



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105940024 B

(45)授权公告日 2019.03.15

(21)申请号 201480074638.8

(72)发明人 格伦·麦克加尔

(22)申请日 2014.12.05

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105940024 A

代理人 郑霞

(43)申请公布日 2016.09.14

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C08F 220/58(2006.01)

61/912,027 2013.12.05 US

G01N 33/543(2006.01)

61/979,431 2014.04.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.08.01

(56)对比文件

US 2005158879 A1,2005.07.21,

US 2005158879 A1,2005.07.21,

CN 102224257 A,2011.10.19,

US 2013211006 A1,2013.08.15,

US 2013165350 A1,2013.06.27,

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/068947 2014.12.05

审查员 王连成

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/085268 EN 2015.06.11

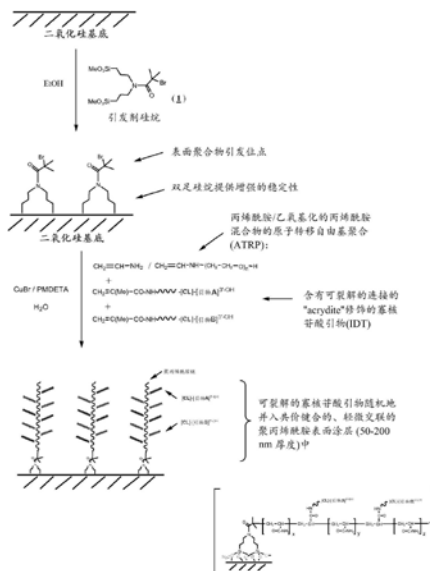
(73)专利权人 生捷科技控股公司  
地址 开曼群岛大开曼

权利要求书1页 说明书17页 附图2页

(54)发明名称  
修饰的表面

(57)摘要

本文提供了用于采用聚合物涂覆表面的方法和组合物。该方法和组合物适用于进行生物反应。具体地,该生物反应可以包括酶反应。



1. 一种用于进行酶反应的方法,其包括:
  - (a) 提供包含表面键合的引发剂物质的基底;
  - (b) 从该引发剂物质进行表面引发聚合,由此产生聚合物刷涂层以及偶联至所述聚合物刷的多个生物分子;以及
  - (c) 采用所述基底上的所述生物分子进行一种或多种酶反应,其中所述生物分子选自寡核苷酸和多核苷酸,且其中所述一种或多种酶反应选自:聚合酶链反应、合成测序反应、连接反应、延伸反应和转录反应,且其中与所述多个生物分子偶联的所述聚合物刷涂层的稳固性体现为在所述聚合酶链反应或所述合成测序反应中:
  - (i) 在40个循环的所述合成测序反应后,至少90%的所述生物分子保留至少90%的完整性;
  - 或(ii) 在25个循环的聚合酶链反应后,至少90%的所述生物分子保留至少90%的完整性。
2. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括向所述基底施加热量。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述聚合酶链反应包含以下反应条件:
  - (a) 在至少85°C的温度下持续至少15秒的变性步骤;
  - (b) 在至少50°C的温度下持续至少15秒的退火步骤;以及
  - (c) 在至少70°C的温度下持续至少30秒的延伸步骤。
4. 如权利要求1所述的方法,其中所述基底包含至少1,000,000个不同类型的生物分子,并且其中每个生物分子均为寡核苷酸。
5. 如权利要求4所述的方法,其中所述酶反应为延伸反应。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述聚合物刷包含丙烯酰胺。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述丙烯酰胺是N-(2-羟乙基)丙烯酰胺。
8. 一种制备修饰的表面的方法,其包括:
  - (a) 提供表面;
  - (b) 使引发剂物质与所述表面共价键合;
  - (c) 从所述引发剂物质进行聚合物的表面引发聚合,由此产生包含多个聚合物链的聚合物涂层;以及
  - (d) 将两个或更多个不同的生物分子偶联至所述聚合物涂层;其中所述表面选自玻璃、二氧化硅、氧化钛、氧化铝、氧化铟锡(ITO)、硅、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、钛、和金,其中所述引发剂物质包含2-溴-2-甲基-N,N-双-(3-三甲氧基硅烷基丙基)丙酰胺,其中所述生物分子是5' acrydite修饰的寡核苷酸,且其中所述两个或更多个不同的生物分子是在所述表面引发聚合过程中偶联至所述聚合物涂层的。

## 修饰的表面

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2013年12月5日提交的美国临时申请号61/912,027以及于2014年4月14日提交的美国临时申请号61/979,431的权益,这些申请通过引用并入本文。

### 背景技术

[0003] 在许多合成测序(SBS)系统中,克隆扩增和SBS在玻璃流动池通道中进行。PCR引物经由被动结合的聚合物涂层附接至该通道的内表面。在使用前,弱结合的聚合物链被洗掉,但剩下的聚合物可能在大量的SBS循环期间不同程度地耗尽,从而导致信号逐渐丧失。这在采用高pH和升高的温度条件时是特别令人担忧的。

### 发明内容

[0004] 提供了用于通过并入生物分子的表面引发聚合来制备聚合物涂层的方法和组合物。在一些情况下,该组合物和方法对于进行核酸反应和合成测序是有用的。在一些情况下,该组合物和方法对于提供稳固(robust)的涂层是有用的。

[0005] 本公开内容的一个方面提供了一种组合物,其包含:偶联有10个或更多个核酸分子的表面,其中在至少30个PCR循环后,至少90%的核酸分子保持完整并偶联至所述表面,其中每个PCR循环包含以下反应条件:(a)在至少85°C的温度下持续至少15秒的变性步骤;(b)在至少50°C的温度下持续至少15秒的退火步骤;以及(c)在至少70°C的温度下持续至少30秒的延伸步骤。

[0006] 在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面覆盖有聚合物刷。在本文提供的方面的一些实施方案中,该聚合物刷包含丙烯酰胺。在本文提供的方面的一些实施方案中,该聚合物刷进一步包含N-(2-羟乙基)丙烯酰胺。在本文提供的方面的一些实施方案中,至少1,000个不同的核酸分子偶联至该表面。在本文提供的方面的一些实施方案中,至少100,000个不同的核酸分子偶联至该表面。在本文提供的方面的一些实施方案中,至少1,000,000个不同的核酸分子偶联至该表面。

[0007] 本公开内容的一个方面提供了一种用于进行酶反应的方法,其包括:(a)提供具有聚合物刷涂层以及偶联至该聚合物刷的多个生物分子的基底;以及(b)采用所述基底上的生物分子进行一种或多种酶反应。

[0008] 在本文提供的方面的一些实施方案中,所述生物分子选自:寡核苷酸、多核苷酸、适体、蛋白质和抗体。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述酶反应选自:聚合酶链反应、测序反应、连接反应、延伸反应和转录反应。在本文提供的方面的一些实施方案中,进一步包括向所述基底施加热量。在本文提供的方面的一些实施方案中,在40个循环的合成测序反应后,至少90%的所述生物分子保留至少90%的完整性。在本文提供的方面的一些实施方案中,在25个循环的聚合酶链反应后,至少90%的所述生物分子保留至少90%的完整性。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述基底包含至少1,000,000个不同类型的生物分子,并且其中每个生物分子均为寡核苷酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述酶

反应为延伸反应。

[0009] 本公开内容的一个方面提供了一种制备修饰的表面的方法,其包括:(a)提供表面;(b)使引发剂物质与所述表面共价键合;(c)从该引发剂物质进行聚合物的表面引发聚合,由此产生包含多个聚合物链的聚合物涂层;以及(d)将两个或更多个不同的生物分子偶联至该聚合物涂层。

[0010] 本公开内容的一个方面提供了一种制备修饰的表面的方法,其包括:(a)提供表面;(b)使引发剂物质与所述表面共价键合;(c)从该引发剂物质进行两个或更多个不同类型的丙烯酸胺单体的混合物的表面引发聚合,由此产生包含多个聚合物链的聚合物涂层;以及(d)将生物分子偶联至该聚合物涂层。

[0011] 在本文提供的方面的一些实施方案中,所述生物分子选自:寡核苷酸、多核苷酸、适体、蛋白质和抗体。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述两个或更多个不同的生物分子为两个不同的寡核苷酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述两个或更多个不同类型的丙烯酸胺单体选自:丙烯酸胺、N-(2-羟乙基)丙烯酸胺、乙二醇丙烯酸胺和甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面选自玻璃、二氧化硅、氧化钛、氧化铝、氧化铟锡(ITO)、硅、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚苯乙烯、多环烯烃、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、钛和金。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面包含玻璃。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面包含硅。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面选自:流动池、测序流动池、流动通道、微流体通道、毛细管、压电表面、孔、微孔、微孔阵列、微阵列、芯片、晶片、非磁性珠、磁珠、铁磁珠、顺磁珠、超顺磁珠以及聚合物凝胶。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述引发剂物质包含有机硅烷。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述引发剂物质包含图1所示的分子。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面引发聚合包括原子转移自由基聚合(ATRP)。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面引发聚合包括可逆加成断裂链转移(RAFT)。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述生物分子包含5' acrydite修饰的寡核苷酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子包含抗体。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子包含肽。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子包含适体。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子的偶联包括聚合过程中acrydite修饰的生物分子的并入。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子包括在溴乙酰基位点的反应。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子的偶联包括在叠氮基位点的反应。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子的偶联包括叠氮-炔Huisgen环加成。

[0012] 本公开内容的一个方面提供了一种组合物,其包含:(a)表面;(b)通过表面引发聚合形成的、与该表面共价结合的聚合物涂层,其中该聚合物涂层包含2个或更多个不同类型的丙烯酸胺单体;以及(c)偶联至该聚合物涂层的生物分子。

[0013] 本公开内容的一个方面提供了一种组合物,其包含:(a)表面;(b)通过表面引发聚合形成的、与该表面共价结合的聚合物涂层;以及(c)偶联至该聚合物涂层的至少两个不同的生物分子。

[0014] 在本文提供的方面的一些实施方案中,所述生物分子包含寡核苷酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,该寡核苷酸在其5'端与聚合物偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,该寡核苷酸在其3'端与聚合物偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,该

生物分子包含抗体。在本文提供的方面的一些实施方案中,该生物分子包含适体。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少两个不同的生物分子包含寡核苷酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述寡核苷酸在其5'端与所述聚合物涂层偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述寡核苷酸在其3'端与所述聚合物涂层偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少两个不同的生物分子包含抗体。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少两个不同的生物分子包含适体。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面包含玻璃。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述表面包含硅。在本文提供的方面的一些实施方案中,该聚合物涂层包含聚丙烯酰胺。在本文提供的方面的一些实施方案中,该聚合物涂层包含PMMA。在本文提供的方面的一些实施方案中,该聚合物涂层包含聚苯乙烯。在本文提供的方面的一些实施方案中,该表面引发聚合包括原子转移自由基聚合(ATRP)。在本文提供的方面的一些实施方案中,该表面引发聚合包括可逆加成断裂链转移(RAFT)。

#### [0015] 援引并入

[0016] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。

#### [0017] 附图简述

[0018] 本发明的新颖特征在所附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在这些附图中:

[0019] 图1示出了引发剂硅烷的实例。

[0020] 图2示出了磷酸胆碱-丙烯酸单体的实例。

[0021] 图3示出了甜菜碱-丙烯酸单体的实例。

[0022] 图4示出了用于生产具有寡核苷酸的聚丙烯酰胺表面涂层的过程的实例。

### 具体实施方式

#### [0023] 概述

[0024] 本公开内容提供了关于表面上的改善的聚合物涂层的方法和组合物。该聚合物涂层可以通过结合至表面的引发剂物质经由表面引发聚合(SIP)而产生。该聚合物涂层可以并入修饰的单体,以调节该涂层的物理化学性质。该聚合物涂层可以并入寡核苷酸。

#### [0025] 表面

[0026] 本公开内容中提供的方法和组合物可以包括在表面上产生聚合物涂层。该表面可以包括玻璃、二氧化硅、氧化钛、氧化铝、氧化铟锡(ITO)、硅、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、聚苯乙烯、聚烯烃(如聚(甲基戊烯)(PMP)和Zeonor™)、环烯烃共聚物如Topas™、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、其他塑料、钛、金、其他金属或其他合适的材料。该表面可以是平坦的或圆的、连续的或非连续的、光滑的或粗糙的。表面的实例包括流动池、测序流动池、流动通道、微流体通道、毛细管、压电表面、孔、微孔、微孔阵列、微阵列、芯片、晶片、非磁性珠、磁珠、铁磁珠、顺磁珠、超顺磁珠以及聚合物凝胶。

#### [0027] 引发剂物质附接

[0028] 本公开内容中提供的方法和组合物可以包含用于键合至支持表面的引发剂物质。

在一些情况下,该引发剂物质包含至少一种有机硅烷。该有机硅烷可以包含一个表面键合基团,导致单足(mono-pedal)结构。该有机硅烷可以包含两个表面键合基团,导致双足(pi-pedal)结构。该有机硅烷可以包含三个表面键合基团,导致三足(tri-pedal)结构。该表面键合基团可以包含 $\text{MeO}_3\text{Si}$ (例如,参见图1,[0100]项)。该表面键合基团可以包含 $(\text{MeO})_3\text{Si}$ 。该表面键合基团可以包含 $(\text{EtO})_3\text{Si}$ 。该表面键合基团可以包含 $(\text{AcO})_3\text{Si}$ 。该表面键合基团可以包含 $(\text{Me}_2\text{N})_3\text{Si}$ 。该表面键合基团可以包含 $(\text{HO})_3\text{Si}$ 。对于有机硅烷包含多个表面键合基团的情况,该表面键合基团可以是相同的或可以是不同的。该有机硅烷可以包含图1中示出的硅烷试剂。在一些情况下,该引发剂物质包含至少一种有机磷酸,其中表面键合基团包含 $(\text{HO})_2\text{P}(=\text{O})$ 。该有机磷酸可以包含一个表面键合基团,导致单足结构。该有机磷酸可以包含两个表面键合基团,导致双足结构。该有机磷酸可以包含三个表面键合基团,导致三足结构。

[0029] 可以用硅烷溶液如硅烷在乙醇、水或其混合物中的溶液进行基底(例如,玻璃基底)的硅烷处理。在用硅烷溶液处理之前,可以清洗基底。可以通过在硫酸-过氧化氢溶液中浸没来进行清洗。为了将引发剂物质附接至塑料基底,可以向表面施加二氧化硅薄膜。可以通过多种方法如真空沉积法沉积二氧化硅,该真空沉积法包括但不限于化学气相沉积(CVD)、溅射法以及电子束蒸发。随后可以在沉积的二氧化硅层上进行硅烷处理。

[0030] 表面引发聚合(SIP)

[0031] 本公开内容中提供的方法和组合物可以包括从与表面结合的引发剂物质形成聚合物涂层。所得到的聚合物涂层可以包含线性链。所得到的聚合物涂层可以包含轻度支化的链。该聚合物涂层可以形成聚合物刷薄膜。该聚合物涂层可以包含一定的交联。该聚合物涂层可以形成接枝结构。该聚合物涂层可以形成网络结构。该聚合物涂层可以形成支化结构。该聚合物可以包含均一的聚合物。该聚合物可以包含嵌段共聚物。该聚合物可以包含梯度共聚物。该聚合物可以包含周期共聚物。该聚合物可以包含统计共聚物。

[0032] 聚合物涂层可以包含具有特定长度或长度范围的聚合物分子。聚合物分子可以具有至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450或500个骨架原子或分子(例如,碳)的长度。聚合物分子可以具有至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450或500个骨架原子或分子(例如,碳)的长度。聚合物分子可以具有至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450或500个单体单元(例如,丙烯酰胺分子)的长度。聚合物分子可以具有至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450或500个单体单元(例如,丙烯酰胺分子)的长度。

[0033] 该聚合物可以包含聚丙烯酰胺(PA)。该聚合物可以包含聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)。该聚合物可以包含聚苯乙烯(PS)。该聚合物可以包含聚乙二醇(PEG)。该聚合物可以包含聚丙烯腈(PAN)。该聚合物可以包含聚(苯乙烯-r-丙烯腈)(PSAN)。该聚合物可以包

含单一类型的聚合物。该聚合物可以包含多种类型的聚合物。该聚合物可以包含在“Ayres, N. (2010). Polymer brushes: Applications in biomaterials and nanotechnology. Polymer Chemistry, 1(6), 769-777”中或在“Barbey, R., Lavanant, L., Paripovic, D., Schüwer, N., Sugnaux, C., Tugulu, S., & Klok, H.A. (2009). Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: synthesis, characterization, properties, and applications. Chemical reviews, 109(11), 5437-5527”中描述的任何聚合物。

[0034] 该聚合可以包括用于控制聚合物链长度、涂层均匀性或其他性质的方法。该聚合可以包括受控的自由基聚合 (CRP)。该聚合可以包括原子转移自由基聚合 (ATRP)。该聚合可以包括可逆加成断裂链转移 (RAFT)。该聚合可以包括活性聚合过程, 包括在“Ayres, N. (2010). Polymer brushes: Applications in biomaterials and nanotechnology. Polymer Chemistry, 1(6), 769-777”中或在“Barbey, R., Lavanant, L., Paripovic, D., Schüwer, N., Sugnaux, C., Tugulu, S., & Klok, H.A. (2009). Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: synthesis, characterization, properties, and applications. Chemical reviews, 109(11), 5437-5527”中描述的那些。

[0035] 生物分子的并入

[0036] 可以将生物分子偶联至本公开内容中描述的聚合物涂层。该生物分子可以包括抗体。该生物分子可以包括蛋白质。该生物分子可以包括肽。该生物分子可以包括酶。该生物分子可以包括适体。该生物分子可以包括寡核苷酸。

[0037] 可以将寡核苷酸偶联至本公开内容中描述的聚合物涂层。该寡核苷酸可以包括引物。该寡核苷酸可以包括可裂解的连接。可裂解的连接可以是可酶促裂解的。该寡核苷酸可以包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55或60个碱基。该寡核苷酸在长度上可以不同, 如3至5个碱基、1至50个碱基、6至12个碱基、8至12个碱基、15至25个碱基、25至35个碱基、35至45个碱基, 或45至55个碱基。偶联至涂层的单个寡核苷酸在长度上可以彼此不同。

[0038] 可以在聚合过程期间将生物分子(例如, 寡核苷酸)并入至聚合物涂层中。例如, 可以在聚合过程期间添加5'-acrydite修饰的寡核苷酸, 以允许寡核苷酸并入至正在聚合的聚丙烯酰胺结构中。在一些情况下, 寡核苷酸在5'端偶联至聚合物涂层。在一些情况下, 寡核苷酸在3'端偶联至聚合物涂层。在一些情况下, 一些寡核苷酸在3'端偶联至聚合物涂层, 而一些寡核苷酸在5'端偶联至聚合物涂层。

[0039] 可以在聚合过程之后将生物分子(例如, 寡核苷酸)并入至聚合物涂层中。例如, 可以在聚合过程期间向聚合物结构中添加反应位点。生物分子可以在聚合之后在该反应位点处并入。该反应位点可以包括溴乙酰基位点。该反应位点可以包括叠氮基。该反应位点可以包括与叠氮-炔Huisgen环加成相容的位点。

[0040] 生物分子(例如, 寡核苷酸)可以以受控的方式并入至聚合物涂层中, 其中特定的生物分子位于聚合物涂层的特定区域。生物分子可以随机并入至聚合物涂层中, 其中特定的生物分子随机分布在整个聚合物涂层中。

[0041] 在一些情况下, 本发明的组合物包含表面、与所述表面共价结合的聚丙烯酰胺涂

层以及偶联至所述聚丙烯酰胺涂层的至少一个寡核苷酸。在其他情况下,该表面包括偶联至聚丙烯酰胺涂层的至少1、10、100、10,000、100,000、1,000,000、10,000,000、100,000,000或1,000,000,000个寡核苷酸。

[0042] 聚合物涂层的物理化学特征的修饰

[0043] 本公开内容中描述的聚合物涂层的物理化学特征可以进行调节。该调节可以通过在聚合过程期间并入修饰的丙烯酰胺单体来实现。

[0044] 在一些情况下,可以在聚合过程期间并入乙氧基化丙烯酰胺单体。可以通过使乙氧基化丙烯酰胺单体存在于聚合溶液中而将其并入。该乙氧基化丙烯酰胺单体可以包括 $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n\text{H}$ 形式的单体。该乙氧基化丙烯酰胺单体可以包括羟乙基丙烯酰胺单体。该乙氧基化丙烯酰胺单体可以包括乙二醇丙烯酰胺单体。该乙氧基化丙烯酰胺单体可以包括甲基丙烯酸羟乙酯(HEMA)。该乙氧基化丙烯酰胺单体可以包括N-(2-羟乙基)丙烯酰胺。乙氧基化丙烯酰胺单体的并入可以产生更加疏水的聚丙烯酰胺表面涂层。

[0045] 在一些情况下,可以在聚合过程期间并入磷酰胆碱丙烯酰胺单体。该磷酰胆碱丙烯酰胺单体可以包括具有图2所示结构的单体。该磷酰胆碱丙烯酰胺单体可以包括其他磷酰胆碱丙烯酰胺单体。可以通过使磷酰胆碱丙烯酰胺单体存在于聚合溶液中而将其并入。

[0046] 在一些情况下,可以在聚合过程期间并入甜菜碱丙烯酰胺单体。该甜菜碱丙烯酰胺单体可以包括具有图3所示结构的单体。可以通过使甜菜碱丙烯酰胺单体存在于聚合溶液中而将其并入。

[0047] 所述聚合物涂层可以具有均匀的厚度。该聚合物涂层在其区域上可以具有不同的厚度。该聚合物涂层可以为平均至少 $1\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $2\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $3\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $5\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $10\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $15\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $20\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $25\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $30\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $40\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $50\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $75\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $100\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $150\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $200\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $300\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $400\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为至少 $500\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $1\mu\text{m}$ 至约 $10\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $5\mu\text{m}$ 至约 $15\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $10\mu\text{m}$ 至约 $20\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $30\mu\text{m}$ 至约 $50\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $10\mu\text{m}$ 至约 $50\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $10\mu\text{m}$ 至约 $100\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $50\mu\text{m}$ 至约 $100\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $50\mu\text{m}$ 至约 $200\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $100\mu\text{m}$ 至约 $300\mu\text{m}$ 厚。该聚合物涂层可以为约 $100\mu\text{m}$ 至约 $500\mu\text{m}$ 厚。

[0048] 反应

[0049] 本公开内容中描述的聚合物涂层可以用于进行反应。所进行的反应可以是酶促反应。用于所进行的反应的试剂可以包含核酸。该反应可以包括消化反应。该反应可以包括延伸反应,如引物延伸或重叠延伸。该反应可以包括扩增反应,如聚合酶链反应(PCR)及其变型(如多重PCR、巢式PCR、逆转录酶PCR(RT-PCR)、半定量PCR、定量PCR(qPCR)或实时PCR、降落PCR或组装PCR)、基于核酸序列的扩增(NASBA)(参见例如,“Compton,J(1991).Nucleic acid sequence-based amplification.Nature 350(6313):91-2.”)、链置换测定(SDA)(参见例如,美国专利号5,712,124,“Strand displacement amplification”)以及环介导的等

温扩增 (LAMP) (参见例如,美国专利号6,410,278,“Process for synthesizing nucleic acid”)。该反应可以包括转录反应,如体外转录。该反应可以包括测序反应,如基于BAC的测序、焦磷酸测序、合成测序,或在“Mardis,E.R.(2008).Next-generation DNA sequencing methods.Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.,9,387-402”中描述的任何方法。

[0050] 本公开内容中描述的聚合物涂层可以是稳固的。聚合物涂层的稳固性可以通过耐久性、抗降解性或经受某些条件后涂层的附着水平来体现。聚合物涂层的稳固性可以通过偶联至该聚合物涂层的、在经受某些条件后仍偶联至该聚合物涂层的生物分子(例如,寡核苷酸)的数目或百分比来体现。条件可以包括但不限于持续时间,温度或系列温度,化学品(例如,酸、碱、还原剂、氧化剂)的存在,机械力(例如,应力、应变、振动、高压、真空),条件的组合,或条件或条件组合的反复循环(例如,包含温度和化学品使用的反应循环)。持续时间可以包括至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50分钟,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13天,或至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、40、50或60周。温度可以包括至少0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100℃。温度可以包括至多0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100℃。化学品可以包括强酸、弱酸、强碱、弱碱、强氧化剂、弱氧化剂、强还原剂、弱还原剂、酶、单体、聚合物、缓冲液、溶剂或其他试剂。条件的循环可以包括至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000或10,000个循环。在一些实施方案中,使用本文的聚合物涂层进行至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个条件循环,并且其中在该循环后,至少50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的聚合物链保持完全完整并与所述表面键合。

[0051] 在一些实施方案中,本文的聚合物涂层用作进行合成测序(SBS)的固体支持体。在SBS中,靶多核苷酸序列可以如下确定:采用聚合酶反应延伸合适的引物来产生其互补体,并对产生该互补体的碱基的连续掺入进行表征。通常将该靶序列固定在固体支持体上。然后,通过顺序添加使不同碱基A、T、G或C中的每一种与靶标接触,并通过附接至该碱基的合适的标记物来检测任何掺入事件。与现有技术方法相比,本发明需要存在保留3'至5'核酸外切酶功能的聚合酶,对该聚合酶进行诱导以在检测掺入之后去除掺入的标记的碱基。然后将相应的未标记的碱基掺入互补链中,以允许进行进一步的序列测定。重复该程序使互补体的序列得到鉴定,并由此也鉴定了靶序列。在一些实施方案中,使用本文的聚合物涂层进行至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900或1000个合成测序(SBS)循环,例如,如美国专利号6,833,246的方法描述的,并且其中在SBS后,至少50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的聚合物链保持完全完整并与所述表面键合。在SBS循环之前,该聚合物涂层可以具有至少10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000或100,000、200,000、500,000、1,000,000、2,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、

100,000,000、200,000,000、500,000,000或十亿个与其偶联的核酸分子。在SBS循环之前,该聚合物涂层可以具有在其上排列的面密度为至少约10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、1,000,000、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 或 $1 \times 10^{11}$ 个分子/平方微米的核酸分子。在一些情况下,在SBS循环之前,该聚合物涂层具有在其上排列的面密度为约 $1 \times 10^2$ 至约 $1 \times 10^6$ 个/平方微米的核酸分子。在一些情况下,在SBS循环之前,该聚合物涂层具有在其上排列的面密度为约 $5 \times 10^2$ 至约 $5 \times 10^4$ 个/平方微米的核酸分子。在一些情况下,在SBS循环之前,该聚合物涂层具有在其上排列的面密度为约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^4$ 个/平方微米的核酸分子。

[0052] 在一些实施方案中,使用本文的聚合物涂层对结合至该涂层的核酸聚合物链进行PCR。例如,PCR可以包括多个循环,其中每个循环包括变性步骤、退火步骤以及延伸或伸长步骤。该变性步骤可以包括使核酸经受至少约85°C、86°C、87°C、88°C、89°C、90°C、91°C、92°C、93°C、94°C、95°C、96°C、97°C或98°C的温度。该变性步骤可以包括至少约15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒或45秒的持续时间。该退火步骤可以包括使核酸经受至少约50°C、51°C、52°C、53°C、54°C、55°C、56°C、57°C、58°C、59°C、60°C、61°C、62°C、63°C、64°C或65°C的温度。该退火步骤可以包括至少约15秒、20秒、25秒、30秒、35秒、40秒或45秒的持续时间。该延伸或伸长步骤可以包括至少约70°C、71°C、72°C、73°C、74°C、75°C、76°C、77°C、78°C、79°C或80°C的温度。该延伸或伸长步骤可以包括至少约30秒、40秒、50秒、60秒、70秒、80秒、90秒、100秒、110秒或120秒的持续时间。可以使用本文的聚合物涂层进行至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100个聚合酶链反应(PCR)循环,并且其中在最终的PCR循环后,至少50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%的聚合物链保持完全完整并与所述表面键合。在PCR循环之前,该聚合物涂层可以具有至少10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000或100,000、200,000、500,000、1,000,000、2,000,000、5,000,000、10,000,000、20,000,000、100,000,000、200,000,000、500,000,000或十亿个与其偶联的核酸分子。在PCR循环之前,该聚合物涂层可以具有在其上排列的密度为至少10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000、50,000、100,000、1,000,000、 $1 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 或 $1 \times 10^{11}$ 个分子/平方微米的核酸分子。在一些情况下,在PCR循环之前,该聚合物涂层具有在其上排列的面密度为约 $1 \times 10^2$ 至约 $1 \times 10^6$ 个/平方微米的核酸分子。在一些情况下,在PCR循环之前,该聚合物涂层具有在其上排列的面密度为约 $5 \times 10^2$ 至约 $5 \times 10^4$ 个/平方微米的核酸分子。在一些情况下,在PCR循环之前,该聚合物涂层具有在其上排列的面密度为约 $1 \times 10^3$ 至约 $1 \times 10^4$ 个/平方微米的核酸分子。

[0053] 优势

[0054] 具有多个键合基团的引发剂物质如硅烷的使用可以提供较高的热和水解稳定性(参见,例如,美国专利号6,262,216)。这样的稳定性可以提高涂层在反应或其他处理的反复循环中的耐久性。

[0055] 如本文所述的表面涂层的使用可以提供比未涂覆的表面所提供的环境更加酶相容或更有利的环境。具有如本文所述的经调节的物理化学特征的表面涂层可以提供用于在该表面之上或附近或在结合至该表面的分子上进行酶反应的优势。该优势可以包括与表面的非特异性结合的减少。该优势可以包括酶如聚合酶的最优环境。例如,中性亲水聚合物和

连接基团可以为酶提供有利的环境。

[0056] 实施例

[0057] 实施例1-平坦表面阵列的产生

[0058] 使具有图1所示结构的引发剂硅烷在EtOH的存在下结合至平坦的二氧化硅基底，从而形成双足表面聚合物引发位点。在CuBr、PMDETA和H<sub>2</sub>O的存在下，使丙烯酰胺和乙氧基化丙烯酰胺的混合物与acrydite修饰的寡核苷酸一起在基底上经历原子转移自由基聚合(ATRP)。这形成了结合至表面引发剂位点的、共价键合的、轻微交联的聚丙烯酰胺表面涂层，其厚度在约50nm至约200nm之间，并且其结构中并入了寡核苷酸(参见图4)。

[0059] 实施例2-平坦表面阵列在测序中的应用

[0060] 如实施例1中所述制备聚丙烯酰胺涂覆的基底。使待测序的DNA与并入至该聚合物结构中的寡核苷酸结合。向该基底添加合成测序试剂，并使合成测序进行40个循环。至少90%的聚合物链保持完整并与表面键合。

[0061] 实施例3-平坦表面阵列在DNA扩增中的应用

[0062] 如实施例1所述制备聚丙烯酰胺涂覆的基底。使待扩增的DNA与并入至该聚合物结构中的寡核苷酸结合。向该基底添加聚合酶链反应(PCR)试剂，并使PCR进行30个循环。至少90%的聚合物链保持完整并与表面键合。

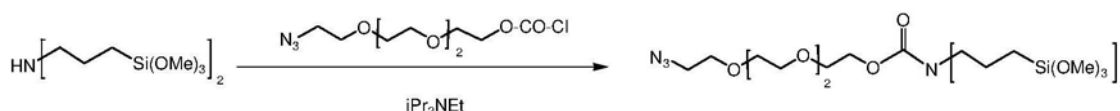
[0063] 实施例4-叠氨基-PEG4-N,N-双(3-(三甲氧基硅烷基)丙基)氨基甲酸酯的合成

[0064] 叠氨基-PEG4-醇(BroadPharm, 220mg; 1.0mmol)通过与2ml CH<sub>3</sub>CN共蒸发两次进行干燥，然后在N<sub>2</sub>下与在1ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中的双光气(200mg; 1.0mmol)合并。在环境温度下静置过夜后，将溶剂蒸发以获得280mg呈浅黄色的油的产物，其无需进一步纯化而使用。<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 4.46(2H, t J=2.8Hz; CH<sub>2</sub>OC(O)Cl); 3.79(2H, t J=4.5Hz; CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 3.68-3.70(10H, m, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>); 3.41(2H, t J=5.2Hz, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)。



[0066] 将双(三甲氧基硅烷基丙基)胺(342mg/320uL; 1.0mmol)与DIEA(136mg/182uL; 1.05mmol)在N<sub>2</sub>下的1ml干醚中合并，并在冰上冷却至0-4℃。将叠氨基-PEG4氯甲酸酯(280mg; 1.0mmol)溶解在1ml干醚中并通过注射器逐滴添加，随后在环境温度下继续搅拌过夜。添加另外2ml的干醚，并将溶液快速过滤并蒸发以产生呈淡黄色的油的硅烷(~550mg)。<sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD): δ(ppm) 4.20-4.24(2H, br m, CH<sub>2</sub>OC(O)N<); 3.67-3.74(13H, m, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>); 3.39(2H, t J~5.0Hz, CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 3.35(21H, s, CH<sub>3</sub>OSi); 3.22-3.28(4H, br m, -CH<sub>2</sub>NC(O)O-); 1.60-1.70(4H, br m, C-CH<sub>2</sub>-C); 0.55-0.65(4H, br m, C-CH<sub>2</sub>-Si)。

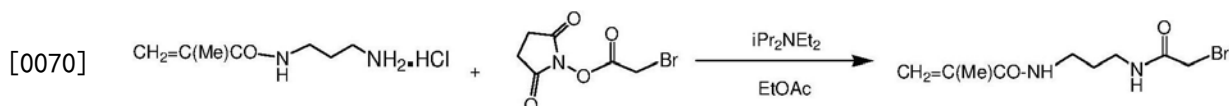
[0067]



[0068] 实施例5-N-(3-(溴乙酰氨基)丙基)甲基丙烯酰胺的合成

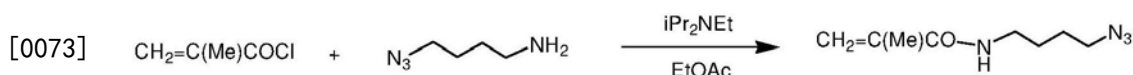
[0069] 将N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐(Polysciences; 360mg; 2.0mmol)与N-(溴乙酰氧基)琥珀酰亚胺(Broad Pharm; 570mg; 2.4mmol)在N<sub>2</sub>下在10mL无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中合并，并用冰MeOH冷却至-10℃。然后在搅拌的同时逐滴添加二异丙基乙胺(Aldrich, 800uL; 4.2mmol)。将该溶液另外冷搅拌30min，然后在室温下搅拌3h。将该溶液用40ml乙酸乙酯稀

释,并用各为12ml的1M HCl、0.1M NaOH及随后的盐水依次洗涤。将有机相用MgSO<sub>4</sub>干燥并蒸发,以得到220mg (~40%)呈灰白色固体的溴乙酰化与氯乙酰化产物的3:1混合物。<sup>1</sup>H-NMR (丙酮-d<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.70 (1H, br s, NH<sub>a</sub>); 7.40 (1H, br s, NH<sub>b</sub>); 5.71-5.73 (1H, br m, CH=C); 5.30-5.32 (1H, m, CH' =C); 4.08 (0.5H, s, CH<sub>2</sub>Cl); 3.89 (1.5H, s, CH<sub>2</sub>Br); 3.24-3.32 (4H, m, CH<sub>2</sub>N); 1.91-1.93 (3H, br m, CH<sub>3</sub>); 1.68 (2H, br qnt, J=6.4Hz; H<sub>2</sub>' CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)。LC-MS (ESI): 5.7min:242,243,244 (10:1:3; M • Na<sup>+</sup>/氯); 219,220,221 (10:1:3; M • H<sup>+</sup>/氯); 134,135,136 (10:0.6:3; M-CH<sub>2</sub>=C (Me) CONH<sup>-</sup>/氯); 126,127 (10:1; M-Cl/BrCH<sub>2</sub>CCONH<sup>-</sup>)。5.9min:286,287,288,289 (10:1:10:1; M • Na<sup>+</sup>/溴); 263,265,266 (10:10:1; M • H<sup>+</sup>/溴); 178,179,180,181 (10:0.6:10:0.6; M-CH<sub>2</sub>=C (Me) CONH<sup>-</sup>/溴); 126,127 (10:1; M-Cl/BrCH<sub>2</sub>CCONH<sup>-</sup>)。



[0071] 实施例6-N-(4-叠氮基丁基)甲基丙烯酰胺的合成

[0072] 在装备有搅拌棒和滴液漏斗并用干燥N<sub>2</sub>冲洗的50mL烧瓶中,将4-叠氮基-1-丁胺 (Synthonix; 1.1g; 8.75mmol) 与DIEA (1.22g; 9.5mmol) 在15mL无水乙酸乙酯中合并。将溶液在冰水浴中冷却至2°C,并逐滴添加甲基丙烯酰氯 (0.96g; 9.2mmol) 在5mL干醚中的溶液并搅拌超过30min。去除冰浴,添加另外15mL的干乙酸乙酯,并在环境温度下继续搅拌过夜。通过过滤将固体去除并将合并的滤液用10ml水洗涤两次、用盐水洗涤一次,然后干燥 (MgSO<sub>4</sub>),真空蒸发以获得1.50g (93%)呈橙色液体的产物。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.92-5.83 (1H, br s, NH); 5.68 (1H, t J=0.8Hz; =CH<sub>a</sub>); 5.68 (1H, m, =CH<sub>b</sub>); 3.45 (4H, br m, NCH<sub>2</sub>); 1.97 (3H, t J=1.4Hz, CH<sub>3</sub>); 1.69-1.60 (4H, br m, C-CH<sub>2</sub>-C)。MS (ESI): 126.2 (M-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>); 183.2 (M • H<sup>+</sup>); 205.2 (M • Na<sup>+</sup>)。由于在4°C储存2-3周后通过NMR注意到伴N<sub>2</sub>析出的分解,因此该产物在10天内使用。



[0074] 实施例7-流动池表面的硅烷化

[0075] 对于大多数实验,所使用的流动池均为由Corning® 7740硼硅酸盐、低膨胀、I型玻璃 (p/n 63825-05, EM Sciences, Hatfield, PA) 制造的平坦的“毛细管微载玻片 (capillary micro glass slide)”。将较短长度的0.5mm ID热缩PTFE管密封至该毛细管的两端,以提供与歧管、注射器等的防漏连接。对于一些实验,采用“翻新的 (refurbished)” Illumina MiSeq™流动池。通过用200mM过硫酸钠在65°C下18hr,随后1M KOH/65°C/6hr,用去离子水冲洗并用氮气流干燥,来将它们原有的表面涂层剥离。

[0076] 在硅烷化之前,通过在25°C下浸没在硫酸-过氧化氢溶液 (Nanostrip, Cyantek Corp., Fremont CA) 中16-18hr,然后用去离子水彻底漂洗并用氮气流干燥,来清洁所有的毛细管流动池表面。将清洁的流动池储存在氮气下并在48小时内硅烷化。通过用新制备的、适当硅烷在95:5乙醇-水中的2% (wt/vol) 溶液填充流动池并在室温下温育4-18小时来进行硅烷化。然后将流动池用乙醇和去离子水彻底漂洗;用氮气干燥,并在环境温度下储存。

[0077] 实施例8-经由表面引发丙烯酰胺ATRP的寡核苷酸引物固定

[0078] 用2-溴-2-甲基-N,N-双-(3-三甲氧基硅烷基丙基)丙酰胺 (参见例如,US 2011/

0143967) 将用于SI-ATRP的流动池如实施例7所述进行硅烷化。

[0079] 引物脱水(Dry-down):将等量的5'-acrydite修饰的正向引物(FWD) (4 $\mu$ L, 1mM) 与反向引物(REV) (4 $\mu$ L, 1mM) 在0.9mL锥形尖端的HPLC小瓶中合并。将溶液在环境温度下在Speed-Vac蒸发仪上缩减至干(10-15分钟)。将含有干燥引物的小瓶用隔膜密封的螺帽紧紧封闭,并通过18号注射器针头连接至真空/N<sub>2</sub>歧管。通过注射器针头进行5个循环的交替真空/氮气再填充将该小瓶去氧。

[0080] 流动池去氧:通过用干燥氮气吹扫,将待用于SI-ATRP的流动池去氧。

[0081] 溶剂去氧:在另一个小瓶中,通过用氮气连续鼓泡30分钟将由在水中的28%甲醇(v:v)组成的溶剂混合物去氧。

[0082] 催化剂/丙烯酰胺溶液的制备:称取CuBr (6.8mg, 47.4 $\mu$ mol) 和CuBr<sub>2</sub> (3.9mg, 17.5 $\mu$ mol), 并将其放置在含有磁性搅拌棒的20mL加隔膜盖的小瓶中。将该小瓶连接至真空/氮气歧管并通过三个循环的排空-氮气回填小心地去氧。然后将去氧的溶液的一部分(14.5mL)通过气密注射器转移至含有铜盐的小瓶中。最后,添加丙烯酰胺(42.5mg, 600 $\mu$ mol) 和PMDETA(14 $\mu$ L, 67.2 $\mu$ mol), 并将溶液剧烈搅拌同时用氮气鼓泡另外15分钟。偶尔需要将溶液短暂地声处理以使CuBr固体分散,从而获得浅蓝色的均相溶液。

[0083] 将聚合溶液转移至流动池:使脱水引物在脱氧的催化剂/丙烯酰胺溶液(20 $\mu$ L)中重建,该引物通过气密注射器转移。将所得溶液转移至来自步骤3的预先吹扫的流动池,将其完全填满。该流动池的末端用石蜡膜(parafilm)密封,并在无氧环境下将该流动池维持在环境温度下24-48小时。

[0084] 洗涤和储存:流动池用28%甲醇-水和1XTE缓冲液(~1mL/ea)冲洗并在4°C下储存。

[0085] 实施例9-通过丙烯酰胺/溴乙酰基-丙烯酰胺的溶液引发FRP接枝进行的寡核苷酸引物固定

[0086] 将流动池表面用3-(丙烯酰氨基)丙基三甲氧基硅烷(Gelest, Inc)进行硅烷化(silanated)。

[0087] 吹扫流动池:通过用干燥氮气吹扫将待用于FRP的流动池去氧。

[0088] 溶液制备和聚合:将在小瓶中的丙烯酰胺(0.0713g, 1mmol) 和N-(3-溴乙酰氨基丙基)甲基丙烯酰胺(6.4mg, 0.024mmol) 在Milliq水(5g)中的溶液用橡胶隔膜密封的盖子盖住。通过用氮气鼓泡30分钟将该溶液去氧。通过添加过硫酸钾(2.5mg, 在50 $\mu$ L脱气的水中0.0093mmol)的溶液与纯四亚甲基二胺(4.45mg, 0.038mmol)引发聚合。将所得溶液立即转移至流动池中,将其完全填满。该流动池的末端用石蜡膜(parafilm)密封,并在无氧环境下将该流动池维持在环境温度下60-80分钟。通过用4-6ml的水清洗该流动池来终止聚合,随后用1mL的6XSSPE去除未结合的聚合物。该流动池储存在4°C的6XSSPE中。

[0089] 引物缀合:将5'-硫代磷酸酯修饰的正向引物(2.5 $\mu$ L, 1mM) 与反向引物(2.5 $\mu$ L, 1mM)的合并溶液放置在0.9mL锥形尖端的HPLC小瓶中。将该溶液在环境温度下在Speed-Vac蒸发仪上缩减至干(10-15分钟),随后在6x SSPE(20 $\mu$ L)中再溶解。将储存溶液从流动池去除并通过气密注射器置换为引物溶液。该流动池的末端用石蜡膜(parafilm)紧紧密封,并将该流动池维持在55°C下2小时。使该流动池冷却至环境温度,然后用Milliq水、6xSSPE和1xTE(每次漂洗1mL)漂洗。将含有1XTE的流动池用石蜡膜(parafilm)密封并在4°C下储存。

[0090] 实施例10-引物通过使用点击化学在硅烷化的流动池表面上的直接固定

[0091] 通过在25°C下浸没在硫酸-过氧化氢溶液(Nanostrip, Cyantek Corp., Fremont CA)中16-18hr,然后用去离子水彻底冲洗并用氮气流干燥,来清洁流动池表面。将流动池在氮气下储存,并在48小时内用新制备的叠氮基-PEG4-N,N-双(3-(三甲氧基硅烷基)丙基)氨基甲酸酯在95:5乙醇-水中的2% (wt/vol) 溶液硅烷化18小时。然后将该流动池用乙醇和去离子水彻底漂洗,并用氮气干燥。添加在0.1M Tris缓冲液(pH 7.0)中含有各100uM的5'-炔基修饰的寡核苷酸正向引物和反向引物、5mM CuI以及10mM三-(3-羟丙基三唑基甲基)胺(THPTA)的溶液并维持在22°C下18小时,之后去除寡核苷酸溶液并将该流动池用去离子水漂洗,干燥并在4°C下储存。

[0092] 实施例11-通过杂交的固定化分析

[0093] 用与正向引物("FWD")互补的5'-CY3标记的寡核苷酸杂交靶标来确认成功的引物衔接:将流动池用在pH 7.4的6X SSPE缓冲液中的250nM靶寡核苷酸填充,在55°C下温育1h,冷却至25°C,随后用4-5倍体积的6X SSPE洗涤。用基于CCD的成像荧光显微镜(LED bb激发; ≥640nm发射滤光器)测量表面荧光。然后去除杂交靶标溶液,并将该流动池在55°C下用20倍体积的甲酰胺洗净,并在4°C下储存在无核酸酶的水中。

[0094] 实施例12-固相DNA扩增和簇生成

[0095] 将准备好的流动池(例如,在先前实施例中准备的那些)放置在可编程的热流体站(为特定目的构建的CentiPD)上。主动冷却的(actively cooled)Peltier热电模块(Laird)、NTC热敏电阻温度传感器和可编程的PID控制器(Laird)提供热控制。可达到的温度范围为20-100°C。在流体侧上,250ul注射器泵(Cavro)通过毛细管流动池以特定的速度抽出已编程的体积的试剂。通过具有通向每个试剂管的吸管(sipper)的24通换向阀(VICI)选择合适的试剂。使准备好的试剂Eppendorf管静置在置于冰浴中的铝冷却块中(以在方案时间段期间将其维持在4°C)。

[0096] 如下制备10mM dNTP的溶液:将300μL的每种dNTP储备溶液(储备溶液浓度:100mM)合并以制备25mM储备液,然后将1000μL的25mM储备液添加至1500μL的10mM Tris pH 8.0中。

[0097] 以1X(约10mL等份)和5X量制备了HB1溶液,示于表1中:

[0098] 表1:HB1溶液

	<b>试剂</b>	<b>储备液</b>	<b>最终</b>	<b>1 RXN</b>
	<b>H2O</b>			<b>7400ul</b>
[0099]	<b>20X SSC</b>	<b>20X</b>	<b>5X</b>	<b>2500ul</b>
	<b>Tween-20</b>	<b>10%</b>	<b>0.1%</b>	<b>100ul</b>
	<b>总计</b>			<b>10ml</b>

[0100] 以5X和1X量(约10mL等份)制备了洗涤缓冲液(W2),如表2中所示:

[0101] 表2:W2溶液

	试剂	储备液	最终	1 RXN	5 RXNS
	H2O			9750ul	48750ul
[0102]	20X SSC	20X	0.3X	150ul	750ul
	Tween-20	10%	0.1%	100ul	500ul
	总计			10ml	50000ul

[0103] 通过将15 $\mu$ L的500 $\mu$ M引物储备溶液添加至1485 $\mu$ L的HB1溶液中,制备了浓度为5 $\mu$ M的标记的引物(FP)溶液,如表3中所示:

[0104] 表3:FP溶液

	试剂	储备液	最终	1 RXN	16 RXNS	成本
[0105]	HB1			360ul	5760ul	\$0
	5uM 引物	5.0uM	0.5uM	40ul	640ul	\$0
	总计			400ul	6400ul	\$0

[0106] 制备了扩增预混物 (APM) 溶液,如表4中所示:

[0107] 表4:APM缓冲溶液

	试剂	储备液	最终	1 RXN	32 RXNS
	H2O			687ul	21984ul
[0108]	10X Thermopol	10X	1X	100ul	3200ul
	5M 甜菜碱	5M	1M	200ul	6400ul
	DMSO	100%	1.3%	13ul	416ul
	总计			1000ul	32000ul

[0109] 制备了扩增混合物 (AM),如表5中所示:

[0110] 表5:AM缓冲溶液

	试剂	储备液	最终	1 RXN	16 RXNS	成本
	H2O			1756ul	28090ul	\$0
	10X Thermopol	10X	1X	280ul	4480ul	\$0
[0111]	5M 甜菜碱	5M	1M	560ul	8960ul	\$128
	DMSO	100%	1.3%	36ul	582ul	\$0
	10mM dNTPs	10mM	0.2mM	56ul	896ul	\$0
	Bst Lg.片段	8U/ul	0.32U/ul	112ul	1792ul	\$444
	总计			2800ul	44800ul	\$573

[0112] 制备了线性化混合物 (LM) 溶液,如表6中所示:

[0113] 表6:LM溶液

	试剂	储备液	最终	1 RXN	16 RXNS	成本
[0114]	<b>H2O</b>			<b>356ul</b>	<b>5696ul</b>	<b>\$0</b>
	<b>10X Thermopol</b>	<b>10X</b>	<b>1X</b>	<b>40ul</b>	<b>640ul</b>	<b>\$0</b>
[0115]	<b>USER</b>	<b>1U/ul</b>	<b>0.01U/ul</b>	<b>4ul</b>	<b>64ul</b>	<b>\$83</b>
	<b>总计</b>			<b>400ul</b>	<b>6400ul</b>	<b>\$83</b>

[0116] 制备了文库稀释缓冲液,其包含具有0.1%Tween-20的pH 8.5的10mM Tris-Cl。

[0117] 如下制备稀释文库:1)将储备2N NaOH溶液稀释成如表7中所示的0.1N NaOH溶液。

2)通过将2 $\mu$ L的PhiX添加至8 $\mu$ L的文库稀释缓冲液中,将储备10nM PhiX溶液稀释成2nM。3)

通过将10 $\mu$ L的0.1N NaOH添加至10 $\mu$ L的2nM样品溶液中并在室温下温育5分钟,使样品变性。

4)通过将980 $\mu$ L预冷的HB1溶液添加至20 $\mu$ L样品中,将变性的样品稀释至20pM。5)通过将650

$\mu$ L预冷的HB1溶液添加至350 $\mu$ L的20pM样品溶液中,将稀释的样品进一步稀释至7pM。6)将稀释的样品保存在冰上直到后续使用。

[0118] 表7:0.1N NaOH溶液

	试剂	1 RXN	4 RXNS
[0119]	<b>H2O</b>	<b>475ul</b>	<b>1900ul</b>
	<b>2N NaOH</b>	<b>25ul</b>	<b>100ul</b>
	<b>总计</b>	<b>500ul</b>	<b>2000ul</b>

[0120] 向试剂板上装载在2mL Eppendorf管中的溶液,其中试剂管与合适的CentPD吸管匹配,具体如下:试剂1:950ul HB1;试剂2:950ul APM;试剂3:1300ul AM1;试剂4:1100ul FM(甲酰胺100%);试剂5:1300ul AM2;试剂6:1100ul W2;试剂7:350ul LM;试剂8:400ul NAOH(0.1N NaOH);试剂9:400ul FP。

[0121] 将如在先前实施例中描述的准备好的流动池放置在热流体站上,并如表9所述在CentPD上启动并运行成簇方案:

[0122] 表9:CentPD成簇方案

	重复	加热步骤			等待 时间 [s]	流动步骤		
		温度 [°C]	速率 [°C/s]	时间 [s]		化学品 [ $\mu$ L]	速率 [ $\mu$ L/s]	时间 [s]
[0123]	流动检查							
	初始准备(prime)	25						

[0124]

		60	HB1	60	4	15
			W2	60	4	15
			NAOH	60	4	15
			APM	60	4	15
			AM1	60	4	15
			AM2	60	4	15
			FM	60	1	60
			HB1	120	1	120
TMP 引入	90		文库	150	1	150
			W2	20	1	20
TMP 斜降 (Rampdown)		30				
	40	0.05	1120			
TMP 缓冲液洗 涤			W2	100	0.5	200
第一次延伸			W2	100	0.5	200
			AIR	3	0.5	6
			AM1	100	1	100
			AIR	3	0.5	6
			W2	40	1	40
FE 等待 Amp-TempRamp	40					
		90				
模板剥离	25		NAOH	150	0.5	300
			W2	150	1	150
	60					
扩增 1	16X		FM	28	3.5	8
			APM	28	1	28
			AM1	72	4	18
扩增 2	16X		FM	28	3.5	8
			APM	28	1	28
			AM2	72	4	18
扩增洗涤			W2	120	2	60
			HB1	95	4	23.75
	25					
线性化开始			LM	150	1	150

		38					
				300			
	线性化循环	5X			LM	20	1
				300			
	线性化终止		25				
					W2	150	4 37.5
[0125]	读取 1 准备				HB1	95	4 23.75
					NAOH	200	1 200
					W2	200	1 200
					FP	200	1 200
			60				
					300		
			40			W2	150
		25			HB1	150	1 150

[0126] 1) 将所有的试剂准备好 (primed) (60 $\mu$ L, 4 $\mu$ L/s 25 $^{\circ}$ C), 其中最后的是HB1和W2缓冲液 (Illumina命名法)。2) 在90 $^{\circ}$ C下以1 $\mu$ L/s的速率引入150 $\mu$ L的模板。该模板为PhiX DNA文库 (在HB1中7pM, 变性的, 插入物大小450bp)。3) 在温育30秒后, 将温度以0.05度/s的速率经18分钟缓慢降低至40 $^{\circ}$ C。4) 同样在40 $^{\circ}$ C下, 以0.5 $\mu$ L/sec用200 $\mu$ L的W2洗掉过量的模板。5) 通过以1 $\mu$ L/s注入150 $\mu$ L的扩增混合物 (AM1) 来实现接枝的引物的第一次延伸, 以3 $\mu$ L气泡结束 (book ended) 以防止可能在传送至流动池的线路中发生的试剂的混合。90秒的温育步骤允许充足的时间通过Bst酶进行完全的模板复制。6) 将流动池冷却至25 $^{\circ}$ C, 并采用以0.5 $\mu$ L/s速率泵送的150 $\mu$ L 0.1N NaOH, 以及随后用150 $\mu$ L缓冲液 (W2) 来将模板剥离。7) 将流动池加热至60 $^{\circ}$ C以准备用于等温扩增。8) 通过重复这三个步骤来进行32个循环的等温扩增: (a) 以3.5 $\mu$ L/s在28 $\mu$ L 100%甲酰胺 (FM) 中变性; (b) 以1 $\mu$ L/s用28 $\mu$ L不含酶的预扩增缓冲液 (APM) 去除甲酰胺并允许再杂交; 以及 (c) 以4 $\mu$ L/s用72 $\mu$ L扩增混合物 (AM) 进行引物延伸。9) 用120 $\mu$ L的W2以及95 $\mu$ L的HB1洗掉扩增试剂。10) 在25 $^{\circ}$ C的温度下以1 $\mu$ L/s引入150 $\mu$ L线性化试剂 (LM) (以切割一半的扩增链)。11) 将流动池加热至38 $^{\circ}$ C, 并温育5min (USER处理, 通过尿嘧啶DNA糖基化酶切割dU)。12) 将新鲜的20 $\mu$ L的LM溶液移动至流动池中并温育5min, 重复五次。13) 在线性化后, 将温度降低至25 $^{\circ}$ C, 并用150 $\mu$ L W2和95 $\mu$ L HB1洗涤。14) 用200 $\mu$ L的0.1N NaOH使流动池再次变性, 并用200 $\mu$ L的W2洗涤。15) 以1 $\mu$ L/s引入200 $\mu$ L与剩余链互补的Cy3 5' 标记的测序引物 (FP)。16) 将温度升至60 $^{\circ}$ C, 并将溶液温育5min以允许杂交。17) 在将温度降至40 $^{\circ}$ C后, 用150 $\mu$ L W2洗掉过量的引物。18) 在将温度进一步降至25 $^{\circ}$ C后, 用150 $\mu$ L的W2进一步洗涤流动池。

[0127] 在具有Alta U-4000CCD相机 (Apogee) 的定制落射荧光显微镜上拍摄成簇群落的图像。由于杂交的引物在5' 端用Cy3荧光团标记, 因此我们使用Cy3-4040C滤光器模块 (Semrock) 以及532nm LED作为激发光源。用ELWD Nikon 0.6NA物镜将图像放大40倍, 使得视野的大小为375x375 $\mu$ m。

[0128] 尽管本文中已经示出并描述了本发明的优选实施方案, 但对于本领域技术人员显

而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将想到多种变化、改变和替代。应当理解,本文中所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。目的在于以下述权利要求限定本发明的范围,并由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

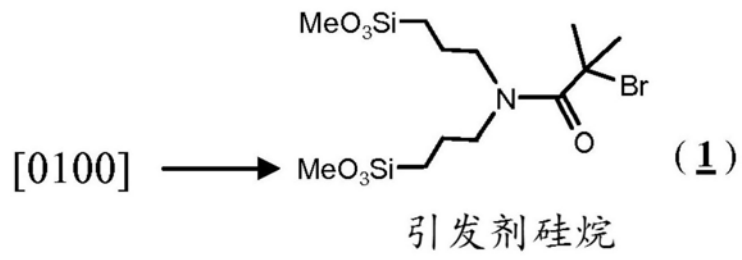


图1

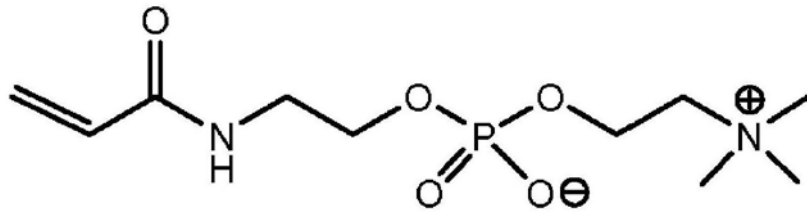


图2

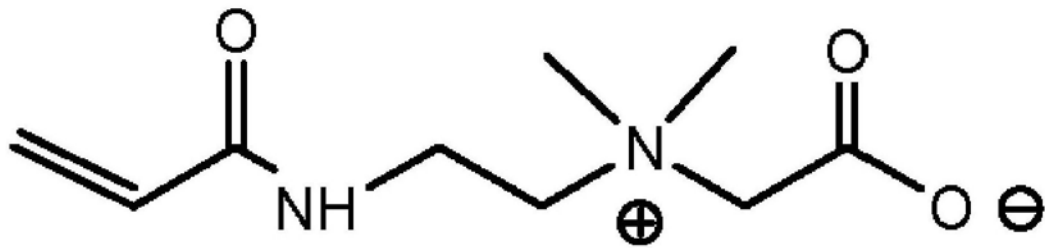


图3

