

[0194] 在一些这样的实施方案中，所述聚合物包被与结合至所述表面的一系列官能团共价结合，其中所述官能团选自烯烃、炔烃、氮烯、醛、肼、活化酯、缩水甘油醚、胺、马来酰亚胺或在邻位具有膦取代基的苯甲酰基酯。

[0195] 在这样的组合物的一个优选的实施方案中，所述官能团包括炔烃，并且式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia)，其中 R^A 是叠氮基。

[0196] 在这样的组合物的另一个优选的实施方案中，所述官能团包括氮烯，并且式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia)，其中 R^A 是叠氮基。

[0197] 在这样的组合物的又一个优选的实施方案中，所述官能团包括活化酯，并且式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia)，其中 R^A 是胺。

[0198] 在这样的组合物的再一个优选的实施方案中，所述官能团包括肼，并且式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia)，其中 R^A 是甲酰基。

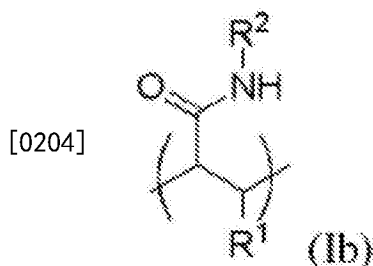
[0199] 在这样的组合物的又一个优选的实施方案中,所述官能团包括醛基,并且式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia),其中 R^A 是胺、氧代胺或肼基。

[0200] 在这样的组合物的再一个优选的实施方案中,所述官能团包括缩水甘油醚,并且式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia),其中 R^A 是胺。

[0201] 在这样的组合物的又一个优选的实施方案中,所述官能团包括胺,并且式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia),其中 R^A 是叠氮基。

[0202] 在这样的组合物的又一个优选的实施方案中,所述官能团包括马来酰亚胺,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia),并且其中 R^A 是巯基。

[0203] 在本文描述的包含聚合物包覆的表面的基质的又一个实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ib):



[0205] 其中 R^2 是任选取代的芳基。

[0206] 在一些这样的实施方案中,式(Ib)中的 R^2 是被一个或多个卤原子任选取代的苯基叠氮化物。在一个具体的实施方案中, R^2 是全氟苯基叠氮化物。

[0207] 在一些实施方案中,式(Ib)中的 R^1 是氢。

[0208] 在其他实施方案中,式(Ib)中的 R^4 是 $-C(O)NR^7R^8$ 。在一个具体的实施方案中, R^4 是 $-C(O)NH_2$ 。

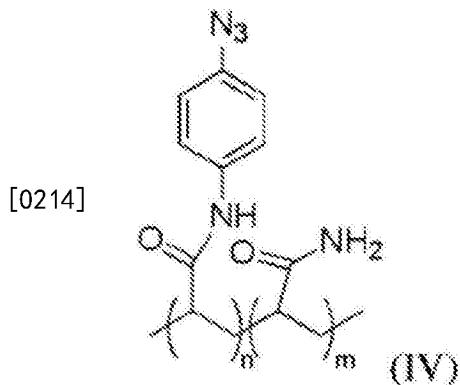
[0209] 在一些实施方案中,式(Ib)中的 $R^{4'}$ 是氢。

[0210] 在一些实施方案中,式(Ib)中的 R^5 是烷基。

[0211] 在其他实施方案中,式(Ib)中的 R^5 是氢。

[0212] 在一些实施方案中,式(Ib)中的 $R^{5'}$ 是氢。

[0213] 在本文描述的包含聚合物包覆的表面的基质的另一个实施方案中,所述聚合物包被包含式(IV)所示的聚合物:



[0215] 其中n是1-50,000范围内的整数,并且m为1-100,000范围内的整数。在具体的实施方案中,式(IV)的苯基被一个或多个氟基任选取代。

[0216] 本文描述的聚合物包被可共价连接至多种基质。基本上可采用任何可以如下反应性基团官能化的基质材料,包括但不限于烯烃、炔烃、氮烯、醛、肼、活化酯、缩水甘油醚、胺、马来酰亚胺。还可采用丙烯酰胺、烯酮(enone)或丙烯酸酯作为基质材料。基质可包括单一材料或多种不同的材料。基质可为复合材料或层叠材料。在一些实施方案中,所述基质具有至少一个包含玻璃的表面。在其他实施方案中,所述基质具有至少一个包含金属的表面。在一些这样的实施方案中,所述金属是金。在一些实施方案中,所述基质具有至少一个包含金属氧化物的表面。在一个实施方案中,所述表面包含氧化钽。其他基质材料可包括但不限于塑料、硅、二氧化硅、氮化硅、熔融的二氧化硅、砷化镓、磷化铟、铝、陶瓷、聚酰亚胺、石英、树脂、聚合物和共聚物。基质可为平的、圆的或有纹理的(textured)。

[0217] 在本文描述的组合物的一些实施方案中,所述基质表面包含聚合物包覆的区域和未被聚合物包覆的惰性区域。聚合物包覆的区域可包含反应性位点,并且因此可用于通过化学键结合或其他分子相互作用来结合分子。在一些实施方案中,可交替所述聚合物包覆的区域和所述惰性区域以形成图案或网格。这样的图案可为一维的或二维的。在一些实施方案中,所述惰性区域可选自玻璃区域、金属区域、遮蔽区域和间隙区域。在一个优选的实施方案中,所述表面包含玻璃区。在另一个优选的实施方案中,所述表面包含金属区。在再一个优选实施方案中,所述表面包含遮蔽区。在又一个优选的实施方案中,所述表面包含间隙区。在本发明描述的组合物的一些实施方案中,所述基质可为珠子。在优选的实施方案中,所述珠子表面被官能化。所述官能化可在将珠子引入小井之前或之后发生。在一个实施方案中,预先在流动池表面限定了所述小井。可用本公开内容的聚合物包覆的示例性基质材料或者可以其他方式用于本文记载的组合物或方法的示例性基质材料在美国系列号13/492,661和13/661,524中有描述,其中每一篇都通过引用并入本文。

[0218] 本文描述的组合物的第二个方面涉及流动池,其包含一个或多个基质,所述基质包含具有与之共价连接的聚合物包被的表面。在一些实施方案中,本文所描述的流动池包含本文所描述的一种或多种基质。在优选的实施方案中,所述聚合物包括PAZAM。

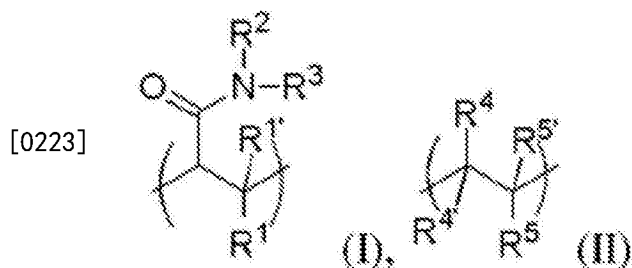
[0219] 在一些实施方案中,所述流动池还包含通过所述聚合物包被结合至所述基质表面的多核苷酸。在优选的实施方案中,所述多核苷酸以多核苷酸簇存在于所述流动池中,其中所述多核苷酸簇的多核苷酸经所述聚合物包被结合至所述流动池的表面。在这样的实施方案中,与所述多核苷酸结合的所述流动池主体的表面被视为基质。在其他实施方案中,将具有聚合物包覆的表面的单独的基质插入所述流动池的主体中。在优选的实施方案中,所述流动池是被分成多个泳道(lane)或多个部分(sector)的流动室,其中所述多个泳道或多个部分中的一个或多个包含以本文描述的共价连接的聚合物包被包覆的表面。在本文描述的流动池的一些实施方案中,单个多核苷酸簇内的结合的多核苷酸具有相同或相似的核苷酸序列。在本文描述的流动池的一些实施方案中,不同的多核苷酸簇内的结合的多核苷酸具有不相同或不相似的核苷酸序列。可用于本文所记载的方法或组合物中的示例性的流动池以及用于制备该流动池的基质包括但不限于,由Illumina, Inc. (加拿大,圣迭戈)市售的那些,或在US 2010/0111768 A1或US 2012/0270305中描述的那些,每一篇都通过引用并入本文。

[0220] 用共价连接的聚合物包覆基质的方法

[0221] 本文公开的方法的第一个方面涉及用于制备固定至基质表面的聚合物包被的方

法。在一些实施方案中,所述方法包括,将聚合物与基质表面接触,其中所述表面包含多个官能团,从而在所述表面上形成聚合物包被,并且其中聚合物包被与所述表面上的所述官能团共价结合。在一些实施方案中,通过在所述基质表面上聚合可聚合的材料从而在所述基质表面上原位形成所述聚合物。在一些其他的实施方案中,在与所述基质表面接触之前预先形成所述聚合物。在优选的实施方案中,所述聚合物包括PAZAM。

[0222] 在将聚合物包被固定至基质表面的方法的一些实施方案中,所述聚合物包被包含式(I)所示的重复单元和式(II)所示的重复单元:



[0224] 其中:每个 R^1 和 $R^{1'}$ 独立地选自氢、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基或以上基团的任选取代的变体;

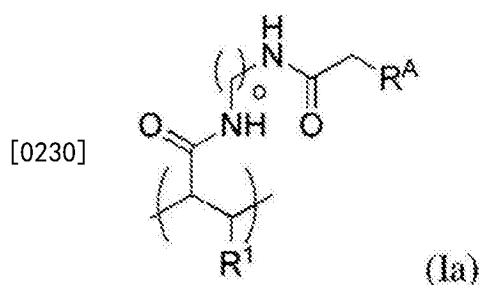
[0225] 每个 R^2 和 R^3 独立地选自氢、烷基、烷基氨基、烷基酰胺基、烷基巯基、芳基或以上基团的任选取代的变体;每个 R^4 、 $R^{4'}$ 、 R^5 和 $R^{5'}$ 独立地选自H、 R^6 、 OR^6 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-OC(O)R^6$ 、 $-C(O)NR^7R^8$ 或 $-NR^7R^8$;

[0226] R^6 独立地选自H、OH、烷基、环烷基、羟基烷基、芳基、杂芳基、杂环基或以上基团的任选取代的变体;

[0227] 每个 R^7 和 R^8 独立地选自H或烷基,或者 R^7 和 R^8 以与它们连接的一个或多个原子结合在一起以形成杂环。

[0228] 在一些实施方案中, R^2 是H,并且 R^3 是任选取代的烷基。在一个实施方案中, R^3 是被N-酰胺基取代的烷基。

[0229] 在用聚合物包覆基质表面的方法的其他实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ia):



[0231] 其中 R^1 是H或烷基; R^A 选自氢、胺、任选取代的烯烃、任选取代的炔烃、氧代胺、叠氮基、甲酰基、卤素、羟基、胍基、脲基、氰尿酸基、硫氰酸酯、羧酸、缩水甘油基、活化酯、氮杂环丙烷、三唑啉、环氧基和巯基;每个 $-(CH_2)_o-$ 可为任选取代的; o 为1-50的整数;前提是当 R^1 是H并且 R^A 是卤素时, R^A 不可以是溴基。

[0232] 在这样的方法的一个实施方案中, o 是5并且 R^A 是叠氮基。

[0233] 在这样的方法的另一个实施方案中, R^1 是氢。

[0234] 在这样的方法的再一个实施方案中, R^4 是 $-C(O)NR^7R^8$, 其中每个 R^7 和 R^8 独立地选自氢、烷基或羟基烷基。在这样的方法的具体实施方案中, R^4 是 $-C(O)NH_2$ 。

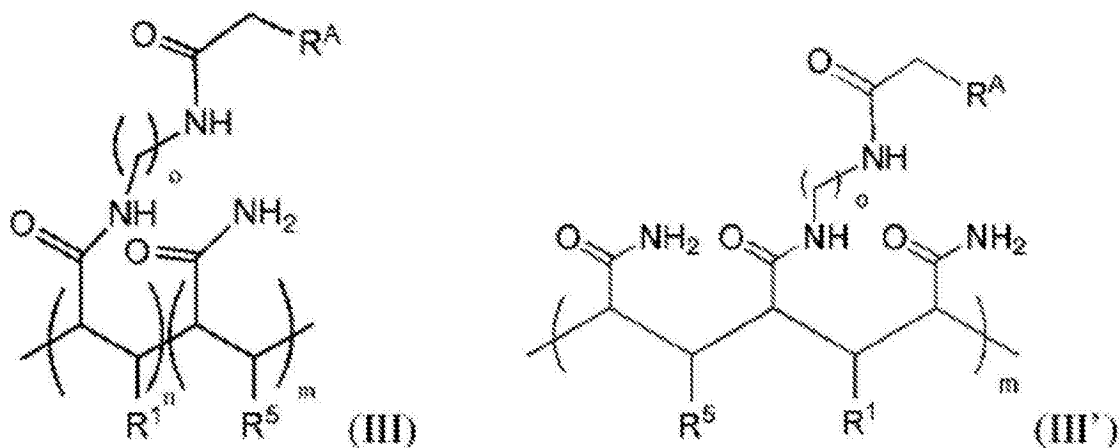
[0235] 在这样的方法的另一个实施方案中, $R^{4'}$ 是氢。

[0236] 在这样的方法的其他实施方案中, $R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 都是氢。

[0237] 在这样的方法的又一个实施方案中, $R^{4'}$ 和 $R^{5'}$ 中的至少一个是烷基, 例如甲基。

[0238] 在一些实施方案中, 所述聚合物包被包含式 (III) 或 (III') 所示的聚合物:

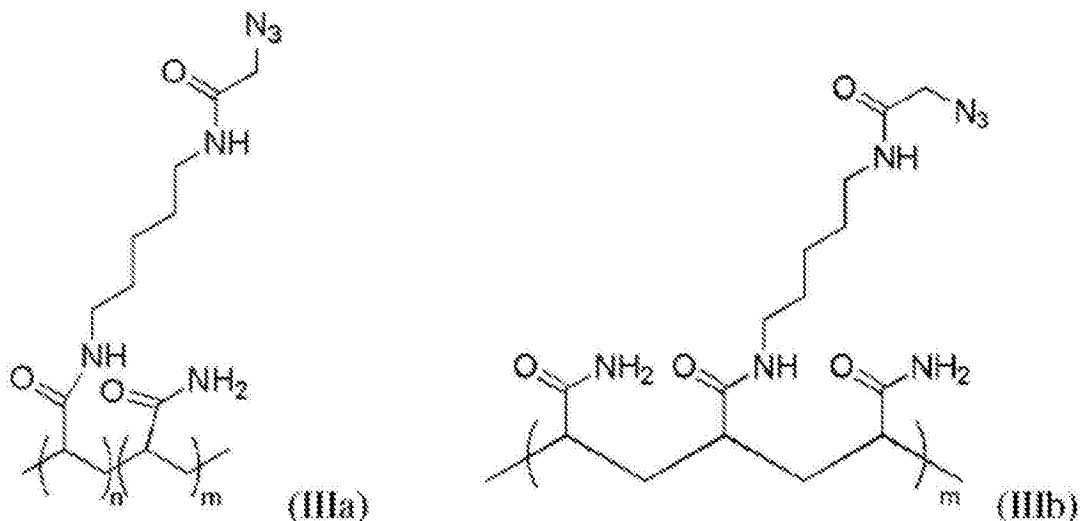
[0239]



[0240] 其中 R^1 选自 H 或烷基; R^A 选自氢、胺、任选取代的烯烃、任选取代的炔烃、氧代胺、叠氮基、甲酰基、卤素、羟基、胍基、脲基、氰尿酸基、硫氰酸酯、羧酸、缩水甘油基、活化酯、氮杂环丙烷、三唑啉、环氧基和巯基; 每个 $-(CH_2)_o$ 可为任选取代的; o 为 1-50 范围内的整数; R^5 选自 H 或烷基; n 是 1-50,000 范围内的整数; 并且 n 是 1-50,000 范围内的整数; 前提是当 R^1 和 R^5 是 H, o 是 5 时, 则 R^A 不可以是溴基。在一些实施方案中, o 是 5。

[0241] 在一个实施方案中, 式 (III) 或 (III') 所示的聚合物也表示为式 (IIIa) 或 (IIIb):

[0242]



[0243] 其中 n 是 1-20,000 范围内的整数, 并且 m 为 1 至 100,000 范围内的整数。

[0244] 在这样的方法的一些实施方案中, 所述基质表面上的所述官能团包括可光活化的叠氮化物。在一些实施方案中, 所述可光活化的叠氮化物为任选取代的苯基叠氮化物基团。在一些这样的实施方案中, 通过将所述基质表面上的胺基与 N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯 (磺基-HSAB) 反应来制备所述苯基叠氮化物。

[0245] 在上文描述的方法的一些实施方案中,在将所述聚合物与所述基质的表面接触之前,光活化所述苯基叠氮化物。在这样的方法的优选实施方案中,所述光活化的官能团产生氮烯。在这样的方法的另一个优选的实施方案中,所述聚合物包被经光活化与氮烯基团共价结合。

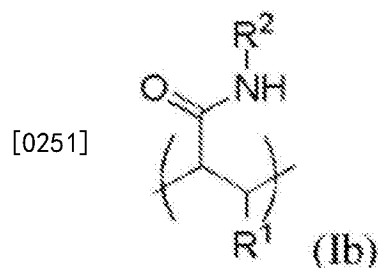
[0246] 在上文描述的将聚合物包被共价连接至基质表面的方法的一些实施方案中,所述基质表面上的所述官能团包括炔基。

[0247] 在上文描述的将聚合物包被共价连接至基质表面的方法的一些实施方案中,在催化剂的存在下将所述聚合物包被与所述官能团共价结合。在具体实施方案中,所述催化剂是铜催化剂。在一些实施方案中,在不使用铜催化剂的情况下将所述聚合物包被共价结合至所述炔基。

[0248] 在上文描述的将聚合物包被共价连接至基质表面的方法的一些实施方案中,所述基质表面上的所述官能团包括烯基。在一些实施方案中,通过将胺官能化的表面与丙烯酰基反应来制备烯基。在一些优选的实施方案中,通过用3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTMS)处理所述表面来制备所述胺官能化的表面。在一些其他的优选实施方案中,所述丙烯酰基可选自活化的丙烯酸酯、丙烯酸、丙烯酸氯化物或COMU(CAS号1075198-30-9)。在一个实施方案中,所述活化的丙烯酸酯是丙烯酸N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯。在一些其他的实施方案中,通过将所述基质表面与官能化的硅烷直接接触来制备所述烯基。在一些其他的实施方案中,所述官能化的硅烷可选自3-丙烯酰胺三甲氧基硅烷或甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷。

[0249] 在上文描述的将聚合物包被共价连接至基质表面的方法的一些实施方案中,在升高的温度下将所述聚合物包被与所述官能团共价结合。在优选的实施方案中,所述升高的温度是60℃至90℃范围内的任何温度。

[0250] 在将聚合物包被固定至基质表面的方法的其他实施方案中,式(I)所示的重复单元也表示为式(Ib):



[0252] 其中R²是任选取代的芳基。

[0253] 在这样的方法的一个实施方案中,式(Ib)中的R²是被一个或多个卤原子任选取代的苯基叠氮化物。在一个具体实施方案中,R²是全氟苯基叠氮化物。

[0254] 在用聚合物包覆基质表面的方法的另一个实施方案中,式(Ib)中的R¹是氢。

[0255] 在这样的方法的一些实施方案中,式(Ib)中的R⁴是-C(O)NR⁷R⁸。在一个具体实施方案中,R⁴是-C(O)NH₂。

[0256] 在这样的方法的其他实施方案中,式(Ib)中的R⁵是氢。

[0257] 在这样的方法的其他实施方案中,式(Ib)中的R⁴'和R⁵'都是氢。

[0258] 在这样的方法的一些实施方案中,以液体形式施用所述可聚合材料。

[0259] 在将聚合物包被固定至基质表面的方法的一些实施方案中,将多个官能团设置在所述基质的表面上,从而在所述聚合材料聚合后形成多个聚合物包覆的区域和多个惰性区域。在一些实施方案中,所述惰性区域选自玻璃区域、金属区域、遮蔽区域和间隙区域。在优选的实施方案中,所述惰性区域包含玻璃。在一些实施方案中,在所述表面上设置所述多个聚合物包覆的区域和所述多个惰性区域,以形成图案或网格。这样的图案或网格可相对于所述基质表面为一维的或二维的。可使用的示例性的模式化表面在美国系列号13/492,661和13/661,524中有描述,每一篇都通过引用并入本文。

[0260] 在上文描述的制备固定至基质表面的聚合物包被的方法的一些实施方案中,在与所述表面的所述官能团共价结合之前将所述聚合物包被溶解于水溶液中。在一些实施方案中,所述基质是珠子。

[0261] 本文公开的方法的第二个方面涉及用于制备多核苷酸阵列的方法。在这样的实施方案中,所述方法可包括以下步骤:(a)将多个第一寡核苷酸和多个第二寡核苷酸与本文描述的任一基质表面上存在的聚合物包被或通过本文描述的将聚合物包被固定至基质表面的任一方法制备的聚合物包被上的反应性位点反应;(b)将与所述聚合物包被结合的所述多种第一寡核苷酸与待扩增的模板接触;以及(c)使用所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸扩增所述模板,从而产生成簇的多核苷酸阵列。在一些实施方案中,每个模板在3'端包含能够与所述第一寡核苷酸杂交的序列,并且在5'端包含能够与所述第二寡核苷酸杂交的序列的互补序列。在以上方法中,所述第二寡核苷酸是任选的。因此,在一些实施方案中,无需存在所述第二寡核苷酸。如果存在的话,可将所述第二核苷酸与所述聚合物包被结合,或可将其提供于溶解中以确保(suring)扩增步骤。

[0262] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的一些实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的所述叠氮基反应的炔基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0263] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的氰尿酸氯反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0264] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的活化的胺基如肼基或胍基反应的醛基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0265] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的硫氰酸基或羧酸基团反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0266] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的另外的实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的缩水甘油基反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0267] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将通过二醛连接子与所述聚合物包被的胺基反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0268] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或

所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的活化酯或环氧基团反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0269] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的氧化胺基反应的醛基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0270] 在上文描述的制备多核苷酸阵列的方法的优选实施方案中,所述基质表面上的所述聚合物包被包含式(IIIa)或(IIIb)所示的聚合物。

[0271] 本文公开的方法的第三个方面涉及用于制备基质的表面的方法,所述方法包括:在一个或多个珠子表面上形成多个官能团;将本文描述的聚合物包被与所述珠子接触,以在所述珠子表面上形成聚合物包被,其中所述聚合物包被与所述珠子表面上的所述官能团共价结合;以及将所述聚合物包被的珠子附着至所述基质表面。在一个实施方案中,所述基质是流动池。在一个实施方案中,所述聚合物包被包含PAZAM。所述聚合物包被可完全或部分地覆盖所述珠子。在一个实施方案中,所述珠子表面上的所述聚合物包被具有约20nm的厚度。在一些实施方案中,所述珠子具有约1.2微米或更小的直径。在一些其他的实施方案中,所述珠子具有约0.5微米或更小的直径。在优选的实施方案中,将所述基质表面模式化。但是,可使用更大的珠子,包括但不限于具有约10微米或更小、5微米或更小、3微米或更小或者2微米或更小的直径的珠子。

[0272] 在制备如本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,所述珠子表面上的所述官能团包括烯烃。在一些实施方案中,通过将所述珠子的胺官能化的表面与丙烯酰基反应来制备烯基。在一些优选的实施方案中,通过用3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTMS)处理所述表面来制备所述胺官能化的表面。在一些其他的优选实施方案中,所述丙烯酰基可选自活化的丙烯酸酯或丙烯酸氯化物。在一个实施方案中,所述活化的丙烯酸酯是丙烯酸N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯。其他可用的偶联剂包括丙烯酸、COMU(CAS号1075198-30-9)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)或N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)。在一些其他的实施方案中,通过将所述基质表面与官能化的硅烷直接接触来制备所述烯基。在一些其他的实施方案中,所述官能化的硅烷可选自3-丙烯酰胺三甲氧基硅烷或甲基丙烯酰氧基丙基三甲氧基硅烷。在一些实施方案中,在与所述聚合物包被接触之前将所述预处理的珠子暴露于包含聚合抑制剂的溶液。在一些实施方案中,所述聚合抑制剂选自丁基羟基甲苯(BHT)、二乙基羟基胺或(2,2,6,6-四甲基哌啶-1-基)氧基(TEMPO)。在一些优选的实施方案中,在升高的温度下将所述聚合物包被与所述珠子表面上的烯基共价结合。在优选的实施方案中,所述升高的温度是60°C-90°C范围内的任何温度。

[0273] 在制备如本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,所述珠子表面上的所述官能团包括可光活化的叠氮化物。在一些实施方案中,所述可光活化的叠氮化物可被苯基叠氮化物基团任选取代。在一些这样的实施方案中,通过将所述基质表面上的胺基与N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯(磺基-HSAB)反应来制备所述苯基叠氮化物。在一些实施方案中,在将所述聚合物与所述基质的表面接触之前,光活化所述苯基叠氮化物。在这样的方法的优选实施方案中,所述光活化的官能团产生氮烯。在这样的方法的另一个优选的实施方案中,所述聚合物包被经光活化与所述官能团共价结合。

[0274] 在制备如本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,所述珠子表面上的所述

官能团包括炔基。在一些实施方案中,在存在催化剂的情况下使所述聚合物包被与所述官能团共价结合。在具体的实施方案中,所述催化剂是铜催化剂。在一些实施方案中,在不使用铜催化剂的情况下将所述聚合物包被与所述炔基共价结合。

[0275] 在制备本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,通过将所述聚合物包覆的珠子加载至所述基质表面上的所述开放小井中来使所述聚合物包覆的珠子附着至所述基质的表面。所述珠子和所述小井可具有使得每个孔中容纳不多于一个珠的尺寸。可选地,相对尺寸可使得每个小井中具有多个珠子。在一些优选的实施方案中,通过将所述聚合物包被的官能团与所述基质表面上的官能团反应来将所述聚合物包覆的珠子附着至所述基质的表面。所述表面的所述官能团可位于表面的特定特征处,例如小井或垫。可选地,可使所述基质的所述官能团遍布于平面表面。用于制备这样的、可使用本文记载的方法和组合物包覆的表面的示例性方法,在美国系列号13/492,661和13/661,524中有描述,每一篇都通过引用并入本文。在一个实施方案中,所述聚合物包被的官能团包括胺,并且所述基质表面上的所述官能团包括N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯。在另一个实施方案中,所述聚合物包被的官能团包括叠氮化物,并且所述基质表面上的所述官能团包括炔烃。在另一个实施方案中,所述聚合物包被的官能团包括巯基,并且所述基质表面上的所述官能团包括马来酰亚胺。

[0276] 在制备本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,所述方法还包括在将所述珠子加载至所述基质表面之前洗涤所述聚合物包覆的珠子以去除过量的未结合聚合物包被。在一些实施方案中,在与所述珠子接触之前将所述聚合物包被溶解于溶液中。在一个实施方案中,所述溶液是水溶液。

[0277] 在制备本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,所述方法还包括:将多个第一寡核苷酸和多个第二寡核苷酸与所述珠子的所述聚合物包被上的反应性位点反应;将与所述聚合物包被结合的所述多个第一寡核苷酸与待扩增模板接触,每个模板包含能够与所述第一寡核苷酸杂交的3'端序列,以及能够与所述第二寡核苷酸杂交的5'端互补序列;以及使用所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸扩增所述模板从而产生成簇的多核苷酸阵列。

[0278] 在上文描述的方法的一些实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的所述叠氮基反应的炔基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0279] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的氰尿酸氯反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0280] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的活化胺基如胍基或脲基反应的醛基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0281] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的硫氰酸基或羧酸基团反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0282] 在上文描述的方法的另外的实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的缩水甘油基反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核

苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0283] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将通过二醛连接子与所述聚合物包被的胺基反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0284] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的活化酯或环氧基团反应的胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0285] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的巯基反应的马来酰亚胺基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0286] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将经烯烃交叉复分解与所述聚合物包被的烯基反应的烯基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0287] 在上文描述的方法的其他实施方案中,所述第一寡核苷酸或所述第二寡核苷酸包含将与所述聚合物包被的氧代胺基反应的醛基。在优选的实施方案中,所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸都包含这样的基团。

[0288] 在制备如本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,所述方法还包括用光学成像试剂对所述聚合物包覆的珠子进行染色的步骤。在一些实施方案中,所述光学成像试剂选自DyLight488磷、DyLight 550磷、DyLight 650磷(二者都购自ThermoFisher Scientific),以及有张力的(strained)炔烃染料(购自Click Chemistry Tools, Inc.的基于DBC0的染料),例如DBC0-Fluor 488、DBC0-Fluor 525、DBC0-Fluor 545、DBC0-Fluor 568、DBC0-Fluor 585和DBC0-SETA 650。在一个实施方案中,所述光学成像试剂是DyLight488磷。

[0289] 在制备如本文所述的基质表面的方法的一些实施方案中,所述基质可选自硅基质、塑料基质或经添加剂浸渍的塑料基质。在一些其他的实施方案中,可用SiO₂、TiO₂或炭黑浸渍所述塑料基质。

[0290] 本文记载的方法可使用多种扩增技术中的任意技术。可使用的示例性技术包括但不限于,聚合酶链式反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、多重置换扩增(MDA)或随机引物扩增(RPA)。在具体的实施方案中,可将用于扩增的一个或多个引物结合至聚合物包被。在PCR实施方案中,可将用于扩增的一个引物或两个引物都结合至聚合物包被。使用两种结合的引物的形式通常被称为桥式扩增,因为引物双链扩增子在位于已被复制的模板序列两侧的两个结合的引物之间形成桥样结构。可用于桥式扩增的示例性试剂和条件在例如以下文献中有描述:美国专利第5,641,658号;美国专利公开第2002/0055100号;美国专利第7,115,400号;美国专利公开第2004/0096853号;美国专利公开第2004/0002090号;美国专利公开第2007/0128624号;以及美国专利公开第2008/0009420号,其中每一篇都通过引用并入本文。也可以这样的方式进行PCR扩增,其中扩增引物中的一个与聚合物包被结合,而第二引物溶于溶液中。使用一种结合的引物与可溶性引物的组合的示例性形式是例如在以下文献中描述的乳液PCR:Dressman等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100:8817-8822(2003);WO 05/010145;或美国专利公布第2005/0130173或2005/0064460号,其中每篇都通过引用并入本

文。乳液PCR是示例性的所述形式,并且应理解,为了本文记载的方法的目的,乳剂的使用是任选的,并且的确对于一些实施方案,未使用乳剂。此外,引物无需直接结合至如在ePCR文献中记载的固体载体,并且相反可结合至如本文所记载的聚合物包被。

[0291] 可修改RCA技术以用于本公开内容的方法。可用于RCA反应的示例性组分和RCA借以产生扩增子的原理在例如以下文献中有描述:Lizardi等,Nat.Genet.19:225-232 (1998);以及US 2007/0099208 A1,其中每一篇都通过引用并入本文。用于RCA的引物可溶于溶液中,或与聚合物包被结合。

[0292] 可修改MDA技术以用于本公开内容的方法。MDA的一些基本原理和可用条件在例如以下文献中有描述:Dean等,Proc Natl.Acad.Sci.USA 99:5261-66 (2002);Lage等,Genome Research 13:294-307 (2003);Walker等,Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995;Walker等,Nucl.Acids Res.20:1691-96 (1992);US 5,455,166;US 5,130,238;以及US 6,214,587,其中每一篇都通过引用并入本文。用于MDA的引物可溶于溶液中,或与聚合物包被结合。

[0293] 在具体的实施方案中,可使用上文中例示的扩增技术的组合。例如,可组合使用RCA和MDA,其中RCA用于产生溶于溶液中的连体(concatameric)扩增子(例如,使用溶液相引物)。所述扩增子然后可充当使用结合至聚合物包被的引物的MDA的模板。在该实例中,在组合RCA和MDA步骤后产生的扩增子将结合至所述聚合物包被。

[0294] 本文公开的方法的第三个方面涉及确定多核苷酸的核苷酸序列的方法。在这样的实施方案中,所述方法可包括以下步骤:(a)将多核苷酸聚合酶与经任一种本文描述的聚合物包被结合至基质表面的多核苷酸簇接触;(b)向所述基质的所述聚合物包覆的表面提供核苷酸,从而在所述多核苷酸聚合酶使用一个或多个核苷酸时产生可检测的信号;(c)检测一个或多个多核苷酸簇处的信号;以及(d)重复步骤(b)和(c),从而确定所述一个或多个多核苷酸簇处存在的多核苷酸的核苷酸序列。

[0295] 在本文描述的方法的一些实施方案中,确定流动池内存在的所述基质表面结合的多核苷酸的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述聚合物包覆的表面是所述流动池的整体部分。在其他实施方案中,所述聚合物包覆的表面是位于所述流动池内的分离的基质。在其他实施方案中,可将所述分离的基质耦联、结合或以其他方式固定至所述流动池的表面或其他部分。

[0296] 核酸测序可用于通过本领域已知的多种方法来确定多核苷酸的核苷酸序列。在优选的方法中,采用边合成边测序(SBS)来确定经本文描述的任一聚合物包被与基质表面结合的多核苷酸的核苷酸序列。在这样的方法中,向与多核苷酸聚合酶结合的模板多核苷酸提供一种或多种核苷酸。所述多核苷酸聚合酶将一种或多种核苷酸掺入至与所述多核苷酸模板互补的新合成的核酸链中。所述合成以这样的寡核苷酸引物起始,其与所述模板多核苷酸的部分或者与在所述模板多核苷酸的一端共价结合的通用部分或非可变核酸部分互补。当针对模板多核苷酸掺入核苷酸时,生成了可检测信号,其使得能够确定在所述测序方法的各步骤期间掺入了哪种核苷酸。以此方式可生成与所述模板多核苷酸的至少一部分互补的核酸序列,从而使得能够确定所述模板多核苷酸的至少一部分的核苷酸序列。流动池提供了用于容纳这样的阵列的方便的形式,其通过本公开内容的方法产生,并且接受边合成边测序(SBS)或涉及在循环中重复递送试剂的其他检测技术。例如,为了起始第一SBS循

环,可将一种或多种标记的核苷酸、DNA聚合酶等流入/流过容纳有通过本文记载的方法制成的核酸阵列的流动池。引物延伸处的那些阵列位点使得可检测到掺入的标记的核苷酸。任选地,所述核苷酸还可包含可逆的终止特性,其在向引物添加核苷酸后,终止引物的进一步延伸。例如,可向引物添加具有可逆的终止子部分的核苷酸类似物,从而使后续延伸不能发生,直至递送解封闭剂去除所述部分。因此,对于使用可逆终止的实施方案,可(在检测发生之前或之后)将解封闭剂递送至所述流动池。可在不同的递送步骤之间进行洗涤。然后可重复所述循环n次,以将所述引物延伸n个核苷酸,从而检测长度为n的序列。可容易地进行调整以使用通过本公开内容的方法产生的阵列的示例性SBS方法、流体系统和检测平台在例如以下文献中有描述:Bentley等,Nature 456:53-59(2008),WO 04/018497;US 7,057,026;WO 91/06678;WO 07/123744;US 7,329,492;US 7,211,414;US 7,315,019;US 7,405,281和US 2008/0108082,其中每一篇都通过引用整体并入本文。

[0297] 可使用其他使用循环反应的测序方法,例如焦磷酸测序。焦磷酸测序检测将特定的核苷酸掺入至新生的核酸链中时释放的无机焦磷酸盐(Pi) (Ronaghi等,Analytical Biochemistry 242(1),84-9(1996);Ronaghi,Genome Res.11(1),3-11(2001);Ronaghi等,Science 281(5375),363(1998);US 6,210,891;US 6,258,568和US 6,274,320,其中每一篇都通过引用整体并入本文。在焦磷酸测序中,可通过ATP硫酸化酶将释放的Pi立即转化成三磷酸腺苷(ATP)来检测所释放的Pi,并且可通过荧光素酶产生的光子来检测生成的ATP的水平。因此,可经发光检测系统监测所述测序反应。用于基于荧光的检测系统的激发辐射源对于焦磷酸测序方法不是必需的。可用于本公开内容的阵列的焦磷酸测序应用的有用流体系统、检测器和方法在例如以下文献中有描述:WO 12/058096 A1、US 2005/0191698 A1、US 7,595,883和US 7,244,559,其中每一篇都通过引用整体并入本文。

[0298] 边连接边测序反应还可用于包括例如在以下文献中描述的那些:Shendure等,Science 309:1728-1732(2005);US 5,599,675;以及US 5,750,341,其中每一篇都通过引用整体并入本文。一些实施方案可包括如在例如以下文献中描述的边杂交边测序法:Bains等,Journal of Theoretical Biology 135(3),303-7(1988);Drmanac等,Nature Biotechnology 16,54-58(1998);Fodor等,Science 251(4995),767-773(1995);以及WO 1989/10977,其中每一篇都通过引用整体并入本文。在边连接边测序和边杂交边测序方法中,使存在于阵列位点的核酸接受反复的寡核苷酸递送和检测循环。可容易地调整本文所记载的或本文所引用的参考文献的用于SBS方法的流体系统,以用于为边连接边测序法或边杂交边测序法递送试剂。通常来说,将所述寡核苷酸荧光标记,并且可使用与本文或本文所引用的参考文献中关于SBS方法所描述的相似的荧光检测器来检测所述寡核苷酸。

[0299] 一些实施方案可使用包括DNA聚合酶活性的实时监测的方法。例如,可通过携带荧光团的聚合酶与 γ -磷酸盐标记的核苷酸之间的荧光共振能量转移(FRET)相互作用或者用零模波导(ZMW)来检测核苷酸掺入。用于基于FRET的测序的技术和试剂在例如以下文献中有描述:Levene等,Science 299,682-686(2003);Lundquist等,Opt.Lett.33,1026-1028(2008);Korlach等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105,1176-1181(2008),其公开内容都通过引用整体并入本文。

[0300] 一些SBS实施方案包括检测核苷酸掺入至延伸产物后释放的质子。例如,基于检测释放的质子的测序可使用可商购自Ion Torrent (Guilford,CT,Life Technologies)的一家

子公司)的电子检测器和相关技术,或US 2009/0026082 A1;US 2009/0127589 A1;US 2010/0137143 A1;或US 2010/0282617 A1中描述的测序方法和系统,其中每一篇都通过引用整体并入本文。

[0301] 本公开内容的例如通过本文记载的方法制备的阵列的另一个有用应用是基因表达分析。可使用RNA测序技术如被称为数字RNA测序的技术来对基因表达进行检测或定量。可使用本领域已知的测序方法如上文记载的那些来实施RNA测序技术。还可使用通过直接杂交至阵列而实施的杂交技术或使用在阵列上检测产物的多重测定来对基因表达进行检测或定量。本公开内容的阵列,例如通过本文记载的方法制备的阵列,还可用于确定来自一个或多个个体的基因组DNA样品的基因型。可在本公开内容的阵列上实施的用于基于阵列的表达和基因型分析的示例性方法在以下文献中有描述:美国专利第7,582,420;6,890,741;6,913,884或6,355,431号,或者美国专利公开第2005/0053980 A1;2009/0186349 A1或US 2005/0181440 A1号,其中每一篇都通过引用整体并入本文。

[0302] 在上文描述的使用流动池的方法的一些实施方案中,在单一的流步骤期间所述流动池中仅存在单一类型的核苷酸。在这样的实施方案中,所述核苷酸可选自dATP、dCTP、dGTP、dTTP及其类似物。在上文描述的使用流动池的方法的其他实施方案中,在单一的流步骤期间所述流动池中存在多种不同种类的核苷酸。在这样的方法中,所述核苷酸可选自dATP、dCTP、dGTP、dTTP及其类似物。

[0303] 通过检测在多核苷酸模板处或其附近产生的信号,实现了对每个流动步骤期间的、附着至所述流动池中存在的所述基质表面上的所述聚合物包被的一种或多种多核苷酸的掺入的一种或多种核苷酸的检测。在上文描述的方法的一些实施方案中,所述可检测信号包括光学信号。在其他实施方案中,所述可检测信号包括非光学信号。在这样的实施方案中,所述非光学信号包括一个或多个所述多核苷酸模板处或其附近的pH变化。

实施例

[0304] 实施例1

[0305] PAZAM制备

[0306] 概述

[0307] 除非另有说明,否则所有反应均在氮气氛或氩气氛下进行,并且起始材料得自供应商(Aldrich Chemical Company、Fisher Scientific、Dow),并且收到即用,不进行进一步纯化。所记录的所有反应温度都指示与反应容器接触的溶液/空气的温度。无需无水溶剂。

[0308] 在Bruker Avance 400MHz仪器上以氧化氘(对于LC NMR 99.9at. %D)记录¹H-NMR谱和¹³C-NMR谱。化学位移表示为距四甲基硅烷(TMS)的百万分率(ppm, δ) 低磁场,并被参比作为内标的所示溶剂。

[0309] GPC分析由Smithers Rapra Technology Limited进行,使用以下色谱条件:

[0310] 仪器:Malvern/Viscotek Triple Detector Array TDA301,结合泵和自动取样器。

[0311] 柱子:Agilent 1×PLaquagel-OH 40+1×PLaquagel-OH 60,30cm,13 μ m,或者Agilent PLaquagel-OH Guard+2×PLaquagel-OH混合,30cm,8 μ m

[0312] 洗脱剂:0.2M NaNO₃;0.01M NaH₂PO₄,调节至pH=7.0

[0313] 流量:1.0mL/分钟(标称),

[0314] 温度:30℃(标称)

[0315] 检测器:具有压差和直角光散射的折射率

[0316] 使用Malvern/Viscotek“OminSec”软件来收集和分析数据。

[0317] 光致发光光谱

[0318] 在Typhoon Trio Variable Mode Imager(GE)上进行荧光测量,并使用ImageQuant TL软件来处理数据。。

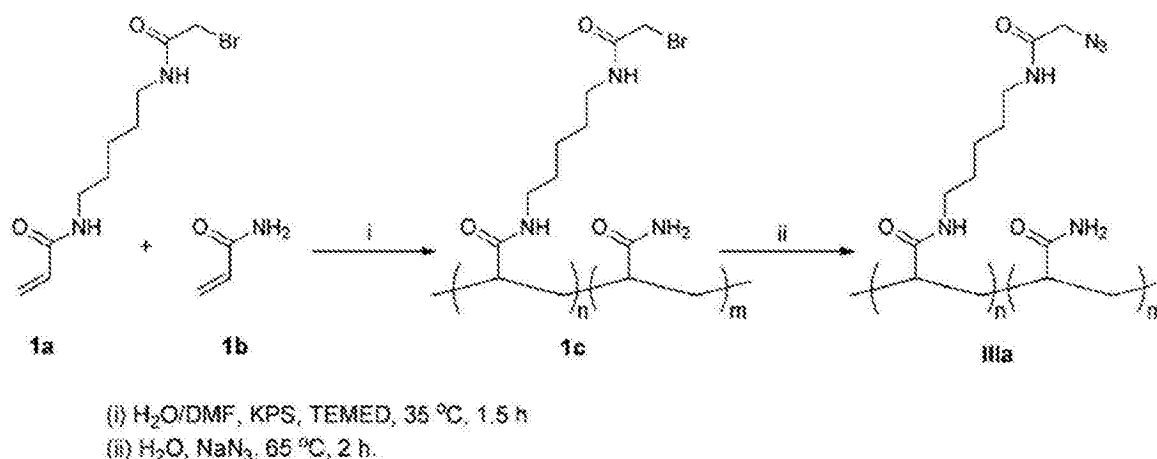
[0319] 制备了薄膜,以用于通过使用旋涂流体法在适当制备的干净的Si或玻璃基质上包覆来进行分析。在Typhoon Trio(GE)上收集与荧光互补寡核苷酸杂交的干燥接枝膜的光致发光光谱。

[0320] 合成

[0321] 可用多种方法制备本文描述的聚合物包被。用于合成式(IIIa)所示的聚合物的一种方法在方案1A中示出。

[0322] 方案1A.溶液态PAZAM混合物的合成

[0323]



[0324] N-(5-溴乙酰胺基戊基)丙烯酰胺(BRAPA)(1c)在美国专利公开第2011/0059865号中有描述,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0325] 通过化学起始的无自由基的聚合来制备水溶性丙烯酰胺聚合物(PAZAM)。通过连续沉淀纯化粗制的聚合物,以得到数均分子量为300kDa至400kDa的PAZAM。还可得到具有更宽范围的平均分子量,例如,30kDa至600kDa范围的。

[0326] 将丙烯酰胺(5.0g,70.3mmol)溶解于去离子H₂O(45mL)中,并且将该混合物充分涡旋以确保完全溶解。在单独的烧瓶中,将BRAPA(1.0g,3.61mmol)添加至DMF(10mL,9.44g),并将所得的混合物充分涡旋以帮助溶解。然后合并BRAPA溶液(9.25g,或者9.80mL)、丙烯酰胺水溶液(47.5mL)和水(190mL)的混合物,并搅拌5分钟。然后将该溶液通过0.2μm Whatman过滤器过滤。

[0327] 将过硫酸钾(125mg,0.46mmol)添加至水(2.5mL)中,并将混合物涡旋以溶解。将叠氮化钠(11.5g,177mmol)添加至去离子水(82.9mL),并将该溶液涡旋以溶解。(NaN₃的终浓度(于粗制聚合物混合物中)是0.53M,其对应50倍过量的相对于有效BRAPA的NaN₃。

[0328] 使用塑料移液管用氩气净化BRAPA/丙烯酰胺预混合物(~250mL) 20分钟。向该单体混合物中添加四甲基乙二胺(TEMED)(纯的, 273 μ L)和过硫酸钾(50mg/mL; 2370 μ L)。搅拌混合物, 并加热至35 $^{\circ}$ C保持1.5小时, 然后使其冷却至室温。在保持搅拌的同时, 将Chainguard I-15(1390 μ L)添加至该粗制混合物中, 然后添加2.03M叠氮化钠溶液(82.9mL)。为了确保完全淬灭在聚合期间产生的任何剩余的自由基, 可在混合物中用空气鼓泡10分钟。将经淬灭的聚合物混合物于65 $^{\circ}$ C下搅拌2小时。然后将混合物冷却至室温, 并可以该状态(4 $^{\circ}$ C)长时间储存。

[0329] 将该粗制混合物(~335mL)逐滴添加至大量过量(~1.5L)的IPA, 同时保持温和搅拌。所述聚合物沉淀为白色固体, 将其收集, 并在泵处干燥。通过在室温下搅拌混合物至少一个小时以帮助溶解, 来将部分干燥的聚合物(~10g)重新溶解于H₂O(100mL)中。然后在保持搅拌下将粘胶溶液逐滴添加至1.5L IPA。在真空下过滤固体, 然后使用高真空干燥, 得到作为白色固体的PAZAM(~5.6g, >95%)。¹H NMR谱在图1A中示出。

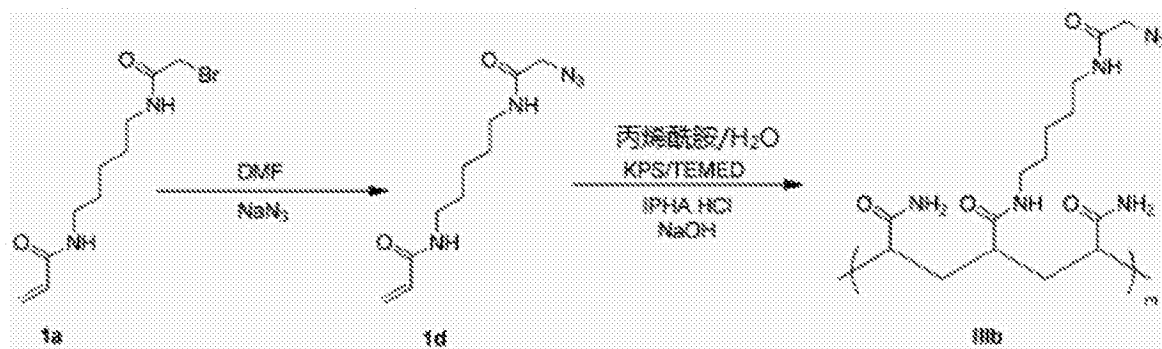
[0330] GPC(0.2M NaNO₃; 0.01M NaH₂PO₄, 调节至pH=7.0; 使用具有130,000的峰值分子量、0.511的固有粘度和于0.1M硝酸钠中的0.147mL/g的示差折射率的窄分布的Pullulan多糖校准。示差折射率的值0.191mL/g被用于计算来自样品的分子量数据): $M_n = 3.15 \times 10^5$ Da, $M_w = 1.0 \times 10^6$ Da, $M_w/M_n = 3.2$ (参见图1B)。所述聚合物具有多模态MW分布。PAZAM样品难以在开始色谱分析之前过滤, 这催生了宽重量分布, 并导致测量人为因素(artifact), 增加了分析的复杂度。然后可将干燥的PAZAM重新溶解于水中至期望的浓度, 通常为0.01%w/v至12%w/v。

[0331] 直链PAZAM的制备

[0332] 可选地, 直链PAZAM(IIIb)的合成在方案1B中示出。

[0333] 方案1B. 直链PAZAM的合成

[0334]



[0335] 1d/丙烯酰胺预混合物的制备: 将1a(915mg)、叠氮化钠(236mg)和DMF(9mL)一起混合于配备有搅拌棒的25mL圆底烧瓶中。将烧瓶放置于drysyn温浴中, 并在氮气氛下于35 $^{\circ}$ C(温浴温度)搅拌2小时, 以形成1d。将丙烯酰胺(4.78g)溶解于去离子水中, 并将所得的1d溶液添加至丙烯酰胺溶液, 并漩涡混合。将反应混合物通过0.2 μ m过滤器过滤。

[0336] 将1L凸缘瓶(flange flask)安装于搅拌器/热板上的1L drysyn温浴中, 并盖上瓶盖。经搅拌器格兰头(gland)将烧瓶配备上锚形搅拌桨(stirring paddle), 并将所述搅拌桨与上方的搅拌器连接。使空气冷凝器与瓶盖的一个快接接头(quickfit joint)结合, 并使连接有氮气歧管(manifold)(但此时没有气流)的管道适配器(adaptor)结合至冷凝器的

顶部。将经过滤的反应混合物溶液转移至安装好的烧瓶中,并使用结合至氮气歧管的5mL stripette移液管在溶液中进行氮气鼓泡30分钟,同时将反应混合物预热至35℃(温浴温度)。

[0337] 粗制PAZAM聚合物溶液的制备:在对丙烯酸酰胺/1d预混物进行脱气的同时,在涡旋下将过硫酸钾(119mg)溶解于去离子水(2.4mL)中。打开冷凝器顶部的氮气流,以确保脱气的反应混合物上方有氮气流。在脱气处理后,将TEMED(99μL)添加至反应混合物,同时以200rpm搅拌。然后,将过硫酸钾溶液添加至搅拌的反应混合物以起始聚合。在氮气下于35℃(温浴温度)继续以200rpm搅拌1.5小时。

[0338] 聚合淬灭:在进行聚合反应的同时,通过将IPHA.HCl(312mg)溶解于去离子水(2.80mL)中来制备IPHA.HCl溶液。当聚合反应进行了1.5小时后,从冷凝器顶部移除氮气管线,使反应容器对空气开放。将氢氧化钠溶液(1M)添加至搅拌的反应混合物中,接着添加制备的IPHA.HCl溶液以淬灭聚合反应。于35℃(温浴温度)下以200rpm再次搅拌淬灭的反应混合物30分钟。

[0339] PAZAM聚合物的纯化:用stripette移液管将粗制的混合物缓慢地添加至搅拌的2-丙醇(750mL),并另外继续搅拌1小时。倒出溶剂,并将其作为包含叠氮化钠的废物进行处理。碾压经沉淀的聚合物以挤出滞留的溶剂。将聚合物重新溶解于去离子水(150mL)中,并用stripette移液管缓慢地将聚合物溶液添加至搅拌的2-丙醇(750mL)中,并另外保持搅拌1小时。再次倒出溶剂,并将其作为包含叠氮化钠的废物进行处理。碾压沉淀的聚合物以挤出滞留的溶剂。在干燥器中于高真空下干燥所得的聚合物18小时,然后转移至测定了皮重的(tared)、经标记的容器中,并在黑暗中于室温下储存。

[0340] 轻微交联的PAZAM的制备

[0341] 类似地,按照通用合成方案1B,以本文描述的经修改的方法来制备轻微交联的PAZAM。

[0342] 1d/丙烯酸酰胺预混合物的制备:将1a(915mg)、叠氮化钠(106mg)和DMF(9mL)一起混合于配备有搅拌棒的25mL圆底烧瓶中。将烧瓶放置于drysyn温浴中,并将溶液在氮气氛下于35℃(温浴温度),在搅拌下加热2小时,以形成1d。将丙烯酸酰胺(4.78g)溶解于去离子水中,并将所得的1d溶液添加至丙烯酸酰胺溶液,并涡旋混合。将反应混合物通过0.2μm过滤器过滤。

[0343] 将1L凸缘瓶安装于搅拌器/热板上的1L drysyn温浴中,并盖上瓶盖。经搅拌器格兰头将烧瓶配备上锚形搅拌桨,并将所述搅拌桨连接至上方的搅拌器。将空气冷凝器与瓶盖的一个快接头结合,并将连接有氮气歧管(但此时没有气流)的管道适配器与冷凝器的顶部结合。将过滤的反应混合物溶液转移至安装好的烧瓶,并使用结合至氮气歧管的5mL stripette移液管在溶液中进行氮气鼓泡30分钟,同时将反应混合物预热至35℃(温浴温度)。

[0344] 粗制PAZAM聚合物溶液的制备:在对丙烯酸酰胺/1d预混物进行脱气的同时,在涡旋下将过硫酸钾(119mg)溶解于去离子水(2.4mL)中。打开冷凝器顶部的氮气流,以确保脱气的反应混合物上方有氮气流。在脱气处理后,将TEMED(99μL)添加至反应混合物,同时以200rpm搅拌。然后,将过硫酸钾溶液添加至搅拌的反应混合物以起始聚合。在氮气下于35℃(温浴温度),继续以200rpm搅拌1.5小时。

[0345] 聚合淬灭和叠氮基溶解 (azidolysis) 分析: 在进行聚合反应的同时, 通过将 IPHA.HCl (312mg) 溶解于去离子水 (2.80mL) 中来制备 IPHA.HCl 溶液。此外, 通过将 575mg 叠氮化钠溶解于 8mL 去离子水中来制备叠氮化钠溶液。当聚合反应进行了 1.5 小时后, 从冷凝器顶部移除氮气管线, 使反应容器对空气开放。在移除盖子上一个塞子后, 氢氧化钠溶液 (1M) 被添加至搅拌的反应混合物中, 接着制备的 IPHA.HCl 溶液被加入以淬灭聚合反应。然后, 将叠氮化钠溶液添加至搅拌的反应混合物。将淬灭的反应混合物加热至 65°C (温浴温度), 并在保持该温度的同时以 200rpm 继续搅拌 2 小时。

[0346] PAZAM 聚合物的纯化: 用 stripette 移液管将粗制混合物缓慢地添加至搅拌的 2-丙醇 (750mL), 并另外继续搅拌 1 小时。倒出溶剂, 并将其作为包含叠氮化钠的废物进行处理。碾压沉淀的混合物以挤出滞留的溶剂。将聚合物重新溶解于去离子水 (150mL) 中, 并用 stripette 移液管缓慢地将聚合物溶液添加至搅拌的 2-丙醇 (750mL) 中, 并另外保持搅拌 1 小时。再次倒出溶剂, 并将其作为包含叠氮化钠的废物进行处理。碾压沉淀的混合物以挤出滞留的溶剂。在干燥器中于高真空下干燥所得的聚合物 18 小时, 然后将其转移至测定了皮重的、经标记的容器中, 并在黑暗中于 4°C 下储存。

[0347] 从 100μL D₂O 与 500μL 聚合物水溶液 (3%) 的混合物得到轻微交联的 PAZAM 的 ¹H NMR (参见图 1C)。

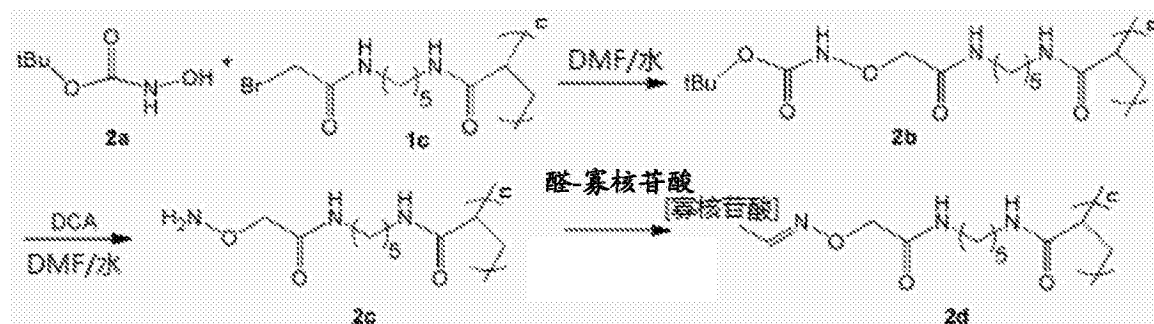
[0348] 实施例2

[0349] PAZAM 衍生物的制备

[0350] PAZAM 衍生物的合成在方案 2 中示出。首先, 将 BRAPA (1c) 与 t-Boc 保护的羟胺 (2a) 反应, 以形成中间体 (2b), 将其用二氯乙酸处理以形成 PAZAM 的氧代胺衍生物 (2c)。然后将 2c 与经醛官能化的寡核苷酸接枝, 以形成 2d。

[0351] 方案 2. PAZAM 的氧代胺衍生物衍生物的合成

[0352]



[0353] 实施例3

[0354] 聚合物包被

[0355] 玻璃基质/流动池上的 PAZAM 包被

[0356] 将 PAZAM 水溶液沉积于玻璃基质、塑料基质或硅基质上。然后接枝包被 (使用炔烃-官能化的寡核苷酸), 并将互补染料与接枝表面杂交。参见图 2A 和 2B。图 2B 中提供了典型的荧光扫描图像。然后使用不同浓度的引物 (炔烃寡核苷酸) 接枝聚合物, 以得到包含近似标准寡核苷酸引物密度 (~ 15000 条引物/ μm^2) 的四条泳道和较高引物密度 (~ 50000 条引物/ μm^2) 的四条泳道。引物密度的范围可为 $2500-1 \times 10^6$ 条引物/ μm^2 , 其取决于选择的接枝引物浓度 (图 2A)。

[0357] 对使用PAZAM包覆的HiSeq (Illumina) 玻璃流动池的Typhoon扫描在图3A中示出。使用逐渐升高浓度的引物(炔炔寡核苷酸)接枝聚合物表面,其显示可使用该技术达到的引物密度(引物/ μm^2)范围(图3B)。

[0358] 图4A示出了使用PAZAM旋涂的玻璃基质的Typhoon扫描。然后使用晶片制造大小适合基因组分析仪 (Genome-Analyzer, Illumina) 内部的流动池。如图2A和2B所述,然后使用逐渐升高浓度的引物(炔寡核苷酸)接枝聚合物表面,其显示可通过该方法在旋涂表面达到的引物密度(引物/ μm^2)范围(图4B)。

[0359] 流涂的PAZAM表面能够支持接种的DNA模板的扩增。图5A示出,从标准SFA通道(泳道1)中的模板生长的DNA簇与PAZAM包覆的通道中的DNA簇相同。使用cBot来生长簇。进行28个簇扩增([PhiX] = 1pM, 短模板, 80b.p.) 循环,然后进行SYBR Green染色。结果显示,该方法提供了能够支持桥式扩增的强力表面(图5B和图5C)。

[0360] 图6A和6B示出了旋涂的PAZAM表面上的DNA簇。这证实,旋涂的PAZAM表面能够支持接种的DNA模板的扩增,从而得到与标准SFA表面上观察到的簇相似的簇。使用Manteia (20 $\times$ 物镜, 1mJ暴露) 和SYBR Green染色得到了这些簇的典型图像(图6C)。

[0361] (N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基) 丙烯酰胺-丙烯酰胺) 共聚物 (PAZAM) 沉积

[0362] 材料和仪器

[0363] (3-氨基丙基) 三甲氧基硅烷 (97%) (APTMS) 和异丙醇 (分析级试剂) (IPA)、N,N,N',N',N''-五甲基二亚乙基三胺 (PMDETA)、硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4% w/v 溶液) 和抗坏血酸钠 (NaAsc) 购自Sigma Aldrich。制备50%的IPA水溶液用于洗涤。N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯 (磺基-HSAB) 购自WebScientific。内部制备了2%的(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基) 丙烯酰胺-丙烯酰胺共聚物 (PAZAM) w/v水溶液。在杂交炉中进行稀释,于35 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。内部制备了磷酸钾缓冲液 (10mM水溶液, pH=7) (KPi) 以及氯酸钠和柠檬酸钠溶液 (SSC)。使用Emitiech K1050X氧等离子体灰化器 (asher) 来进行流动池的清洗。将MJ Research PTC-200热循环仪 (MJ) 用于磺基-HSAB和PAZAM的溶液沉积。将UVP XX-Series UV Bench Lamp用于磺基-HSAB与PAZAM的光化学反应。将Ophir PD300-UV光电二极管传感器 (20pW-300mW) 用于监视在整个光化学反应中递送至流动池的UV能。

[0364] 方法

[0365] 将未加工的流动池 (Illumina) 放置于等离子体灰化器中,在100W下保持10分钟。然后通过蒸汽沉积将干净的玻璃基质硅烷化。将流动池的端口放置在于真空干燥器中的装有100 μL 纯APTMS的两个开放玻璃小瓶的顶部上。将干燥器放置在真空下,并于60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。从真空干燥器移除流动池后,将其放置于MJ上,并用KPi (10mM) 以75 μL ·分钟 $^{-1}$ 引发2分钟。然后将于10mM KPi中的21.1mM磺基-HSAB溶液以100 μL ·分钟 $^{-1}$ 流动2分钟。在室温下于黑暗中进行静止孵育1.5小时。然后分别用去离子水、50% IPA溶液和去离子水以100 μL ·分钟 $^{-1}$ 洗涤2分钟,确保流动池通道中没有引入气隙。然后将2%的PAZAM溶液以100 μL ·分钟 $^{-1}$ 流入通道中,为期1分钟,确保流动池通道中没有引入气隙。在移除MJ后,使用UV灯对流动池进行UV照射。UV源和流动池之间的距离为1cm。调节暴露时间以向每平方厘米面积流动池递送15J。然后分别用去离子水、50% IPA、去离子水和KPi (10mM) 以100 μL ·分钟 $^{-1}$ 洗涤流动池2分钟。然后通过于60 $^{\circ}\text{C}$ 下将于KPi (10mM) 中的炔炔寡核苷酸与PMDETA、硫酸铜和NaAsc (500mg·mL $^{-1}$ 水溶液) 反应30分钟从而将流动池官能化。通过用在炔炔引物5'端以荧光染料

官能化的序列互补寡核苷酸染色证实所述表面上存在炔烃寡核苷酸。

[0366] 结果

[0367] 在Typhoon Trio荧光扫描仪 (GE Healthcare) 上进行荧光检测。示出了显示沿通道 (图7A) 的中值强度的典型图像 (图7B) 和图表。

[0368] 在HiSeq 2.6mm流动池 (Illumina) 上完成 2×26 个循环的运行 (run)。第一碱基报告指示, 在所有泳道中都检测到簇 (参见图8A至图8C)。26个循环后在包覆有PAZAM的通道中仍然存在簇。结果还显示, 可在Illumina配对末端方案 (paired-end protocol) 中测序PAZAM簇, 以及52个循环 (即, 一对26个循环) 的返回数据。参见图8D至图8I。

[0369] 在固体基质上旋涂PAZAM

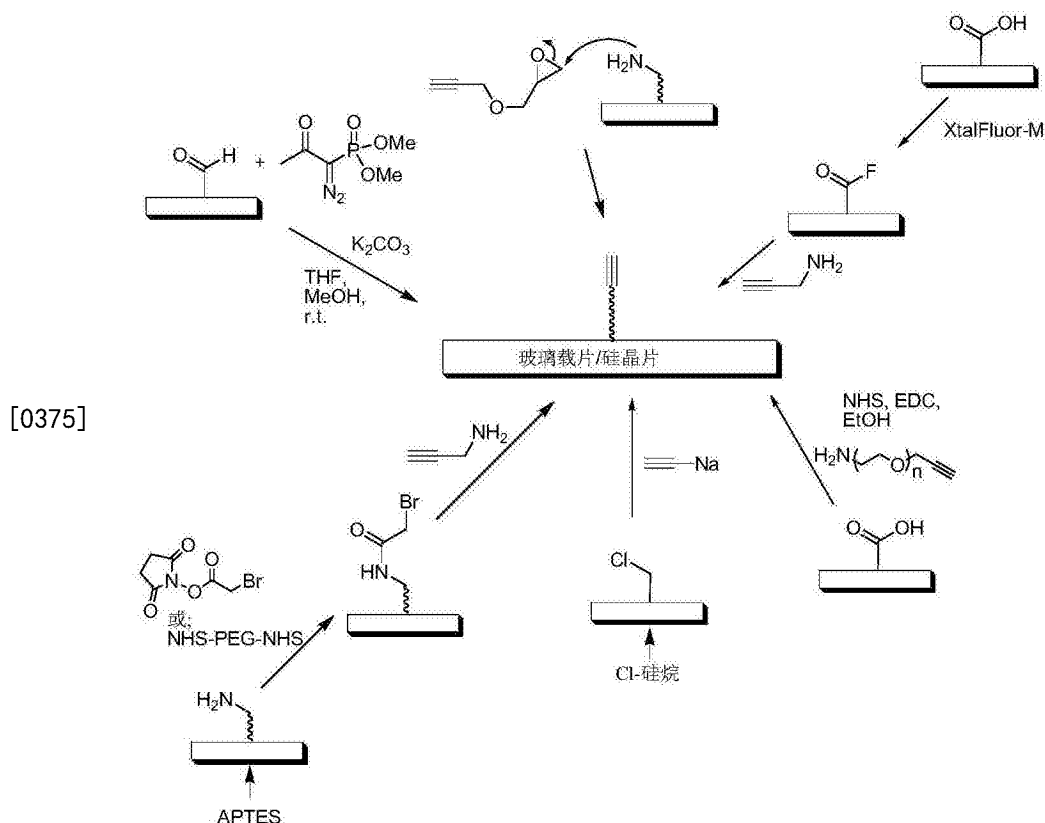
[0370] 在典型实验中, 首先通过在等离子体灰化器 (Emitiech K1050X) 中以100W灰化五分钟来清洁模式化的玻璃基质。清洁后, 通过将基质放置在包含处于开放小瓶中的0.5mL (3-氨基丙基) 三乙氧基硅烷 (APTES) 的真空干燥器中来将所述基质硅烷化。将干燥器放置在减压下, 并于60℃孵育一小时。在硅烷化后, 打开干燥器, 并取出基质。然后将基质面朝下放置于装有pH 7.0的10mM磷酸钾缓冲液 (KPi) 中的5mg/mL N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯 (SHSAB) 的皮氏培养皿 (petri dish) 中。于室温下放置一小时后, 用水漂洗基质, 并用氮气吹干。将基质放置于旋涂涂覆仪 (coater) 上, 并移取2%w/v PAZAM的水溶液至基质上。在旋涂后, 立即用365nm UV辐射 (UVP, 灯XX15L) 辐照基质30分钟。然后用水充分漂洗表面, 并用氮气吹干。在用盖玻片密封后, 然后通过于60℃下与于pH 7.0的10mM KPi (1.429mL) 中的炔烃寡核苷酸 (3×10^{-9} 摩尔) 以及N,N,N',N',N''-五甲基二亚乙基三胺 (PMDETA, 13.14μL, 6.3×10^{-5} 摩尔)、硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4%w/v溶液, 7.49μL, 1.2×10^{-6} 摩尔) 和抗坏血酸钠 (4.75μL 500mg/mL水溶液, 1.2×10^{-5} 摩尔) 反应30分钟来将表面官能化。通过用在5'端以荧光德克萨斯红染料官能化的序列互补寡核苷酸染色来证实所述表面上存在炔烃寡核苷酸。如图7A所示, 可通过在Typhoon Trio荧光扫描仪 (GE Healthcare) 上扫描来检测荧光信号。

[0371] 图9示出了用与互补荧光寡核苷酸杂交的炔烃寡核苷酸官能化的旋涂基质。深色指示旋涂聚合物层上存在寡核苷酸。

[0372] 实施例4

[0373] 炔烃官能化的表面的制备

[0374] 方案3. 建议的用于制备炔烃官能化的表面的合成路线



[0376] 如本文所述,可将多种官能团用于聚合物锁定。方案3示出了多种建议的用于制备炔烃官能化表面的合成路线。

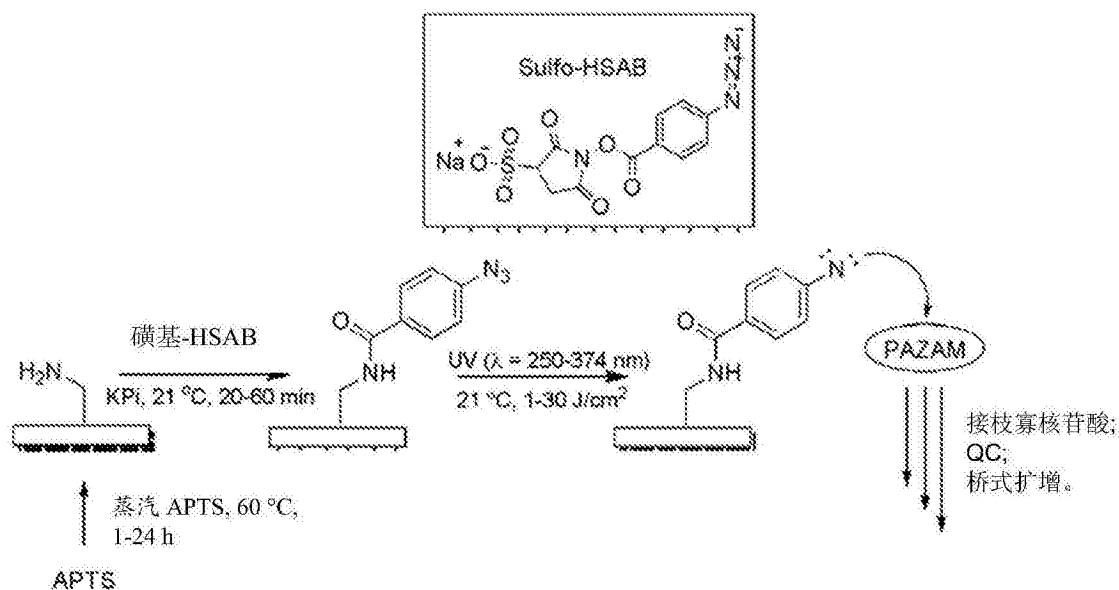
[0377] 一种替选方法涉及使用光活性偶联剂N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮基苯甲酸酯(磺基-HSAB)。磺基-HSAB是市售的双官能交联剂,其包含光活性芳基叠氮化物和活化的NHS单元。在暴露至UV光(~250nm至374nm)后,芳基叠氮化物产生氮烯,并释放氮气。该高反应性物质可经历多种快速插入反应。

[0378] 实施例5

[0379] 光活性表面的制备

[0380] 方案4.用于生成光活性表面的途径

[0381]



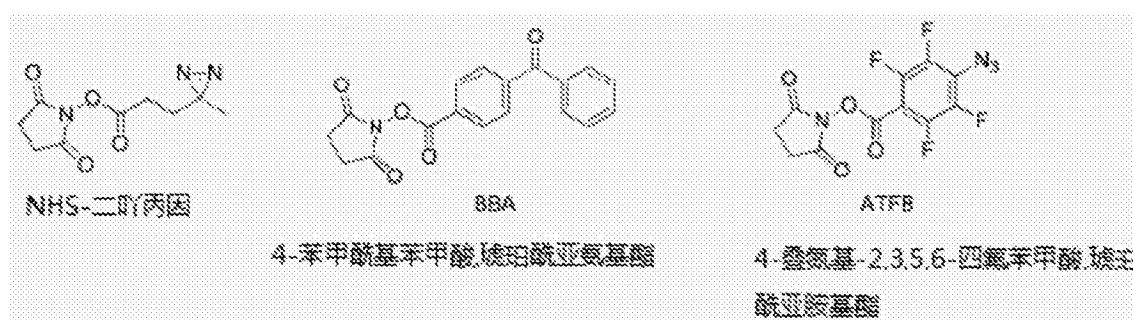
[0382] 方案4示出了用于制备光活性表面的途径。用APTS(甲氧基或者乙氧基硅烷)预处理表面,并烘烤以形成胺基单层(或多层)。然后将胺基与磺基-HSAB反应以形成叠氮基衍生物。在21 °C下用1J/cm²至30J/cm²能量进行UV活化,生成活性氮烯物质,其可容易地接受多种与PAZAM的插入反应。

[0383] 初始发现指示,该涉及使用光活性表面和纯化的PAZAM混合物的方法可用于包覆标准GA流动池(Illumina),并且可使用所得的包被来生长簇。此外,可在制备的光活性晶片上沉积(例如,通过旋涂、浸泡、浸渍、喷涂等)聚合物并得到相似的结果。已将如以上方案4所述来衍生的包覆的PAZAM混合物进行测序,并在下文中详述了运行的概要信息。

[0384] 可选的交联剂

[0385] 除了磺基-HSAB外,还筛选了三种其他的交联剂的光稳定性和效力,并将其与磺基-HSAB进行比较。

[0386]



[0387] 使用标准方法流程用GA流动池(Illumina)筛选可选的交联剂。受试的交联剂包括磺基-HSAB、二吡丙因、BBA和ATFB。在20 °C下于约20mM浓度的DMF中进行偶联反应。APTES沉积后,用20mM各交联剂的水/DMF溶液处理氨基硅烷官能化的流动池的可选泳道。以和磺基-HSAB对照通道相同的时间来孵育这些通道。在连续洗涤后,进行PAZAM包覆和UV暴露,以将聚合物锁定至表面,将泳道与我们的标准引物寡核苷酸接枝,并用互补荧光寡核苷酸序列进行染色。德克萨斯红杂交后的结果归纳于图10A和10B中。

[0388] 通过使用Typhoon成像仪测量经杂交的互补寡核苷酸的荧光信号来评估三种可选交联剂的性能。结果很明显,测量的表面引物密度低于对于磺基-HSAB所记录的密度的一半。对于任何这些光活性交联剂(包括磺基-HSAB),可潜在地热触发与包覆的聚合物形成共价连接的插入机制。

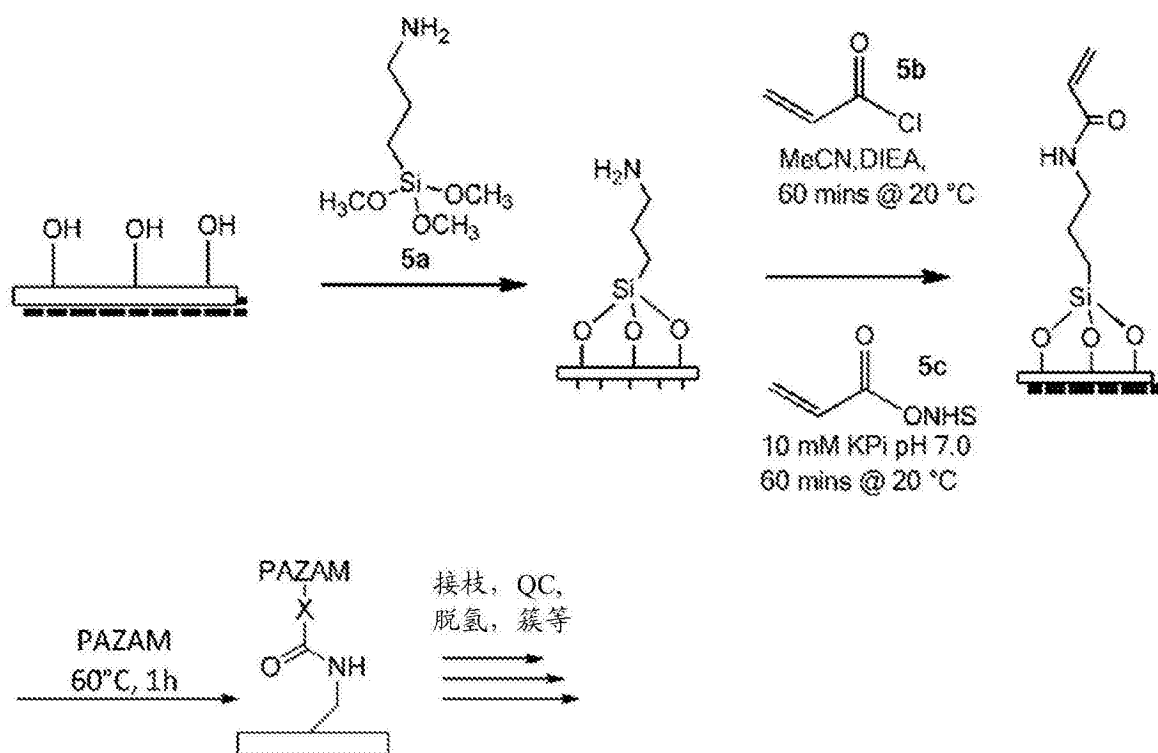
[0389] 实施例6

[0390] 不饱和表面的制备以及PAZAM的热交联

[0391] 用于聚合物锁定的另一个备选方法是PAZAM的热交联,其包括用不饱和基团如烯烃将基质表面官能化。方案5示出了一些用于生成烯烃官能化表面的合成路线。

[0392] 方案5.用于生成丙烯酰胺官能化表面的途径

[0393]



[0394] 首先用3-氨基丙基三甲氧基硅烷 (APTMS) (**5a**) 处理基质表面,以形成胺官能化的表面。然后将胺官能团与丙烯酰氯 (**5b**) 或活化的丙烯酰NHS酯 (**5c**) 反应。接着,通过将1%至2%的PAZAM水溶液泵送至流动池中,或将其旋涂于开放的玻片上来把PAZAM引入至不饱和表面。存在于泵送至流动池中的水溶液中的PAZAM的量可为例如0.1%至10%。以升高的温度孵育基质,一般是 60°C 。在该方法中,PAZAM上的叠氨基与表面上的不饱和烯基反应。在该方法中可涉及不同的机制,如Krülle等, *Tetrahedron: Asymmetry* (1997), 8:3087-3820中所提示的,其通过引用整体并入本文。

[0395] 在用水或水性缓冲剂洗涤以除去未反应的过量PAZAM后,可将表面与核酸引物接枝。可在所有其他下游处理(例如,QC或簇生长)中使用标准技术。该表面与通过UV活化锁定的聚合物具有相似的性能特征。例如,可将其与不同浓度的接枝引物接枝,以达到不同引物密度。还可对其进行脱水、干燥储存以及再水化,保持活性表面通量(参见图12)。

[0396] 实施例7

[0397] 成簇聚合物包被的应用以及测序

[0398] 在图8A至8I中,使用PAZAM包覆的HiSeq流动池(Illumina)完成 2×26 个循环的运行。第一碱基报告指示,在所有泳道中都检测到簇。此外,26个循环后仍然存在PAZAM簇。PAZAM簇完成配对末端读取,并返回完整的52个循环(即,一对的26个循环)的数据。

[0399] 通过热交联方法制备的聚合物包覆的表面还可对使用如本文描述的标准方法进行簇生长和测序有效。图13A示出了在Hi-Seq(Illumina)上成像的、以PhiX V3作为模板的热交联表面上的簇生长。图13B示出了从使用常规测序化学、在Hi-Seq上运行的 2×26 个循环得到的测序度量。

[0400] 实施例8

[0401] 模式化的聚合物包被的应用

[0402] 除了包覆常规的流动池外,还可使用生成光活性层来形成模式化的表面。微织造技术通常可用于制造惰性或钝化(passive)材料“海”中的氨基官能化“岛”。

[0403] 如同磺基-HSAB的芳基叠氮化物可位于氨基芯上以制造模式化的光活性层。用如同PAZAM的聚合物混合物包覆该表面,然后进行UV暴露和后续洗涤,形成聚合物模式化的阵列。所述方法在图11A中示出。

[0404] 背景区不含任何光偶联的聚合物,因为交联剂仅位于小块(patch)中。将自由基插入反应限制于表面的单层中以使不受控制的自由基增长最小化。还可容易地从市售的起始材料获取用硅烷和磷酸盐单元官能化的芳基叠氮化物,使得能够锚定于各种小块类型(参见图11A)。通过使用具有裸玻璃特征和金间隙区(图11B)的载片观察到官能化特征小块中的优先聚合物沉积。右图示出Mantecia荧光图像,并且左图示出载片的Typhoon图像,较深色的区域指示增加的聚合物包被。

[0405] 类似地,热交联方法还使得能够在下层的官能层被模式化时形成模式化的官能聚合物小块。例如,可使用常用的平板印刷技术制备模式化的氨基硅烷小块。通常,这涉及用保护剂包覆基质,暴露保护剂然后显影保护剂,以在基质上形成裸小块。然后用硅烷官能化裸小块,接着移除保护剂块,并留下氨基官能化基质的小块和非官能化基质的大间隙区。然后可如方案5所示用不饱和的烯基官能化这些贴剂,接着用PAZAM孵育。所得的表面包含预定网格状PAZAM小块,这可支持在限定的模式阵列上进行簇生长。在图14中,示出了按如上文所述制备的表面支持选择性地在模式化区域上进行桥式扩增。特征是直径450nm,间距1.4 μ m。使用Illumina V3 PE cBot试剂盒以及1pM人DNA模板来进行簇生长。扩增后用Sybr gree对表面成像。

[0406] 可使用的用于制造模式化表面的其他方法包括例如在美国系列号13/492,661和13/661,524中所描述的那些,其中每一篇都通过引用并入本文。

[0407] 实施例9

[0408] 用PAZAM包覆珠子

[0409] 可使用多种方法将聚合物包被施用于珠子。本文描述的一种方法包括使用UV可活化表面,用于聚合物锁定。实施例11中描述的备选方法包括使用烯烃或丙烯酰胺官能化表面,用于聚合物的热交联。在该热基方法中,一般在用烯烃或丙烯酰胺基官能化后,将珠子暴露于包含聚合物抑制剂(例如,BHT、二乙基羟基胺或TEMPO等)的洗涤溶液。可通过进行该步骤来防止由于烯烃或丙烯酰胺基的过早聚合而导致珠子聚集。

[0410] 在珠子上包覆PAZAM后,洗涤珠子以去除未结合的过量PAZAM。洗涤后,PAZAM层为

约20nm厚。然后通过使PAZAM上的叠氮基与5'炔基修饰的寡核苷酸反应来将珠子与引物接枝(P5/P7混合物)。还可使用替选的接枝化学,包括但不限于:将聚合物中的胺基与5'-NHS修饰的寡核苷酸反应;将聚合物中的氧代胺基与5'-醛修饰的寡核苷酸反应以形成肟;将聚合物中的巯基与5'-马来酰亚胺修饰的寡核苷酸反应;烯烃交叉复分解反应(在复分解催化剂的存在下将聚合物和5'-修饰的寡核苷酸的末端烯基反应);将聚合物中的胺基于5'-氰尿酸氯修饰的寡核苷酸反应等。然后可洗掉未与珠子上的PAZAM接枝的过量引物,在其上留下具有PAZAM-寡核苷酸层的珠子。

[0411] 可使用一些方法在施用于基质表面之前对聚合物包覆的珠子进行质量控制。一种方法是直接用染料(例如Dylight488 Phosphine)染色PAZAM。另一种方法是用染料标记的PAZAM上的寡核苷酸的反向互补物接枝寡核苷酸。可通过流式细胞术来测量标记的珠子,或将标记的珠子投影在表面上,然后通过光学显微镜(包括荧光显微镜)进行分析。此外,可在破坏性测试中使用小份的珠子以评估珠子将如何在测试中进行。一个实例是将小份珠子加载至基质上,进行测试,并确定是否大量的珠子足够良好地用于加载多个阵列。

[0412] 可使用不同类型的可蚀刻基质来加载珠子,例如,硅、塑料(Zeonor®)以及含有添加剂(例如SiO₂或炭黑)的塑料。图15示出了通过将PAZAM包覆的珠子加载至干净的Zeonor载片上制备的模式化PAZAM阵列。

[0413] 使用聚合物包覆的珠子制备模式化阵列存在一些优点。首先,珠子方法成本高效且节省时间。与包覆和接枝流动池的常规方法相比,珠子加载方法使得能够制备具有高密度的阵列表面。一种示例性的常规方法使用将不同试剂递送至流动池的装置,并且使流动池温度受到控制,这导致仅部分的泵送引物被接枝,造成大量浪费。此外,本文描述的珠子加载方法比常规方法快得多,并且允许大规模的商用应用。

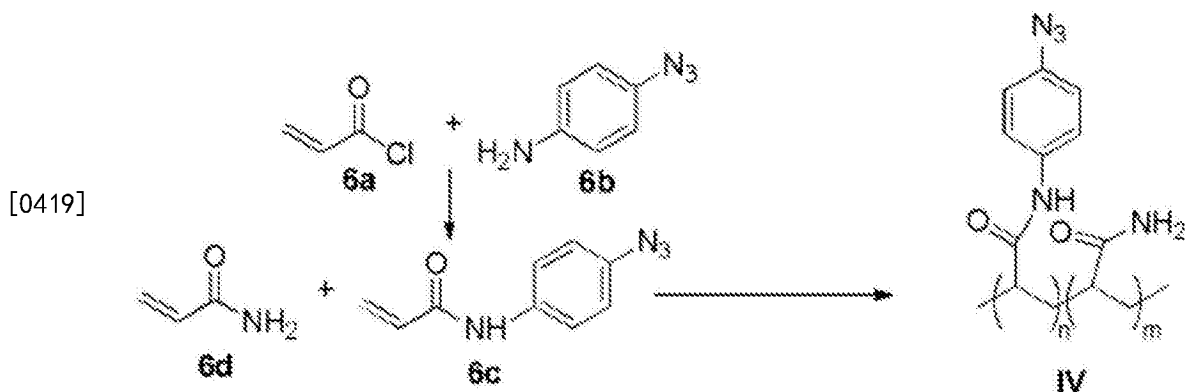
[0414] 实施例10

[0415] 光活性聚合物

[0416] 本文公开了能够支持桥式扩增以及后续的边合成边测序(SBS)化学的替选水溶性聚合物的使用。此外,可使用多种不同技术容易地将所述聚合物施用至表面。特别地,可在施用至表面之前完全特征化的线性聚合物的开发对限制表面包被的的质量的潜在变化是有益的。此外,本文描述的方法包括使用替选包覆策略(包括浸渍、喷涂和旋涂聚合物)的能力。

[0417] 方案6示出了可使用市售起始材料制备的线性聚合物的制备。可使用所述聚合物来(以可控方式)包覆玻璃晶片和硅晶片,以在制造成流动池之前充分地特征化溶液聚合物和所包覆的晶片。该方法还允许合适地官能化一个或两个流动池表面。

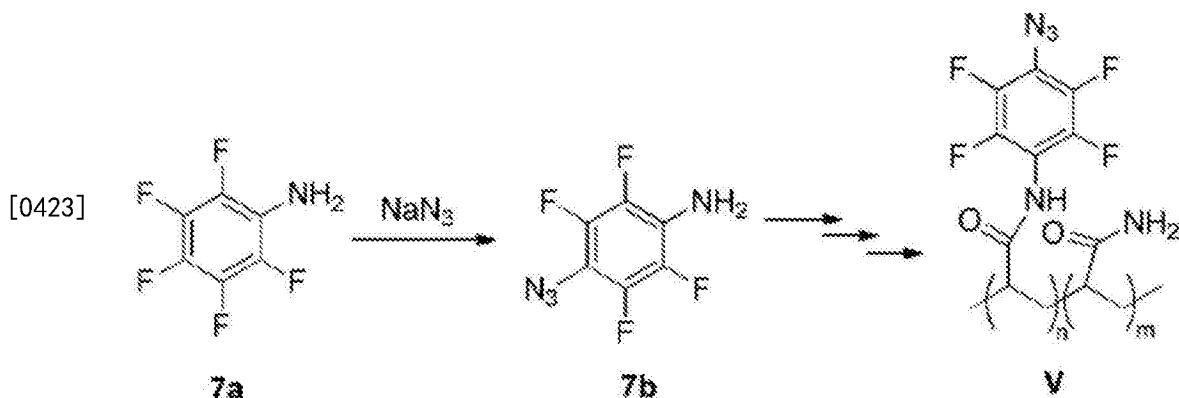
[0418] 方案6. 光活化线性聚合物的合成



[0420] 可使用传统溶液-相技术进行大规模聚合。可使用与现有用于制备PAZAM的方法类似的自由基聚合来聚合丙烯酰胺和新单体6c(通过简单的一步法来合成)。

[0421] 一种改造涉及使用全氟芳基叠氮化物(Keana, J.F.W.; Cai, S.X. New Reagents for Photoaffinity Labeling: Synthesis and Photolysis of Functionalized Perfluorophenyl Azides. J. Org. Chem. 1990, 55, 3640-3647), 其公开内容通过引用整体并入本文。这些物质显示出在生成氮烯后接受环扩增的下降趋势。结果, UV触发的反应由于不形成插入产物而更干净。

[0422] 方案7. 用于制备光活性聚合物的全氟芳基叠氮化物单体的合成



[0424] 早在1969年就报道了使用芳基叠氮化物作为标记试剂。(Fleet, G.W.J.; Porter, R.R.; Knowles, J.R. Affinity Labeling of Antibodies with Aryl Nitrene as Reactive Group. Nature 1969, 224, 511-512), 其公开内容通过引用整体并入本文。在本申请中开发了这些官能团的双反应性; 其在1,3-二极环加成(用于接枝寡核苷酸)中作为伴侣, 并且在UV触发生成单氮烯物质后作为光偶联剂。使用UV-活性的单体的优点是该反应“干净”(仅插入产生)、具化学选择性且被定位, 其聚合物环境提供了大量可插入键。

[0425] 该方法消除了进行沉积后的任何官能化步骤的需要。一旦用预接枝的聚合物包覆后, 可切割晶片、附着盖片并进行QC步骤以确定/证实有效表面引物的数量。

[0426] 然后分离纯化的批次, 使用例如铜催化的Huisgen 1,3-环加成在溶液中将一部分(约~80%)进行接枝(图16: 途径2)。然后可将经接枝的聚合物与未反应的物质重新合并, 以提供包含配对末端引物以及能够锁定至晶片表面和邻近聚合物链的光活化基团的聚合物混合物(参见图16)。

[0427] 该光耦合方法改进了聚合物支持簇生长和测序步骤的稳健性。前面的工作已经示出动态的无硅的丙烯酰胺混合物能够支持SBS, 但是在集簇和测序期间变得更加明显后表

现出微弱可见的不期望的“褶皱”。使用本文公开的光耦合方法可改进聚合物对晶片的锚定,同时降低过度的柔韧性,并保持可接近接枝引物。

[0428] 实施例11

[0429] 使用热交联用PAZAM包覆珠子

[0430] 从Fishers, IN的Bang's实验室得到作为10wt.%固体悬液的二氧化硅珠子(PN SS04N/9348,但是注意,可以相似方法使用许多其他珠子组成和尺寸)。将1ml (10mg)的小份转移至1.5ml eppendorf管。用台式离心机(5000rfu)离心该管30秒,以将珠离心至管底部。通过吸取来去除溶液。然后,向管中添加1ml乙腈(Aldrich PN 34967),将管涡旋30秒,以使悬液均质化,接着再次离心至管底。将该过程重复5次,以更换溶剂。最后,通过吸取去除最后的溶剂(在将珠离心至管底后)。

[0431] 在单独的15ml管中添加5ml乙腈和100 μ l 3-丙烯酰胺基丙基三甲氧基硅烷(Gelest PN SIA0146.0)。将该溶液涡旋15秒以混合溶液。然后,向溶液中添加聚合抑制剂以防止过早聚合:将2 μ l N,N-二乙基羟基胺(Aldrich PN 471593)添加至2ml硅烷溶液中使抑制剂浓度为1000ppm。然后,将1ml具有抑制剂溶液的硅烷溶液添加至珠子。将管涡旋30秒以使珠子悬液在硅烷溶液中均质化。然后在烘烤混合仪上于室温将珠子与硅烷反应30分钟。接着离心珠子的管,以将珠子离心至管底,并通过吸取去除溶液。然后以与上文所述相似的方式将珠子经溶剂交换至包含1000ppm N,N-二乙基羟基胺聚合抑制剂的乙腈中。

[0432] 在硅烷化后,将珠子经溶剂交换至包含1000ppm聚合抑制剂的乙醇中(通过5次连续的离心、吸取和添加新溶剂)。然后,将珠子经溶剂交换至包含1000ppm聚合抑制剂的丙酮中。最后,通过吸取去除剩余的丙酮(对珠子进行离心后),用通过橡胶带固定的kimwipe擦拭纸盖住珠子的管,以确保干燥的珠子不逸失至排空室中。然后将珠子放置于预热至40℃的真空炉中,并使其接受内部真空(约27托)1小时。然后从真空炉移除珠子,并添加1ml包含1000ppm聚合抑制剂的HPLC级水。然后通过涡旋30秒将珠子悬液均质化。

[0433] 在单独的1.5ml eppendorf管中,添加10 μ l来自先前步骤的珠子的水性悬液。然后,向珠子添加1ml于HPLC级水中的1.0wt.%的PAZAM聚合物溶液。通过在台式涡旋仪上涡旋20秒将溶液均质化,接着以7000rfu离心90秒以得到珠子。然后通过吸取移除PAZAM聚合物溶液。接着,向珠子添加1ml 2.0wt.%的PAZAM溶液,并通过在台式涡旋仪上涡旋20秒将溶液均质化。然后,通过使管在60℃反应1小时,将PAZAM热接枝至硅烷。将PAZAM热接枝至珠子后,于室温下用5 $\times$ 1ml HPLC级水洗涤珠子(使用如上文所述的溶剂交换方法),接着用3 $\times$ 1ml预热的(约40℃)HPLC级水洗涤。将珠子稀释至100 μ l HPLC级水中,以制成10wt.%固体悬液。

[0434] 使用标准寡核苷酸合成方法分开合成(或者可选地,从寡核苷酸合成供应商购得)具有5'炔基官能团的P%和P7寡核苷酸。将寡核苷酸溶液提供为于HPLC水中的100 μ m溶液。

[0435] 按以下方法进行炔基官能化的寡核苷酸与叠氮基官能化的PAZAM的接枝。向小份的100 μ l 10wt.%固体的PAZAM接枝的珠子溶液中添加800 μ l pH 7.4的1 $\times$ PBS缓冲剂以及100 μ l寡核苷酸溶液。以温和的鼓泡氮气流量用氮气对该溶液鼓泡10分钟。然后添加2 μ l纯PMDETA(Aldrich PN 369497)。接着,随后添加17 μ l 160mM硫酸铜水溶液(Aldrich PN C2284)。通过涡旋20秒将溶液混合,这时其变为紫色。最后,添加25 μ l于HPLC水中的40mg/ml抗坏血酸钠溶液(Aldrich PN A7631),并且在通过涡旋20秒而混合后,溶液变蓝。将溶液于

60℃下反应1小时。然后离心珠子,并通过吸取移除反应溶液。以前文所述相似的方式(使用5×1ml缓冲剂洗涤来交换溶剂)将珠子洗涤至1×PBS缓冲液(pH 7.4)中。

[0436] 然后将寡核苷酸官能化的珠子加载至以1.2微米孔官能化的空微阵列载片上。按US 6,770,441所述制备载片。按以下方法加载珠子:通过于室温下将包含小井的盖片浸渍于0.1N NaOH中5分钟来预清洁所述盖片,然后用流动的HPLC级水(约100ml)进行强力洗涤,并在氮气流下干燥。接着,向100μl珠子溶液中添加10μl 200度(proof)的乙醇(Aldrich PN E7023)。然后,将载片放置在预热至40℃的真空炉中,并使所述载片蒸发30分钟。通过轻柔地手动施用乙醇饱和的kimwipe擦拭纸来从显微镜盖片表面去除剩余的珠子。

[0437] 向用该方法制备的一张载片上添加于5×SSC缓冲液(Aldrich PN S6639)中的10μM 5'-染料标记的(优选Cy5标记的)寡核苷酸溶液,其中的寡核苷酸与固定至PAZAM接枝的珠子的寡核苷酸反向互补。然后用玻璃盖玻片覆盖该载片。使载片于室温下杂交30分钟。然后移除盖玻片,并用大量的流动5×SSC缓冲液(约100ml)洗涤载片。最后,向载片添加100μl 5×SSC缓冲液,然后盖上盖玻片,并在GE Typhoon FLA 9500上,于设定为500PMT设置的Cy5染料通道扫描来对载片进行成像。

[0438] 向用该方法制备的另一载片添加橡胶垫圈以及在玻璃中的合适位置预钻有小孔的另一显微镜载片,以使得能够经Illumina HiSeq测序仪引入液体。然后按照制造商的针对HiSeq 2000的说明书(Illumina Inc., San Diego, CA),将DNA簇在载片上生长并对簇进行测序。该载片显示能够对每簇测序多至150bp的样品DNA。

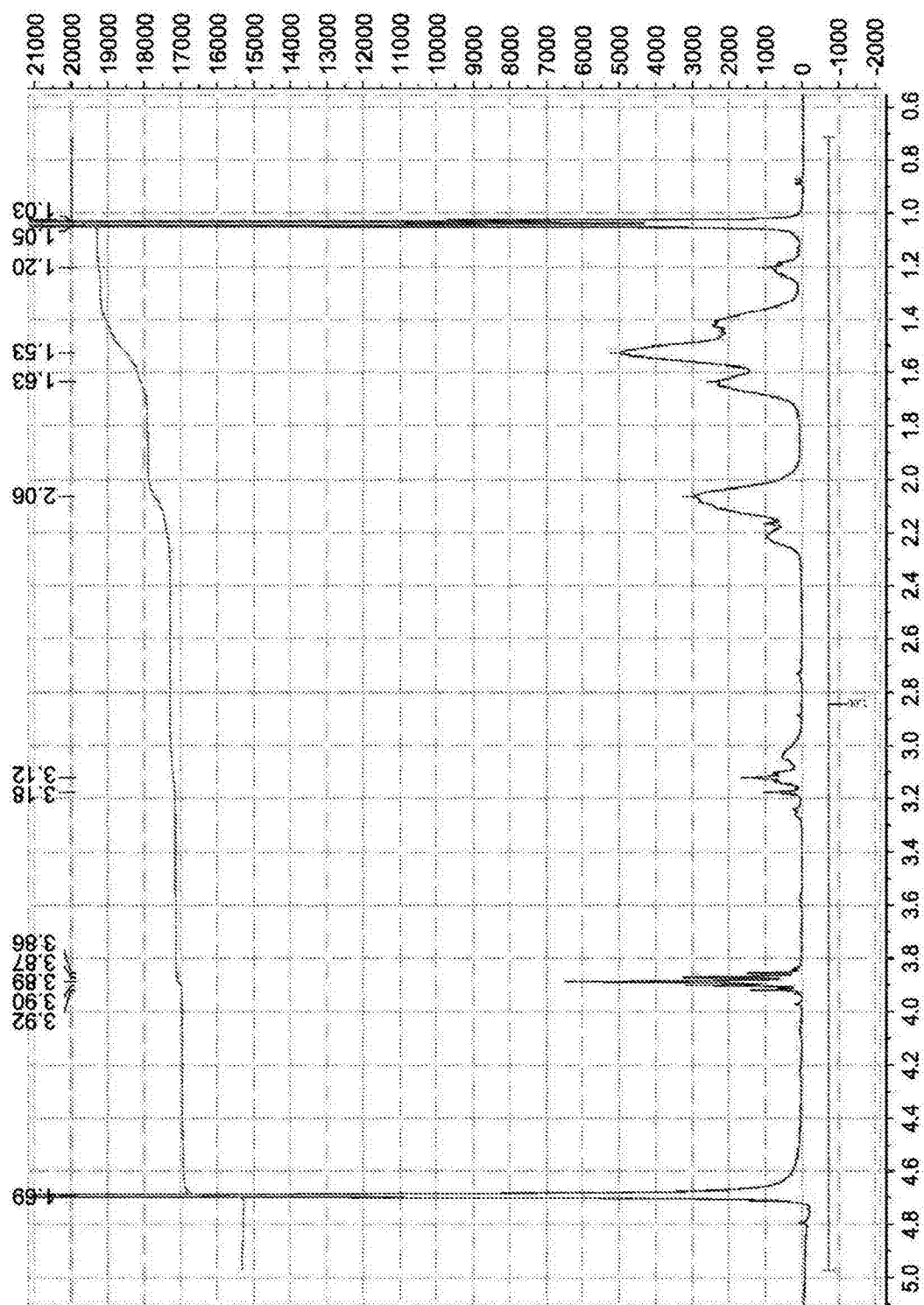


图1A

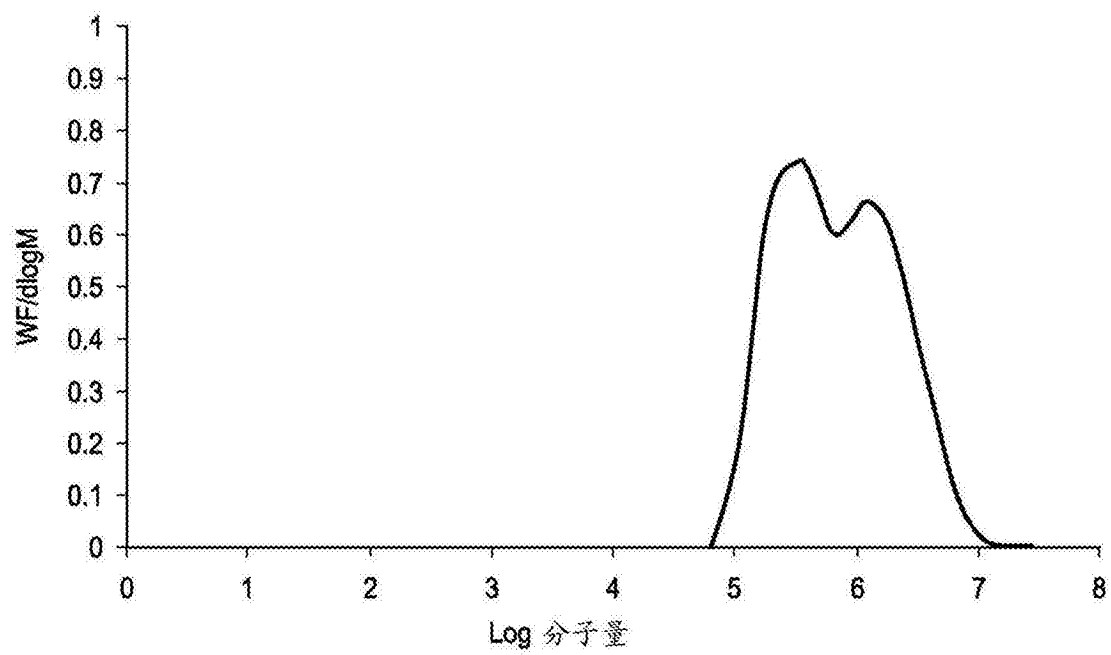


图1B

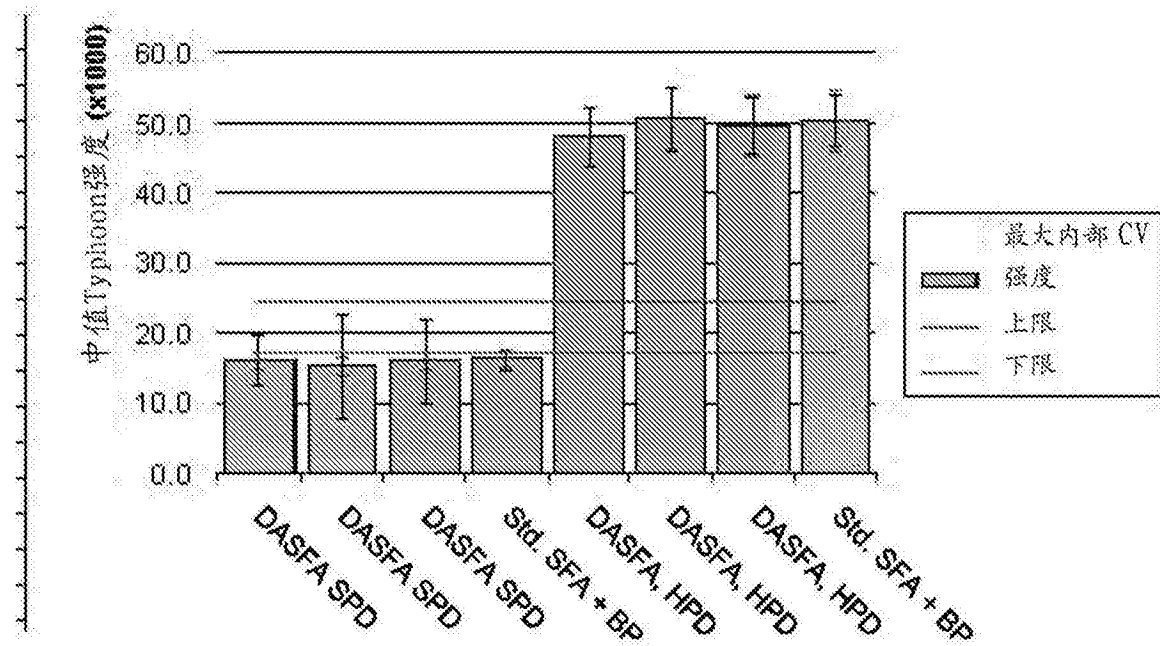


图2A

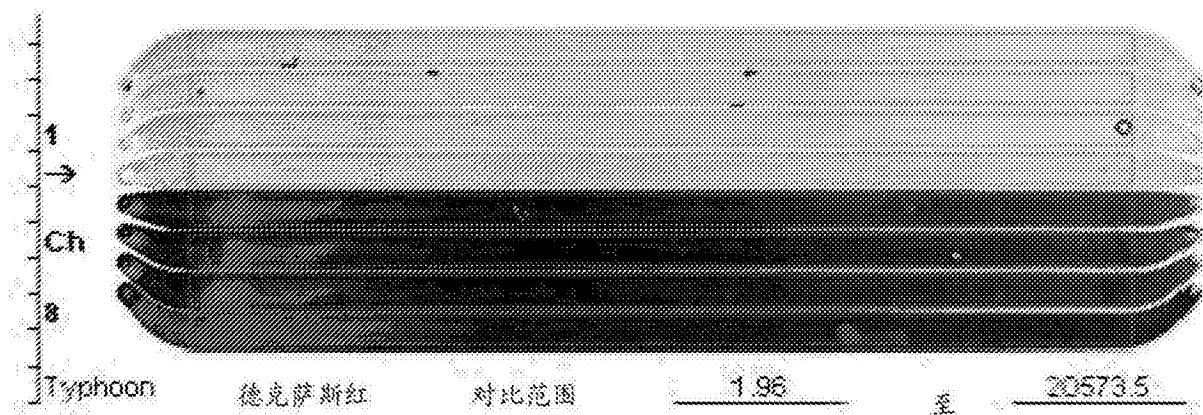


图2B

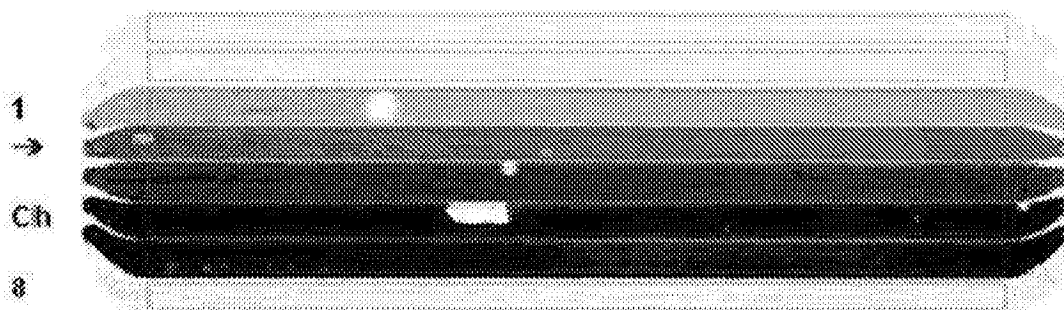


图3A

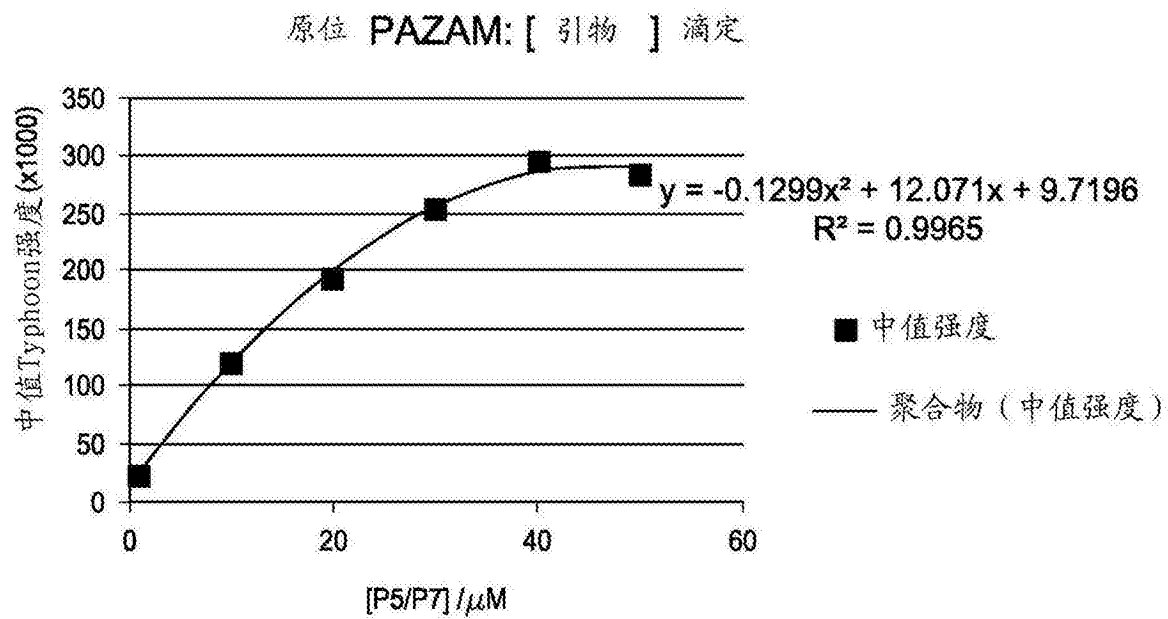


图3B

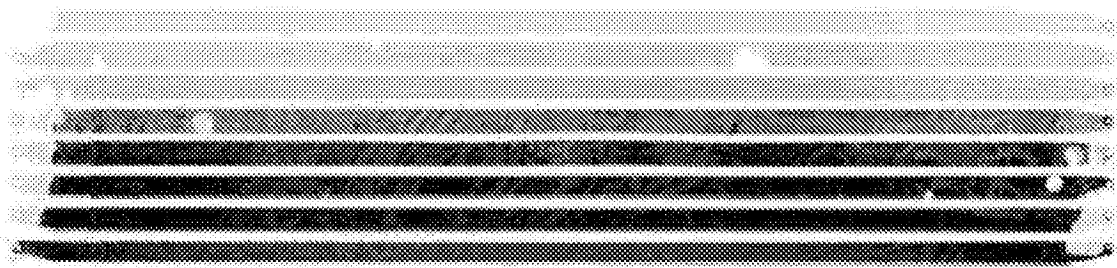


图4A

旋涂的 PAZAM: [引物] 滴定

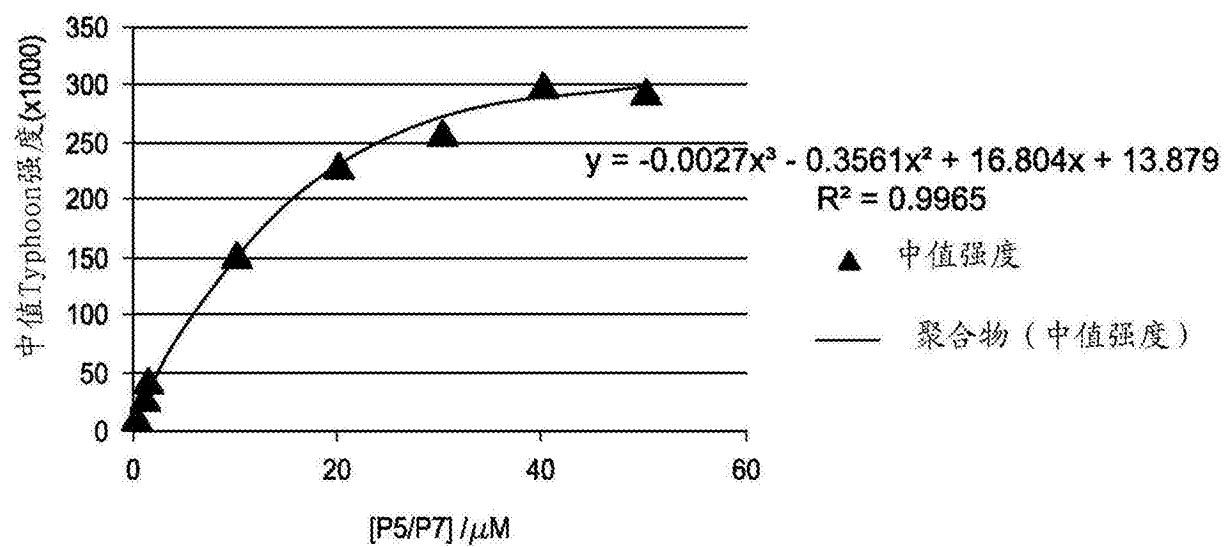


图4B

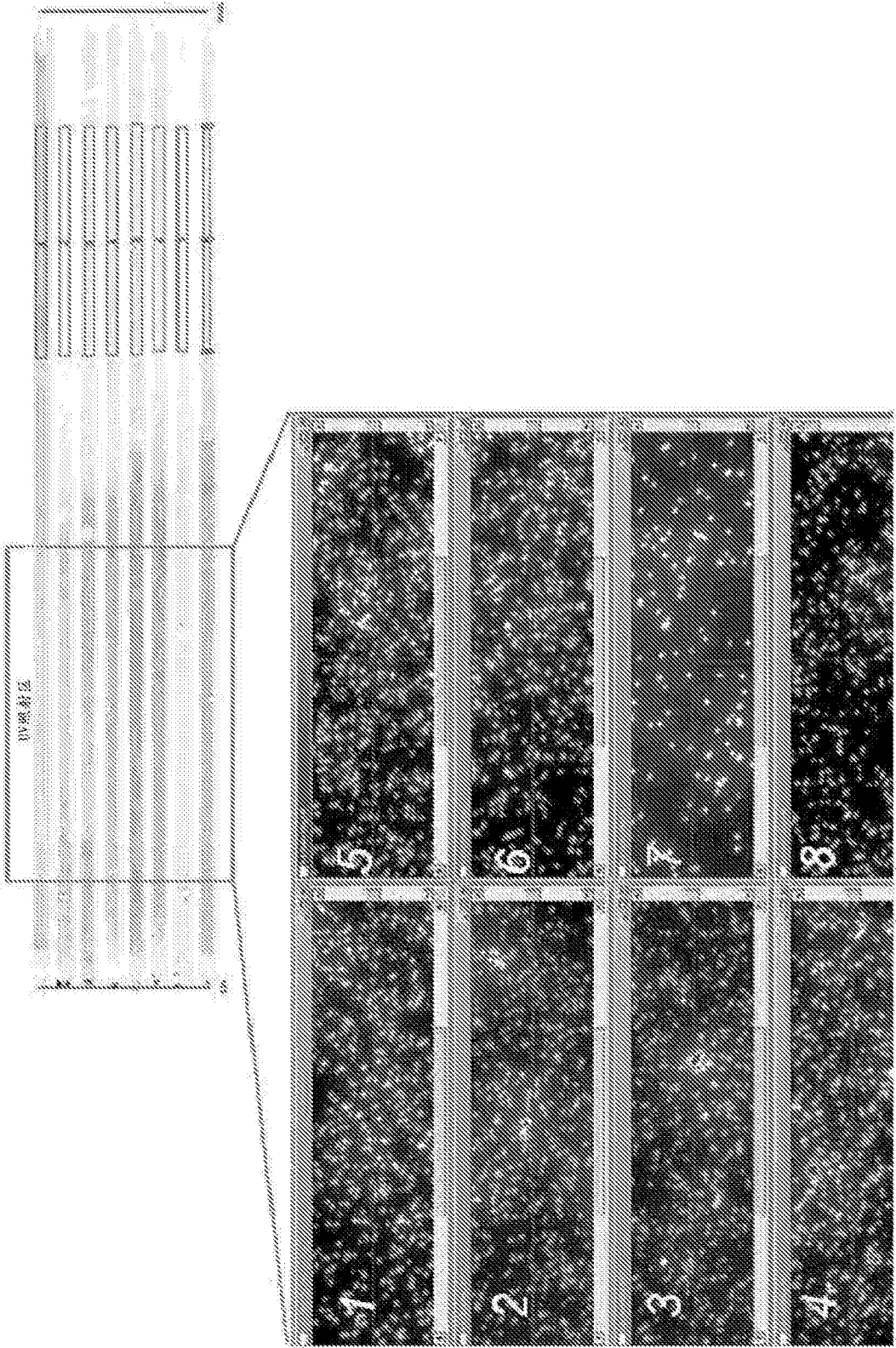


图5A

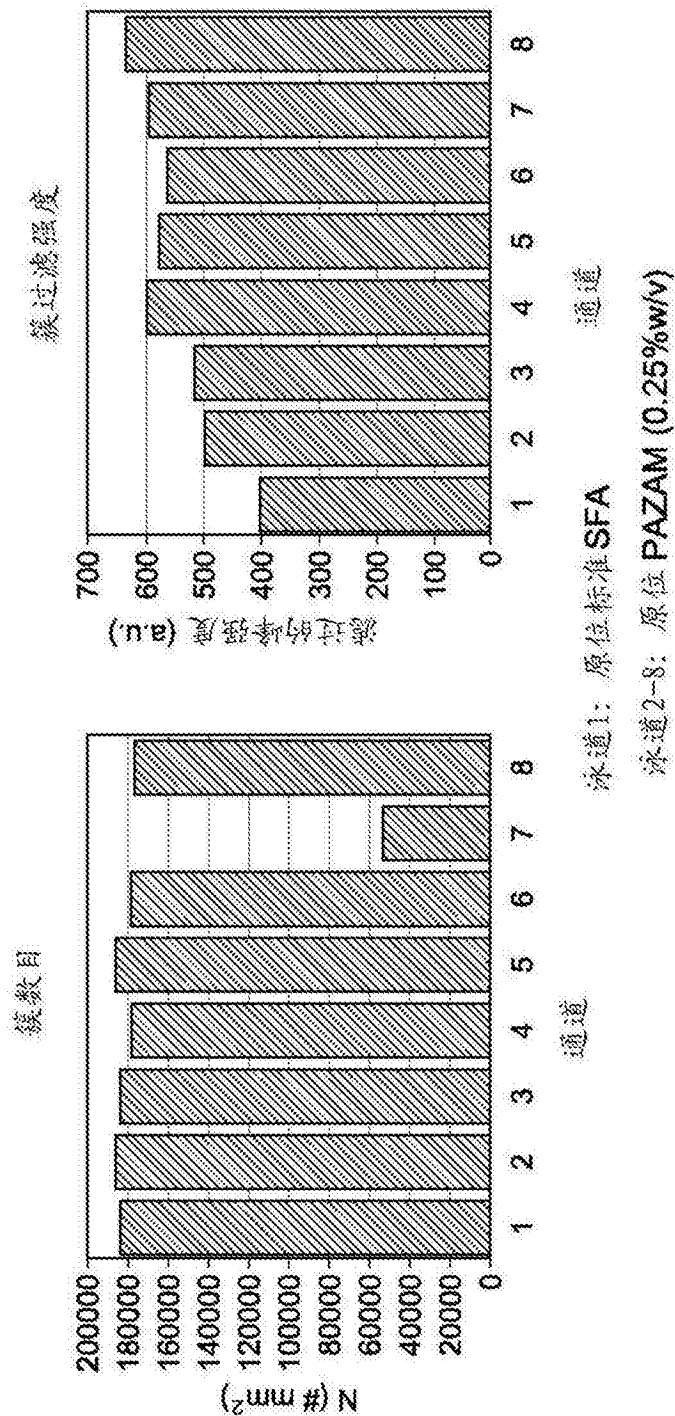


图 5B

图 5C

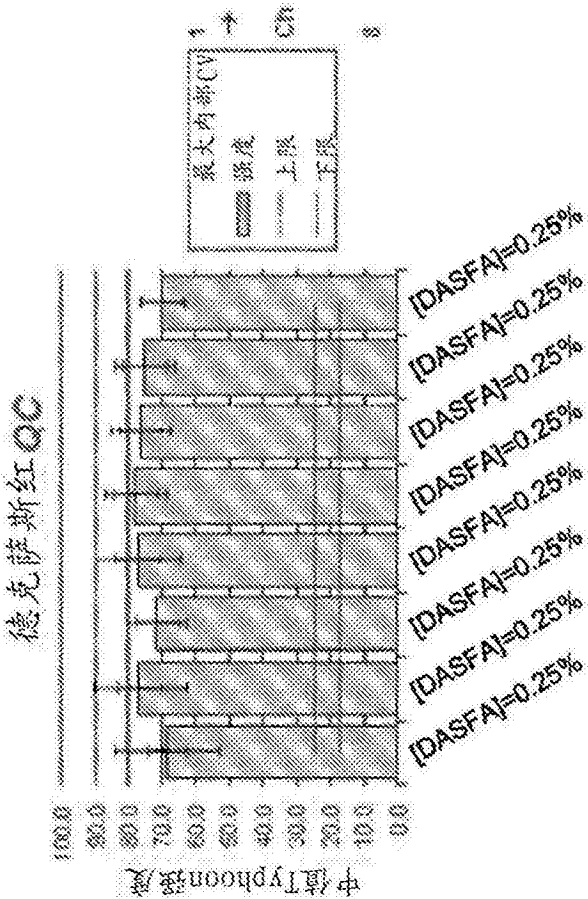


图6A

Typhoon 荧光图像: 与互补的含有染料的
寡核苷酸序列杂交的表面

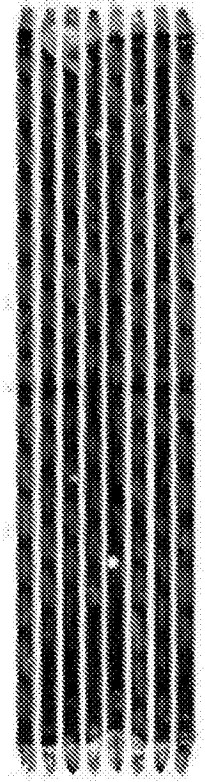


图6B

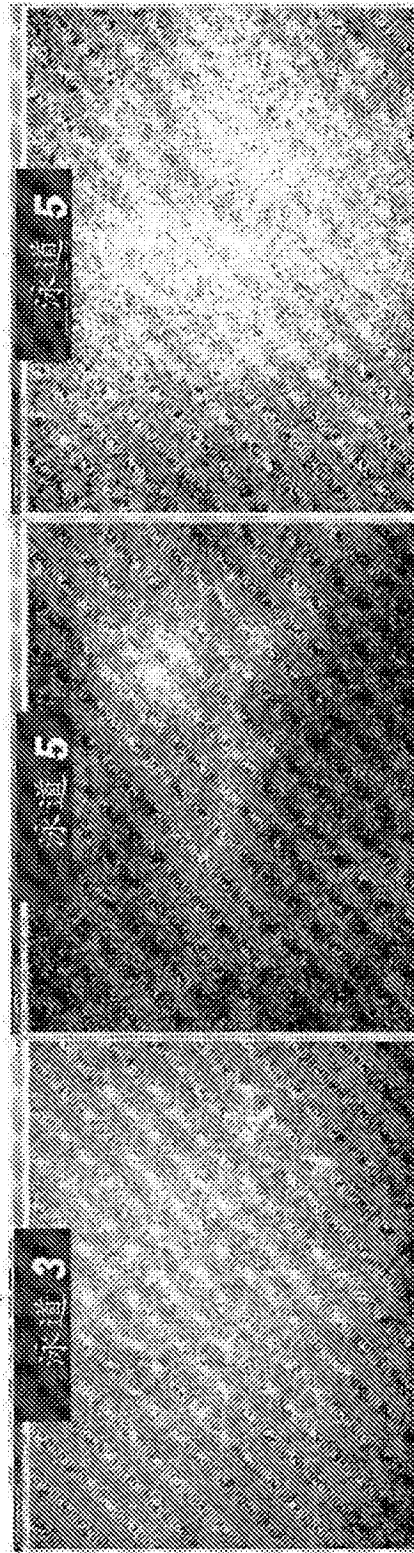


图6C

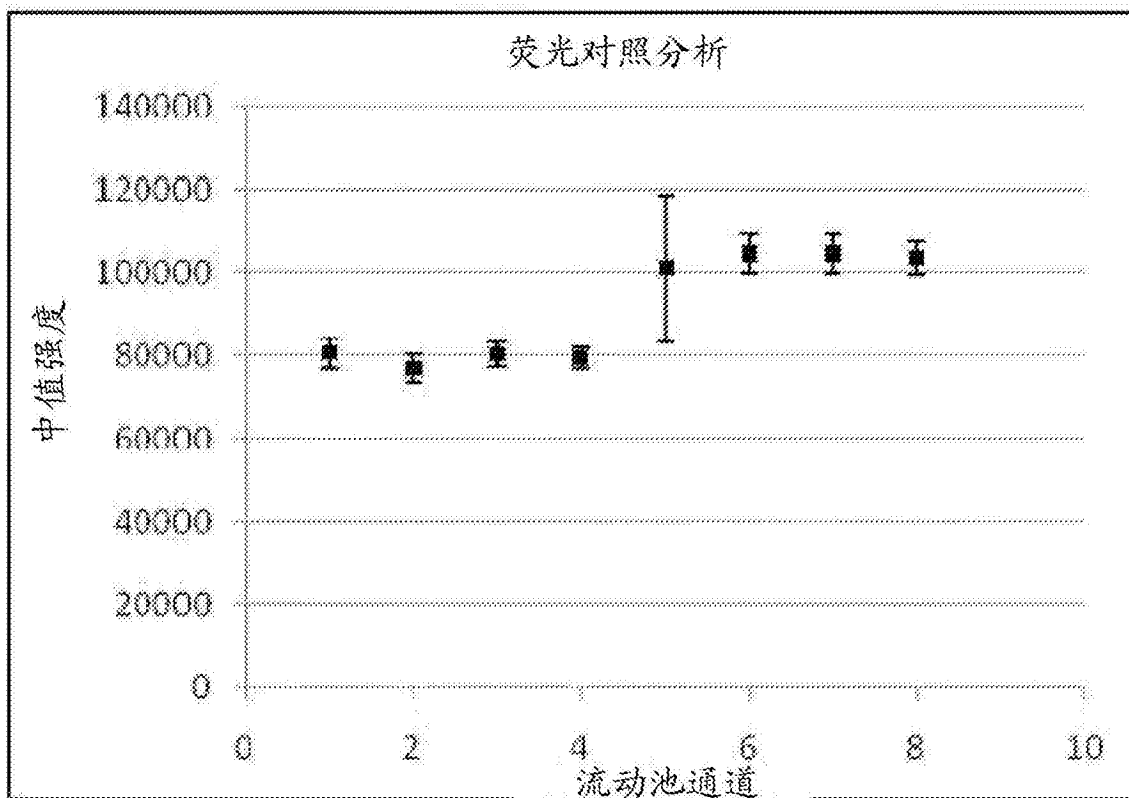


图7A

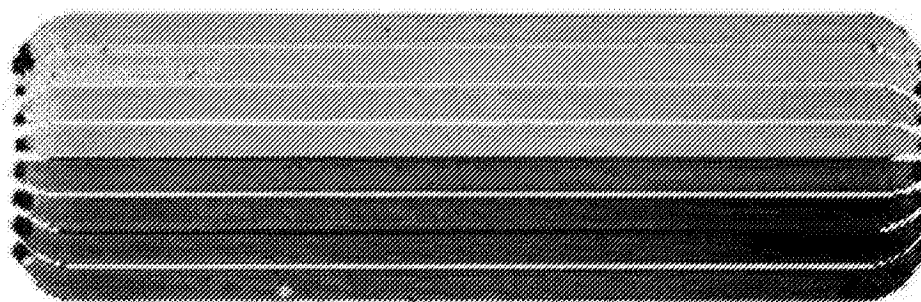


图7B

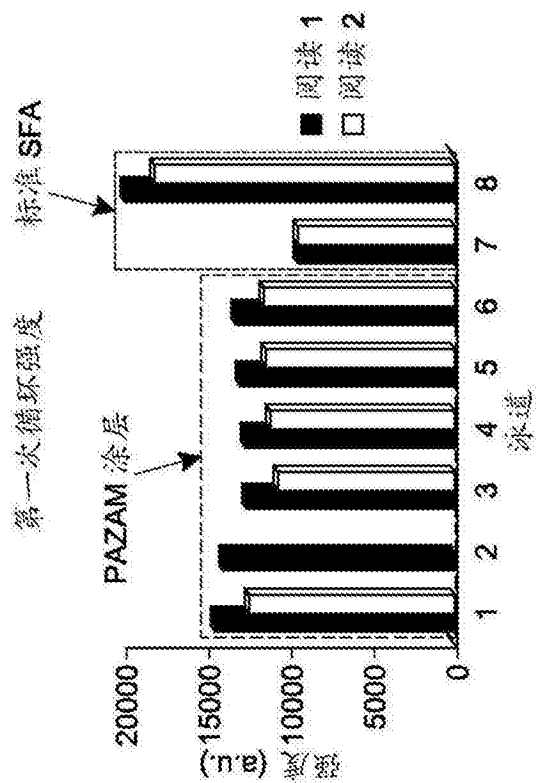


图8A

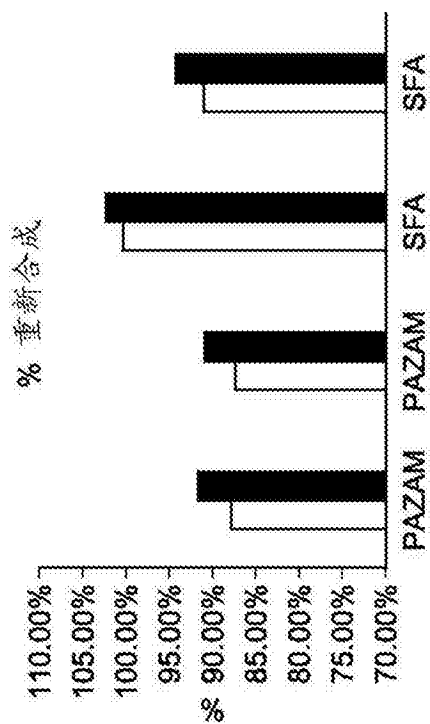


图8B

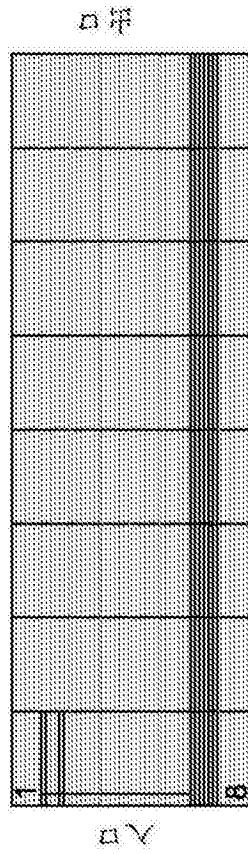
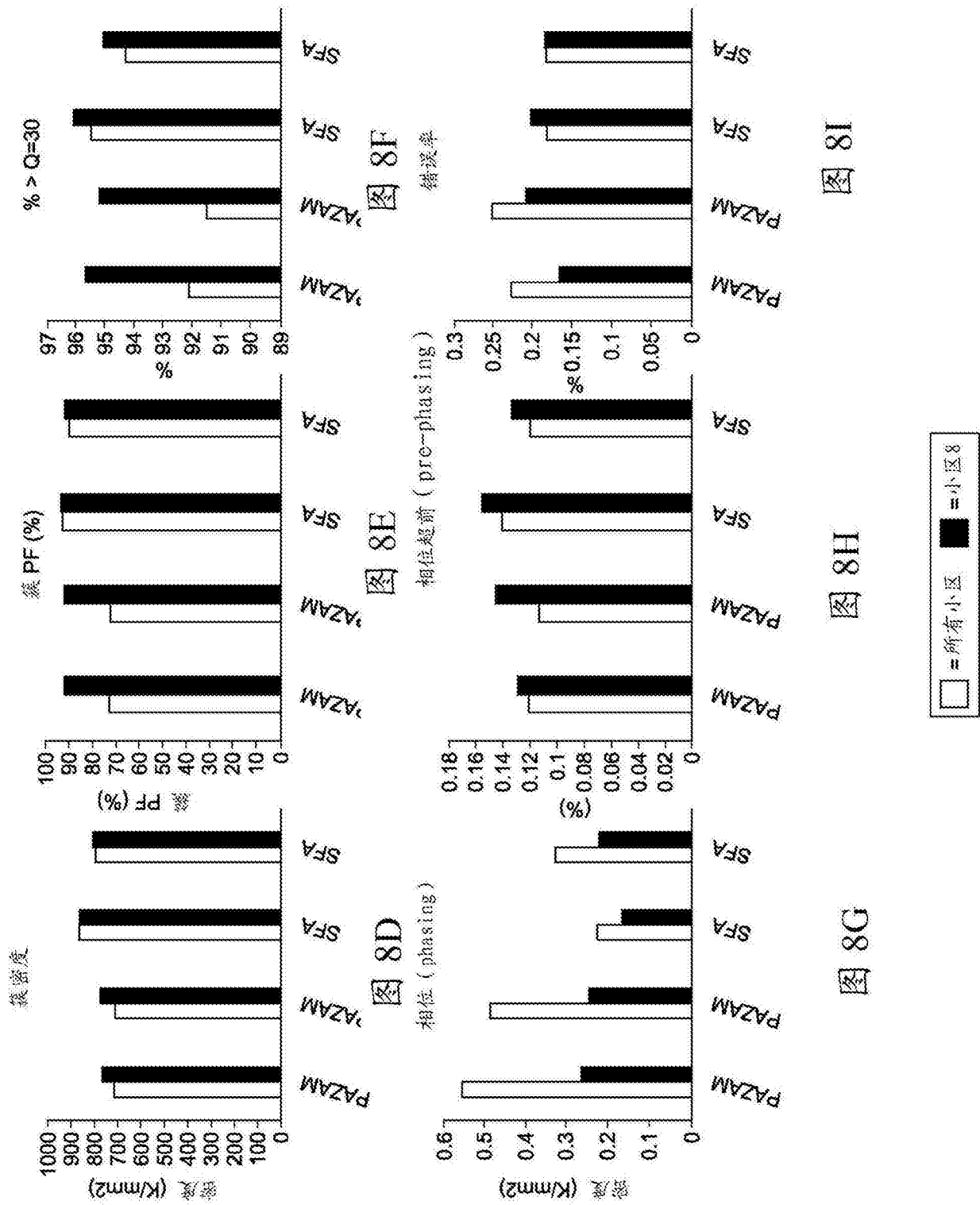


图8C



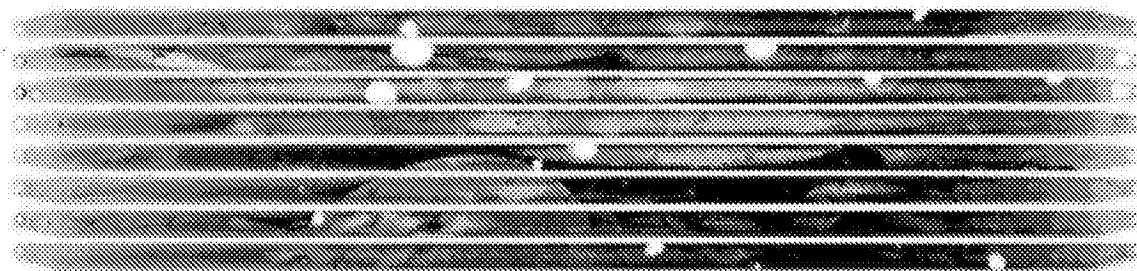


图9

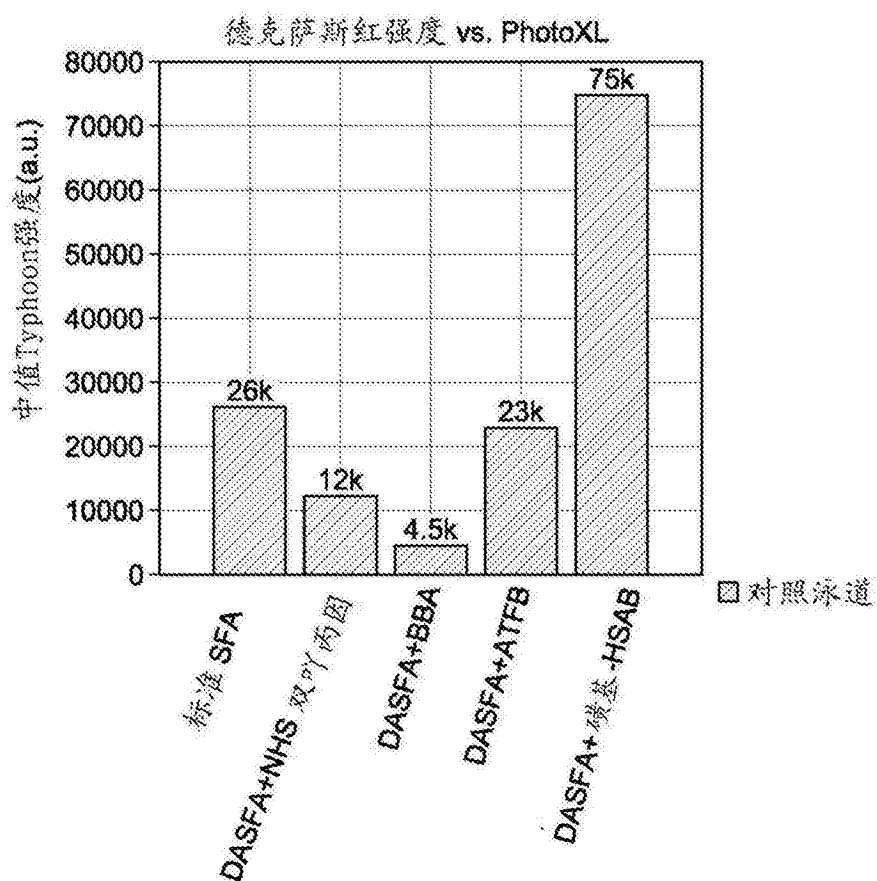


图10A

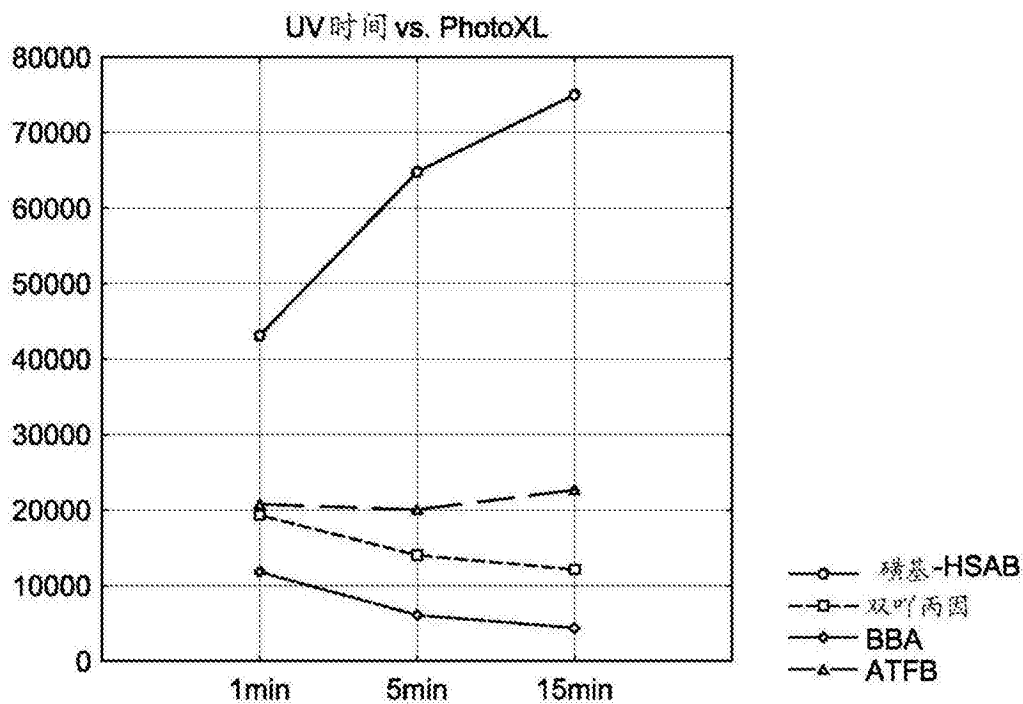


图10B

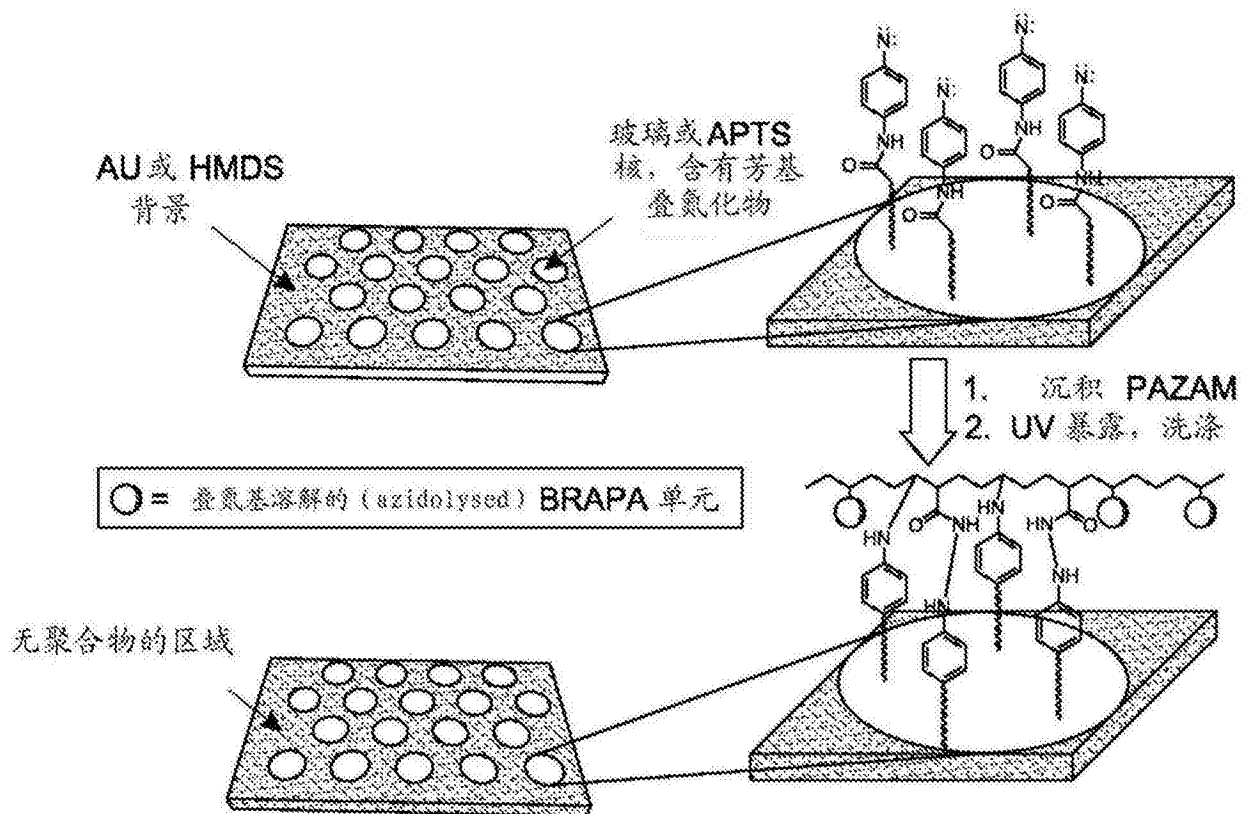


图11A

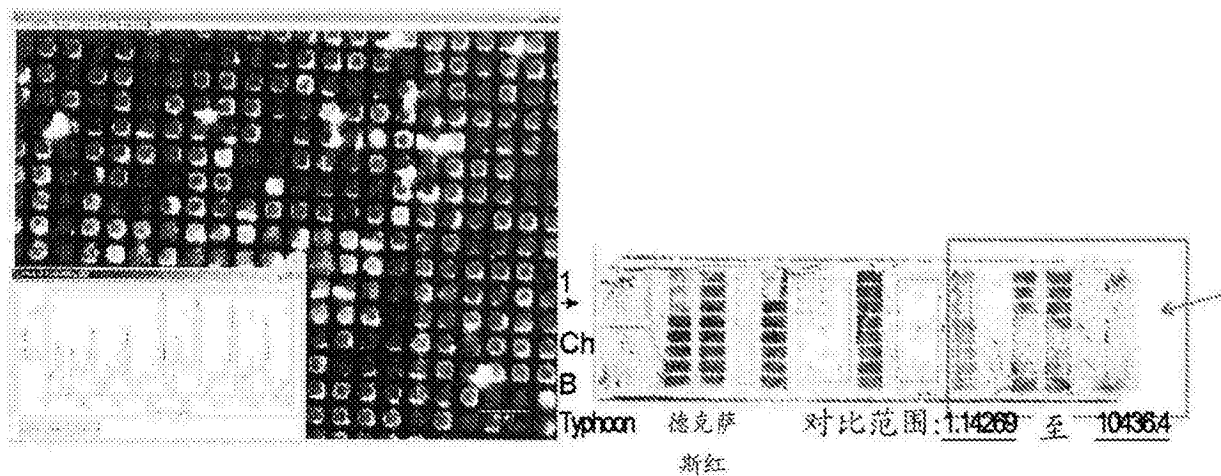


图11B

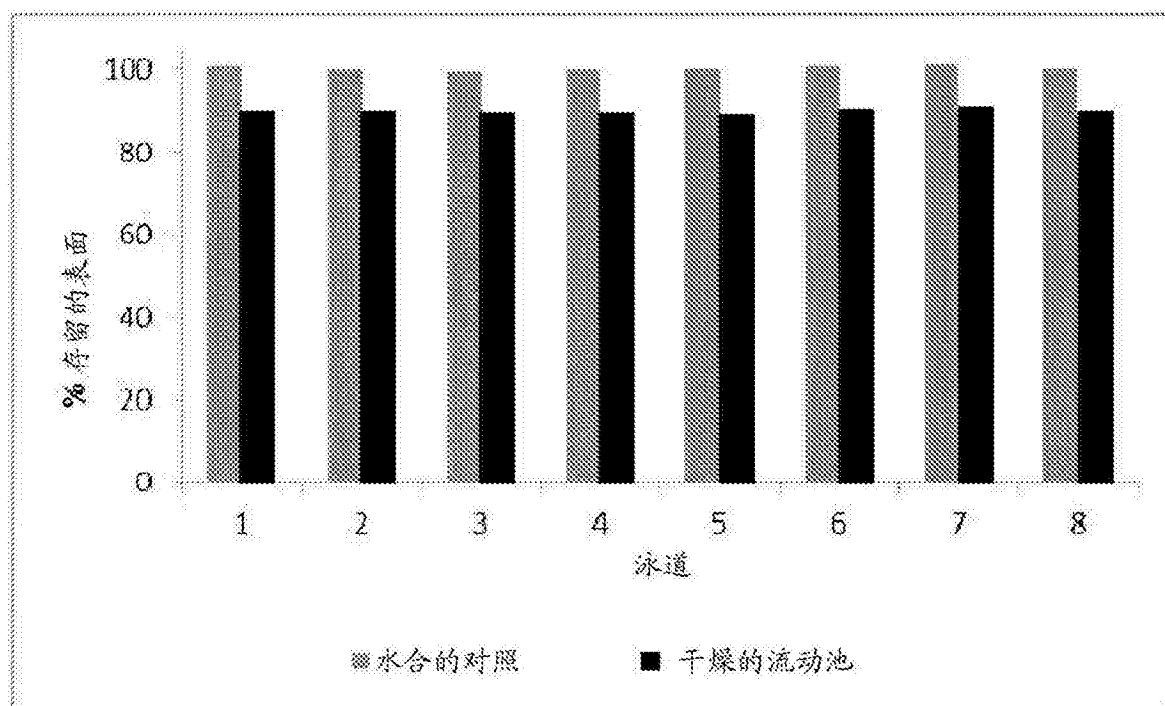


图12

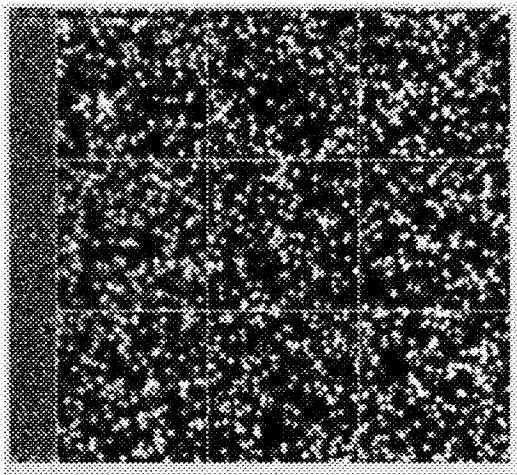


图13A

泳道	密度 (k/mm ²)	% PF	相位/相位超前 (%)	强度	20个循环后 的%Int.	% ≥ Q30	% 重新合成
1	174 +/- 13	95.2 +/- 6.3	0.233 / 0.251	15159 +/- 2627	79.8 +/- 3.0	98.8	85
2	178 +/- 14	96.5 +/- 3.1	0.230 / 0.239	16739 +/- 2598	81.3 +/- 4.4	98.8	89
3	161 +/- 15	96.4 +/- 2.9	0.211 / 0.242	13839 +/- 1618	80.2 +/- 3.6	99	85
4	170 +/- 14	94.6 +/- 7.8	0.267 / 0.232	16977 +/- 2044	79.8 +/- 6.4	98.6	88
5	101 +/- 43	74.7 +/- 31.0	0.250 / 0.257	9749 +/- 6047	114.4 +/- 97.1	97.3	97
6	136 +/- 11	94.9 +/- 9.5	0.265 / 0.252	15321 +/- 1978	77.6 +/- 4.1	98.6	84
7	120 +/- 7	89.0 +/- 24.4	0.138 / 0.201	14161 +/- 1727	80.0 +/- 2.3	87.5	42
8	132 +/- 21	87.3 +/- 20.3	0.221 / 0.258	13156 +/- 2959	81.2 +/- 13.8	98.7	85

图13B

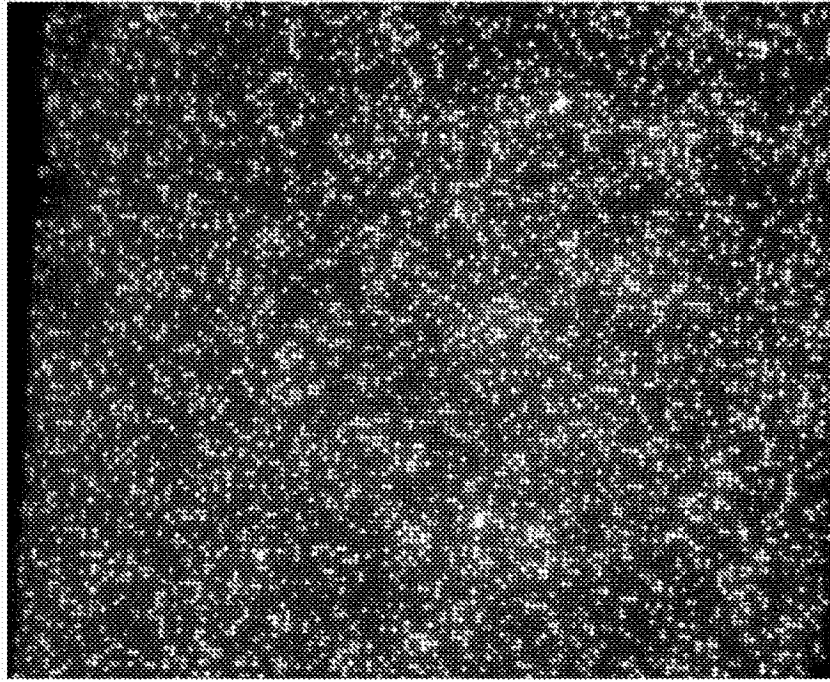


图14

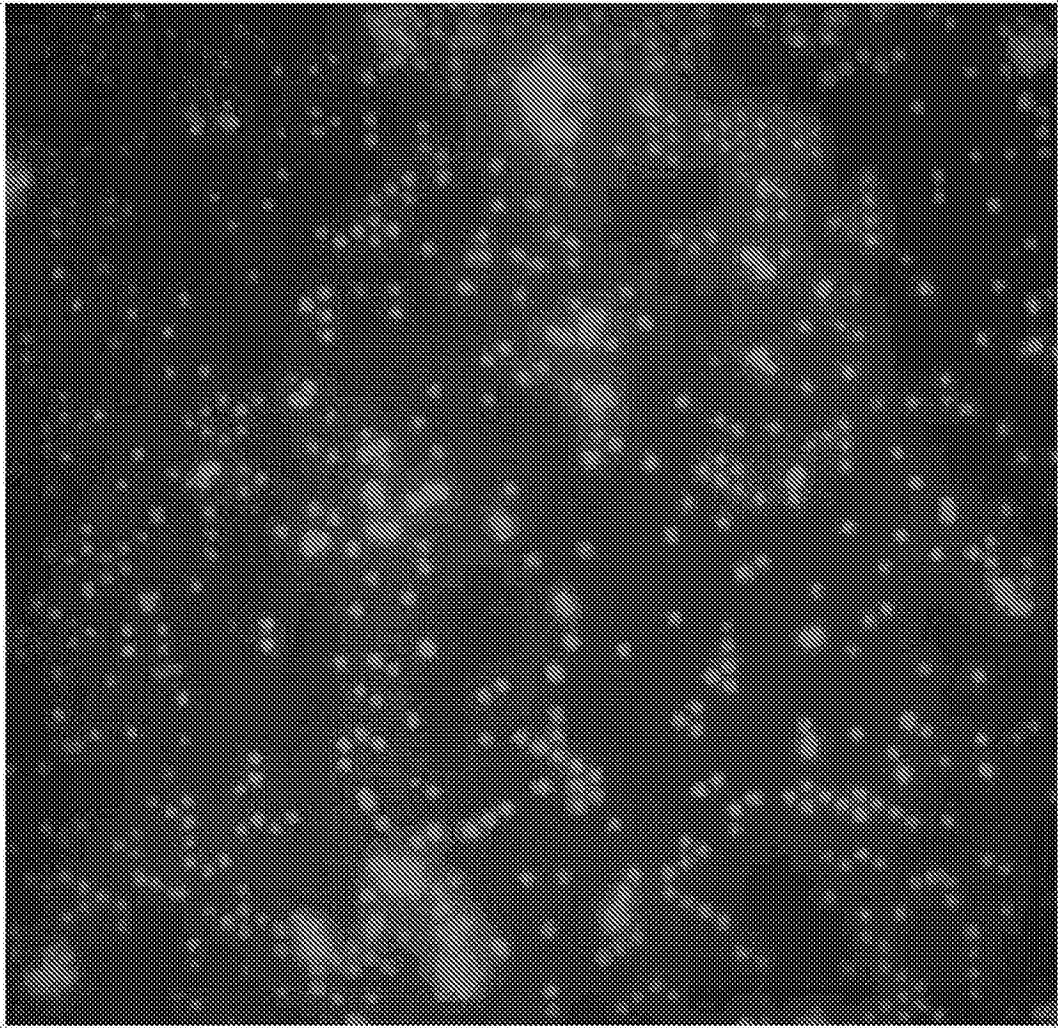


图15

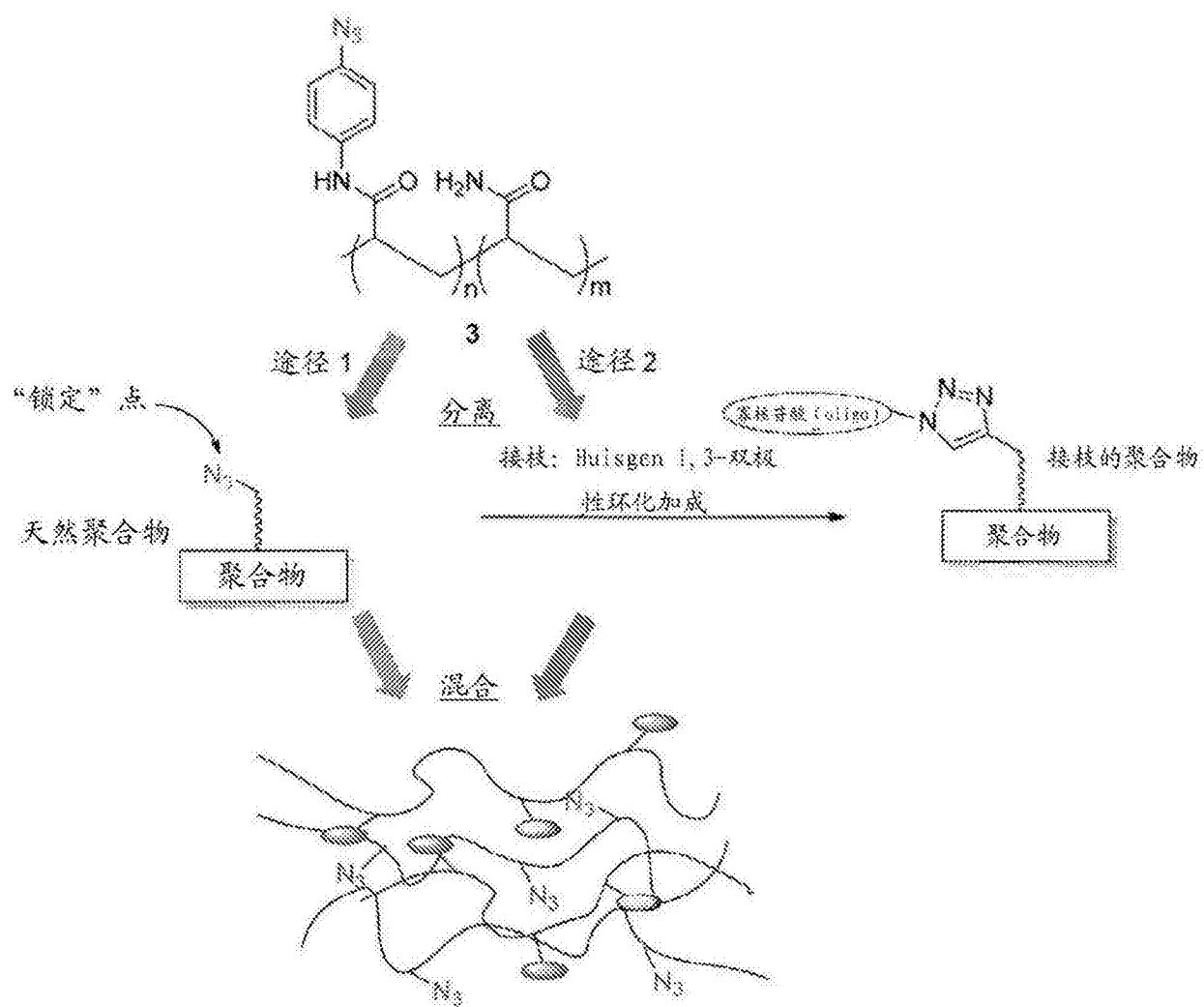


图16