(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109689216 B
(45)授权公告日 2022.04.05

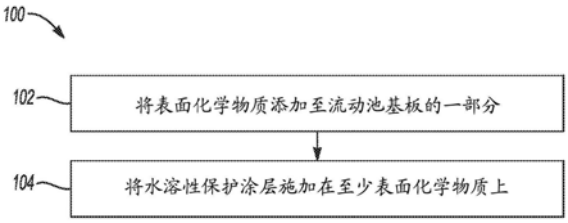
(21)申请号 201880002944.9
(22)申请日 2018.05.02
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109689216 A
(43)申请公布日 2019.04.26
(30)优先权数据
62/504,977 2017.05.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.01.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/030689 2018.05.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/208561 EN 2018.11.15
(73)专利权人 伊鲁米那股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 伊鲁米纳剑桥有限公司
伊鲁米那新加坡私人有限公司
(72)发明人 S·M·拉米雷兹
布莱恩·D·马瑟 爱德文·李
文昭晶 英素·丹尼尔·金
亚历山大·里切斯
卢多维克·文森特
泽维尔·凡哈滕 陈海宽
麦斯威尔·齐默雷
朱莉娅·莫里森
詹卢卡·安德烈·阿蒂奥里
克里斯托·斯莱 海登·布莱克
路易斯·J·克拉夫特 谢虹
韦玮 瑞安·桑福德
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 李慧慧 郑霞
(51)Int.Cl.
B01L 3/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 104736235 A,2015.06.24
CN 103951797 A,2014.07.30
US 2016023208 A1,2016.01.28
US 2015259735 A1,2015.09.17
CN 105431554 A,2016.03.23
审查员 郝雅宁
权利要求书10页 说明书47页 附图17页

(54)发明名称

流动池的保护表面涂层

(57)摘要

方法的实例包括改性基底的暴露表面以并入第一化学基团;使第一化学基团与官能化的聚合物分子的第一反应基团反应,以形成被共价地结合至基底的暴露表面的官能化的官能化的聚合物涂层;通过使引物与官能化的聚合物涂层的第二反应基团反应,将引物接枝到官能化的聚合物涂层;以及在引物和官能化的聚合物涂层上形成水溶性保护涂层。本文还公开了并入水溶性保护涂层的实例的流动池的实例。



CN 109689216 B

1.一种流动池,包括:

基底,所述基底包括暴露表面;

官能化的聚合物涂层,所述官能化的聚合物涂层通过在所述暴露表面上的化学基团被共价地结合至所述基底的所述暴露表面;

引物,所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层;以及

水溶性保护涂层,所述水溶性保护涂层在所述引物和所述官能化的聚合物涂层上,

其中所述水溶性保护涂层通过以下形成:

(i)通过施加包括按质量比体积计高达15%的水溶性材料的水溶液而形成,所述 水溶性材料包括:

非阳离子合成聚合物,其包括聚丙烯酰胺、聚(丙烯酸)、聚丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酰胺)、聚(N-烷基丙烯酰胺)、聚(N-二烷基丙烯酰胺)、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)、聚(二乙烯基醚-马来酸酐)、聚(磷酸酯)、聚(2-烷基-2-噁唑啉)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(2-羟乙基丙烯酸酯)、聚乙二醇、聚醚、聚(磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯)、聚(乙烯基醚-马来酸)、羟基官能聚合物或其组合;

缓冲液,其包括以下物质的水溶液:柠檬酸钠盐水、具有或不具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、3-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]-2-羟基丙烷-1-磺酸(TAPSO)、N-(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基)甘氨酸(tricine)、3-(N-吗啡代)丙烷磺酸(MOPS)或3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-羟基丙烷磺酸(DIPSO);

甘油;

螯合剂,其包括三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、(三(2-羧乙基)膦)或红菲咯啉二磺酸二钠盐;或者

其组合,

或者

(ii)通过施加包括按质量比体积计1%-10%的聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物的水溶液或者包括0.5M乙二胺四乙酸钠盐的水溶液而形成。

2.如权利要求1所述的流动池,其中由于在所述暴露表面上的所述化学基团与所述官能化的聚合物涂层的第一反应基团的反应,所述官能化的聚合物涂层被共价地结合至所述暴露表面。

3.如权利要求2所述的流动池,其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应,所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层。

4.如权利要求1至3中任一项所述的流动池,还包括被结合至所述基底的结合区的盖,其中所述盖和所述基底至少部分地界定流动通道。

5.如权利要求4所述的流动池,其中所述基底是包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底,并且其中所述流动通道与所述凹陷选择性地连通。

6.如权利要求1至3中任一项所述的流动池,其中所述基底是包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底。

7.如权利要求4所述的流动池,其中所述基底是包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底。

8.如权利要求6所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层在所述凹陷中以及在所述间隙区域的至少一部分上。

9.如权利要求5或7所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层在所述凹陷中以及在所述间隙区域的至少一部分上。

10.如权利要求1至3中任一项所述的流动池，其中所述基底是非图案化基底。

11.如权利要求4所述的流动池，其中所述基底是非图案化基底。

12.如权利要求1所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、聚丙烯酰胺、三(羟甲基)氨基甲烷、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水或其混合物。

13.如权利要求1所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物。

14.如权利要求1-3、5、7-8和11-13中任一项所述的流动池，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

15.如权利要求4所述的流动池，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

16.如权利要求6所述的流动池，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

17.如权利要求9所述的流动池，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

18.如权利要求10所述的流动池，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

19.如权利要求1-3、5、7-8、11-13和15-18中任一项所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

20.如权利要求4所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

21.如权利要求6所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

22.如权利要求9所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

23.如权利要求10所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

24.如权利要求14所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

25.如权利要求1-3、5、7-8、11-13、15-18和20-24中任一项所述的流动池，其中所述化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

26.如权利要求4所述的流动池，其中所述化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二

环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

27.如权利要求6所述的流动池，其中所述化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

28.如权利要求9所述的流动池，其中所述化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

29.如权利要求10所述的流动池，其中所述化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

30.如权利要求14所述的流动池，其中所述化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

31.如权利要求19所述的流动池，其中所述化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

32.如权利要求1-3、5、7-8、11-13、15-18、20-24和26-31中任一项所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

33.如权利要求4所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

34.如权利要求6所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

35.如权利要求9所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

36.如权利要求10所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

37.如权利要求14所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

38.如权利要求19所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

39.如权利要求25所述的流动池，其中所述化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

40.如权利要求32所述的流动池，其中所述化学基团是降冰片烯基或被取代的降冰片

烯基。

41.如权利要求33-39中任一项所述的流动池，其中所述化学基团是降冰片烯基或被取代的降冰片烯基。

42.如权利要求2所述的流动池，其中所述第一反应基团为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

43.如权利要求3所述的流动池，其中所述第二反应基团为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

44.如权利要求42所述的流动池，其中所述第一反应基团是叠氮基。

45.如权利要求43所述的流动池，其中所述第二反应基团是叠氮基。

46.如权利要求3所述的流动池，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

47.如权利要求1-3、5、7-8、11-13、15-18、20-24、26-31、33-40和42-46中任一项所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

48.如权利要求4所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

49.如权利要求6所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

50.如权利要求9所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

51.如权利要求10所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

52.如权利要求14所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

53.如权利要求19所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

54.如权利要求25所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

55.如权利要求32所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

56.如权利要求41所述的流动池，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

57.一种制备流动池的方法，包括：

提供具有包括第一化学基团的暴露表面的基底；

使所述第一化学基团与官能化的聚合物分子的第一反应基团反应，以形成被共价地结

合至所述基底的所述暴露表面的官能化的聚合物涂层；

通过使引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团反应，将所述引物接枝到所述官能化的聚合物涂层；以及

在所述引物和所述官能化的聚合物涂层上形成水溶性保护涂层，以制备所述流动池，

其中所述水溶性保护涂层通过以下形成：

(i)通过施加包括按质量比体积计高达15％的水溶性材料的水溶液而形成，所述 水溶性材料包括：

非阳离子合成聚合物，其包括聚丙烯酰胺、聚(丙烯酸)、聚丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酰胺)、聚(N-烷基丙烯酰胺)、聚(N-二烷基丙烯酰胺)、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)、聚(二乙烯基醚-马来酸酐)、聚(磷酸酯)、聚(2-烷基-2-噁唑啉)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(2-羟乙基丙烯酸酯)、聚乙二醇、聚醚、聚(磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯)、聚(乙烯基醚-马来酸)、羟基官能聚合物或其组合；

缓冲液，其包括以下物质的水溶液：柠檬酸钠盐水、具有或不具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、3-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]-2-羟基丙烷-1-磺酸(TAPSO)、N-(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基)甘氨酸(tricine)、3-(N-吗啡代)丙烷磺酸(MOPS)或3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-羟基丙烷磺酸(DIPSO)；

甘油；

螯合剂，其包括三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、(三(2-羧乙基)膦)或红菲咯啉二磺酸二钠盐；或者

其组合，

或者

(ii)通过施加包括按质量比体积计1％-10％的聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物的水溶液或者包括0.5M乙二胺四乙酸钠盐的水溶液而形成。

58.如权利要求57所述的方法，其中所述提供包括改性所述基底的所述暴露表面以并入所述第一化学基团。

59.如权利要求57所述的方法，其中所述基底是非图案化基底，并且其中所述方法还包括将盖结合至所述非图案化基底的结合区，其中所述盖和所述非图案化基底至少部分地界定包括所述暴露表面的流动通道。

60.如权利要求58所述的方法，其中所述基底是非图案化基底，并且其中所述方法还包括将盖结合至所述非图案化基底的结合区，其中所述盖和所述非图案化基底至少部分地界定包括所述暴露表面的流动通道。

61.如权利要求60所述的方法，其中所述暴露表面的所述改性、所述第一化学基团与所述第一反应基团的所述反应、所述引物的所述接枝和所述水溶性保护涂层的所述形成涉及相应的流过过程。

62.如权利要求58所述的方法，其中：

所述基底是非图案化基底；

所述暴露表面的所述改性包括等离子体灰化；以及

在所述暴露表面的所述改性之后，所述方法还包括将盖结合至所述非图案化基底的结

合区,其中所述盖和所述非图案化基底至少部分地界定包括所述暴露表面中的一些的流动通道。

63.如权利要求58所述的方法,其中:

所述基底是包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底;

所述暴露表面的所述改性涉及将包括所述第一化学基团的硅烷或硅烷衍生物附接至所述暴露表面,以形成硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域;

所述第一化学基团与官能化的聚合物分子的第一反应基团的所述反应在所述硅烷化凹陷中和在所述硅烷化间隙区域上形成所述官能化的聚合物涂层;以及

在所述引物的所述接枝之前,所述方法还包括从所述硅烷化间隙区域去除所述官能化的聚合物涂层。

64.如权利要求63所述的方法,其中:

所述接枝将所述引物附接至所述硅烷化凹陷中的所述官能化的聚合物涂层,从而形成官能化凹陷;以及

所述水溶性保护涂层的所述形成是在所述官能化凹陷和至少一些所述间隙区域上产生所述水溶性保护涂层。

65.如权利要求63所述的方法,其中在所述官能化的聚合物涂层的所述去除之后,所述方法还包括将盖结合至所述图案化基底的结合区,其中所述盖和所述图案化基底至少部分地界定流动通道,所述流动通道包括具有在其上的所述官能化的聚合物涂层的所述硅烷化凹陷。

66.如权利要求65所述的方法,其中所述引物的所述接枝和所述水溶性保护涂层的所述形成涉及相应的流过过程。

67.如权利要求57或58所述的方法,其中在形成所述官能化的聚合物涂层之后以及在所述引物的所述接枝和所述水溶性保护涂层的所述形成之前,所述方法还包括:

在所述官能化的聚合物涂层上图案化初始水溶性保护涂层,使得所述基底的结合区保持暴露;

将盖结合至所述基底的所述结合区以形成与所述初始水溶性保护涂层选择性地流体连通的流动通道;以及

去除所述初始水溶性保护涂层。

68.如权利要求57所述的方法,其中所述水溶性保护涂层的所述形成涉及施加包括按质量比体积计1%至15%的水溶性材料的水溶液。

69.如权利要求57所述的方法,其中所述水溶性保护涂层的所述形成涉及施加包括按质量比体积计1%至10%的水溶性材料的水溶液。

70.如权利要求57所述的方法,其中所述水溶性保护涂层的所述形成涉及施加包括按质量比体积计2%至5%的水溶性材料的水溶液。

71.如权利要求57所述的方法,其中所述水溶性保护涂层的所述形成涉及施加包括按质量比体积计1%至5%的水溶性材料的水溶液。

72.如权利要求57所述的方法,其中所述水溶性保护涂层的所述形成涉及施加包括按质量比体积计4%至8%的水溶性材料的水溶液。

73.如权利要求57所述的方法,其中所述水溶性保护涂层的所述形成涉及施加包括按

质量比体积计5％至7.5％的水溶性材料的水溶液。

74.如权利要求57所述的方法，其中基于所述引物的引物密度来调节所述水溶液中的所述水溶性材料的百分比。

75.如权利要求68-73中任一项所述的方法，其中基于所述引物的引物密度来调节所述水溶液中的所述水溶性材料的百分比。

76.如权利要求57所述的方法，其中所述水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、聚丙烯酰胺、三(羟甲基)氨基甲烷、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水或其混合物。

77.如权利要求57所述的方法，其中所述水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物。

78.如权利要求57-66、68-74和76-77中任一项所述的方法，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

79.如权利要求67所述的方法，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

80.如权利要求75所述的方法，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

81.如权利要求57-66、68-74、76-77和79-80中任一项所述的方法，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

82.如权利要求67所述的方法，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

83.如权利要求75所述的方法，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

84.如权利要求78所述的方法，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

85.如权利要求57-66、68-74、76-77、79-80和82-84中任一项所述的方法，其中所述第一化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

86.如权利要求67所述的方法，其中所述第一化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

87.如权利要求75所述的方法，其中所述第一化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

88.如权利要求78所述的方法，其中所述第一化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的

四唑基、甲酰基或羟基。

89.如权利要求81所述的方法，其中所述第一化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

90.如权利要求57-66、68-74、76-77、79-80、82-84和86-89中任一项所述的方法，其中所述第一化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

91.如权利要求67所述的方法，其中所述第一化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

92.如权利要求75所述的方法，其中所述第一化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

93.如权利要求78所述的方法，其中所述第一化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

94.如权利要求81所述的方法，其中所述第一化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

95.如权利要求85所述的方法，其中所述第一化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

96.如权利要求90所述的方法，其中所述第一化学基团是降冰片烯基或被取代的降冰片烯基。

97.如权利要求91-95中任一项所述的方法，其中所述第一化学基团是降冰片烯基或被取代的降冰片烯基。

98.如权利要求57-66、68-74、76-77、79-80、82-84、86-89和91-96中任一项所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

99.如权利要求67所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

100.如权利要求75所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

101.如权利要求78所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

102.如权利要求81所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独

立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

103.如权利要求85所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

104.如权利要求90所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

105.如权利要求97所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

106.如权利要求98所述的方法，其中所述第一反应基团和第二反应基团都是叠氮基。

107.如权利要求99-105中任一项所述的方法，其中所述第一反应基团和第二反应基团都是叠氮基。

108.如权利要求57-66、68-74、76-77、79-80、82-84、86-89、91-96和99-106中任一项所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

109.如权利要求67所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

110.如权利要求75所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

111.如权利要求78所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

112.如权利要求81所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

113.如权利要求85所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

114.如权利要求90所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基

团用于与所述第二反应基团反应。

115.如权利要求97所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

116.如权利要求98所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

117.如权利要求107所述的方法，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层，并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

118.如权利要求57-66、68-74、76-77、79-80、82-84、86-89、91-96、99-106和109-117中任一项所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

119.如权利要求67所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

120.如权利要求75所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

121.如权利要求78所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

122.如权利要求81所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

123.如权利要求85所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

124.如权利要求90所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

125.如权利要求97所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

126.如权利要求98所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

127.如权利要求107所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

128.如权利要求108所述的方法，其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

129.一种使用权利要求1-56中任一项的流动池的方法，包括：

将所述流动池插入到测序仪中；以及

通过将所述流动池上的所述水溶性保护涂层暴露于水来去除所述水溶性保护涂层。

130.如权利要求129所述的方法，其中所述去除通过执行流过过程以去除所述水溶性保护涂层来完成。

流动池的保护表面涂层

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年5月11日提交的美国临时申请号62/504,977的优先权，该临时申请通过引用以其整体并入。

背景技术

[0003] 生物阵列是用于检测和分析分子的多种工具之一，所述分子包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。在这些应用中，阵列被设计成包括用于在人类和其他生物体的基因中存在的核苷酸序列的探针。例如，在某些应用中，单独的DNA和RNA探针可以附接在阵列支架上的几何网格中(或随机地)的小位置处。例如来自已知的人或生物体的测试样品可以暴露于网格，使得互补片段在阵列中的单独位点处与探针杂交。然后可以通过在位点上扫描特定频率的光以识别在样品中存在哪些片段、通过片段被杂交的位点的荧光来检查阵列。

[0004] 生物阵列可以用于基因测序。一般来说，遗传测序涉及确定在一段遗传物质中的核苷酸或核酸的顺序，例如DNA或RNA的片段。越来越长的碱基序列正在被分析，并且产生的序列信息可以用于各种生物信息学方法中以逻辑地将片段拟合在一起，以便可靠地确定片段被衍生自的遗传物质的大量长度的序列。特征片段的自动的基于计算机的检查已经被开发，并且已经被用于基因组作图、基因及其功能的识别、某些状况和疾病状态的风险的评估等。除了这些应用以外，生物阵列还可以用于检测和评估各种分子、分子的家族、基因表达水平、单核苷酸多态性和基因分型。

[0005] 概述

[0006] 在一个方面中，流动池包括：基底；结合至基底的结合区的盖(lid)，其中盖和基底至少部分地界定流动通道；以及被定位在基底上和流动通道中的表面化学物质(surface chemistry)。水溶性保护涂层覆盖在基底上的表面化学物质。

[0007] 在一个方面中，流动池包括：基底，所述基底包括暴露表面；官能化的聚合物涂层(coating layer)，所述官能化的聚合物涂层通过暴露表面上的化学基团共价地结合至基底的暴露表面；被接枝到官能化的聚合物涂层的引物(primer)；以及在引物和官能化的聚合物涂层上的水溶性保护涂层(water-soluble protective coating)。在一些实例中，流动池还包括结合至基底的结合区的盖，其中盖和基底至少部分地界定流动通道。

[0008] 在本文描述的流动池的一些方面中，由于在暴露表面上的化学基团与官能化的聚合物涂层的第一反应基团的反应，官能化的聚合物涂层被共价地结合至暴露表面。在一些实例中，由于引物与官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，引物被接枝到官能化的聚合物涂层。

[0009] 本文公开的流动池的实例包括图案化基底。图案化基底包括由间隙区域分隔的凹陷和被定位在凹陷中的表面化学物质。在一些实例中，盖被结合至图案化基底的结合区，其中盖至少部分地界定与凹陷选择性连通的流动通道。水溶性保护涂层覆盖凹陷中的表面化学物质。在一些实例中，暴露表面上的化学基团在凹陷中被附接至基底。

[0010] 本文公开的流动池的另一个实例包括非图案化基底。在一些实例中，盖被结合至非图案化基底的结合区，其中盖和非图案化基底至少部分地界定包括暴露表面的流动通道。表面化学物质被定位在非图案化基底上和流动通道中。水溶性保护涂层覆盖表面化学物质。在一些实例中，暴露表面上的化学基团附接至非图案化基底。

[0011] 在另一个方面中，一种使用如本文描述的流动池的方法包括：将流动池插入到测序仪中；以及通过将水溶性保护涂层暴露于水(任选地呈水性缓冲液的形式)来去除水溶性保护涂层。在一些方面中，去除是通过执行流过过程以去除水溶性保护涂层来完成的。水溶性保护涂层的去除揭示引物，该引物然后可以用于与靶寡核苷酸杂交，所述靶寡核苷酸包括与引物的至少一部分互补的序列。

[0012] 在本文公开的方法的实例中，将表面化学物质添加至流动池基底的一部分中，并且将水溶性保护涂层施加在至少表面化学物质上。

[0013] 在另一个方面中，一种方法包括：提供具有包括第一化学基团的暴露表面的基底，其中所述提供任选地包括使基底的暴露表面改性以并入第一化学基团；使第一化学基团与官能化聚合物分子的第一反应基团反应，以形成共价地结合至基底的暴露表面的官能化的聚合物涂层；通过使引物与官能化的聚合物涂层的第二反应基团反应，将引物接枝到官能化的聚合物涂层；以及在引物和官能化的聚合物涂层上形成水溶性保护涂层。

[0014] 附图简述

[0015] 通过参考以下详细描述和附图，本公开内容的实施例的特征将变得明显，其中相似的参考数字对应于相似的(尽管可能不相同的)部件。为了简洁起见，具有先前描述的功能的参考数字或特征可以结合或可以不结合其中它们出现的其他附图来描述。

[0016] 图1是图示出了本文公开的方法的实施例的流程图；

[0017] 图2是图示出了图1所示的方法的更详细实施例的流程图；

[0018] 图3是通过图2所示的方法形成的实施例流动池的横截面图；

[0019] 图4是图示出了本文公开的方法的另一实施例的流程图；

[0020] 图5A至图5H是一起图示出了图4所示的方法的实施例的横截面视图；

[0021] 图5A至图5D和图5I至图5L是一起图示出了图4所示的方法的另一个实施例的横截面视图；

[0022] 图6A至图6E是一起图示出了本文公开的方法的另一个实施例的横截面视图；

[0023] 图7是描绘了在30℃下储存持续7天后的流动池的发夹-TET(HP-TET)保留的柱状图，在其上具有保护涂层的不同实施例；

[0024] 图8是描绘了用于流动池和用于未涂覆对照物的HP-TET保留的绘图，流动池在其上具有保护涂层的实施例；

[0025] 图9是具有在不同湿度条件下封装的实施例流动泳道(flow lane)和比较流动泳道的流动池在第一或初始测序循环之后的荧光强度的绘图；

[0026] 图10是具有实施例流动泳道和比较流动泳道的流动池在第一测序循环之后的荧光强度的绘图，所述流动池被暴露于温度斜坡曲线持续在从2天至19天范围内的不同时间段；

[0027] 图11A是在60℃老化持续6天的实施例流动池和比较流动池在第一初始测序循环(C1)之后的读数1(R1)荧光强度的绘图；

[0028] 图11B包括在室温下老化持续7天的实施例流动池和比较流动池在第一测序循环(C1)之后的通过过滤器的簇的百分比(顶部)的绘图和读数1(R1)荧光强度的绘图；

[0029] 图12A是在不同温度孵育持续1小时的实施例流动池的中值强度的绘图；

[0030] 图12B是在不同温度孵育持续1小时的比较流动池的中值强度的图；

[0031] 图13是具有在不同温度存储持续不同时间段的实施例流动泳道和比较流动泳道的流动池在第一测序循环之后的读数1(R1)荧光强度的绘图；

[0032] 图14是描绘了以mm(x轴)计的横越在图案化晶片上的保护涂层的距离相对于以μm(y轴)计的涂层厚度的距离的关系(即涂层厚度(μm)作为横越晶片表面的距离(mm)的函数)的图；

[0033] 图15是在室温储存持续28天、35天和71天之后的实施例流动池和比较流动池的表面引物可接近性测试(CFR测定)之后的荧光强度的绘图；

[0034] 图16是在30℃下干燥储存持续0周、2周和6周之后的实施例流动池、在30℃下干燥储存持续2周和6周之后的比较流动池以及在4℃下湿储存持续6周之后的实施例流动池在第一测序循环之后的荧光强度的绘图；

[0035] 图17是描绘了在不同储存条件下储存11天后的Cal Fluor Red(CFR)保留测定的结果的绘图，其中CFR保留意指在第0天的CFR信号相对于在储存后的CFR信号；

[0036] 图18是描述了实施例流动池和比较实施例流动池在时间0(T0)以及在第1天和第2天的CFR保留(%，在第X天的CFR信号/在第0天的信号的比率)的柱状图；

[0037] 图19是相对于相应实施例流动池部分的保护涂层的厚度的与干燥对照相比的实施例流动池部分的强度百分比增加的绘图；

[0038] 图20是包括实施例流动泳道和比较实施例流动泳道的流动池在第一测序循环(C1)之后的两次读数的荧光强度的绘图；

[0039] 图21是CFR(相对信号)相对于与引物接枝同时形成的保护涂层的百分比的图；以及

[0040] 图22是实施例保护涂层和若干比较实施例保护涂层的强度(以任意荧光单位AFU)相对于浓度的图。

[0041] 详细描述

[0042] 流动池的第一方面包括：图案化基底，所述图案化基底包括由间隙区域分隔的凹陷和被定位在凹陷中的表面化学物质(例如，官能化的聚合物涂层和接枝到其上的引物)；结合至图案化基底的结合区的盖，其中盖至少部分地界定与凹陷选择性连通的流动通道；以及水溶性保护涂层，所述水溶性保护涂层覆盖凹陷中的表面化学物质和图案化基底的至少一部分。

[0043] 在一个方面中，流动池包括：包括暴露表面的基底；共价地结合至基底的暴露表面的官能化的聚合物涂层；接枝到官能化的聚合物涂层的引物；以及在引物和官能化的聚合物涂层上的水溶性保护涂层。在一些实例中，流动池还包括结合至基底的结合区的盖，其中盖和基底至少部分地界定流动通道。

[0044] 在一些实例中，由于暴露表面上的化学基团与官能化的聚合物涂层的第一反应基团的反应，官能化的聚合物涂层被共价地结合至暴露表面。在一些实例中，由于引物与官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，引物被接枝到官能化的聚合物涂层。在一些实例

中，引物包括用于与第二反应基团反应的炔基基团。在一些实例中，附接至暴露表面的化学基团是烯基基团、环烯基基团或降冰片烯基基团。在一些实例中，化学基团是被附接至基底的暴露表面的连接基(linker)例如硅烷或硅烷衍生物的一部分。

[0045] 在一些实例中，基底是图案化基底。图案化基底包括由间隙区域分隔的凹陷。在一些实例中，盖被结合至图案化基底的结合区，其中盖至少部分地界定与凹陷选择性连通的流动通道。在一些实例中，水溶性保护涂层覆盖官能化的聚合物涂层和凹陷中的引物。在一些实例中，暴露表面上的化学基团任选地经由连接基在凹陷中被附接至基底。

[0046] 在其他实例中，流动池基底是非图案化基底。在一些实例中，盖被结合至非图案化基底的结合区，其中盖和非图案化基底至少部分地界定包括暴露表面的流动通道。官能化的聚合物涂层和引物在非图案化基底上和流动通道中。水溶性保护涂层覆盖官能化的聚合物涂层和引物。在一些实例中，暴露表面上的化学基团任选地经由连接基被附接至基底。因此，在一些方面中，流动池包括非图案化基底；结合至非图案化基底的结合区的盖，其中盖和非图案化基底至少部分地界定流动通道；被定位在非图案化基底上和流动通道中的表面化学物质(例如，官能化的聚合物涂层和接枝到其上的引物)；以及覆盖表面化学物质的水溶性保护涂层。

[0047] 在第一方面中，一种方法包括将表面化学物质添加至流动池基底的一部分中，以及将水溶性保护涂层施加在至少表面化学物质上。在该方法的该第一方面的实例中，添加表面化学物质涉及形成官能化的聚合物涂层，以及将引物接枝到官能化的聚合物涂层；并且在引物被接枝后施加水溶性保护涂层。此外在该第一方面的该实例中，水溶性保护涂层被图案化以在形成水溶性保护涂层之后界定流动池基底的结合区；并且该方法还包括将盖结合至流动池基底的所界定的结合区以形成流动通道。

[0048] 在该方法的该第一方面的另一个实例中，添加表面化学物质涉及形成官能化的聚合物涂层，并且在形成官能化的聚合物涂层之后施加水溶性保护涂层。此外在该第一方面的该实例中，水溶性保护涂层选自由聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、聚丙烯酰胺和聚乙二醇组成的组。仍还在该第一方面的该实例中，水溶性保护涂层被图案化以在形成水溶性保护涂层之后界定流动池基底的结合区；并且该方法还包括将盖结合至流动池基底的所界定的结合区以形成流动通道。在结合后，该方法还包括去除水溶性保护涂层，从而暴露官能化的聚合物涂层和基底的另一部分；将引物接枝到官能化的聚合物涂层；以及在引物、官能化的聚合物涂层和流动池基底的其他部分上形成第二水溶性保护涂层。在该方面的实例中，去除水溶性保护涂层涉及溶解过程。此外在该方面中，第二水溶性保护涂层选自由以下组成的组：非阳离子合成聚合物；天然多糖或其衍生物；天然蛋白质或其衍生物；水溶性盐；选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇、甘油和环糊精组成的组的小分子化合物；及其组合。

[0049] 在一个方面中是一种方法，其中在基底的暴露表面上形成官能化的聚合物涂层。引物被接枝到官能化的聚合物涂层。在官能化的聚合物涂层上形成水溶性保护涂层。在一些实例中，暴露表面包括附接至其上的连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)。在一些方面中，该方法包括将连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)附接至暴露表面。在一些方面中，基底是非图案化的。在其他方面中，基底被图案化，并且该附接提供衍生化(例如硅烷化)凹陷和衍生化(例如硅烷化)间隙区域。

[0050] 在一个方面中，一种方法包括：使基底的暴露表面改性以并入第一化学基团；使第一化学基团与官能化的聚合物分子的第一反应基团反应，以形成被共价地结合至基底的暴露表面的官能化的聚合物涂层；通过使引物与官能化的聚合物涂层的第二反应基团反应，将引物接枝到官能化的聚合物涂层；以及在引物和官能化的聚合物涂层上形成水溶性保护涂层。

[0051] 在本文公开的方法的另一个实例中，暴露表面的改性包括将连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)附接至基底的暴露表面。在一些实例中，连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)包括第一化学基团。在一些实例中，连接基是硅烷或硅烷衍生物。在一些实例中，暴露表面的改性包括等离子体灰化。在一些实例中，改性包括等离子体灰化以形成等离子体灰化表面并将连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)附接至其上。

[0052] 在一些实例中，基底是非图案化的。在一些实例中，第一化学基团与官能化的聚合物分子的第一反应基团的反应形成官能化的聚合物涂层，该官能化的聚合物涂层经由连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)被共价地结合至基底的暴露表面。在一些实例中，在暴露表面的改性之后，该方法还包括将盖结合至非图案化基底的结合区，其中盖和非图案化基底至少部分地界定包括一些暴露表面的流动通道。

[0053] 在其他实例中，基底是非图案化的。在一些实例中，暴露表面的改性包括等离子体灰化，并且在暴露表面的改性之后，该方法还包括将盖结合至非图案化基底的结合区，其中盖和非图案化基底至少部分地界定包括一些暴露表面的流动通道。

[0054] 在一些实例中，基底是图案化基底(包括由间隙区域分隔的凹陷)。在一些实例中，官能化的聚合物涂层在凹陷中形成以形成官能化凹陷，并且水溶性保护涂层在官能化的凹陷上形成。在一些方面中，化学基团在凹陷中附接至基底，并且流动通道与凹陷选择性地连通。在一些实例中，水溶性保护涂层在凹陷中以及在间隙区域的至少一部分上。

[0055] 在一些实例中，图案化基底包括被附接至暴露表面的连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)。在一些实例中，连接基被附接至凹陷中的暴露表面，并且在一些实例中，连接基附接至凹陷和间隙区域中的暴露表面，以形成衍生化(例如硅烷化)凹陷和衍生化(例如硅烷化)间隙区域。在一些实例中，暴露表面的改性涉及将包括第一化学基团的连接基(例如硅烷或硅烷衍生物)附接至暴露表面，以形成衍生化(例如硅烷化)凹陷以及任选地衍生化(例如硅烷化)间隙区域。在一些实例中，反应在衍生化(例如硅烷化)凹陷和间隙区域中形成官能化的聚合物涂层。在一些实例中，在引物的接枝之前，该方法还包括从衍生化(例如硅烷化)间隙区域中去除官能化的聚合物涂层。在一些实例中，通过从间隙区域抛光官能化的聚合物涂层来进行去除。引物被接枝到衍生化(例如硅烷化)凹陷中的官能化的聚合物涂层，以形成官能化的凹陷。在一些这样的实例中，该接枝将引物附接至衍生化(例如硅烷化)凹陷中的官能化的聚合物涂层，从而形成官能化的凹陷。水溶性保护涂层在官能化的凹陷和间隙区域的至少一部分上形成。在一些实例中，该形成在官能化凹陷和至少一些间隙区域上产生水溶性保护涂层。在一些实例中，在去除官能化的聚合物涂层之后，该方法还包括将盖结合至图案化基底的结合区，其中盖和非图案化基底至少部分地界定流动通道，该流动通道包括在其上具有官能化的聚合物涂层的硅烷化凹陷。

[0056] 因此，在一些实例中，该方法包括将硅烷或硅烷衍生物附接至包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底的表面，从而形成硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域；在硅烷化凹陷中

和在硅烷化间隙区域上形成官能化的聚合物涂层;从硅烷化间隙区域抛光官能化的聚合物涂层;将引物接枝到硅烷化凹陷中的官能化的聚合物涂层,以形成官能化凹陷;以及在官能化凹陷和间隙区域的至少一部分上形成水溶性保护涂层。

[0057] 在该方法的一些方面中,在引物被接枝之后形成水溶性保护涂层;水溶性保护涂层被图案化,使得在形成水溶性保护涂层之后,图案化基底的结合区保持暴露;并且该方法还包括将盖结合至图案化基底的结合区,以形成与至少一些官能化的凹陷选择性地流体连通的流动通道。

[0058] 在该方法的其他方面中,在从图案化基底的间隙区域去除官能化的聚合物涂层(例如,通过抛光)之后,并且在将i)引物接枝和ii)形成水溶性保护涂层之前,该方法还包括:在官能化的聚合物涂层上图案化初始水溶性保护涂层,使得图案化基底的结合区保持暴露;将盖结合至图案化基底的结合区以形成与至少一些凹陷选择性地流体连通的流动通道;以及去除初始水溶性保护涂层。

[0059] 在一些实例中,暴露表面的改性、第一化学基团与第一反应基团的反应、引物的接枝和/或水溶性保护涂层的形成涉及相应的流过过程(flow through process)。在一些实例中,引物的接枝和水溶性保护涂层的形成涉及相应的流过过程。在一些实例中,施加水溶性保护涂层涉及流过沉积、浸涂、旋涂、喷涂、超声喷涂、刮刀涂布、气溶胶印刷或喷墨印刷。

[0060] 在一些实例中,所述方法还包括将盖结合至流动池基底的结合区以形成流动通道,以及然后添加表面化学物质(例如,官能化的聚合物涂层和引物)并且施加水溶性保护涂层。

[0061] 在一些实例中,在引物的接枝之后,该方法还包括至少部分地去除水溶性保护涂层,并且进行基于染料的测定以检测引物的任何降解(例如,损失或功能的丧失)。

[0062] 在一些实例中,在形成官能化的聚合物涂层之后以及在引物的接枝和水溶性保护涂层的形成之前,该方法还包括:在官能化的聚合物涂层上图案化初始水溶性保护涂层,使得基底的结合区保持暴露;将盖结合至基底的结合区以形成与初始水溶性保护涂层选择性地流体连通的流动通道;以及去除初始水溶性保护涂层。在一些实例中,初始水溶性保护涂层通过喷涂或流过过程来施加。在一些实例中,初始水溶性保护涂层和水溶性保护涂层由相同的材料形成,而在其他实例中,它们由不同的材料形成。

[0063] 在一些实例中,水溶性保护涂层的形成涉及将水溶性材料的水溶液施加至基底的暴露表面。在一些实例中,然后使水溶性材料的水溶液在暴露表面上干燥(例如,通过加温、加热、蒸发、真空暴露等)。在一些实例中,水溶液包括高达约15%、或约1%至15%、或约1%至10%、或约1%至5%、或约2%至5%、或约4%至8%、或约5%至7.5%、或约5%、或约7.5%(质量比体积)的水溶性材料。在一些实例中,水溶液包括约5%至约7.5%、或约5%、或约7.5%(质量比体积)的水溶性材料。在一些实例中,水溶液中的水溶性材料的百分比基于引物的引物密度来调节。在一些实例中,水溶液还包括共溶剂,例如乙醇。在一些实例中,水溶液是在10%含水乙醇中的约5%至约7.5%、或约5%、或约7.5%的水溶性材料。

[0064] 在本文描述的方法和流动池的一些实例中,水溶性保护涂层包括水溶性非阳离子合成聚合物;水溶性天然多糖或其衍生物;水溶性天然蛋白质或其衍生物;水溶性盐;或者选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇、甘油和环糊精组成的组的水溶性小分子化合物;或其组合。在一些实例中,水溶性保护涂层包括水溶性非阳离子合

成聚合物。在一些实例中，水溶性保护涂层包括：

[0065] (a)非阳离子合成聚合物，任选地包括聚丙烯酰胺、聚(丙烯酸)或聚丙烯酸酯(例如聚丙烯酸钠)、聚(甲基丙烯酸)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酰胺)、聚(N-烷基丙烯酰胺)、聚(N-二烷基丙烯酰胺)、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)、聚(二乙烯基醚-马来酸酐)、聚(磷酸酯)、聚(2-烷基-2-噁唑啉)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(2-羟乙基丙烯酸酯)、聚乙二醇、聚(磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯)、聚醚(例如聚乙烯醚、聚乙二醇、聚(环氧乙烷)等、聚(乙烯基醚-马来酸)、羟基官能聚合物(例如PEG或PVA)、非天然多肽(例如聚(谷氨酸)或其盐)或有机硅或其组合；包括例如无规共聚物、嵌段共聚物和接枝共聚物以及支化类似物；或者

[0066] (b)天然多糖或其衍生物，其任选地选自由以下组成的组：淀粉、羧甲基纤维素、黄原胶、果胶、葡聚糖、角叉菜胶、瓜尔胶、纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羟乙基纤维素(HEC)、甲基纤维素、羧甲基羟乙基纤维素(CMHEC)、透明质酸、淀粉磷酸酯、羟丙基淀粉、羟乙基淀粉、琼脂糖、琼脂和藻酸盐及其组合；或者

[0067] (c)天然蛋白质或其衍生物，其任选地选自酪蛋白和白蛋白；或者

[0068] (d)水溶性盐，其任选地选自由以下组成的组：氯化物、溴化物、硫酸盐、磷酸盐、碳酸盐、醋酸盐和柠檬酸盐的钠盐或钾盐，例如氯化钠、溴化钠、硫酸钠、磷酸钠、碳酸钠、醋酸钠、柠檬酸钠、氯化钾、溴化钾、硫酸钾、磷酸钾、碳酸钾、醋酸钾、柠檬酸钾或柠檬酸钠盐水或其组合；或者

[0069] (e)缓冲液(例如弱酸及其共轭碱的水溶液)，其中弱酸或共轭碱任选地是柠檬酸钠盐水、任选地具有EDTA的三(羟甲基)氨基甲烷(例如Tris或Tris碱)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、3-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]-2-羟基丙烷-1-磺酸(TAPO)、N-(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基)甘氨酸(tricine)、3-(N-吗啡代)丙烷磺酸(MOPS)或3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-羟基丙烷磺酸(DIPSO)；或者

[0070] (f)水溶性表面活性剂，其任选地为阴离子型表面活性剂或非离子型表面活性剂，或者任选地为十二烷基硫酸钠、烷基乙氧基化物、乙氧基化油、脂肪或磺基琥珀酸盐；或者

[0071] (g)糖(例如蔗糖)、抗氧化剂、乙二醇、甘油或环糊精；或者

[0072] (h)螯合剂，其任选地为乙二胺四乙酸钠盐、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、(三(2-羧乙基)膦)或红菲咯啉二磺酸二钠盐(bathophenanthrolinedisulfonic acid disodium salt)；或者

[0073] (i)其组合。

[0074] 合适的非阳离子合成聚合物的实例是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物(其一个实例包括从BASF公司可获得的KOLLICOAT® IR)。合适的羟基官能聚合物的实例是在商品名KOLLICOAT® IR下从BASF公司可商购的。包括酸基团的任何水溶性非阳离子合成聚合物都可以以碱金属盐形式使用。

[0075] 在一些本文公开的实例中，当在引物接枝之后被施加时，保护涂层可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物(例如均从BASF公司可获得的KOLLICOAT® IR)、蔗糖、葡聚糖(例如，200,000Da的分子量)、聚丙烯酰胺(例如，40,000Da、200,000Da等的分子量)、聚乙二醇，乙二胺四乙酸钠盐(即EDTA)、具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷、(三(2-羧乙

基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水。在本文公开的一些其他实例中,当在官能化的聚合物涂层形成之后或期间被施加时,保护涂层可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、聚丙烯酰胺或聚乙二醇。对于至少蔗糖和聚丙烯酰胺,应该理解,官能化的聚合物涂层应该在施加这些材料的保护涂层之前被固化。

[0076] 在一些实例中,水溶性保护涂层包括非阳离子合成聚合物;天然多糖或其衍生物;天然蛋白质或其衍生物;水溶性盐;选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇、甘油或环糊精组成的组的小分子化合物;或其组合。在一些实例中,水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、乙二醇、三(羟甲基)氨基甲烷或其盐、乙二胺四乙酸或其盐、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺或其盐、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水或其混合物。在一些实例中,水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖或其混合物。在一些实例中,水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物。在一些实例中,接枝共聚物包括约75%聚乙烯醇和约25%聚乙二醇。

[0077] 在本文描述的方法或流动池的一些实例中,官能化的聚合物涂层包括聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

[0078] 在本文描述的方法或流动池的一些实例中,水溶性保护涂层作为与官能化的聚合物涂层的混合物存在于(或施加至)流动池上。在这样的实例中,流动池包括:包括暴露表面的基底;被共价地结合至基底的暴露表面的官能化的聚合物涂层;被接枝到官能化的聚合物涂层的引物;以及与官能化的聚合物涂层混合的水溶性保护涂层。相关方法包括:使基底的暴露表面改性以并入第一化学基团;使第一化学基团与水溶性保护涂层和包括第一反应基团的官能化聚合物分子的混合物反应,以形成被共价地结合至所述基底的暴露表面并与水溶性保护涂层混合的官能化的聚合物涂层;以及通过使引物与官能化的聚合物涂层的第二反应基团反应,将引物接枝到官能化的聚合物涂层。在这样的实例中,然后同时施加官能化的聚合物涂层和水溶性保护层。在这样的实例中,官能化的聚合物涂层在施加官能化的聚合物分子和水溶性保护涂层的混合物之后被固化。在一些实例中,相对于官能化的聚合物分子,混合物为水溶性涂层的从5wt%至约95wt%、或约10wt%至约80wt%、或约25wt%至约75wt%、或约25wt%、50wt%、或75wt%。水溶性保护涂层可以在固化步骤期间保护表面。在一些实例中,施加包括水溶性涂层前体和官能聚合物分子的混合物。在一些实例中,混合物还包括溶剂,例如乙醇。在一些实例中,水溶性涂层前体是KOLLICOAT® IR,并且官能化的聚合物分子是PAZAM。在一个实例中,在官能化聚合物涂覆步骤期间施加在水中的5%w/vKOLLICOAT® IR、0.25%w/v PAZAM和5%乙醇的混合物改进了CFR强度和读数1循环1强度,并且相对于对照物(在水中的0.25%w/v PAZAM和5%乙醇)维持在0.8μM、1.1μM、1.5μM和5μM的浓度下装载的产生的所接枝的引物的%通过过滤器。在一些实例中,混合物是5%w/v水溶性涂层前体(例如KOLLICOAT® IR)、0.25%w/v官能聚合物分子(例如PAZAM)和5%乙醇。在这样的实例中,水溶性涂层可以在引物接枝步骤期间保持在适当的位置。对于图案化基底,水溶性涂层可以在随后的抛光步骤(其采用水性条件)期间或者在接枝前的流动池的再水合(官能化的聚合物涂层在固化期间脱水)期间被去除。

[0079] 在本文描述的方法或流动池的一些实例中，并入在基底的暴露表面上的化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基(hydrazonyl)、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。在一些实例中，化学基团是降冰片烯基或被取代的降冰片烯基。在一些实例中，化学基团通过连接基被共价地链接至基底的暴露表面。连接基可以包括例如亚烷基、乙二醇、丙二醇、乙酰基、羰基、乙酰胺基、酰胺基、硅烷、硅、甲硅烷基醚或其他间隔基单元或其组合。在一些实例中，连接基包括硅烷或硅烷衍生物，并且在本文中被称为硅烷连接基。在一些实例中，硅烷连接基包括-$Si(X)_2$-C_{2-6}烷基-，其中每个X是-OH、-O-烷基或-O-SiR_3衍生物(例如硅氧烷)。在一些实例中，连接基是-$Si(OR)_2$-CH_2-。在一些实例中，连接基包括甲硅烷基醚和亚烷基基团。

[0080] 在本文描述的流动池或方法的一些实例中，第一反应基团和第二反应基团独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。在一些实例中，第一反应基团和第二反应基团是相同的。在一些实例中，第一反应基团和第二反应基团都是叠氮基。

[0081] 在本文描述的流动池或方法的一些实例中，在一个末端处用与第二反应性基团反应的部分使引物改性。例如，引物包括用于与第二反应基团反应的炔基基团。

[0082] 在本文描述的流动池或方法的一些实例中，引物是包括功能引物的两个群体的多个引物。在一些实例中，引物是功能引物的群体(其可以包括功能引物例如引物A和引物B的两个亚群体)和非功能引物的群体。在一些方面中，引物包括引物序列。在使用功能引物的两个亚群体的情况下，它们包括不同的引物序列。靶寡核苷酸与引物杂交(经由与引物序列互补的序列)，并且引物在聚合酶的存在下延伸以形成结合至底物的靶寡核苷酸的互补拷贝。

[0083] 应当理解，本文描述的流动池的任何特征和制造本文描述的流动池的方法的任何特征可以以任何期望的方式和/或配置组合在一起。此外，应当理解，来自任何方法和/或来自流动池的特征的任何组合可以一起使用，和/或来自任何或所有这些方面的任何特征可以与本文公开的实例的任何特征组合。

[0084] 本文公开的方法的实例涉及在流动池制造工作流程期间施加保护涂层。保护涂层可以直接施加在被沉积在基底上的化学上和/或生物上活性的表面化学物质(例如，官能化的聚合物涂层、引物)上。保护涂层可以在随后的加工技术(例如，组装技术，例如盖结合、晶片切割等)期间和/或在流动池的运送期间和/或在流动池的短期储存和/或长期储存期间保护表面化学物质。在一个实例中，存储期可以高达120天或更长。在另一个实例中，储存期可以在从约1天至约75天的范围内。在另一个实例中，储存期可以在从约1天至约2年的范围内，或者可以是约12个月、18个月或24个月。虽然已经提供了实例，但是应当理解，储存期可以从在保护涂层已经被施加之后的任何时间直到使用流动池是合意的范围内。作为实例，保护涂层可以保护表面化学物质免受化学或物理降解，例如免受碎片和/或污染，其否则可能在盖结合或其他组装过程期间接触表面化学物质。作为另一个实例，保护涂层可以保护表面化学物质免受在运送期间可能导致的刮擦或其他处理相关的缺陷。作为又一个实例，保护涂层可以在制造、运送和/或短期储存和/或长期储存期间(例如，在从约4℃至约80℃

范围内的温度或者在一些情况中低至约-25℃的更低温度)保护表面化学物质免受环境因素(例如温度、湿度等)。保护涂层有助于维持表面化学物质的固有稳定性,并且因此改进流动池的货架期、温度耐受性、耐久性和环境储存能力。表面化学物质的稳定是有效的过程,并且表面化学物质然后随时间是稳定的。

[0085] 本文公开的方法可以完全地在晶片级、完全地在管芯级、部分地在晶片级和/或部分地在管芯级被执行。作为部分地在晶片级和管芯级执行该方法的实例,该方法可以使用晶片来开始,晶片然后被切割以形成若干管芯,并且该方法可以继续使用每个管芯。至少在一些实例中,执行开放晶片加工的能力(例如,在盖结合之前进行的化学或物理步骤)使得各种计量/分析技术能够用于质量控制和表征。在被结合以形成流动池之前,图案化和表面改性的晶片/基底可以暴露于例如原子力显微术(AFM)、扫描电子显微术(SEM)、椭率测量术、测角术、散射测量和/或荧光技术。可选地,结合的流动池可以暴露于这些技术。在管芯级,该方法可以在开放面管芯上或者在组装的流动池(具有封闭的流动通道)上被执行。

[0086] 应当理解,除非另有说明,否则本文中使用的术语在相关领域中将呈现它们的普通含义。下面阐述了本文使用的若干术语及其含义。

[0087] 除非上下文另外清楚地规定,否则单数形式“一(a)”、“一(an)”、和“所述(the)”包括复数指代物。

[0088] 术语“包括(comprising)”、“包括(including)”、“包含(containing)”和这些术语的各种形式是彼此同义的,并且意指同样广泛的。

[0089] 术语“顶部”、“底部”、“下部”、“上部”、“在…上”等在本文中用于描述流动池和/或流动池的各种部件。应当理解,这些方向术语并不意指暗示特定的取向,而是用于指定在部件之间的相对取向。方向术语的使用不应被解释为将本文公开的实例限制于任何特定的取向。

[0090] 如本文所使用的,“烷基”指的是完全饱和(即,不包含双键或三键)的直链或支链的烃链。烷基基团可以具有1至20个碳原子。示例性的烷基基团包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基及类似基团。作为实例,名称“C1-4烷基”指示在烷基链中存在一个至四个碳原子,即该烷基链选自由甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基以及叔丁基组成的组。

[0091] 如本文所使用的,“烯基”指的是包含一个或更多个双键的直链的或支链的烃链。烯基基团可以具有2至20个碳原子。示例性的烯基基团包括乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基及类似基团。烯基基团可以被指定为例如“C2-4烯基”,其指示在烯基链中存在2个至4个碳原子。

[0092] 如本文所使用的,“炔基”指的是包含一个或更多个三键的直链的或支链的烃链。炔基基团可以具有2至20个碳原子。炔基基团可以被指定为例如“C2-4炔基”,其指示在炔基链中存在2个至4个碳原子。

[0093] “氨基”官能团指的是-NR_aR_b基团,其中R_a和R_b每个独立地选自氢、C1-6烷基、C2-6烯基、C2-6炔基、C3-7碳环基、C6-10芳基、5-10元杂芳基以及5-10元杂环基,如在本文中定义的。

[0094] 如本文所使用的,“芳基”指的是在环骨架中仅包含碳的芳香族环或芳香族环体系(即,共享两个相邻的碳原子的两个或更多个稠环)。当芳基是环体系时,该体系中的每一个

环是芳香族的。芳基基团可以具有6至18个碳原子，其可以被指定为C6-18。芳基基团的实例包括苯基、萘基、蒽基以及葸基。

[0095] 如在本文所使用的，术语“附接”指的是两个事物彼此接合、紧固、粘附、连接或结合的状态。例如，核酸可以通过共价键或非共价键被附接至官能化的聚合物涂层。共价键的特征在于共享原子之间的电子对。非共价键是不涉及电子对的共享的物理键，并且可以包括例如氢键、离子键、范德华力、亲水相互作用和疏水相互作用。

[0096] “叠氮化物”或“叠氮基”官能团指的是$-N_3$。

[0097] 如本文所使用的，“碳环基”意指在环体系骨架中仅包含碳原子的非芳香族环或非芳香族环体系。当碳环基是环体系时，两个或更多个环可以以稠合的方式、桥接的方式或螺连接的方式被接合在一起。碳环基可以具有任何饱和度，条件是环体系中的至少一个环不是芳香族的。因此，碳环基包括环烷基、环烯基以及环炔基。碳环基基团可以具有3至20个碳原子(即C3-20)。碳环基环的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环己烯基、2,3-二氢-茚、双环[2.2.2]辛基、金刚烷基以及螺[4.4]壬基。

[0098] 如本文所使用的，如在本文使用的术语“羧酸”或“羧基”指的是-C(O)OH。

[0099] 如本文所使用的，“环烷基”意指完全饱和的碳环基环或碳环基环体系。实例包括环丙基、环丁基、环戊基以及环己基。

[0100] 如本文所使用的，“亚环烷基(cycloalkylene)”意指经由两个附接点被附接至分子的剩余部分的完全饱和的碳环基环或碳环基环体系。

[0101] 如本文所使用的，“环烯基”或“环烯烃”意指具有至少一个双键的碳环基环或碳环基环体系，其中在环体系中没有环是芳香族的。实例包括环己烯基或环己烯和降冰片烯或降冰片烯基。如本文所使用的，“杂环烯基”或“杂环烯烃”意指具有至少一个双键的、在环骨架中具有至少一个杂原子的碳环基环或碳环基环体系，其中在环体系中没有环是芳香族的。

[0102] 如本文所使用的，“环炔基”或“环炔烃”意指具有至少一个三键的碳环基环或碳环基环体系，其中在环体系中没有环是芳香族的。实例是环辛炔。另一个实例是双环壬炔。并且如本文所使用的，“杂环炔基”或“杂环炔烃”意指具有至少一个三键的、在环骨架中具有至少一个杂原子的碳环基环或碳环基环体系，其中在环体系中没有环是芳香族的。

[0103] 如本文中使用的术语“沉积”指的是任何合适的施加技术，其可以是手动的或自动的，并且导致表面性质的改变。通常，沉积可以使用气相沉积技术、涂覆技术、接枝技术或类似技术来执行。一些具体的实例包括化学气相沉积(CVD)、喷涂(例如超声喷涂)、旋涂、浸泡或浸涂、刮刀涂布、水坑分配(puddle dispensing)、流过涂布、气溶胶印刷、喷墨印刷等。在一些方面中，通过喷涂来施加水溶性保护涂层。在其他方面中，通过流过涂布来施加水溶性保护涂层。

[0104] 如本文所使用的，术语“凹陷”指的是图案化基底中的离散凹形特征，其具有完全被图案化基底表面的间隙区域包围的表面开口。凹陷可以在其表面中的开口处具有多种形状中的任何一种，作为实例包括圆形、椭圆形、正方形、多边形、六边形、星形(具有任何数量的顶点)等。与表面正交地截取的凹陷的横截面可以是弯曲的、正方形的、多边形的、双曲线的、锥形的、角形的等。作为实例，凹陷可以是井(well)。也如本文所使用的，“官能化凹陷”指的是离散凹形特征，其中官能化的聚合物涂层和引物被附接。

[0105] 术语“每个”当关于物品的集合被使用时意图识别集合中的单独物品，但不一定指的是集合中的每一个物品。如果明确的公开内容或上下文清楚地指示其他情况，则可能发生例外情况。

[0106] 如本文所使用的，术语“流动池”意图意指容器，该容器具有其中反应可以被实施的腔室(即流动通道)、用于将试剂输送至腔室的入口、和用于从腔室去除试剂的出口。在一些实例中，腔室能够实现在腔室中发生的反应的检测。例如，腔室可以包括一个或更多个透明表面，允许对腔室中的阵列、光学标记分子或类似物的光学检测。

[0107] 如本文所使用的，“流动通道”可以是被界定在两个结合的部件之间的区域，其可以选择性地接纳液体样品。在一些实例中，流动通道可以被界定在图案化基底和盖之间，并且因此可以与被界定在图案化基底中的一个或更多个凹陷流体连通。在其他实例中，流动通道可以被界定在非图案化基底和盖之间。

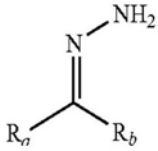
[0108] 本文提到的“官能化的聚合物涂层”意图意指液体和气体可渗透的半刚性材料。官能化的聚合物涂层可以是水凝胶，所述水凝胶当液体(例如水)被吸收时可以膨胀并且当液体通过干燥被除去时可以收缩。典型地，虽然水凝胶可以吸收水，但它不是水溶性的。在实例中，官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。官能化的聚合物涂层还可以包括其他分子，所述其他分子包括选自由以下组成的组的一个或更多个官能团：任选地被取代的烯基、叠氮化物/叠氮基、任选地被取代的氨基、羧基、任选地被取代的腙、任选地被取代的肼、羟基、任选地被取代的四唑、任选地被取代的四嗪、腈氧化物、硝酮或硫醇。在一些方面中，官能团是用于将官能化的聚合物涂层与基底表面和/或引物附接以在这些组分之间形成共价键的反应基团。

[0109] 如本文所使用的，“杂芳基”指的是在环骨架中包含一个或更多个杂原子(即，不同于碳的元素，包括但不限于氮、氧以及硫)的芳香族环或芳香族环体系(即，共享两个相邻原子的两个或更多个稠环)。当杂芳基是环体系时，该体系中的每一个环是芳香族的。杂芳基基团可以具有5-18个环成员。

[0110] 如本文所使用的，“杂环基”意指在环骨架中包含至少一个杂原子的非芳香族环或非芳香族环体系。杂环基可以以稠合的方式、桥接的方式或螺连接的方式被接合在一起。杂环基可以具有任何饱和度，条件是环体系中的至少一个环不是芳香族的。在环体系中，杂原子可以存在于非芳香族环或芳香族环中。杂环基基团可以具有3至20个环成员(即，构成环骨架的原子的数量，包括碳原子和杂原子)。杂环基基团可以被指定为“3-6元杂环基”或类似的名称。在一些实例中，杂原子是O、N或S。

[0111] 如本文所使用的术语“肼”或“肼基”指的是-NHNH$_2$基团。

[0112] 如本文所使用的，如在本文使用的术语“腙”或“腙基”指的是

[0113]  基团，其中R$_a$和R$_b$在本文中定义。

[0114] 如本文所使用的，“氢氧基”或“羟基”指-OH基团。

[0115] 如本文所使用的，术语“间隙区域”指的是在基底中或在分离凹陷的表面上的区域。例如，间隙区域可以将阵列的一个特征与阵列的另一个特征分离。彼此分离的两个特征可以是离散的，即彼此缺乏物理接触。在另一实例中，间隙区域可以将特征的第一部分与特

征的第二部分分开。在许多实例中，间隙区域是连续的，而特征是离散的，例如，如对于在其他连续表面中界定的多个井的情况。由间隙区域提供的分离可以是部分分离或完全分离。间隙区域可以具有与在表面中界定的特征的表面材料不同的表面材料。例如，阵列的特征可以具有超过在间隙区域处存在的量或浓度的涂层和引物的量或浓度。在一些实例中，涂层和引物可以不存在于间隙区域处。

[0116] 如本文所使用的“腈氧化物”意指“$R_aC{\equiv}N^+O^-$”基团，其中R_a在本文中定义。制备腈氧化物的实例包括通过用氯酰胺-T处理或通过碱对亚胺酰氯[RC(Cl)＝NOH]的的作用从醛肟原位生成。

[0117] 如本文所使用的“硝酮”意指“$R_aR_bC{=}NR_c^+O^-$”基团，其中R_a和R_b在本文中定义，并且R_c选自C1-6烷基、C2-6烯基、C2-6炔基、C3-7碳环基、C6-10芳基、5-10元杂芳基和5-10元杂环基，如在本文所定义的。

[0118] 如本文所使用的，“核苷酸”包括含氮杂环碱基、糖以及一个或更多个磷酸酯基团。核苷酸是核酸序列的单体单元。在RNA中，糖是核糖，并且在DNA中，糖是脱氧核糖，即缺少存在于核糖中的2’位置处的羟基基团的糖。含氮杂环碱基(即核碱基)可以是嘌呤碱基或嘧啶碱基。嘌呤碱基包括腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)及其修饰的衍生物或类似物。嘧啶碱基包括胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)及其修饰的衍生物或类似物。脱氧核糖的C-1原子结合至嘧啶的N-1或嘌呤的N-9。

[0119] 如本文使用的术语“开放晶片加工”指的是在任何组装(例如，结合)工艺之前用于用表面化学物质和保护涂层使基底晶片的表面改性的一系列连续工艺。

[0120] 术语“流动池基底”或“基底”指的是支撑物(support)，在所述支撑物上可以添加表面化学物质。术语“图案化基底”指的是支撑物，在所述支撑物中或在所述支撑物上界定有凹陷。术语“非图案化基底”指的是大体上平面的支撑物。基底可以是晶片、面板、矩形片、管芯或任何其他合适的配置。基底通常是刚性的，并且不溶于水性液体。基底对用于使凹陷改性的化学物质可以是惰性的。例如，基底对用于形成官能化的聚合物涂层、用于形成保护涂层、用于将引物附接至官能化的聚合物涂层等的化学物质可以是惰性的。合适的基底的实例包括环氧硅氧烷、互补金属氧化物半导体(CMOS)材料、硅倍半氧烷(例如多面体硅倍半氧烷或POSS材料)、玻璃(例如来自Corning的EAGLE XG®玻璃)和改性玻璃或官能化玻璃、塑料(包括丙烯酸树脂、聚苯乙烯和苯乙烯与其他材料的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨酯、聚四氟乙烯(例如来自Chemours的TEFLON®)、环烯烃/环烯烃聚合物(COP)(例如来自Zeon的ZEONOR®)、聚酰亚胺等)、尼龙、陶瓷/陶瓷氧化物、二氧化硅、熔融二氧化硅或基于二氧化硅的材料、硅酸铝、硅和改性硅(例如，硼掺杂的p+硅)、氮化硅(Si_3N_4)、氧化硅(SiO_2)、五氧化二钽(TaO_5)或其他钽氧化物(TaO_x)、氧化铪(HaO_2)、碳、金属、无机玻璃或类似物。基底也可以是玻璃或硅，在表面处具有钽氧化物或另一种陶瓷氧化物的涂层。基底可以是刚性的或柔性的。

[0121] 如本文所使用的，“等离子体灰化”指的是通过氧等离子体从基底去除有机物质的过程。由等离子体灰化产生的产物可以用真空泵/系统去除。等离子体灰化可以通过引入反应性羟基基团使基底活化。在一些方面中，连接基基团然后可以被附接至羟基基团。

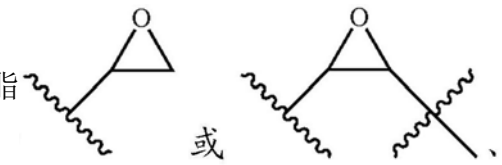
[0122] 如本文所使用的，“引物”被定义为单链核酸序列(例如，单链DNA或单链RNA)，其用

作用于DNA或RNA合成的起点。引物的5’末端可以被改性以允许与官能化的聚合物涂层的偶联反应。在一些方面中，引物的5’末端用炔基基团改性。引物长度可以是任何数目的碱基长的并且可以包括多种非天然核苷酸。在一个实例中，测序引物是在例如从20至40个碱基的范围内的短链。在一些方面中，引物在溶液中以从约5μM至50μM、或约10μM至40μM、或约15μM至30μM的浓度(在本文中被称为“引物密度”)被施加至基底。如本文使用的“引物密度”不是在表面上接枝的引物的度量，而是基于接枝混合物中的引物的浓度的推断密度。在一些方面中，引物密度为从约1μM至约20μM(使用1-20μM引物溶液将引物接枝到表面上)。在一些方面中，引物是功能引物(能够用作用于寡核苷酸合成的起点)和非功能引物的混合物。非功能引物是不起引物的作用的寡核苷酸，例如截短的引物序列或用可检测的、任选地可裂解的标记物标记的短寡核苷酸序列。非功能引物允许独立(单独)控制总寡核苷酸/引物密度以及接枝的底物上的功能引物密度。在一些实例中，引物密度为12μM引物和6μM非功能引物(例如，附接有质量控制示踪剂的寡核苷酸)。在一些实例中，总引物密度为约18μM。在一些实例中，总引物密度为约22μM。接枝的引物可以在表面上以从每平方微米约10,000个至约50,000个或约25,000个引物存在。

[0123] 如本文所使用的，术语“保护涂层”指的是呈固体(例如薄膜)、液体或凝胶的形式的水溶性材料，所述水溶性材料被施加在表面化学物质上，例如被施加在图案化基底的凹陷中或在至少大体上平坦的基底(即，非图案化基底)的流动通道区域上。保护涂层可以是不有害地影响下面的表面化学物质或基底并且用于保护和/或保持表面化学物质的功能的任何水溶性材料。根据定义，水溶性保护涂层与水凝胶可区分，因为保护涂层在暴露于水时溶解，并且可能以这种方式被洗掉，而水凝胶是不溶于水的。例如，保护涂层可以使官能化层膨胀，并且至少大体上防止该层在加工和/或运送和/或储存期间经历有害变化。对于另一个实例，保护涂层可以保持引物的可接近性，并且至少大体上防止官能化层的降解。

[0124] 虽然已经提供了若干实例，但是应该理解，其他水溶性的非阳离子合成聚合物和小分子可以用于形成保护涂层，只要所选择的材料不有害地影响下面的表面化学物质或基底。此外，选择可以容易地被去除的材料可能也是合意的，该材料不干扰随后执行的过程(例如引物附接、清洗等)和/或不干扰随后执行的测序技术。在实例中，保护涂层不是自动荧光材料。

[0125] 在实例中，水溶性保护涂层的厚度或深度至少为约25nm。在实例中，水溶性保护涂层的厚度或深度在从约50nm至约100nm的范围内。在另一个实例中，水溶性保护涂层的厚度或深度在从约1μm至约15μm的范围内。在又一个实例中，水溶性保护涂层的厚度或深度在从约1.5μm至约12μm的范围内。厚度的上限可以至少部分地取决于流动通道和所形成的流动池的结构和尺寸。在实例中，厚度范围的上端可以在从约10μm至约15μm的范围内。

[0126] 如本文所使用的，术语“硅烷”和“硅烷衍生物”指的是包含一个或更多个硅原子的有机或无机化合物。无机硅烷化合物的实例是SiH_4或卤化SiH_4，其中氢被一个或更多个卤素原子替代。有机硅烷化合物的实例是$X\text{-}R^B\text{-}Si(OR^C)_3$，其中X是不可水解的有机基团，例如氨基、乙烯基、环氧树脂甲基丙烯酸酯、硫、烷基、烯基、炔

基;R^B是间隔基,例如-$(CH_2)_n$-,其中n是0至1000;R^C选自氢、任选地被取代的烷基、任选地被取代的烯基、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的5-10元杂芳基以及任选地被取代的5-10元杂环基,如本文所定义的。如本文所使用的,术语"硅烷"和"硅烷衍生物"可以包括不同硅烷和/或硅烷衍生物化合物的混合物。

[0127] 在一些实例中,硅烷或硅烷衍生物包括能够与官能化的聚合物涂层的官能团起反应的不饱和部分。如本文所使用的,术语"不饱和部分"指的是化学基团,所述化学基团包括环烯烃、环炔烃、杂环烯烃、杂环炔烃或其任选地被取代的变体,包括至少一个双键或一个三键。不饱和部分可以是单价或二价。当不饱和部分是单价时,环烯烃、环炔烃、杂环烯烃和杂环炔烃分别与环烯基、环炔基、杂环烯基和杂环炔基可互换使用。当不饱和部分是二价时,环烯烃、环炔烃、杂环烯烃和杂环炔烃分别与环亚烯基(cycloalkenylene)、环亚炔基(cycloalkynylene)、杂环亚烯基(heterocycloalkenylene)和杂环亚炔基(heterocycloalkynylene)可互换使用。

[0128] 不饱和部分可以直接共价地附接至硅烷或硅烷衍生物的硅原子,或者经由连接基间接地附接。合适的连接基的实例包括任选地被取代的亚烷基(即,被认为是通过打开双键而从烯烃或者通过从不同碳原子中去除两个氢原子而从烷烃衍生的二价饱和脂族基团(例如乙烯))、被取代的聚乙二醇或类似物。

[0129] 如本文所使用的"间隔层(spacer layer)"指的是将两种组分结合在一起的材料。在一些实例中,间隔层可以是有助于结合的辐射吸收材料,或者可以与有助于结合的辐射吸收材料接触。

[0130] 如本文使用的术语"表面化学物质"指的是被并入到流动池的腔室中的化学和/或生物活性组分。本文公开的表面化学物质的实例包括被附接至基底的表面的至少一部分的官能化的聚合物涂层和/或被附接至官能化的聚合物涂层的至少一部分的引物。

[0131] "硫醇"官能团指的是-SH。

[0132] 如本文所使用的,术语"四嗪"或"四嗪基"指的是包括四个氮原子的六元杂芳基基团。四嗪可以任选地被取代。

[0133] 如本文所使用的"四唑"指的是包括四个氮原子的五元杂环基基团。四唑可以任选地被取代。

[0134] 如本文所使用的,术语"YES方法"指的是由Illumina公司开发的化学气相沉积工艺,该工艺使用由Yield Engineering Systems("YES")提供的化学气相沉积工具。该工具包括三种不同的气相沉积系统。自动化YES-VertaCoat硅烷气相系统被设计用于批量生产(volume production),具有可以容纳200mm或300mm晶片的柔性晶片处理模块(flexible wafer handling module)。手动加载YES-1224P硅烷气相系统被设计用于多样化批量生产,具有其可配置的大容量腔室。Yes-LabKote是对于可行性研究和R&D理想的低成本的桌面版本(tabletop version)。

[0135] 鉴于上述定义,可以理解在此阐述的和在权利要求中列举的方面和实例。

[0136] 现在将参照附图描述包括保护涂层的流动池的实例及用于制造和使用其的方法。

[0137] 方法100的实例在图1中描绘。方法100包括将表面化学物质添加至基底的一部分(如在参考数字102处所示出的),以及将水溶性保护涂层至少施加在表面化学物质上(如在参考数字104处所示出的)。在实例中,方法100包括将表面化学物质添加至流动池基底的一

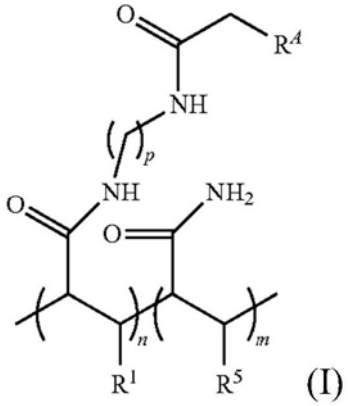
部分中，其中表面化学物质是测序引物或附接测序引物的官能化的聚合物涂层或测序引物和官能化的聚合物涂层；以及在至少表面化学物质上施加水溶性保护涂层。方法100的两个实例在图2中被示出为方法100’和100”。

[0138] 方法100’、100”可以涉及如在图2中的参考数字101处所示的图案化基底或者非图案化基底。参考图6A至图6E进一步描述涉及非图案化基底12’的方法100的另一实例。图案化基底可以是图案化晶片或图案化管芯或本文公开的任何其他图案化基底。可以使用本文所描述的基底的任何实例。图案化基底(如在图3中的参考数字12处所示的)包括被界定在基底的暴露层或表面上或中的凹陷以及分离相邻凹陷的间隙区域。可以使用多种技术来在基底中或在基底上制造凹陷，所述多种技术包括例如光刻术、纳米压印光刻术、冲压技术、压花技术、模制技术、微蚀刻技术、印刷技术等。如本领域中的技术人员将认识到的，所使用的技术将取决于基底的组成和形状。可以设想凹陷的许多不同布局，如下面参考图5A所讨论的。

[0139] 虽然在图2中未示出，但是在添加表面化学物质之前，方法100’、100”中的每个可以涉及将图案化基底暴露于清洁工艺和/或另一工艺，所述另一工艺准备图案化基底的表面(例如凹陷以及在一些情况中相邻的间隙区域)用于表面化学物质的随后沉积。下面参照图4和图5A至图5L进一步讨论清洁工艺和表面准备工艺的实例。

[0140] 在示例性方法100’中，表面化学物质可以是官能化的聚合物涂层和引物两者，并且可以使用单个保护涂层。在该实例中，添加表面化学物质涉及在凹陷中形成官能化的聚合物涂层(参考数字102’)并且将引物接枝到官能化的聚合物涂层(参考数字102”)，并且在引物被接枝之后形成水溶性保护涂层(参考数字104’)。

[0141] 在方法100’中的参考数字102’处，发生官能化的聚合物涂层形成。官能化的聚合物涂层的实例包括式(I)的重复单元：

[0142] 

(I)

[0143] 其中：

[0144] R^1为H或任选地被取代的烷基；

[0145] R^A选自由以下组成的组：叠氮基、任选地被取代的氨基、任选地被取代的烯基、任选地被取代的腙、任选地被取代的肼、羧基、羟基、任选地被取代的四唑、任选地被取代的四嗪、腈氧化物、硝酮和硫醇；

[0146] R^5选自由H和任选地被取代的烷基组成的组；

[0147] $-(CH_2)_p-$中的每个可以任选地被取代；

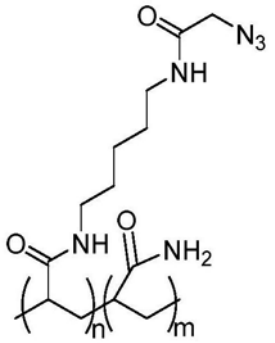
[0148] p是在1至50的范围内的整数；

[0149] n是在1至50,000的范围内的整数;并且

[0150] m是在1至100,000的范围内的整数。

[0151] 在式(I)的结构中,本领域普通技术人员将理解,“n”和“m”亚单元是以随机顺序存在于整个聚合物中的重复亚单元。

[0152] 官能化的聚合物涂层的具体实例是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)PAZAM(参见例如美国专利公布号2014/0079923A1或2015/0005447A1,其中每个专利都通过引用以其整体被并入本文),其包括下面所示的结构:

[0153] 

[0154] 其中n是在1-20,000的范围内的整数,并且m是在1-100,000的范围内的整数。如同式(I)一样,本领域普通技术人员将认识到,“n”和“m”亚单元是以随机顺序存在于整个聚合物结构中的重复单元。

[0155] 式(I)或PAZAM聚合物的分子量可以在从约10kDa至约1500kDa的范围内,或者在特定实例中可以是约312kDa。

[0156] 在一些实例中,式(I)或PAZAM聚合物是线性聚合物。在一些其他实例中,式(I)或PAZAM聚合物是轻度交联的聚合物。在其他实例中,式(I)或PAZAM聚合物包括支化。

[0157] 合适的聚合物材料的其他实例包括具有胶体结构的那些,例如琼脂糖;或聚合物网状结构,例如明胶;或者交联聚合物结构,例如聚丙烯酰胺聚合物和共聚物、不含硅烷的丙烯酰胺(SFA,参见例如美国专利公布号2011/0059865号,其通过引用以其整体被并入本文)或者SFA的叠氮水解版本。合适的聚丙烯酰胺聚合物的实例可以如例如在WO 2000/031148(通过引用以其整体被并入本文)中描述的由丙烯酰胺和丙烯酸或包含乙烯基基团的丙烯酸形成,或者如例如在WO 2001/001143或WO 2003/0014392(其每个通过引用以其整体被并入本文)中描述的由形成[2+2]光-环加成反应的单体形成。其他合适的聚合物是SFA和用溴乙酰胺基团衍生的SFA的共聚物(例如BRAPA)或者SFA和用叠氮乙酰胺基团衍生的SFA的共聚物。

[0158] 应理解,其他官能化分子可以用于形成官能化的聚合物涂层,只要它们被官能化以与图案化基底和随后施加的引物相互作用。用于形成官能化的聚合物涂层的合适分子的其他实例包括具有胶体结构的那些,例如琼脂糖;或聚合物网状结构,例如明胶;或交联的聚合物结构,例如聚丙烯酰胺聚合物和共聚物、不含硅烷的丙烯酰胺(SFA)或者SFA的叠氮水解版本。合适的聚丙烯酰胺聚合物的实例可以从丙烯酰胺和丙烯酸或包含乙烯基基团的丙烯酸合成,或者从形成[2+2]光-环加成反应的单体合成。

[0159] 官能化的聚合物分子(例如PAZAM)可以使用旋涂、或浸涂或浸涂(dipping or dip coating)、或官能化分子在正压或负压下的流动、或其他合适的技术被沉积在图案化基底

的表面上。官能化分子可以存在于溶液中。在实例中，溶液包括在乙醇和水的混合物中的PAZAM。在一些方面中，官能化的聚合物分子在完全聚合之前被施加至基底，并且聚合以形成涂层在基底表面上完成。

[0160] 在被涂覆后，官能化分子也可以暴露于固化工艺，以跨过整个图案化基底(即，在凹陷和间隙区域上)形成官能化的聚合物涂层。在实例中，使官能化分子固化可以在从室温(例如，约25℃)至约60℃的范围内的温度发生持续在从约5分钟至约2小时的范围内的时间。在一些实例中，官能化的聚合物涂层在施加保护涂层之前被固化。

[0161] 为了在凹陷中而不是在图案化基底的间隙区域上形成官能化的聚合物涂层，可以使用i)具有在从约7.5至约11范围内的pH并且包括研磨颗粒的碱性含水浆料或者ii)抛光垫和不含研磨颗粒的溶液来从间隙区域抛光官能化的聚合物涂层。

[0162] 在方法100'的该实例中，然后将引物接枝到保留在凹陷中的官能化的聚合物涂层，如在参考数字102"处作为引物附接示出的。合适的引物的实例包括正向扩增引物或反向扩增引物。合适的引物的具体实例包括P5引物或P7引物，其在由Illumina公司销售的商用流动池的表面上用于在HiSeq™、HiSeqX™、MiSeq™、MiSeqX™、NextSeq™、NovaSeq™、Genome Analyzer™和其他仪器平台上测序。

[0163] 接枝可以通过浸泡涂布(dunk coating)、喷涂、水坑分配或通过将引物附接至至少一些凹陷中的官能化的聚合物涂层的另一种合适的方法来实现。这些示例性技术中的每种可以利用引物溶液或混合物，其可以包括引物、水、缓冲液和催化剂。

[0164] 浸泡涂布可以涉及将图案化基底(在其凹陷中具有官能化的聚合物涂层)浸入到一系列温控浴中。浴也可以是流控制的和/或覆盖有氮气覆盖物(blanket)。浴可以包括引物溶液或混合物。在整个各种浴中，引物将附接至至少一些凹陷中的官能化的聚合物涂层。在实例中，涂覆的和抛光的图案化基底将被引入到包括引物溶液或混合物的第一浴中，在该第一浴中反应发生以附接引物，并且然后图案化基底将被移动至另外的浴中用于洗涤。图案化基底可以用机器臂或手动地从一个浴移动至另一个浴。干燥系统也可以用于浸泡涂布中。

[0165] 喷涂可以通过将引物溶液或混合物直接喷雾到涂覆的和抛光的图案化基底上来完成。喷涂的晶片可以在从约0℃至约70℃范围内的温度被孵育持续在从约4分钟至约60分钟的范围内的时间。在孵育后，可以使用例如旋涂机来稀释和除去引物溶液或混合物。

[0166] 水坑分配可以根据池和旋出方法来执行，并且因此可以用旋涂机完成。引物溶液或混合物可以(手动地或经由自动工艺)施加至涂覆的和抛光的图案化基底。施加的引物溶液或混合物可以被施加至涂覆的和抛光的图案化基底的整个表面或散布跨过整个表面。引物涂覆的图案化基底可以在从约0℃至约80℃的范围的温度被孵育持续在从约2分钟至约60分钟的时间。在孵育后，可以使用例如旋涂机来稀释并除去引物溶液或混合物。

[0167] 在一个实例中，在引物被接枝到凹陷中的官能化的聚合物涂层之后，方法100'的该实例还包括将水溶性保护涂层施加在表面化学物质上和基底的至少一部分上(如在参考数字104'处被示出为保护涂层形成)。在另一个实例中，引物溶液或混合物可以包括形成保护涂层的水溶性成膜材料，并且因此可以进行同时的引物接枝和保护涂层形成。

[0168] 当引物接枝和保护涂层形成是分开的过程时，水溶性保护涂层可以选择性地被沉积或图案化，使得表面化学物质(在该实例中，官能化涂层和其上的引物)被覆盖，并且使得

图案化基底的结合区保持暴露。图案化基底的结合区通常位于图案化基底的一些间隙区域上，其中盖将结合至图案化基底。当图案化基底是晶片时，结合区可以界定由晶片形成的若干流动池的边界。当图案化基底是管芯时，结合区域可以界定正在形成的一个流动池的外部边界。应当理解，图案化基底的不是结合区的部分的其他部分可以被涂覆有水溶性保护涂层。

[0169] 在方法100'的该实例中，选择性地沉积或图案化水溶性保护涂层可以通过浸涂、旋涂、喷涂、超声喷涂、刮刀涂布、气溶胶印刷或喷墨印刷来实现。掩模可以用于覆盖图案化基底的结合区，使得水溶性保护涂层不涂敷在结合区上。

[0170] 用于水溶性保护涂层的示例性选择性沉积或图案化技术中的每一种可以利用水溶液，该水溶液可以包括水和高达约15％(质量比体积)的水溶性材料。在一些实例中，水溶性材料构成水溶液的15％或更少。在其他实例中，水溶液包括从约2％至约13％的水溶性材料或从约2.5％至约10％的水溶性材料。应当理解，水溶液的浓度可以根据流动池结构(例如，流动通道的尺寸、输入和输出端口等)而变化。例如，当利用流过沉积时，可以选择浓度，使得水溶液可以流过流动池，而不堵塞端口、流动通道等。因此，浓度也可以大于约15％。为了获得期望的厚度，浓度的下限可以是约2wt％(质量比体积)。在方法100'的该实例中，水溶性材料(和产生的保护涂层)可以是本文公开的任何实例(即，水溶性非阳离子合成聚合物；水溶性天然多糖或其衍生物；水溶性天然蛋白质或其衍生物；水溶性盐；选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇组成的组的水溶性小分子化合物；或环糊精)。在实例中，水溶性材料可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物(其实例是作为从BASF公司可获得的KOLLICOAT® IR可商购的)、蔗糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、聚乙二醇，乙二胺四乙酸二钠盐(即EDTA)、具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、红菲咯啉二磺酸二钠盐、甘油或柠檬酸钠盐水。

[0171] 水溶液还可以包括添加剂，例如水溶性共溶剂、抗氧化剂、染料、紫外光稳定剂、加工助剂等。这些添加剂可以以不有害地影响水溶性成膜材料的流动性或溶液或成膜能力的量被包括在水溶液中。例如，共溶剂例如乙醇可以任选地以在从约1％至约10％或从约2.5％至约7.5％的范围内的量存在。在另一个实例中，水溶液可以包括约5％的水溶性材料、约5％的共溶剂和余量(约90％)的水。在其他实例中，水溶液可以包括约5％至约7.5％的水溶性材料和约5％至约10％的共溶剂与余量的水(例如在10％含水乙醇中的7.5％w/v KOLLICOAT® IR)。

[0172] 在施加水溶液之后，其可以被干燥以形成呈固体或凝胶形式的水溶性保护涂层。干燥可以经由空气暴露、氮气暴露、真空、加热(例如在烘箱中)或旋涂(即旋涂直到干燥)来完成。

[0173] 保护涂层的一些实例可以保持呈液体形式，例如氯化钠-柠檬酸钠(SSC)。保护涂层的液体形式构成湿储存，因为溶液可以至少大体上填充流动通道并覆盖表面化学物质。例如，当流动通道在保护涂层施加之前形成时(例如，在图2中或在图6A-图6E中的步骤104'')，可以使用保护涂层的液体形式，使得液体可以被包含在其中。在实例中，SSC作为0.75M NaCl、0.075M柠檬酸钠混合物施加。

[0174] 方法100'的该实例然后包括组件，如在参考数字106处所示的。保护涂层在任何组装过程期间保护表面化学物质。在实例中，组装涉及将盖结合至图案化基底的结合区，以形

成与凹陷选择性地流体连通的流动通道。当图案化基底是晶片时，盖的不同区域可以至少部分地界定使用晶片形成的相应流动通道。当图案化基底是管芯时，盖可以界定正在形成的一个或更多个流动通道。

[0175] 盖可以是对激发光透明的任何材料，激发光指向凹陷中的表面化学物质。作为实例，盖可以是玻璃(例如硼硅酸盐、熔融二氧化硅等)、塑料或类似物。合适的硼硅酸盐玻璃的可商购的实例是可从Schott North America公司获得的D263®。合适的塑料材料，也就是环烯烃聚合物的可商购的实例是从Zeon Chemicals L.P.可获得的ZEONOR®产品。

[0176] 在一些实例中，盖可以与侧壁一体地形成，侧壁对应于结合区的形状并且将被结合至结合区。例如，凹槽(recess)可以被蚀刻到透明块中，以形成大体上平坦的部分和从大体上平坦的部分延伸的侧壁。当蚀刻的块被安装至图案化基底的结合区时，凹槽可以成为流动通道。

[0177] 在其他实例中，侧壁和盖可以是彼此耦合的单独部件。例如，盖可以是大体上矩形的块，其具有至少大体上平坦的外表面和至少大体上平坦的内表面，所述内表面界定流动通道的一部分(例如，顶部部分)(一旦结合至图案化基底)。该块可以安装到(例如，结合至)侧壁上，该侧壁结合至图案化基底的结合区并形成流动通道的侧壁。在该实例中，侧壁可以包括在本文中关于间隔层(下文描述)阐述的任何材料。

[0178] 盖可以使用任何合适的技术例如激光结合、扩散结合、阳极结合、共晶结合、等离子活化结合、玻璃料结合或本领域中已知的其他方法来结合至图案化基底的结合区。在实例中，间隔层可以用于将盖结合至图案化基底的结合区。间隔层可以是将图案化基底的至少一些间隙区域(例如，结合区)和盖密封在一起的任何材料。

[0179] 在一个实例中，间隔层可以是吸收在由盖和/或图案化基底透射的波长处的辐射的辐射吸收材料。所吸收的能量进而在间隔层和盖之间以及在间隔层和图案化基底之间形成结合。这种辐射吸收材料的实例是在约1064nm处吸收的来自DuPont(USA)的黑色KAPTON®(含炭黑的聚酰亚胺)。应当理解，聚酰亚胺可以在不添加炭黑的情况下使用，除了波长必须被改变为由天然聚酰亚胺材料显著吸收的波长(例如，480nm)。作为另一个实例，当用在532nm处的光照射时，聚酰亚胺CEN JP可以被结合。当间隔层是辐射吸收材料时，间隔层可以被定位在盖和图案化基底之间的界面处，使得间隔层接触期望的结合区。可以施加压缩(例如，约100PSI的压力)，同时将合适波长的激光能量施加至界面(即，辐射吸收材料被照射)。激光能量可以从顶部和底部两者施加至界面，以便实现合适的结合。

[0180] 在另一实例中，间隔层可以包括与其接触的辐射吸收材料。辐射吸收材料可以施加在间隔层和盖之间的界面处以及在间隔层和图案化基底之间的界面处。作为实例，间隔层可以是聚酰亚胺，并且单独的辐射吸收材料可以是炭黑。在该实例中，单独的辐射吸收材料吸收激光能量，该激光能量形成间隔层和盖之间以及间隔层和图案化基底之间的结合。在该实例中，可以在相应的界面处施加压缩，同时将在合适波长处的激光能量施加至界面(即辐射吸收材料被照射)。

[0181] 当图案化基底是晶片时，间隔层和(盖的或连接至盖的)侧壁可以物理地将一个流动通道与相邻的流动通道分开，并且可以位于晶片的周边处。当图案化基底是管芯并且正在形成的流动池将包括单个流动通道或泳道(lane)时，间隔层和(盖的或连接至盖的)侧壁

可以位于管芯的周边处以界定流动通道并且密封流动池。当图案化基底是管芯并且正在形成的流动池将包括多个隔离的流动通道(例如,八个流动通道或四个流动泳道)时,间隔层和(盖的或连接至盖的)侧壁可以物理地将一个流动通道/泳道与相邻的流动通道/泳道分开,并且可以位于管芯的周边处。然而,应当理解,根据实施方式,间隔层和侧壁可以位于任何期望的区域中。

[0182] 当图案化基底是管芯时,方法100'的组装106涉及形成流动池的盖的结合。当图案化基底是晶片时,方法100'的组装106可以涉及另外的加工,例如切割。在一个实例中,盖可以结合至图案化晶片,并且切割形成单独的流动池。如本文所提到的,在晶片上,侧壁可以物理地将一个流动通道与相邻的流动通道分开,并且因此切割可以通过至少一些侧壁发生,使得每个单独的流动池包括期望数量的流动通道,每个流动通道具有围绕其周边的原始侧壁的一部分。在另一个实例中,图案化的晶片可以被切割以形成无盖的管芯,该无盖的管芯可以具有结合至其上的相应盖以形成单独的流动池。

[0183] 在一个实例中,在组装106之后,形成一个或更多个流动池。

[0184] 现在参考图2中的示例性方法100",表面化学物质可以是官能化的聚合物涂层和引物两者,并且可以使用两种不同的保护涂层。类似于方法100',在方法100"期间添加表面化学物质涉及在凹陷中形成官能化的聚合物涂层(参考数字102')并且将引物接枝到官能化的聚合物涂层(参考数字102"')。然而,与方法100'不同,在方法100"期间,在形成官能化的聚合物涂层之后,形成初始水溶性保护涂层(参考数字104"),并且在接枝引物之后,形成另一水溶性保护涂层(参考数字104"')。

[0185] 在方法100"中的参考数字102'和104"处,添加表面化学物质涉及在凹陷中形成官能化的聚合物涂层(102'),并且在形成官能化的聚合物涂层之后,形成初始水溶性保护涂层(104")。应当理解,在方法100"中可以使用如本文描述的用于形成官能化的聚合物涂层的材料和方法。在实例中,在抛光官能化的聚合物涂层约5小时内沉积初始水溶性保护涂层可能是合意的。该时间范围可以减小官能化的聚合物涂层的表面衰减速率,并且还可以提供更大的热加工窗口。

[0186] 初始水溶性保护涂层可以选择性地被沉积或图案化,使得表面化学物质(在该实例中,官能化的聚合物涂层)被覆盖,并且使得图案化基底的结合区保持暴露。结合区通常位于图案化基底的一些间隙区域上,其中盖将被结合至图案化基底。

[0187] 水溶性保护涂层的选择性沉积或图案化可以经由浸涂、旋涂、喷涂、超声喷涂、刮刀涂布、气溶胶印刷或喷墨印刷来实现。如上所提到的,掩模可以用于覆盖图案化基底的结合区,使得初始水溶性保护涂层不施加在结合区上。

[0188] 用于初始水溶性保护涂层的示例性选择性沉积或图案化技术中的每一种可以利用水溶液,该水溶液可以包括水和高达约15%(质量比体积)的水溶性材料。如本文所提到的,水溶液的浓度可以根据流动池结构(例如,流动通道的尺寸、输入和输出端口等)变化,并且因此可以大于15%或小于15%。为了获得期望的厚度,浓度的下限可以是约2wt%(质量比体积)。在方法100"的该实例中,水溶性材料(和产生的保护涂层)可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、聚丙烯酰胺或聚乙二醇。在该实例中,水溶液还可以包括添加剂,例如抗氧化剂、染料、紫外光稳定剂、加工助剂等。

[0189] 如在参考数字106'处所示的,方法100"涉及在形成初始保护涂层之后组装流动

池。在该实例中，初始保护涂层在任何组装工艺中保护官能化的聚合物涂层。当图案化基底是晶片时，组装涉及将盖结合至结合区以形成与相应组的凹陷选择性地流体连通的相应流动通道，以及然后切割所结合的盖和基底以形成相应的流动池。当图案化基底是管芯时，组装涉及将盖结合至结合区以形成具有一个或更多个流动通道的单个流动池。结合和/或切割过程可以如本文描述的执行。

[0190] 在组装106'(即，结合、或结合和切割)之后，形成一个或更多个流动池。方法100'然后涉及去除初始水溶性保护涂层，从而暴露官能化的聚合物涂层和图案化基底的至少一部分(参考数字108，被示出为IPC去除)；将引物接枝到官能化的聚合物涂层(参考数字102"'，被示出为引物附接)；以及在引物、官能化的聚合物涂层和图案化基底的至少一部分上形成第二水溶性保护涂层(参考数字104"'，被示出为保护涂层形成)。

[0191] 过程108、102"'和104"'可以发生在作为组装106'的结果而形成的每个流动池或者任一个或更多个流动池中。

[0192] 因为初始保护涂层是水溶性的，所以其去除可能涉及溶解过程。水和缓冲液或水或含水缓冲液可以通过在盖或图案化基底中形成的相应输入端口被引入到流动池的流动通道中，可以在流动通道中保持持续足以溶解初始保护涂层的时间，并且然后可以从在盖或图案化基底中形成的相应输出端口被去除。因此，溶解可以作为流过过程被执行。当保护涂层溶解时，所形成的溶液将具有相对低的水溶性材料的浓度(在一些情况中，例如约15％或更低，质量比体积)，这使得流动通道和端口能够保持畅通。在溶解初始保护涂层并从流动池中除去溶液后，官能化的聚合物涂层和已经被初始保护涂层涂覆的任何图案化基底被暴露。

[0193] 在方法100"的该实例中，然后将引物接枝到凹陷中的官能化的聚合物涂层，如由参考数字102"'所表示的。可以使用本文所描述的任何引物。在方法100"的该实例中，接枝可以通过流过过程来完成。在流过过程中，本文描述的引物溶液或混合物可以通过相应的输入端口被引入到流动池的流动通道中，可以在流动通道中保持持续足够长的时间(即孵育期)，用于使引物附接至在一个或更多个凹陷中的官能化的聚合物涂层，并且然后可以从相应的输出端口被去除。在引物附接之后，另外的流体可以被引导通过流动通道，以清洗现在官能化的凹陷和流动通道。

[0194] 在实例中，在将引物接枝到凹陷中的官能化的聚合物涂层之后，方法100"的该实例还包括在表面化学物质(在该实例中，具有附接至其上的引物的官能化的聚合物涂层)上和在图案化基底的至少一部分上形成(第二)水溶性保护涂层(参考数字104"')。

[0195] 在该示例性方法100"中，(第二)水溶性保护涂层可以通过流过过程被沉积。在流过过程中，水溶液(包括水，并且在一些情况中，高达约15％(质量比体积)的水溶性材料)可以通过相应的输入端口被引入到流动池的流动通道中，并且可以保持在流动通道中。可以引入足够的水溶液以覆盖表面化学物质和在流动通道内的图案化基底的任何暴露表面。当溶液在流动通道中时，流动池可以暴露于干燥过程，在该过程中，空气、氮气或真空通过输入端口被冲洗持续设定量的时间，以干燥在表面化学物质和基底的任何暴露部分上的(第二)水溶性保护涂层。在其他实例中，可以不执行干燥过程，并且可以在流动池流动通道中形成液体保护涂层。

[0196] 在该示例性方法100"中，(第二)水溶性保护涂层可以是本文公开的任何实例(即，

水溶性非阳离子合成聚合物;水溶性天然多糖或其衍生物;水溶性天然蛋白质或其衍生物;水溶性盐;选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇组成的组的水溶性小分子化合物;或环糊精)。在实例中,水溶性材料可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物(例如从BASF公司可获得的KOLLICOAT® IR)、蔗糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、乙二醇、乙二胺四乙酸钠盐、具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水。

[0197] 在另一个实例中,在表面化学物质20、22上的引物接枝和(第二)水溶性保护涂层可以经由流过过程同时发生。在该实例中,单一溶液包括引物和水溶性材料。

[0198] 在一个实例中,在保护涂层形成104”’之后,形成一个或更多个流动池。

[0199] 在图3中示出了通过方法100’或100”形成的流动池10的实例。流动池10包括图案化基底12,其可以是已经暴露于方法100’或100”的过程的管芯,或者是已经暴露于方法100’或100”的过程并且已经被切割作为组装106或106’的一部分的晶片。

[0200] 通常,图案化基底12包括由间隙区域16分隔的凹陷14以及被定位在凹陷14中的表面化学物质20、22。表面化学物质包括官能化的聚合物涂层20和引物22。虽然未示出,但是应当理解,凹陷14也可以具有被定位在基底12和官能化的聚合物涂层之间的表面制备化学物质(例如,硅烷或硅烷衍生物)。这个同一表面制备化学物质也可以被定位在间隙区域16上。

[0201] 流动池10还包括结合至图案化基底12的结合区25的盖26,其中盖26至少部分地界定与凹陷14选择性地连通的流动通道30A、30B等。在图3所示的实例中,盖26包括被连接至若干侧壁29的顶部部分27,并且这些部件27、29界定六个流动通道30A、30B、30C、30D、30E、30F中的每个的一部分。相应的侧壁29将一个流动通道30A、30B、30C、30D、30E、30F与每个相邻的流动通道30A、30B、30C、30D、30E、30F隔离,每个流动通道30A、30B、30C、30D、30E、30F与相应组的凹陷14选择性地流体连通。

[0202] 虽然未示出,但是26或图案化基底12可以包括入口端口和出口端口,其将流体地接合其他端口(未示出),用于将流体引导到相应的流动通道30A、30B、30C、30D、30E、30F中(例如,从试剂盒或其他流体存储系统)并从流动通道中引导出来(例如,到废物去除系统)。

[0203] 水溶性保护涂层24覆盖凹陷14中的表面化学物质20、22,以及图案化基底12的至少一部分(例如,也不是结合区25的那些间隙区域16)。在示例性的流动池10中,保护涂层24已经通过在方法100’中的参考数字104’处所示的过程或者在方法100”中的参考数字104”’所示的过程形成。因此,保护涂层24可以是本文公开的任何实例(即,水溶性非阳离子合成聚合物;水溶性天然多糖或其衍生物;水溶性天然蛋白质或其衍生物;水溶性盐;选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇组成的组的水溶性小分子化合物;或环糊精)。

[0204] 流动池10可以在保护涂层24在适当的位置的情况下被运送、存储等。当在应用(例如,测序操作)中利用流动池10是合意的时,可以经由关于参考数字108描述的溶解过程来至少部分去除保护涂层。去除可以作为测序操作的一部分发生。可选择地,为了使测序继续进行,去除可以不发生。

[0205] 图3所示的流动池10可以使用非图案化基底而不是图案化基底来形成。在非图案化基底的情况下,连续表面将包括与在图3的井14’中发现的相同的表面化学物质20、22。参

考图6A至图6E示出并进一步描述了实例。

[0206] 在图4中描绘了方法200的另一实例。方法200的该实例是方法100的变型，并且详细地描述了可能涉及的一些其他过程，例如准备图案化基底12的表面(即凹陷14，以及在一些情况中，相邻的间隙区域16)用于表面化学物质20、22的随后沉积。

[0207] 方法200包括将硅烷或硅烷衍生物附接至图案化基底的表面，该表面包括由间隙区域分隔的凹陷，从而形成硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域(如在参考数字202处所示的)；在硅烷化凹陷中和在硅烷化间隙区域上形成官能化的聚合物涂层(如在参考数字204处所示的)；从硅烷化间隙区域抛光官能化的聚合物涂层(如在参考数字206处所示的)；将引物接枝到硅烷化凹陷中的官能化的聚合物涂层，以形成官能化凹陷(如在参考数字208处所示的)；以及在官能化凹陷和图案化基底的至少一部分上形成水溶性保护涂层(如在参考数字210处所示的)。

[0208] 将参考图5A至图5H(其类似于方法100')或图5A至图5D和图5I至图5L(其类似于方法100")进一步描述方法200的实例。方法200的任何细节也可以与方法100'或100"组合或被包括在方法100'或100"中。

[0209] 图5A是图案化基底12的横截面图。图案化基底12可以是图案化晶片或图案化管芯或任何其他图案化基底(例如，面板、矩形片等。可以使用本文描述的基底12的任何实例。图案化晶片可以用于形成若干流动池，并且图案化管芯可以用于形成单个流动池。在实例中，基底可以具有在从约2mm至约300mm的范围内的直径，或者具有其高达10英尺(～3米)的最大尺寸的矩形片或面板。在实例中，基底晶片具有在从约200mm至约300mm的范围内的直径。在另一个实例中，基底管芯具有在从约0.1mm至约10mm的范围内的宽度。虽然已经提供了示例性的尺寸，但是应当理解，可以使用具有任何合适尺寸的基底。

[0210] 图案化基底12包括在基底12的暴露层或表面上或在基底12的暴露层或表面中界定的凹陷14以及分隔相邻凹陷14的间隙区域16。在本文公开的实例中，凹陷14用表面化学物质(例如，20、22)被官能化，而间隙区域16可以用于结合，但其上将不存在引物(在图5E和图5K中所示)。

[0211] 凹陷14可以使用多种技术被制造在基底12中或基底12上，所述多种技术包括例如光刻术、纳米压印光刻术、冲压技术、压花技术、模制技术、微蚀刻技术、印刷技术等。如本领域技术人员将认识到的，所使用的技术将取决于基底12的组成和形状。

[0212] 可以设想凹陷14的许多不同布局，包括规则的、重复的和非规则的图案。在实例中，凹陷14被设置成六边形网格用于紧密充填和改进的密度。其他布局可以包括例如直线(即矩形)布局、三角形布局及类似布局。在一些实例中，布局或图案可以是在行和列中的凹陷14的x-y格式。在一些其他实例中，布局或图案可以是凹陷14和/或间隙区域16的重复布置。在还有其他实例中，布局或图案可以是凹陷14和/或间隙区域16的随机布置。图案可以包括斑点、衬垫、井、柱、条纹、漩涡、线、三角形、矩形、圆形、弧形、棋盘格、方格、对角线、箭头、正方形和/或交叉影线。

[0213] 布局或图案可以相对于在所界定的区域中的凹陷14的密度(即，凹陷14的数量)来表征。例如，凹陷14可以以每mm^2约200万的密度存在。可以将密度调节到不同的密度，包括例如每mm^2至少约100、每mm^2约1,000、每mm^2约10万、每mm^2约100万、每mm^2约200万、每mm^2约500万、每mm^2约1000万、每mm^2约5000万或更大的密度。可选地或此外，密度可以被调节为不

大于每mm^2约5000万、每mm^2约1000万、每mm^2约500万、每mm^2约200万、每mm^2约100万、每mm^2约10万、每mm^2约1,000、每mm^2约100或更小。还应当理解，在基底12上的凹陷14的密度可以在选自上述范围的较低值之一和较高值之一之间。作为实例，高密度阵列可以被表征为具有被间隔开小于约100nm的凹陷14，中等密度阵列可以被表征为具有被间隔开约400nm至约1μm的凹陷14，以及低密度阵列可以被表征为具有被间隔开大于约1μm的凹陷14。虽然已经提供了示例性密度，但是应当理解，可以使用具有任何合适密度的基底。

[0214] 布局或图案可以也或可选地从平均间距、即从凹陷14的中心到相邻间隙区域16的中心的间隔(中心到中心的间隔)方面来表征。图案可以是规则的，使得围绕平均间距的变化的系数小，或者图案可以是非规则的，在这种情况下，变化的系数可以相对大。在任一情况下，平均间距可以是例如至少约10nm、约0.1μm、约0.5μm、约1μm、约5μm、约10μm、约100μm或更大。可选地或另外地，平均间距可以是例如至多约100μm、约10μm、约5μm、约1μm、约0.5μm、约0.1μm或更小。位点16的特定图案的平均间距可以在选自上述范围的较低值之一和较高值之一之间。在实例中，凹陷14具有约1.5μm的间距(中心到中心的间隔)。虽然已经提供了示例性例的平均间距值，但是应当理解，也可以使用其他平均间距值。

[0215] 在图5A至图5L所示的实例中，凹陷14是井14’，并且因此图案化基底12在其表面中包括井14’的阵列。井14’可以是微井或纳米井。每个井14’可以通过其体积、井开口面积、深度和/或直径来表征。

[0216] 每个井14’可以具有能够限制液体的任何体积。最小体积或最大体积可以被选择，例如以适应对流动池10的下游使用所预期的吞吐量(例如，多重性)、分辨率、分析物组成或分析物反应性(参见图5G和图5K)。例如，体积可以是至少约$1\times10^{-3}\mu m^3$、约$1\times10^{-2}\mu m^3$、约0.1μm^3、约1μm^3、约10μm^3、约100μm^3或更大。可选地或另外地，体积可以是至多约$1\times10^4\mu m^3$、约$1\times10^3\mu m^3$、约100μm^3、约10μm^3、约1μm^3、约0.1μm^3或更小。应当理解，官能化的聚合物涂层可以填充井14’的全部或部分体积。在单独的孔14’中的涂层的体积可以大于上面指定的值、小于上面指定的值或在上面指定的值之间。

[0217] 可以基于与上面关于井体积阐述的标准相似的标准来选择由表面上的每个井开口所占据的面积。例如，用于表面上的每个井开口的面积可以为至少约$1\times10^{-3}\mu m^2$、约$1\times10^{-2}\mu m^2$、约0.1μm^2、约1μm^2、约10μm^2、约100μm^2或更大。可选地或另外地，该面积可以是至多约$1\times10^3\mu m^2$、约100μm^2、约10μm^2、约1μm^2、约0.1μm^2、约$1\times10^{-2}\mu m^2$或更小。由每个井开口占据的面积可以大于上面指定的值、小于上面指定的值或在上面指定的值之间。

[0218] 每个井14’的深度可以是至少约0.1μm、约1μm、约10μm、约100μm或更大。可选地或另外地，深度可以是至多约$1\times10^3\mu m$、约100μm、约10μm、约1μm、约0.1μm或更小。每个井14’的深度可以大于上面指定的值、小于上面指定的值或在上面指定的值之间。

[0219] 在一些情况下，每个井14’的直径可以是至少约50nm、约0.1μm、约0.5μm、约1μm、约10μm、约100μm或更大。可选地或另外地，直径可以为至多约$1\times10^3\mu m$,、约100μm、约10μm、约1μm、约0.5μm,、约0.1μm或更小(例如，约50nm)。每个井14’的直径可以大于上面指定的值、小于上面指定的值或在上面指定的值之间。

[0220] 图案化基底12可以暴露于一系列过程，以便在凹陷14中添加表面化学物质20、22，并在表面化学物质20、22上以及在图案化基底12的至少一部分上形成水溶性保护涂层24。图5B至图5H一起图示出了其中在形成保护涂层24之前添加表面化学物质20、22的实例；并

且图5B至图5D和图5I至图5L一起图示出了一实例，在该实例中形成若干保护涂层24'、24，以便在方法200的不同阶段保护不同的表面化学物质20、22。

[0221] 虽然未示出，但是应当理解，图案化基底12可以暴露于等离子体灰化，以便清洁和活化表面。例如，等离子体灰化过程可以去除有机材料并引入表面羟基基团。其他合适的清洁过程可以用于部分地根据基底12的类型来清洁基底12。例如，可以用氧化剂或苛性碱溶液执行化学清洁。

[0222] 图案化基底12(在图5A中示出)然后可以暴露于将准备表面12用于官能化的聚合物涂层20的沉积的过程(图5C)，官能化的聚合物涂层20是本文公开的表面化学物质的一个实例。在实例中，图案化基底12可以暴露于硅烷化，硅烷化将硅烷或硅烷衍生物18(图5B)附接至图案化晶片表面。硅烷化跨过整个表面，包括在凹陷14、14'中(例如，在底表面上和沿着侧壁)和在间隙区域16上，引入硅烷或硅烷衍生物18。

[0223] 硅烷化可以使用任何硅烷或硅烷衍生物18来完成。硅烷或硅烷衍生物18的选择可以部分地取决于用于形成官能化的聚合物涂层20(在图5C中示出)的官能化分子，因为在硅烷或硅烷衍生物18和官能化的聚合物涂层20之间形成共价键可能是合意的。用于将硅烷或硅烷衍生物18附接至基底12的方法可以根据所使用的硅烷或硅烷衍生物18而变化。在本文中阐述了若干实例。

[0224] 在实例中，硅烷或硅烷衍生物18是(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)或(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)(即$X\text{-}R^{B}\text{-}Si(OR^{C})_{3}$，其中X是氨基，$R^{B}$是$-(CH_{2})_{3}-$，以及$R^{C}$是乙基或甲基)。在该实例中，基底12的表面可以用(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)或(3-氨基丙基)三甲氧基硅烷(APTMS)预处理，以将硅共价地连接至表面上的一个或更多个氧原子(而不意图通过机制来保持，每个硅可以结合至一个、两个或三个氧原子)。该化学地处理的表面被烘烤以形成胺基团单层。然后胺基团与磺基HSAB反应以形成叠氮基衍生物。在21℃下用1J/cm^{2}至30J/cm^{2}的能量的UV活化产生活性氮烯类物质，其可以容易地经历与PAZAM(例如，官能化分子)的各种插入反应。

[0225] 也可以使用其他硅烷化方法。合适的硅烷化方法的实例包括气相沉积、YES方法、旋涂或其他沉积方法。本文描述了可以用于使基底12硅烷化的方法和材料的一些实例，但是应该理解，也可以使用其他方法和材料。

[0226] 在利用YES CVD烘箱的实例中，图案化基底12被放置在CVD烘箱中。腔室可以被通风，并且然后硅烷化循环开始。在循环期间，硅烷或硅烷衍生物容器可以被保持在合适的温度(例如，对于降冰片烯硅烷约120℃)，硅烷或硅烷衍生物蒸气管线被保持在合适的温度(例如，对于降冰片烯硅烷约125℃)，并且真空管线被保持在合适的温度(例如，约145℃)。

[0227] 在另一个实例中，硅烷或硅烷衍生物18(例如液体降冰片烯硅烷)可以沉积在玻璃瓶内，并且放置在带有图案化基底12的玻璃真空干燥器内。然后可以将干燥器抽空到在从约15mTorr至约30mTorr的范围内的压力，并且放置在在从约60℃至约125℃的范围内的温度的烘箱内。允许硅烷化继续进行，并且然后将干燥器从烘箱中移除、冷却并在空气中通风。

[0228] 气相沉积、YES方法和/或真空干燥器可以与各种硅烷或硅烷衍生物18一起使用，所述各种硅烷或硅烷衍生物18例如包括本文公开的不饱和部分的实例的那些硅烷或硅烷衍生物18。作为实例，当硅烷或硅烷衍生物18包括环烯烃不饱和部分例如降冰片烯、降冰片

烯衍生物(例如,包括氧或氮代替碳原子之一的(杂)降冰片烯)、跨环辛烯、跨环辛烯衍生物、跨环戊烯、跨环庚烯、跨环壬烯、双环[3.3.1]壬-1-烯、双环[4.3.1]癸-1(9)-烯、双环[4.2.1]壬-1(8)-烯以及双环[4.2.1]壬-1-烯时,可以使用这些方法。这些环烯烃中的任何一种可以例如用R基团例如氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂环基(heteroalicyclyl)、芳烷基或(杂环基)烷基取代。降冰片烯衍生物的实例包括[(5-双环[2.2.1]庚-2-烯基)乙基]三甲氧基硅烷。作为其他实例,当硅烷或硅烷衍生物18包括环炔烃不饱和部分例如环辛炔、环辛炔衍生物或双环壬炔(例如双环[6.1.0]壬-4-炔或其衍生物、双环[6.1.0]壬-2-炔或双环[6.1.0]壬-3-炔)时,可以使用这些方法。这些环炔烃可以用本文描述的任何R基团取代。

[0229] 如图5B所示,硅烷或硅烷衍生物18的附接形成硅烷化的图案化基底,包括硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域。

[0230] 硅烷化的图案化晶片然后可以暴露于将在硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域上形成官能化的聚合物涂层20的工艺。

[0231] 如本文所描述的,官能化的聚合物涂层20的实例包括PAZAM或被官能化以与图案化晶片12和随后施加的引物22相互作用的任何其他分子。官能化的聚合物涂层20可以使用关于参考数字102'描述的任何技术在硅烷化的图案化晶片的表面上(即,在硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域上)形成。产生的涂层20在图5C中示出。

[0232] 将官能化的聚合物涂层20附接至硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域(即18)可以通过共价结合。将官能化的聚合物涂层20共价连接至硅烷化凹陷对在各种使用期间在最终形成的流动池的整个寿命期间将官能化的聚合物涂层20保持在凹陷14、14'中是有帮助的。下面是在硅烷或硅烷衍生物18和官能化的聚合物涂层20之间可以发生的反应的一些实例。

[0233] 当硅烷或硅烷衍生物18包括降冰片烯或降冰片烯衍生物作为不饱和部分时,降冰片烯或降冰片烯衍生物可以:I)经历与PAZAM的叠氮化物/叠氮基基团的1,3-偶极环加成反应;ii)经历与附接至PAZAM的四嗪基团的偶联反应;经历与附接至PAZAM的腙基团的环加成反应;经历与附接至PAZAM的四唑基团的光点击反应;或者经历与附接至PAZAM的腈氧化物基团的环加成。

[0234] 当硅烷或硅烷衍生物18包括环辛炔或环辛炔衍生物作为不饱和部分时,环辛炔或环辛炔衍生物可以:I)经历与PAZAM的叠氮化物/叠氮基的应变促进的叠氮化物-炔烃1,3-环加成(SPAAC)反应,或者ii)经历与附接至PAZAM的腈氧化物基团的应变促进的炔烃-腈氧化物环加成反应。

[0235] 当硅烷或硅烷衍生物18包括双环壬炔(bicyclononyne)作为不饱和部分时,由于在双环环体系中的应变,双环壬炔可以经历与附接至PAZAM的叠氮化物或腈氧化物的类似的SPAAC炔烃环加成。

[0236] 虽然未示出,但是应当理解,在该方法的一些实例中,图案化基底12可以不暴露于硅烷化。相反,图案化基底12可以暴露于等离子灰化,并且然后官能化的聚合物涂层20可以直接旋涂(或以其他方式沉积)在等离子灰化的图案化基底12上。在该实例中,等离子灰化可以产生表面活化剂(例如,-OH基团),其可以将官能化的聚合物涂层20粘附至图案化基底12。在这些实例中,选择官能化的聚合物涂层20,使得它与通过等离子灰化产生的表面基团反应。

[0237] 同样虽然未示出，但是应当理解，硅烷化的和涂覆的图案化基底(在图5C中示出)可以暴露于清洁工艺。该工艺可以利用水浴和声处理。水浴可以被保持在从约22℃至约45℃的范围内的相对低温。在另一实例中，水浴温度在从约25℃至约30℃的范围内。

[0238] 然后将硅烷化的和涂覆的图案化基底暴露于抛光以从硅烷化间隙区域中去除官能化的聚合物涂层20的一部分。硅烷化的、涂覆的和抛光的图案化基底在图5D中示出。硅烷或硅烷衍生物18的邻近间隙区域16的部分可以作为抛光的结果被去除或者可以不作为抛光的结果被去除。因此，在图5D至图5L中，硅烷或硅烷衍生物18的邻近间隙区域16的部分以虚线示出，因为它们在抛光后可能至少部分地保留，或者它们在抛光后可能被去除。当这些硅烷化部分被完全地去除时，应该理解，下面的基底12被暴露。因此，在一些实例中，间隔层28可以在结合区域25(例如，在图5G和图5J中)处直接接触基底12，并且保护涂层24’、24可以在一个或更多个间隙区域16(例如，在图5F、图5J和图5L中)直接接触基底12。当这些硅烷化部分在抛光后至少部分地保留时，随后结合的盖和随后形成的保护涂层24、24’在结合区25和间隙区域16处直接接触硅烷或硅烷衍生物18。

[0239] 抛光工艺可以用温和的化学浆料(包括研磨剂)来执行，该温和的化学浆料可以从间隙区域16中去除薄的官能化的聚合物涂层20和在一些情况中硅烷或硅烷衍生物18的至少一部分，而不有害地影响在这些区域处的下面的基底12。可选地，抛光可以用不包括研磨颗粒的溶液来执行。

[0240] 温和的化学浆料是具有在从约7.5至约11的范围内的pH并且包括研磨颗粒的碱性含水浆料。研磨颗粒的实例包括碳酸钙($CaCO_3$)、琼脂糖、石墨、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、二氧化硅、氧化铝(即矾土)、铈土、聚苯乙烯及其组合。在一些实例中，研磨颗粒选自由碳酸钙($CaCO_3$)、琼脂糖和石墨组成的组。研磨颗粒的平均颗粒尺寸可以在从约15nm至约5μm的范围内，并且在一个实例中为约700nm。

[0241] 除了研磨颗粒，碱性含水浆料还可以包括缓冲液、螯合剂、表面活性剂和/或分散剂。缓冲液的实例包括Tris碱(即，三(羟基甲基)氨基甲烷)，其可以存在于具有约9的pH的溶液中。螯合剂的实例是乙二胺四乙酸(EDTA)，其可以存在于具有约8的pH的溶液中。表面活性剂的实例是阴离子型表面活性剂，例如十二烷基硫酸钠。可以使用具有不同分子量的聚丙烯酸酯分散剂。分散剂的实例是聚(丙烯酸钠盐)。分散剂可以有助于保持研磨颗粒的尺寸，并且至少大体上防止研磨颗粒的沉降。

[0242] 碱性含水浆料可以用于化学机械抛光系统中以抛光图5C所示的硅烷化的和涂覆的图案化基底的表面。抛光头/衬垫或其他抛光工具能够从间隙区域16抛光官能化的聚合物涂层20，同时将官能化的聚合物涂层20留在凹陷14、14’中，并且至少大体上保持下面的基底12完整。作为实例，抛光头可以是Strasbaugh ViPRR II抛光头。

[0243] 如上面所提到的，抛光可以用抛光垫和不含任何研磨剂的溶液来执行。例如，抛光垫可以与不含研磨颗粒的溶液(即不包括研磨颗粒的溶液)一起使用。

[0244] 抛光从间隙区域16去除官能化的聚合物涂层20的部分(以及在一些情况中硅烷或硅烷衍生物18的至少一部分)，并且将官能化的聚合物涂层20的部分留在硅烷化凹陷中，如图5D所示。同样如上面所提到的，在抛光完成后，间隙区域16可以保持被硅烷化。换句话说，在抛光之后，硅烷化的间隙区域可以保持完整。可选地(如由18的虚线部分所指示的)，作为抛光的结果，硅烷或硅烷衍生物18可以从间隙区域16中去除。

[0245] 虽然未示出，但是应当理解，硅烷化的、涂覆的和抛光的图案化基底(在图5D中示出)可以暴露于清洁工艺。该工艺可以利用水浴和声处理。水浴可以被保持在从约22℃至约30℃的范围内的相对低温。硅烷化的、涂覆的和抛光的图案化基底也可以被旋转干燥，或经由另一种合适的技术被干燥。

[0246] 然后，图5D中所示的硅烷化的、涂覆的和抛光的图案化基底可以暴露于图5E至图5H所示的工艺或图5I至图5L所示的工艺。在图5E至图5H中，形成单个水溶性保护涂层24，并且在图5I至图5L中，形成多个水溶性保护涂层24’、24。

[0247] 现在将描述图5E至图5H中所示的实例。在图5E中，引物22被接枝到凹陷14、14’中的官能化的聚合物涂层20。可以使用本文描述的任何引物。在该实例中，接枝可以通过浸泡涂布、喷涂、水坑分配或者通过另一种合适的方法来实现，所述另一种合适的方法将引物附接至凹陷14、14’中的至少一些中的官能化的聚合物涂层20。这些示例性技术中的每一种都可以利用本文描述的引物溶液或混合物，其可以包括引物、水、缓冲液和催化剂。

[0248] 如图5F中所示，在引物22被接枝到凹陷14、14’中的官能化的聚合物涂层20之后，水溶性保护涂层24在表面化学物质20、22上以及在图案化基底的至少一部分上形成。水溶性保护涂层24可以在图案化基底12的暴露表面上形成，该暴露表面不是结合区25的一部分。在该实例中，水溶性保护涂层24选择性地沉积或图案化在相邻凹陷14、14’之间的间隙区域16上，但不在图案化基底12的其中结合区域25所位于的边缘/周边处。水溶性保护涂层24的选择性沉积/图案化可以使用水溶液来完成，如本文描述。在该实例中，水溶液中的材料可以是本文公开的任何实例(即，水溶性非阳离子合成聚合物；水溶性天然多糖或其衍生物；水溶性天然蛋白质或其衍生物；水溶性盐；选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇组成的组的水溶性小分子化合物；或环糊精)。在实例中，水溶性材料可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、乙二醇、乙二胺四乙酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水。在水溶液被沉积后，其可以被干燥以形成水溶性保护涂层24。

[0249] 如在图5G中所描绘的，盖26然后可以结合至结合区25。盖26可以是本文描述的任何材料和且在本文描述的任何配置中。盖26也可以经由本文描述的任何技术结合至结合区25。

[0250] 在图5G所示的实例中，盖26包括与侧壁29一体地形成的顶部部分27。侧壁29通过间隔层28结合至图案化基底12的结合区25。

[0251] 盖26和图案化基底12(具有表面化学物质20、22)一起界定流动通道30，该流动通道30与凹陷14、14’选择性地流体连通。流动通道30可以用于例如选择性地将流体引入到保护涂层24中，以便去除涂层24，并且选择性地将反应组分或反应物引入至表面化学物质20、22(在去除保护涂层24之后)，以便在凹陷14、14’中/处引发指定的反应。

[0252] 当盖26结合至硅烷化的、涂覆的、抛光的和接枝的图案化基底时，形成流动池10’的实例，如图5G所示。在该实例中，保护涂层24保持在表面化学物质20、22和一些图案化基底表面上的适当位置上。流动池10’可以在保护涂层24在适当位置上的情况下被运送、存储等。

[0253] 当在应用(例如，测序操作)中例用流动池10’是合意的时，可以经由关于参考数字108描述的溶解过程来去除保护涂层24。保护涂层24的水溶性使它能够经由溶解在水溶液

中而被去除，这对下面的表面化学物质20、22或图案化基底12是无害的。图5H描绘了在去除保护涂层24后的流动池10’。

[0254] 现在将描述图5I至图5L中所示的实例。在图5I中，初始水溶性保护涂层24’可以选择性地沉积或图案化，使得官能化的聚合物涂层20被覆盖，并且使得图案化基底12的结合区25保持暴露。在该实例中，初始水溶性保护涂层24’选择性地沉积或图案化在相邻凹陷14、14’之间的间隙区域16上，但不在结合区域25所位于的图案化基底12的边缘/周边处。初始水溶性保护涂层24’的选择性沉积/图案化可以如本文描述的使用关于参考数字104”描述的水溶液(其包括水和在一些情况中高达约15％(质量比体积)的聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖或聚乙二醇)来完成。

[0255] 初始保护涂层24在随后执行的任何组装过程期间保护官能化的聚合物涂层20。如在图5J中描绘的，组装过程可以包括将盖26结合至结合区25。虽然未示出，但是当使用基底晶片时，组装过程可以包括结合和切割。盖26可以是任何材料，并且可以具有本文描述的任何配置。盖26可以经由本文描述的任何技术结合至结合区25。

[0256] 在图5J所示的实例中，盖26包括与侧壁29一体地形成的顶部部分27。侧壁29通过间隔层28结合至图案化基底12的结合区25。在盖26被结合之后，流动通道30在盖26和图案化基底12之间形成。流动通道30可以用于选择性地将各种流体引入至流动池10’。

[0257] 初始水溶性保护涂层24’然后可以被去除，如图5K所示。因为初始保护涂层是水溶性的，所以它的去除可能涉及水性溶解，如关于参考数字108所描述的。在初始保护涂层24’溶解并从流动通道30中除去溶液后，官能化的聚合物涂层20和已经被初始保护涂层24’涂覆的任何图案化基底12(例如，未结合至盖26的间隙区域16)被暴露。

[0258] 此外在图5K中示出的，在去除初始保护涂层24’之后，引物22可以被接枝到凹陷14、14’中的官能化的聚合物涂层20。可以使用本文描述的任何引物22。在该实例中，接枝可以使用流过过程(参考数字102”’)和本文描述的引物溶液或混合物来完成，引物溶液或混合物可以包括引物、水、缓冲液和催化剂。在引物22被接枝后，形成流动池10’。

[0259] 如果流动池10’将被运送或储存持续某些时间段，则(第二)水溶性保护涂层24可以被施加至表面化学物质20、22以及被施加在图案化基底12的至少一部分(即，被暴露在通道30内的间隙区域16)上，如图5L所示。(第二)水溶性保护涂层24的沉积可以使用关于参考数字104”’描述的流过过程和水溶液来完成。重申一下，在该实例中在水溶液中的水溶性材料可以是本文公开的任何实例(即，水溶性非阳离子合成聚合物；水溶性天然多糖或其衍生物；水溶性天然蛋白质或其衍生物；水溶性盐；选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇组成的组的水溶性小分子化合物；或环糊精)。在实例中，水溶性材料可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、乙二醇、乙二胺四乙酸钠盐、具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水。

[0260] 该方法的又一个实例(例如，方法100或200)涉及非图案化基底12’，如图6A至图6E所示。

[0261] 本文公开的任何基底和非图案化基底12’不包括凹陷14或间隙区域16。在该示例性方法中，盖26在开始时结合至非图案化基底12’以形成流动通道30。盖26可以是本文描述的任何材料和在本文描述的任何配置中。盖26也可以经由本文描述的任何技术结合至非图

案化基底12’。

[0262] 在图6B所示的实例中，盖26包括与侧壁29一体地形成的顶部部分27。侧壁29通过间隔层28结合至非图案化基底12’的结合区。结合区可以在非图案化基底12’的周边处或者在任何区域处，在该任何区域中形成流动通道30的边界是合意的。在其他实例中，间隔层28可以形成侧壁，并且可以附接至至少大体上平坦的盖26。

[0263] 盖26(包括侧壁29)和非图案化基底12一起界定流动通道30。流动通道30可以用于例如选择性地引入流体，以便形成表面化学物质20、22和保护涂层24，去除涂层24，以及选择性地将反应组分或反应物引入至表面化学物质20、22(在去除保护涂层24之后)，以便在流动通道30内引发指定的反应。

[0264] 在形成官能化的聚合物涂层20(在图6C中示出)之前，该方法可以涉及将非图案化基底暴露于(经由流过过程)清洁工艺和/或另一工艺(例如硅烷化)，所述另一工艺准备非图案化基底的暴露表面用于官能化分子的随后沉积。

[0265] 在图6B中示出了非图案化基底12’的硅烷化。在该实例中，硅烷化将硅烷或硅烷衍生物18附接至在流动通道30中存在的非图案化晶片表面12’的暴露部分。

[0266] 硅烷化可以使用任何硅烷或硅烷衍生物18来完成。硅烷或硅烷衍生物18的选择可以部分地取决于用于形成官能化的聚合物涂层20(在图6C中示出)的官能化分子，因为可能合意的是在硅烷或硅烷衍生物18和官能化的聚合物涂层20之间形成共价键。用于将硅烷或硅烷衍生物18附接至基底12’的方法可以是流过过程。

[0267] 如图6C所示，在该实例中，官能化的聚合物涂层20然后在硅烷或硅烷衍生物18上或者在已经沉积的其他化学物质上形成，以准备在流动通道30内的非图案化基底12’的暴露表面。

[0268] 可以使用本文描述的任何官能化分子。在该实例中，官能化的聚合物涂层的形成可以通过流过过程来完成。在流过过程中，官能化分子可以通过相应的输入端口被引入到流动通道30中，并且可以被固化。官能化的聚合物涂层20将在非图案化基底12’的暴露表面上形成，并且抛光不发生。

[0269] 如图6D中所示，引物22被接枝到流动通道30中的官能化的聚合物涂层20。可以使用本文描述的任何引物。在该实例中，接枝可以通过流过过程来完成。在流过过程中，本文描述的引物溶液或混合物可以通过相应的输入端口被引入到流动通道30中，可以在流动泳道中保持持续足够的时间(即孵育期)，以使引物附接至官能化的聚合物涂层20，并且然后可以从相应的输出端口被去除。在引物附接之后，另外的流体可以被引导通过流动通道，以清洗现在官能化的流动通道30。

[0270] 在图6D中示出了在该实例中的产生的流动池10”。该流动池10”可以用于测序操作中，或者可以被涂覆有保护涂层24用于运送和/或储存。

[0271] 如图6E中所示，在实例中，在引物22被接枝到流动通道30中的官能化的聚合物涂层20上之后，水溶性保护涂层24在表面化学物质20、22上形成。在该实例中，水溶性保护涂层24的形成可以通过流过过程来完成。在流过过程中，水溶液(包括水和在一些情况中高达约15％(质量比体积)的水溶性成膜材料)可以通过相应的输入端口被引入到流动通道30中，并且可以保持在流动通道中。可以引入足够的水溶液以覆盖在流动通道30内的表面化学物质20、22。当在流动通道30中时，流动池可以暴露于干燥过程，其中空气、氮气或真空通

过输入端口冲洗持续设定量的时间，以使表面化学物质20、22上的(第二)水溶性保护涂层干燥。

[0272] 在该实例中，水溶液中的水溶性材料可以是本文公开的任何实例(即，水溶性非阳离子合成聚合物；水溶性天然多糖或其衍生物；水溶性天然蛋白质或其衍生物；水溶性盐；选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇组成的组的水溶性小分子化合物；或环糊精)。在实例中，水溶性材料可以是聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、乙二醇、乙二胺四乙酸钠盐、具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水中的任何一种。

[0273] 应该理解，在一些实例中，引物接枝和水溶性保护涂层24的形成可以同时发生。

[0274] 当在应用(例如测序操作或基因分型操作)中利用流动池10”(具有在表面化学物质20、22上的保护涂层24)是合意的时，可以经由关于参考数字108描述的溶解过程来去除保护涂层24。保护涂层24的水溶性使它能够经由溶解在水溶液中而被去除，这对下面的表面化学物质20、22是无害的。

[0275] 此外，本文公开的方法可以涉及执行质量控制测定。在实例中，该测定可以是CFR或HP-TET测定或另一种合适的基于染料的测定。可以在引入保护涂层24之前(但是在引物接枝之后)执行测定，并且然后在去除保护涂层24(并且引物被再次暴露)之后再次执行测定。测定数据可以指示任何引物降解是否发生。在实例中，该方法涉及去除水溶性保护涂层；以及执行基于染料的测定以检测引物的任何降解。在实例中，本文公开的流动池10、10’、10”可以呈现出在具有其上的保护涂层的情况下在2天的储存后CFR保留的小于15％的下降以及在另一个实例中在具有其上的保护涂层的情况下在2天的储存后CFR保留的小于10％的下降。在又一个实例中，流动池10、10’、10”可以不呈现出CFR保留的下降，而是可以呈现出增加的CFR保留(例如在从约1％至约25％的范围内，或者对于另一个实例，从约5％至约20％)。在另一个实例中，在引物接枝之后但在施加水溶性涂层之前，可以通过将所接枝的引物与标记的质量控制寡核苷酸杂交来检测引物接枝效率。检测杂交的质量控制寡核苷酸，并且然后从所接枝的引物中脱杂交。然后施加水溶性涂层。

[0276] 本文公开的实例说明了保护涂层24没有在结合区25上形成。然而，在其他实例中，保护涂层24可以在整个基底12、12’的表面上(即，在表面化学物质20、22上，在一些实例中在间隙区域16上，以及在结合区25上)形成，并且盖26可以通过保护涂层24结合至基底12、12’。

[0277] 虽然未示出，但是应当理解，流动池10、10’、10”的一些实例可以通过一个或更多个固定机构(例如，粘合剂、粘结剂、紧固件等)被直接固定至检测装置(未示出)，并且因此与检测装置物理接触。检测装置可以包括CMOS装置(其包括多个堆叠层，包括例如硅层、介电层、金属-介电层、金属层等)和光学部件。光学部件可以被布置成使得检测装置的光学传感器至少大体上与检测装置的单个光波导和在流动池10、10’、10”的单个凹陷14、14’内的表面化学物质20、22对准，并且因此可操作地与该单个光波导和该表面化学物质20、22相关联。

[0278] 此外虽然未示出，但是应当理解，代替被结合至盖26，官能化基底(其上具有表面化学物质20、22或在其凹陷14中)可以结合至另一个官能化基底(其上具有表面化学物质

20、22或在其凹陷中)。两个官能化表面可以彼此面对,并且可以具有在其间界定的流动通道。间隔层和合适的结合方法可以用于将两个官能化基底结合在一起。

[0279] 本文公开的流动池10、10'、10"可以用于多种测序方法或技术中,所述多种测序方法或技术包括经常被称为合成测序(SBS)、循环阵列测序、连接测序、焦磷酸测序及类似测序的技术。利用这些技术中的任何一种并且在使用图案化基底的实例中,由于功能分子层20和所附接的测序引物22存在于官能化凹陷(即,其上具有表面化学物质20、22的14、14')中而不是在间隙区域16上,扩增将被限制于官能化凹陷。在其他实例中,扩增可以跨过整个流通池泳道发生。

[0280] 作为一个实例,合成测序(SBS)反应可以在系统例如来自Illumina(San Diego,CA)的HiSeq™、HiSeqX™、MiSeq™、NovaSeq™或NextSeq™测序器系统上运行。在SBS中,监测核酸引物沿核酸模板的延伸,以确定模板中的核苷酸的序列。基本的化学过程可以是聚合(例如,通过聚合酶催化)或连接反应(例如,通过连接酶催化)。在特定的基于聚合酶的SBS过程中,荧光标记的核苷酸以模板依赖方式添加到引物22中(从而使引物22延伸),使得添加到引物22中的核苷酸的顺序和类型的检测可以用于确定模板的序列。例如,为了引发第一个SBS循环,一个或更多个标记的核苷酸、DNA聚合酶等可以被输送到容纳引物22的阵列的流动通道30、30A等内/通过流动通道30、30A等。可以通过成像事件来检测官能化凹陷(即其上具有表面化学物质20、22的14、14'),其中引物延伸导致标记的核苷酸被并入。在成像事件期间,照明系统(未示出)可以向官能化凹陷(即,其上具有表面化学物质20、22的14、14')提供激发光。

[0281] 在一些实例中,核苷酸还可以包括可逆终止性质,一旦核苷酸被添加至引物22,该可逆终止性质就进一步终止引物延伸。例如,具有可逆终止子部分的核苷酸类似物可以被添加至引物22,使得随后的延伸不能发生,直到去封闭剂(deblocking agent)被输送以除去该部分。因此,对于使用可逆终止的实例,去封闭剂可以被输送至流动池30、30A等(在检测发生之前或之后)。

[0282] 清洗可以在各种流体输送步骤之间发生。SBS循环然后可以重复n次以将引物22延伸n个核苷酸,从而检测长度为n的序列。

[0283] 虽然已经详细地描述了SBS,但是应该理解,本文描述的流动池10、10'、10"可以与其他测序方案一起用于基因分型,或者用于其他化学和/或生物应用中。

[0284] 为了进一步说明本公开内容,本文给出了实例。应当理解,这些实例出于说明性的目的被提供并且不应被解释为限制本公开内容的范围。

[0285] 在这些实例中的一些中,保护涂层被干燥,并且保护涂层中的一些是湿的。湿涂层被称为"湿储存"或"湿储存的"。虽然暴露于干燥过程的涂层明显是干的且看起来是固体的,但应该理解,可能已经存在微量水分。湿涂层呈液体形式。

[0286] 非限制性工作实施例

[0287] 实施例1

[0288] 该实施例的流动池(1A和1B)包括被界定在图案化硅和/或钽氧化物基底上的若干流动通道/泳道,其中每个泳道与多个井流体连通。在每个井中形成PAZAM层,并且在PAZAM层上接枝1μm引物。保护涂层最终在表面化学物质上形成(如下所述)。一些保护涂层被干燥,并且保护涂层之一是湿的。

[0289] 测试比较流动池。表面化学性质与实施例的流动池相同。在比较流动池的表面化学物质上没有形成保护涂层。

[0290] 在将保护涂层添加到实施例的流动池中之前，在每个实施例流动池和比较流动池的每个泳道中执行第一次HP-TET质量控制测定。HP或发夹界定用于在所接枝的流动池表面上探测引物的DNA分子的二级结构部分，并且TET(或TET+DNA)是具有与所使用的引物互补的序列的染料标记的寡核苷酸。TET与引物杂交，过量的TET被洗掉，并且所附接的染料的荧光通过荧光检测来测量。

[0291] 在第一次HP-TET测定之后，制备聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物(在本实施例中为KOLLICOAT® IR)的若干水溶液。每种溶液具有在从0.10％至10％(质量比体积)的范围内的共聚物的不同浓度。流过过程用于将水溶液之一引入到每个流动池的泳道之一中，并且引入到在相应泳道内的PAZAM层和引物上。水溶液被干燥以形成保护涂层。每个干燥的保护涂层具有不同浓度的共聚物。使用氮气来干燥这些实施例的池和比较池。

[0292] 干燥的实施例的流动池然后在保护涂层在适当位置的情况下在60℃下干燥储存持续3天(相当于在25℃或环境条件下干燥储存持续1个月)。

[0293] 比较的未涂覆流动池(“未涂布”)暴露于相同的干燥储存条件。

[0294] 另一保护涂层通过使用流过过程引入液体氯化钠-柠檬酸钠(SSC)缓冲液来形成。因此，该实施例的流动池暴露于湿储存条件，其中氯化钠-柠檬酸钠(SSC)缓冲液在4℃保持浸泡在流动池表面化学物质上。

[0295] 在储存后，在清洗期间经由水性溶解从相应的实施例流动池的泳道中除去保护涂层，并且冲洗掉湿储存的流动池。在每个实施例流动池和比较流动池的每个泳道中执行另一个HPTET质量控制测定。

[0296] 使用在涂布前和在储存后的HP-TET结果来计算HP-TET保留结果。保留在图7中示出。如所描绘的，对于流动池1A和1B两者，HP-TET保留通常随着共聚物浓度的增加而增加。在1％处或低于1％，共聚物涂层不如比较实施例或湿储存有效。该实施例说明，在从约2.5％至约10％的范围内的共聚物浓度下，与在相同干燥条件下储存的未涂覆表面化学物质相比，保护涂层改进了表面化学物质的干燥储存稳定性，并且接近湿储存条件的稳定性。

[0297] 实施例2

[0298] 实施例流动池(2A至2H中的每个中的两个)包括被界定在钽氧化物涂覆的硅基底上的一条泳道。在泳道中形成PAZAM层，并且在PAZAM层上接枝1μm引物。在表面化学物质上最终形成保护涂层。如下所描述的，对每种类型的保护涂层测试两个实施例流动池，并且图8中的结果是具有相同类型的保护涂层的两个流动池的平均值。一些保护涂层被干燥(2A至2H)，并且保护涂层之一是湿的。

[0299] 测试比较流动池。表面化学物质与实施例流动池相同。在比较流动池的表面化学物质上没有形成保护涂层。

[0300] 在将保护涂层添加至实施例流动池之前，在实施例流动池和比较流动池的每个泳道中执行第一次HP-TET质量控制测定。

[0301] 在第一次HP-TET测定后，制备不同潜在保护涂层材料的若干水溶液。用乙二胺四乙酸钠盐(EDTA)(0.1wt％)、甘油(1wt％)、氢醌(0.1wt％)、KOLLICOAT® IR(1％)、聚乙二醇3000(1％)、三(2-羧乙基)膦(TCEP)(0.1wt％)、Tris碱(pH 7-8)(100mM)和

TWEEN®20(非离子乳化剂)(1%)制备溶液。

[0302] 使用流过过程以将水溶液之一引入到实施例流动池中的两个中(即EDTA溶液在两个流动池(统称为2A)中,甘油溶液在另两个流动池(统称为2B)中,氢醌溶液在另外两个流动池(统称为2C)中,KOLLICOAT® IR溶液在另外两个流动池中(统称为2D),聚乙二醇3000溶液在两个另外的流动池(统称为2E)中,TCEP溶液在另外两个流动池(统称为2E)中,Tris碱溶液在还另两个流动池(统称为2G)中,以及TWEEN® 20溶液在两个其他流动池(统称为2H)中),并且被引入到PAZAM层和相应流动池内的引物上。将水溶液干燥以形成保护涂层。使用氮气来执行实施例的池和比较池的干燥。

[0303] 然后在保护涂层在适当位置的情况下将实施例流动池在60℃干燥储存持续3天(相当于在25℃或环境条件下干燥储存持续1个月)。

[0304] 比较的未涂覆流动池(C1)暴露于相同的干燥储存条件。

[0305] 另一保护涂层通过使用流过过程引入液体氯化钠-柠檬酸钠(SSC)缓冲液来形成。因此,该实施例流动池(WC)暴露于湿储存条件,其中氯化钠-柠檬酸钠(SSC)缓冲液在4℃保留浸泡在流动池表面化学物质上。

[0306] 在储存后,在清洗期间经由水性溶解从实施例流动池的泳道中除去保护涂层,并且冲洗掉湿储存的流动池(WC)。在每个实施例流动池和比较流动池的每个泳道中执行另一个HP-TET质量控制测定。

[0307] 使用在涂覆之前和在储存后的HP-TET结果来计算HP-TET保留结果。保留在图8中示出。如所描绘的,具有甘油(2B)、共聚物(2D)、聚乙二醇(2E)和TCEP(2F)的涂层的流动池的HP-TET保留与在类似条件下储存的干燥储存的比较实施例(C1)可比较或更好。涂层2A、2C、2G和2H的结果指示,在这些浓度和/或通过流过过程施加的这些涂层可能阻碍引物的可接近性和/或可能不阻止表面化学物质以及涂层2B和2D-2F的降解。据信,涂层2A、2C、2G和2H在不同浓度下和/或当通过不同的涂覆工艺被施加时可以表现得更好。

[0308] 实施例3

[0309] 在本实施例中使用的流动池每个都包括具有在其上界定的4个泳道的非图案化玻璃基底。在流动池之一中,泳道中的两个(统称为3A)用作实施例泳道,以及泳道中的两个(统称为C2A)用作比较实施例泳道。在流动池中的另一个中,泳道中的两个(统称为3B)用作实施例泳道,以及泳道中的两个(统称为C2B)用作比较实施例泳道。在流动池中的第三个中,泳道中的两个(统称为3C)用作实施例泳道,以及泳道中的两个(统称为C2C)用作比较实施例泳道。

[0310] 在每个泳道中形成PAZAM层,并且在PAZAM层上接枝引物。在实施例泳道(3A、3B、3C)中,使用流过过程在表面化学物质上形成KOLLICOAT® IR保护涂层。在比较实施例泳道(C2A、C2B、C2C)中,没有形成保护涂层。通过使氮气流过每条泳道持续30秒来执行实施例泳道和比较实施例泳道的干燥。

[0311] 具有实施例流动泳道3A和比较流动泳道C2A的流动池在84%的相对湿度的情况下在包装中储存持续7天和14天。具有实施例流动泳道3B和比较流动泳道C2B的流动池在5%的相对湿度的情况下在包装中储存持续7天和14天。

[0312] 将这些流动池从储存器中移除并且用于测序。实施例泳道3A、3B和比较实施例泳

道C2A、C2B在测序期间被暴露于清洗步骤。据信，清洗至少部分地从实施例泳道3A、3B中去除保护涂层。然而，也可以在不去除保护涂层的情况下执行测序。

[0313] 图9示出了在第一测序循环之后泳道(3A、3B、C2A、C2B)的荧光强度的绘图。数据显示，与当未使用保护涂层时相比(即，将3A与C2A进行比较，并将3B与C2B进行比较)，当保护涂层在适当的位置上时，循环1强度受湿度储存条件的影响最小。用于未涂覆的泳道C2A、C2B的循环1强度表明，作为湿度暴露的结果，表面化学物质衰减。对5％湿度(流动泳道3B)的强度的影响也远小于在84％湿度(流动泳道3A)下观察到的影响。

[0314] 具有实施例流动泳道3CA和比较流动泳道C2C的流动池在外部温度波动下储存持续在2天和19天之间。在相应的时间段内在每24小时时间段期间，温度概况斜坡(ramp)在从约-23℃至约60℃的范围内。从第0小时至约第8小时，温度保持在约-23℃至-25℃之间。然后温度斜升至约60℃，并保持持续约8小时。然后将温度斜降到约-23℃至-25℃之间，以及从约第18小时至第24小时，温度保持在约-23℃至-25℃之间。

[0315] 将该流动池从储存中移除并用于测序。实施例泳道3C和比较实施例泳道C2C在测序期间暴露于清洗步骤，并且这些步骤被认为至少部分地从实施例泳道3C中去除保护涂层(尽管测序可以在没有保护涂层去除的情况下被执行)。

[0316] 图10示出了在第一测序循环之后泳道(3C、C2C)的荧光强度的绘图。数据显示，与当未使用保护涂层时相比(即，将3C与C2C进行比较)，当保护涂层在适当的位置上时，循环1强度受到外部温度波动的影响最小。用于未涂覆泳道C2C的循环1强度表明，作为外部温度波动的结果，表面化学物质衰减。

[0317] 实施例4

[0318] 在该实施例中使用两个开放流动池(即，没有盖被附接)。每个开放流动池包括被界定在图案化硅基底上的单个泳道(4A、4B)，其中每个泳道与多个井流体连通。在每个井中形成PAZAM层，并且在PAZAM层上接枝1μm引物。

[0319] 在形成任何保护涂层之前，两个开放流动池暴露于测序。

[0320] 然后使用浸涂工艺在每个开放流动池的表面化学物质的半部分上形成KOLLICOAT® IR保护涂层。开放流动池在氮气中干燥。因此，在该实施例中，所涂覆的半部分被称为实施例4A和实施例4B，而未涂覆的半部分被称为比较实施例C3和比较实施例C4。

[0321] 在形成保护涂层之后，包括涂覆侧4A和比较未涂覆侧C3的样品流动池在60℃下暴露于6天的开放式储存。在开放式储存中，保护涂层和未涂覆侧的所暴露的表面化学物质直接暴露于60℃温度。包括涂覆侧4B和比较未涂覆侧C4的样品流动池在室温暴露于7天的开放式储存。

[0322] 将整个流动池(即先前涂覆的半部分4A和4B)和未涂覆的半部分(C3和C4)从用于测序的存储中去除。保护涂层被认为在清洗步骤期间经由水性溶解而至少部分地从涂覆的半部分4A和4B中去除。

[0323] 图11A示出了在时间T0的包括4A和C3的流动池的第一测序循环之后(即，在4A上预涂覆)和在时间T1的存储之后的荧光强度的绘图。数据显示，与当未使用保护涂层时相比(即，将4A与C3进行比较)，当保护涂层在适当的位置上时，循环1强度在60℃受到开放式储存的影响最小。用于未涂覆的半部分C3的循环1强度表明，作为开放式储存的结果，表面化

学物质衰减。

[0324] 图11B示出了两个绘图—顶部图示出了穿过过滤器的簇的百分比(%通过过滤器(PF)),而底部图示出了在时间T0包括4B和C4的流动池的第一测序循环之后的荧光强度(即,在4B上预涂覆),以及在时间T1的存储之后进行的两次运行。%通过过滤器(PF)是用于描述通过纯洁阈值的簇的度量,并且用于测序数据的进一步加工和分析。较高的%通过过滤器导致用于测序数据的独特簇的增加的收率。图11B中的数据显示,当使用保护涂层时,%通过过滤器被改进(在时间T0和两个T1数据点比较4B与C4)。图11B中的数据还显示,与当未使用保护涂层时相比(即,在时间T0和两个T1数据点比较4B与C4),当保护涂层在适当的位置上时,循环1强度在室温受到开放式储存的影响最小。用于未涂覆的半部分C4的循环1强度表明,作为开放式储存的结果,即使在室温,表面化学物质也衰减。

[0325] 实施例5

[0326] 一种开放图案化玻璃晶片具有在其每一个井中形成的PAZAM层。在抛光后,切割晶片,并在切割池之一上喷涂KOLLICOAT® IR保护涂层。除了没有形成KOLLICOAT® IR保护涂层之外,以类似的方式(用PAZAM涂层)形成比较切割池。

[0327] 将实施例切割池和比较切割池在20℃、60℃和80℃储存持续1小时。在储存后,在清洗期间经由水性溶解从实施例切割池中除去保护涂层。然后将1μm引物接枝在实施例切割池和比较切割池的PAZAM层上,以分别形成实施例流动池和比较流动池。

[0328] 执行CFR测定以确定引物的接枝是否受到不同储存条件的影响。在CFR测定期间,引物接枝的表面暴露于在缓冲溶液中的荧光标记(Cal Fluor Red)的互补寡核苷酸。这些寡核苷酸与表面结合的引物结合,并且多余的CFR被洗掉。然后在荧光检测器中扫描表面以测量表面上的CFR强度,以提供表面上的引物浓度和健康状况的定量测量。在测量后,用温和的碱溶液去除寡核苷酸,并且重新扫描表面以确认所有CFR都被去除。

[0329] 用于实施例流动池的中值强度结果显示在图12A中,并且用于比较流动池的中值强度结果显示在图12B中。明显地,比较流动池的未涂覆PAZAM层接枝引物的能力在暴露于60℃或更高温度时被有害地影响(图12B)。实施例流动池的涂覆的PAZAM层能够在所有测试温度比比较切割池的未涂覆PAZAM层更好地接枝引物(比较图12A和图12B)。尽管在80℃中值强度关于实施例流动池和比较流动池两者都降低,但是实施例流动池与比较流动池相比似乎降低得更慢。

[0330] 实施例6

[0331] 在本实施例中使用的流动池每个都包括具有在其上界定的4个泳道的非图案化玻璃基底。在每个流动池中,泳道中的两个是具有在其上形成的保护涂层的实施例泳道,并且泳道中的两个是没有在其上形成的保护涂层的比较泳道。

[0332] 在每个池的每个泳道中,形成PAZAM层,并且使用流过过程将引物接枝在PAZAM层上。在每个流通池的两个实施例泳道中的每个中,使用流过过程在表面化学物质上形成KOLLICOAT® IR保护涂层。在每个流动池的两个比较实施例泳道中的每个中,没有形成保护涂层。实施例泳道和比较泳道的干燥通过使氮气流过每个泳道持续30秒来执行。

[0333] 每个流动池(包括两个实施例泳道和两个比较实施例泳道)储存在特定的温度、也就是25℃、40℃、60℃或80℃。池被存储持续的天数从1天到高达120天变化。

[0334] 将流动池从储存中移除并用于测序。在测序期间,将实施例泳道和比较实施例泳

道暴露于清洗步骤，并且这些步骤被认为至少部分地从实施例泳道中除去保护涂层(尽管测序可以在没有这样的除去的情况下被执行)。

[0335] 图13示出了在第一测序循环之后的泳道组(实施例(即6)或比较组(即C5))的平均荧光强度的绘图。对实施例泳道和比较实施例泳道示出了强度数据，并且数据通过池被储存的温度和池被储存持续的天数来绘制。数据清楚地表明，与当未使用保护涂层时相比(即，将标记为“6”的数据与标记为“C5”的比较数据进行比较)，当保护涂层在适当的位置上时，循环1强度受到升高的温度储存条件的影响最小，而与储存的天数无关。用于未涂覆的比较实施例泳道的循环1强度表明，作为温度暴露的结果，表面化学物质衰减。

[0336] 实施例7

[0337] 将KOLLICOAT® IR喷涂到具有TaO_x表面的图案化CMOS晶片上。喷涂经过的次数跨过图案化CMOS晶片变化，以确定对产生的涂层的厚度的影响。结果在图14中被示出为以mm(x轴)计的跨过晶片上的保护涂层的距离相对于以μm(y轴)计的保护涂层厚度的距离。共聚物涂层的厚度随着经过的次数跨过晶片增加而略微增加，并且然后随着经过的次数减少而略微减少。该数据表明，喷涂可以用于获得具有受控厚度的保护涂层。

[0338] 实施例8

[0339] 开放图案化CMOS晶片具有在其每个井中形成的PAZAM层。在抛光后，将晶片切割成700nm的池，并在三个切割池上喷涂KOLLICOAT® IR保护涂层。除了没有形成KOLLICOAT® IR保护涂层之外，以类似的方式(用PAZAM涂层)形成比较切割池。

[0340] 一个实施例切割池和一个比较切割池在室温(即～25℃)储存持续28天、35天或71天。在储存后，在清洗期间经由水性溶解将保护涂层从实施例切割池中除去。然后将1μm引物接枝在实施例切割池和比较切割池的PAZAM层上，以分别形成实施例流动池(9A(28天储存)、9B(35天储存)、9C(71天储存)和比较流动池(C7A(28天储存)、C7B(35天储存)、C7C(71天储存))。

[0341] 然后对每个池执行测序。清洗步骤从实施例流动池中除去保护涂层。

[0342] 图15示出了在第一测序循环后的荧光强度的绘图。在每个储存期，当与实施例流动池9A、9B、9C(在有保护涂层的情况下被储存)相比时，比较流动池C7A、C7B、C7C(在没有保护涂层的情况下被储存)呈现出降低的强度。用于未涂覆流动池C7A、C7B、C7C的循环1强度表明，作为暴露的结果，即使在室温，表面化学物质也衰减。

[0343] 实施例9

[0344] 开放图案化硅晶片具有在每个井中形成的PAZAM层。在抛光后，切割晶片以形成池，并且在两个切割池上选择性地喷涂初始KOLLICOAT® IR保护涂层，使得结合区保持暴露。除了没有形成KOLLICOAT® IR保护涂层之外，以类似的方式(用PAZAM涂层)形成比较切割池。将盖结合至实施例切割池和比较切割池的相应结合区，以形成流动池。然后，使用流过过程经由水性溶解从在实施例流动池内的PAZAM层去除初始KOLLICOAT® IR保护涂层。

[0345] 然后使用流过过程将引物接枝到在实施例流动池和比较实施例流动池的每个内的每个PAZAM层。

[0346] 在引物接枝之后，经由流过过程和干燥，在实施例流动池内的引物和PAZAM层上形

成另一个KOLLICOAT®IR保护涂层。

[0347] 然后在保护涂层在适当位置上的情况下将实施例流动池(10A和10B)在30℃下干燥储存持续2周或6周。两个比较的未涂覆流动池(C8A、C8B)暴露于相同的干燥储存条件(在30℃下2周储存或6周储存),而另一个实施例流动池(WC2)暴露于湿储存条件持续6周,在此期间氯化钠-柠檬酸钠(SSC)缓冲液保留在流动池表面化学物质上在4℃浸泡。

[0348] 在储存后,然后对每个池执行测序。在清洗步骤期间,保护涂层被认为至少部分地从实施例流动池10A、10B去除,并且SSC缓冲液从湿储存的流动池WC2被冲洗。

[0349] 图16示出了在第一测序循环后的荧光强度的绘图。在每个储存期期间,与实施例流动池10A、10B(在有保护涂层的情况下被储存)相比,比较流动池C8A、C8B(在干燥条件下在没有保护涂层的情况下被储存)呈现出降低的强度。在6周,干保护涂层提供与湿储存保护涂层一样好的对表面化学物质的保护(比较10B与WC2)。

[0350] 实施例10

[0351] 敞开式图案化钽氧化物涂覆的基底具有在每个井中形成的PAZAM层,并且引物使用流过过程被接枝在PAZAM层上。还测试了比较流动池。表面化学物质与实施例流动池相同。在比较流动池的表面化学物质上没有形成保护涂层。

[0352] 在实施例流动池上形成任何保护涂层之前,执行第一次CFR测定。

[0353] 在第一次CFR测定后,制备不同潜在的保护涂层材料的若干水溶液。用乙二胺四乙酸钠盐(EDTA)、聚乙二醇、(三(2-羧乙基)膦)(TCEP)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺(THPTA)、具有EDTA的三(羟甲基)氨基甲烷(TE缓冲液)和红菲咯啉二磺酸二钠盐(Bath)制备溶液。每种溶液具有如表1所示的浓度。通过在实施例流动池的表面上搅拌溶液来施加水溶液,并且允许溶液蒸发以形成涂层。然后将实施例流动池在4℃或室温干燥储存持续11天。另一个实施例流动池是湿储存池。下表1识别了所测试的各种池和它们被测试时的条件。

[0354] 表1

[0355]

		存储条件	
标识符	**保护涂层**	**4°C**	**室温 (RT)**
WC3	湿存储	是	否
C11 (比较实施例)	无	是	否
11A	0.5M EDTA	是	否
11B	4.4 wt% PEG	是	否
11C	0.8 wt% TCEP	是	否
11D	1.0 wt% THPTA	是	否
11E	1x TE缓冲液	是	否
C12 (比较实施例)	无	否	是
11F	1x TE缓冲液	否	是
11G	1.6 wt% Bath	否	是
11H	0.5M EDTA	否	是
11I	4.4 wt% PEG	否	是
11J	0.8 wt% TCEP	否	是
11K	1.0 wt% THPTA	否	是

[0356] 比较的未涂覆流动池C11和C12分别暴露于与在干燥4℃和干燥室温储存的实施例池相同的干燥储存条件。另一个流动池WC3暴露于湿储存条件，其中氯化钠-柠檬酸钠(SSC)缓冲液保留在4℃浸泡在流动池表面化学物质上。

[0357] 在相应条件下储存后，在清洗期间经由水性溶解从每个实施例流动池(11A至11K)中去除保护涂层，并且冲洗掉湿储存的流动池WC3。在每个实施例流动池和比较流动池中执行另一个CFR质量控制测定。

[0358] 图17所示的结果是11天的CFR结果除以每个实施例和比较实施例的TOCFR结果。如所描绘的，具有每个干保护涂层的流动池的CFR保留优于在类似条件下储存的干燥储存的

比较实施例，并且与湿储存条件不分上下。

[0359] 实施例11

[0360] 敞开式图案化硅基底具有在其每个井中形成的PAZAM层。在抛光后，1μm引物然后被接枝在PAZAM层上。以类似的方式形成比较实施例。

[0361] 在任何保护涂层在实施例敞开式流动池上形成之前，执行第一次CFR测定。此数据在图18中被示出为T0。

[0362] 在第一次CFR测定之后，制备KOLLICOAT® IR的水溶液，并且用于在实施例敞开式池上形成喷涂的保护涂层。

[0363] 然后将该实施例敞开式流动池在60℃干燥储存持续1天或2天

[0364] 然后在每个敞开式池上在它们各自的储存期后执行测序，并且在清洗步骤期间除去保护涂层。

[0365] 图18示出了在1个储存日和2个储存日之后执行第一测序循环之后的CFR保留(%，在第X天(X＝1或2)的CFR信号除以在第0天的信号的比率)的柱状图。在每个储存期，与实施例流动池12(在有保护涂层的情况下储存)相比，比较流动池C13(在没有保护涂层的情况下储存)呈现出显著降低的CFR保留。在储存一天后，比较流动池的CFR下降40％。

[0366] 实施例12

[0367] 图案化CMOS晶片具有在其每个井中形成的PAZAM层。在抛光后，将不同厚度的KOLLICOAT® IR涂层喷涂在图案化CMOS晶片上以及图案化CMOS晶片的相应井(以及其中的PAZAM层)中。用于选择性喷涂KOLLICOAT® IR涂层的溶液包括约5％KOLLICOAT® IR、约5％乙醇和约90％水。各种涂层的厚度在从1.708μm到11.73μm的范围内。晶片的另一部分保持未涂覆，并且被用作比较实施例。

[0368] 然后将晶片(包括实施例部分和比较实施例部分)在40℃干燥储存持续2天。

[0369] 经由水性溶解从晶片去除相应的涂层，然后将引物浸泡接枝在井中的PAZAM层上。然后执行CFR测定。

[0370] 对已经被涂覆有KOLLICOAT® IR涂层的晶片的每个实施例部分显示相对于比较实施例部分的％强度增加。结果显示在图19中，并且用已经使用的KOLLICOAT® IR涂层的厚度标记。结果表明，保护涂层的厚度似乎不影响在保护涂层被去除后维持PAZAM层接枝引物的性能时的功能。

[0371] 实施例13

[0372] 实施例流动池包括在图案化硅基底上界定的八个泳道，其中每个泳道与多个井流体连通。在每个井中形成PAZAM层，并且在PAZAM层上接枝1μm引物。

[0373] 在八个泳道中的四个中最终在表面化学物质上形成保护涂层。更具体地，八个泳道中的四个被涂覆有包括约5％KOLLICOAT® IR、约5％乙醇和约90％水的溶液。使用真空、随后是30秒的氮气暴露来使池干燥。流动池在60℃储存持续2天。

[0374] 其他四个泳道是比较流动泳道。比较流动泳道中的表面化学物质与实施例流动泳道相同，除了在比较流动泳道的表面化学物质上没有形成保护涂层以外。

[0375] 在储存后，在实施例流动泳道(统称为13)和比较实施例流动泳道(统称为C14)的每个中执行测序。作为测序的一部分，使用水性洗涤来去除保护涂层。

[0376] 图20示出了在第一测序循环之后用于两次读数的实施例泳道(13)和比较实施例泳道(C14)的平均荧光强度的绘图。如所描绘的,保护涂层保护流动池的实施例泳道免受C1强度的显著下降。

[0377] 实施例14

[0378] 实施例流动池包括在图案化硅基底上界定的八个泳道,其中每个泳道与多个井流体连通。在每个井中形成PAZAM层,并且在PAZAM层上接枝1μm引物。

[0379] 引物接枝混合物用在从5%至0.1%范围内的不同量的KOLLICOAT® IR来制备,并且在流动池上的八个泳道中被随机化。允许该接枝混合物孵育,并且然后使用真空、随后是在每个孔/端口中的30秒的氮气暴露来使池干燥。

[0380] 经由水性溶解来去除保护涂层,并且执行CFR测定。

[0381] 图21示出了相对CFR相对于KOLLICOAT® IR的百分比的绘图。相对一致的CFR数据表明,引物可以在沉积保护涂层的同时被接枝。此实施例提供了涂层不有害地影响在此实施例中使用的引物沉积化学物质的证据。

[0382] 实施例15

[0383] 此实施例中的三个流动池包括在图案化硅基底上界定的八个泳道,其中每个泳道与多个井流体连通。在每个井中形成PAZAM层,并且在PAZAM层上接枝1μm引物。

[0384] 在八个泳道中的一个中的表面化学物质上形成聚丙烯酰胺保护涂层。比较涂层(不同的水溶性阳离子聚合物)在八个泳道中的五个中的表面化学物质上形成,并且八个泳道中的一个保持未涂覆。比较涂层是不同的阳离子聚合物。下表2识别了所测试的各种池及它们被测试时的浓度。

[0385] 表2

[0386]

		浓度 (%)		
标识符	**保护涂层**	**FC1**	**FC2**	**FC3**
无涂层 (比较实施例)	无	NA	NA	NA
14	聚丙烯酰胺	0.01	0.1	1
C15A	Luviquat® HOLD	0.01	0.1	1

[0387]

(比较实施例)				
C15B (比较实施例)	Luviquat® FC 370	0.01	0.1	1
C15C (比较实施例)	Luviquat® FC 550	0.01	0.1	1
C15D (比较实施例)	聚季铵盐-10	0.01	0.1	1
C15E (比较实施例)	聚(乙烯亚胺)(PEI)	0.01	0.1	1

[0388] 涂层经由流过过程形成,并且使用30秒的氮气暴露干燥。清洗池。

[0389] 在每个流动池泳道中执行成簇。将测序库加载到每个流动泳道中,并由互补引物捕获片段。每个片段被扩增成不同的克隆簇。测量强度,并且图22将结果示出为任意荧光单位,其量化在流动池泳道表面上存在的双链DNA的量。如所描绘的,保护涂层保护实施例泳道,而阳离子聚合物阻碍成簇(比较14与C15A至C15E中的每个)。阳离子聚合物可能结合至PAZAM和/或引物表面化学物质。

[0390] 另外的注解

[0391] 应当认识到,前面的概念和下面更详细讨论的另外的概念的所有组合(条件是这样的概念不是相互不一致的)都被设想为本文公开的发明主题的一部分。特别是,出现在本公开内容的末尾处的所要求保护的主题的所有组合都被设想为本文公开的发明主题的一部分。还应当认识到,也可以出现在通过引用并入的任何公开内容中的本文中明确使用的术语应当被赋予与本文公开的特定概念最一致的含义。

[0392] 在整个说明书中对“一个实施例”、“另一个实施例”、“实施例”等的提及意指关于该实施例描述的特定要素(例如,特征、结构和/或特性)被包括在本文描述的至少一个实施例中,并且可以存在于其他实施例中或可以不存在于其他实施例中。此外,应该理解,用于任何实施例的所描述的要素可以在各种实施例中以任何合适的方式组合,除非上下文清楚地另有规定。

[0393] 应当理解,本文提供的范围包括所陈述的范围和在所陈述的范围内的任何值或子范围,就好像在所陈述的范围内的值或子范围被明确地列举一样。例如,从约200mm至约300mm的范围应该被解释为不仅包括从约200mm至约300mm的明确列举的限制,而且还包括单独的值,例如约208mm、约245mm、约275.5mm等,以及例如从约225mm至约290mm、从约235mm至约280mm等的子范围。此外,当利用“约”和/或“大体上”来描述值时,它们意指涵盖与所陈述的值的微小变化(高达+/-10%)。

[0394] 虽然已经详细地描述了若干实施例,但是应该理解,可以修改所公开的实施例。因此,上述描述被认为是非限制性的。

[0395] 本文还提供了以下方面:

[0396] 1)一种流动池,包括:

[0397] 基底，所述基底包括暴露表面；

[0398] 官能化的聚合物涂层，所述官能化的聚合物涂层通过在所述暴露表面上的化学基团被共价地结合至所述基底的所述暴露表面；

[0399] 引物，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层；以及

[0400] 水溶性保护涂层，所述水溶性保护涂层在所述引物和所述官能化的聚合物涂层上。

[0401] 2)如项目1)所述的流动池，其中由于在所述暴露表面上的所述化学基团与所述官能化的聚合物涂层的第一反应基团的反应，所述官能化的聚合物涂层被共价地结合至所述暴露表面。

[0402] 3)如项目1)或项目2)所述的流动池，其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应，所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层。

[0403] 4)如项目1)至3)中任一项所述的流动池，还包括被结合至所述基底的结合区的盖，其中所述盖和所述基底至少部分地界定流动通道。

[0404] 5)如项目4)所述的流动池，其中所述基底是包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底，并且其中所述流动通道与所述凹陷选择性地连通。

[0405] 6)如项目1)至4)中任一项所述的流动池，其中所述基底是包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底。

[0406] 7)如项目5)至6)中任一项所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层在所述凹陷中以及在所述间隙区域的至少一部分上。

[0407] 8)如项目1)至4)中任一项所述的流动池，其中所述基底是非图案化基底。

[0408] 9)一种方法，包括：

[0409] 提供具有包括第一化学基团的暴露表面的基底，其中所述提供任选地包括改性所述基底的所述暴露表面以并入所述第一化学基团；

[0410] 使所述第一化学基团与官能化的聚合物分子的第一反应基团反应，以形成被共价地结合至所述基底的所述暴露表面的官能化的聚合物涂层；

[0411] 通过使引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团反应，将所述引物接枝到所述官能化的聚合物涂层；以及

[0412] 在所述引物和所述官能化的聚合物涂层上形成水溶性保护涂层。

[0413] 10)如项目9)所述的方法，其中所述基底是非图案化基底，并且其中所述方法还包括将盖结合至所述非图案化基底的结合区，其中所述盖和所述非图案化基底至少部分地界定包括所述暴露表面的流动通道。

[0414] 11)如项目10)所述的方法，其中所述暴露表面的所述改性、所述第一化学基团与所述第一反应基团的所述反应、所述引物的所述接枝和所述水溶性保护涂层的所述形成涉及相应的流过过程。

[0415] 12)如项目9)所述的方法，其中：

[0416] 所述基底是非图案化基底；

[0417] 所述暴露表面的所述改性包括等离子体灰化；以及

[0418] 在所述暴露表面的所述改性之后，所述方法还包括将盖结合至所述非图案化基底的结合区，其中所述盖和所述非图案化基底至少部分地界定包括所述暴露表面中的一些的

流动通道。

[0419] 13)如项目9)所述的方法,其中:

[0420] 所述基底是包括由间隙区域分隔的凹陷的图案化基底;

[0421] 所述暴露表面的所述改性涉及将包括所述第一化学基团的硅烷或硅烷衍生物附接至所述暴露表面,以形成硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域;

[0422] 所述反应在所述硅烷化凹陷中和在所述硅烷化间隙区域上形成所述官能化的聚合物涂层;以及

[0423] 在所述引物的所述接枝之前,所述方法还包括从所述硅烷化间隙区域去除所述官能化的聚合物涂层。

[0424] 14)如项目13)所述的方法,其中:

[0425] 所述接枝将所述引物附接至所述硅烷化凹陷中的所述官能化的聚合物涂层,从而形成官能化凹陷;以及

[0426] 所述形成在所述官能化凹陷和至少一些所述间隙区域上产生所述水溶性保护涂层。

[0427] 15)如项目13)所述的方法,其中在所述官能化的聚合物涂层的所述去除之后,所述方法还包括将盖结合至所述图案化基底的结合区,其中所述盖和所述图案化基底至少部分地界定流动通道,所述流动通道包括具有在其上的所述官能化的聚合物涂层的所述硅烷化凹陷。

[0428] 16)如项目15)所述的方法,其中所述引物的所述接枝和所述水溶性保护涂层的所述形成涉及相应的流过过程。

[0429] 17)如项目9)所述的方法,其中在形成所述官能化的聚合物涂层之后以及在所述引物的所述接枝和所述水溶性保护涂层的所述形成之前,所述方法还包括:

[0430] 在所述官能化的聚合物涂层上图案化初始水溶性保护涂层,使得所述基底的结合区保持暴露;

[0431] 将盖结合至所述基底的所述结合区以形成与所述初始水溶性保护涂层选择性地流体连通的流动通道;以及

[0432] 去除所述初始水溶性保护涂层。

[0433] 18)如项目9)所述的方法,其中所述水溶性保护涂层的所述形成涉及施加包括高达约15%、或约1%至15%、或约1%至10%、或约1%至5%、或约2%至5%、或约4%至8%、或约5%至7.5%(质量比体积)的水溶性材料的水溶液。

[0434] 19)如项目18)所述的方法,其中基于所述引物的引物密度来调节所述水溶液中的所述水溶性材料的百分比。

[0435] 20)如项目1)-8)中任一项所述的流动池或项目9)-19)中任一项所述的方法,其中所述水溶性保护涂层包括非阳离子合成聚合物;天然多糖或其衍生物;天然蛋白质或其衍生物;水溶性盐;或者选自由水溶性表面活性剂、糖、抗氧化剂、螯合剂、缓冲液、乙二醇、甘油和环糊精组成的组的小分子化合物;或其组合。

[0436] 21)如项目20)所述的流动池或方法,其中所述水溶性保护涂层包括:

[0437] (a)非阳离子合成聚合物,所述非阳离子合成聚合物包括聚丙烯酰胺、聚(丙烯酸)、聚丙烯酸酯、聚(甲基丙烯酸)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(乙烯醇)、聚(甲基丙烯酰胺)、

聚(N-烷基丙烯酰胺)、聚(N-二烷基丙烯酰胺)、聚(N-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺)、聚(二乙烯基醚-马来酸酐)、聚(磷酸酯)、聚(2-烷基-2-噁唑啉)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(2-羟乙基丙烯酸酯)、聚乙二醇、聚醚、聚(磺基甜菜碱甲基丙烯酸酯)、聚(乙烯基醚-马来酸)、羟基官能聚合物、非天然多肽或有机硅或其组合；

[0438] (b)天然多糖或其衍生物，其包括淀粉、羧甲基纤维素、黄原胶、果胶、葡聚糖、角叉菜胶、瓜尔胶、纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、羟乙基纤维素(HEC)、甲基纤维素、羧甲基羟乙基纤维素(CMHEC)、透明质酸、淀粉磷酸酯、羟丙基淀粉、羟乙基淀粉、琼脂糖、琼脂或藻酸盐或其组合；

[0439] (c)包括酪蛋白或白蛋白的所述天然蛋白质或其衍生物；

[0440] (d)水溶性盐，其包括氯化钠、溴化钠、硫酸钠、磷酸钠、碳酸钠、醋酸钠、柠檬酸钠、氯化钾、溴化钾、硫酸钾、磷酸钾、碳酸钾、醋酸钾、或柠檬酸钾或柠檬酸钠盐水或其组合；

[0441] (e)缓冲液，其包括柠檬酸钠盐水、任选地具有乙二胺四乙酸的三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸(HEPES)、3-[[1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基]氨基]-2-羟基丙烷-1-磺酸(TAPSO)、N-(2-羟基-1,1-双(羟甲基)乙基)甘氨酸(tricine)、3-(N-吗啡代)丙烷磺酸(MOPS)或3-(N,N-双[2-羟乙基]氨基)-2-羟基丙烷磺酸(DIPSO)的水溶液；

[0442] (f)水溶性表面活性剂，其包括阴离子型表面活性剂或非离子型表面活性剂，或者包括十二烷基硫酸钠、烷基乙氧基化物、乙氧基化油、脂肪或磺基琥珀酸盐；或者

[0443] (g)糖、抗氧化剂、乙二醇、甘油或环糊精；

[0444] (h)螯合剂，其包括乙二胺四乙酸钠盐、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺、(三(2-羧乙基)膦)或红菲咯啉二磺酸二钠盐；或者

[0445] (i)其组合。

[0446] 22)如项目20)所述的流动池或方法，其中所述水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖、葡聚糖、聚丙烯酰胺、乙二醇、三(羟甲基)氨基甲烷或其盐、乙二胺四乙酸或其盐、(三(2-羧乙基)膦)、三(3-羟丙基三唑基甲基)胺或其盐、红菲咯啉二磺酸二钠盐、羟基官能聚合物、甘油或柠檬酸钠盐水或其混合物。

[0447] 23)如项目20)所述的流动池或方法，其中所述水溶性保护涂层包括聚乙烯醇/聚乙二醇接枝共聚物、蔗糖或其混合物。

[0448] 24)如前述项目中任一项所述的流动池或方法，其中所述官能化的聚合物涂层是聚(N-(5-叠氮基乙酰胺基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺)(PAZAM)。

[0449] 25)如前述项目中任一项所述的流动池，其中所述水溶性保护涂层作为与所述官能化的聚合物涂层的混合物存在于所述流动池上。

[0450] 26)如前述项目中任一项所述的流动池或方法，其中所述化学基团或所述第一化学基团是任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

[0451] 27)如前述项目中任一项所述的流动池或方法，其中所述化学基团或所述第一化学基团通过硅烷连接基被共价地连接至所述基底的所述暴露表面。

[0452] 28)如项目27)所述的流动池或方法，其中所述化学基团或所述第一化学基团是降

冰片烯基或被取代的降冰片烯基。

[0453] 29)如前述项目中任一项所述的流动池或方法,其中所述第一反应基团和所述第二反应基团在被列举的情况下每个均独立地为任选地被取代的烯基、任选地被取代的环烯基、任选地被取代的降冰片烯基、任选地被取代的环辛炔基、任选地被取代的二环壬炔基、任选地被取代的炔基、叠氮基、任选地被取代的四嗪基、腙基、任选地被取代的四唑基、甲酰基或羟基。

[0454] 30)如项目29)所述的流动池或方法,其中所述第一反应基团和第二反应基团都是叠氮基。

[0455] 31)如前述项目中任一项所述的流动池或方法,其中由于所述引物与所述官能化的聚合物涂层的第二反应基团的反应,所述引物被接枝到所述官能化的聚合物涂层,并且所述引物包括炔基基团用于与所述第二反应基团反应。

[0456] 32)如前述项目中任一项所述的流动池或方法,其中所述引物是包括功能引物的群体和非功能引物的群体的多个引物。

[0457] 33)一种使用项目1)-8)或20)-32)中任一项的流动池的方法,包括:

[0458] 将所述流动池插入到测序仪中;以及

[0459] 通过将所述流动池上的所述水溶性保护涂层暴露于水来去除所述水溶性保护涂层。

[0460] 34)如项目33)所述的方法,其中所述去除通过执行流过过程以去除所述水溶性保护涂层来完成。

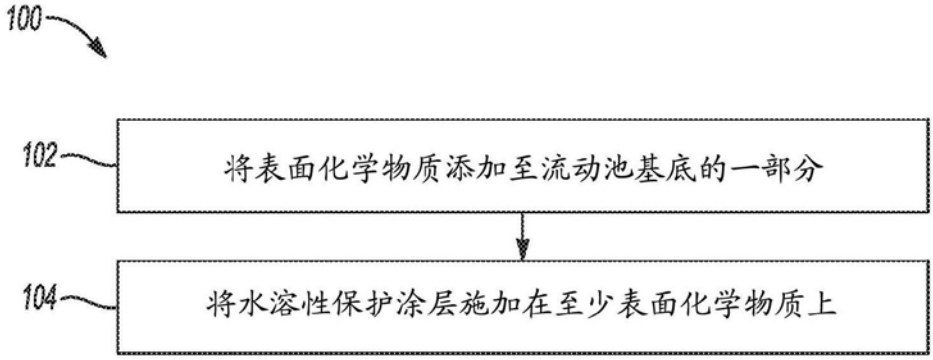

100
102
将表面化学物质添加至流动池基底的一部分
104
将水溶性保护涂层施加在至少表面化学物质上

图1

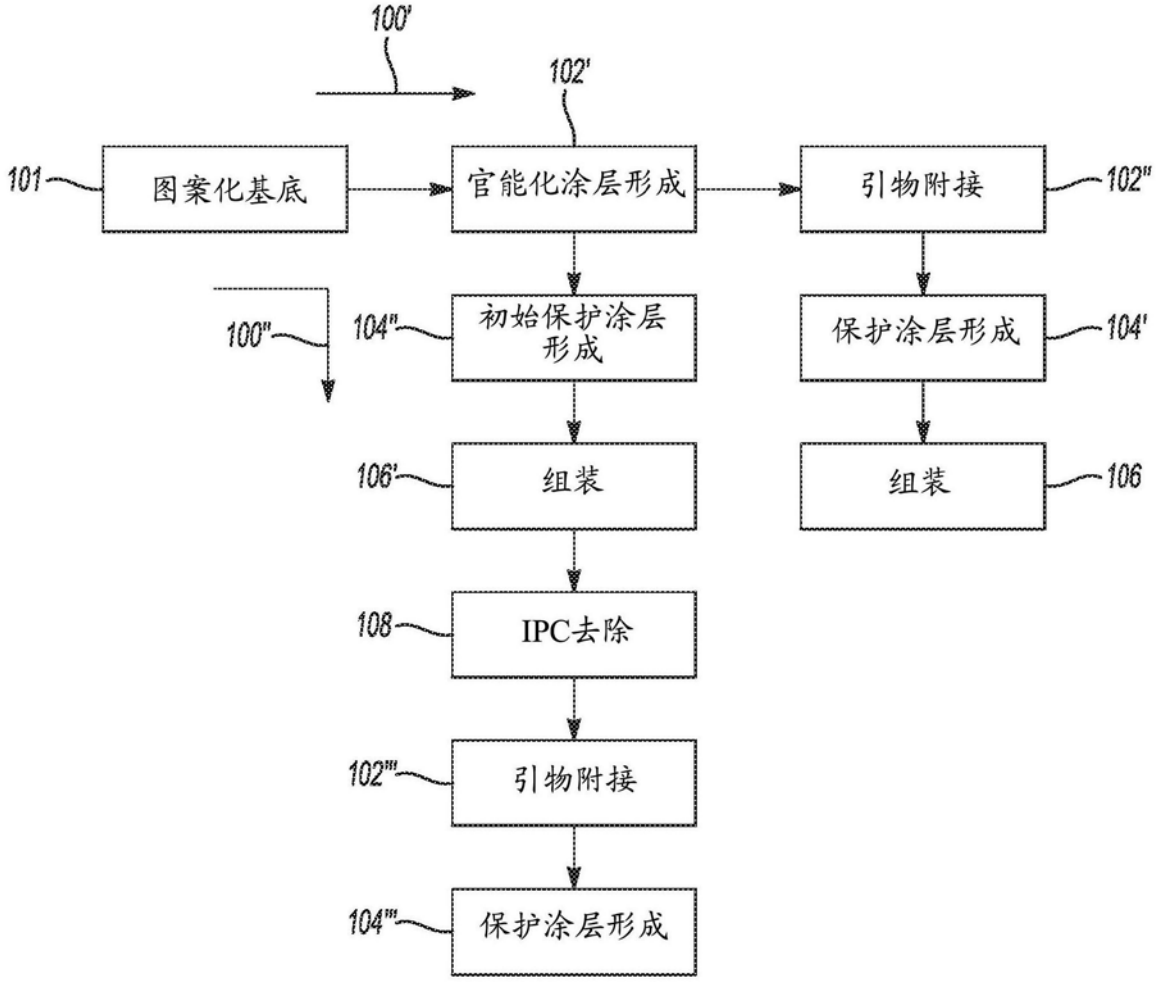

100'
102'
101
图案化基底
官能化涂层形成
引物附接
102"
100"
104"
初始保护涂层形成
保护涂层形成
104'
106'
组装
组装
106
108
IPC去除
102'''
引物附接
104'''
保护涂层形成

图2

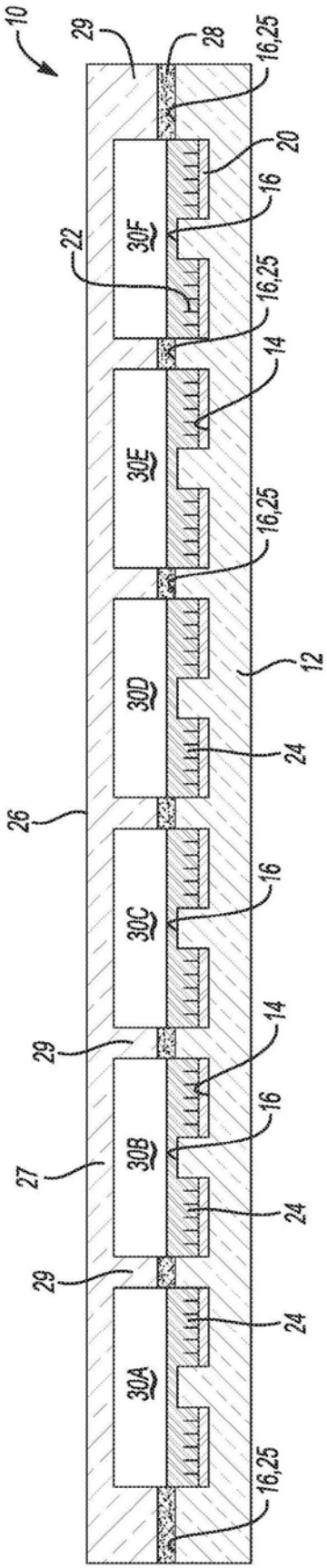

10
29
28
16,25
20
16
22
30F
16,25
14
30E
16,25
12
30D
24
26
30C
16
29
14
16
27
30B
24
29
24
30A
16,25

图3

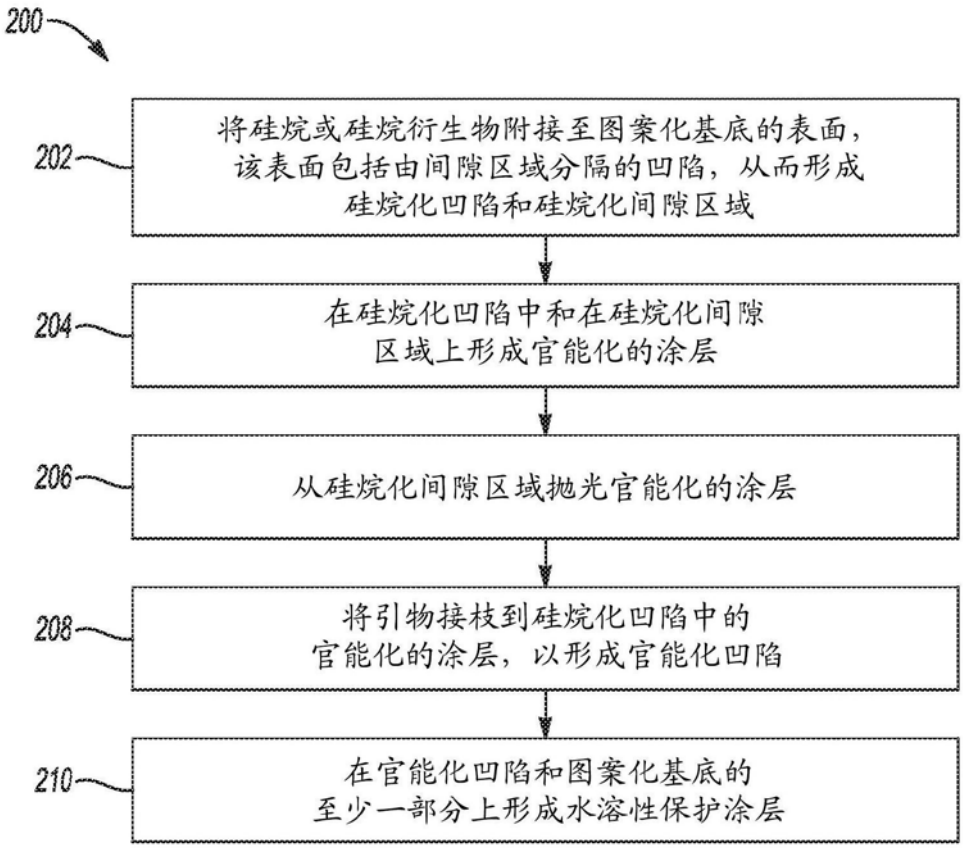

200
202
将硅烷或硅烷衍生物附接至图案化基底的表面，该表面包括由间隙区域分隔的凹陷，从而形成硅烷化凹陷和硅烷化间隙区域
204
在硅烷化凹陷中和在硅烷化间隙区域上形成官能化的涂层
206
从硅烷化间隙区域抛光官能化的涂层
208
将引物接枝到硅烷化凹陷中的官能化的涂层，以形成官能化凹陷
210
在官能化凹陷和图案化基底的至少一部分上形成水溶性保护涂层

图4

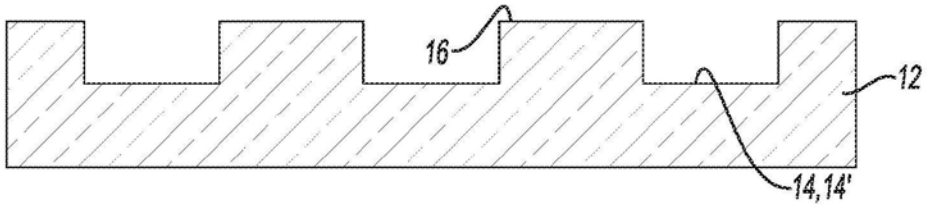


图5A

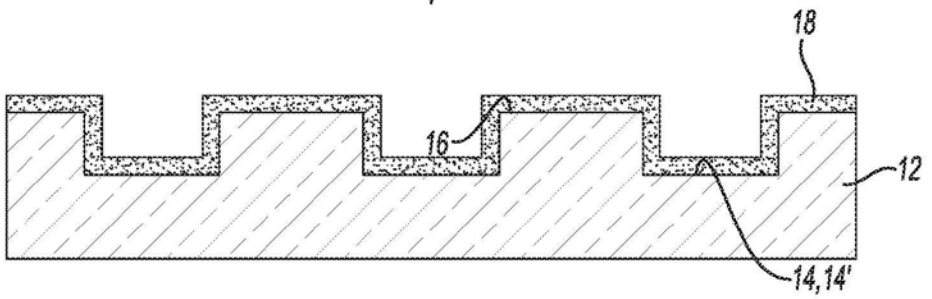


图5B

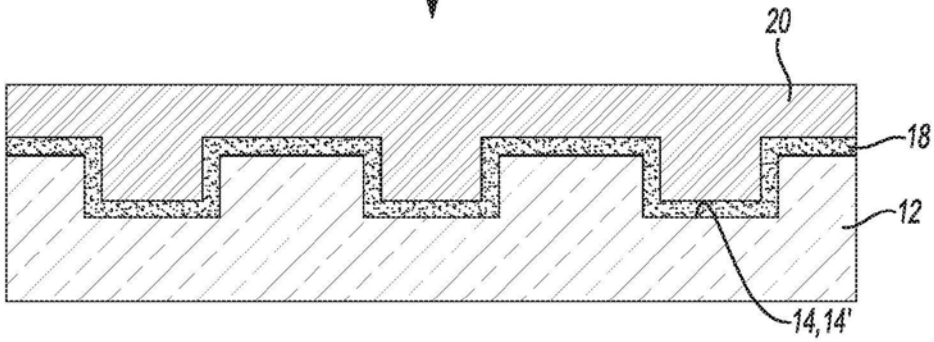
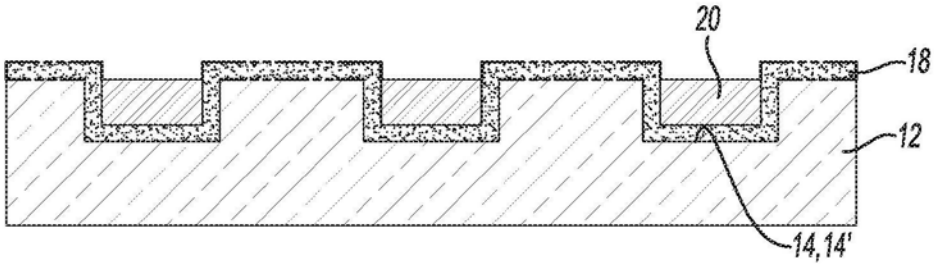


图5C



到图5E 到图5I

图5D

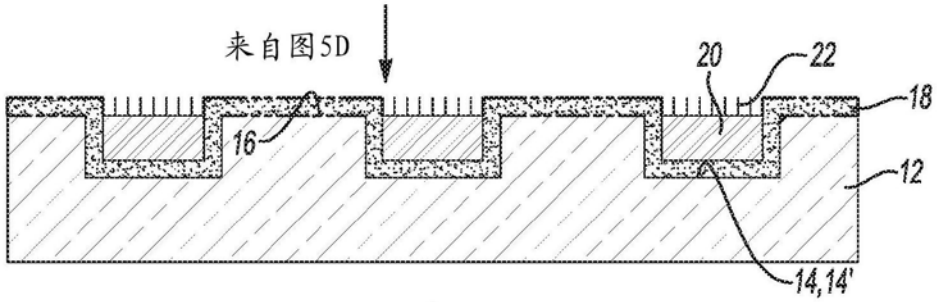


图5E

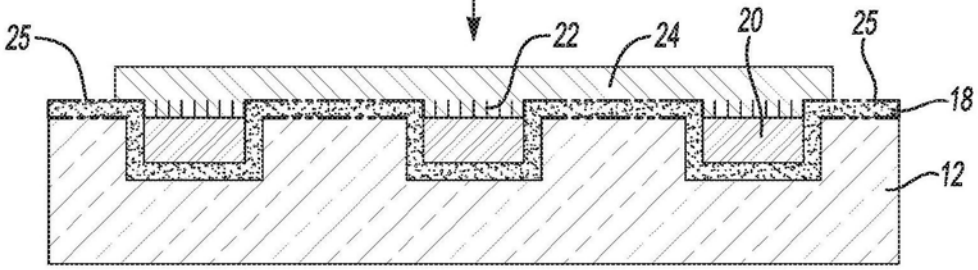


图5F

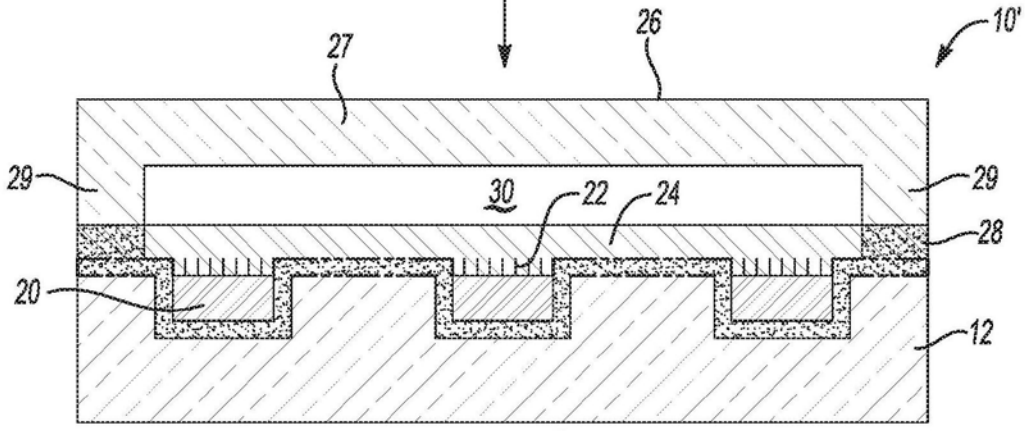


图5G

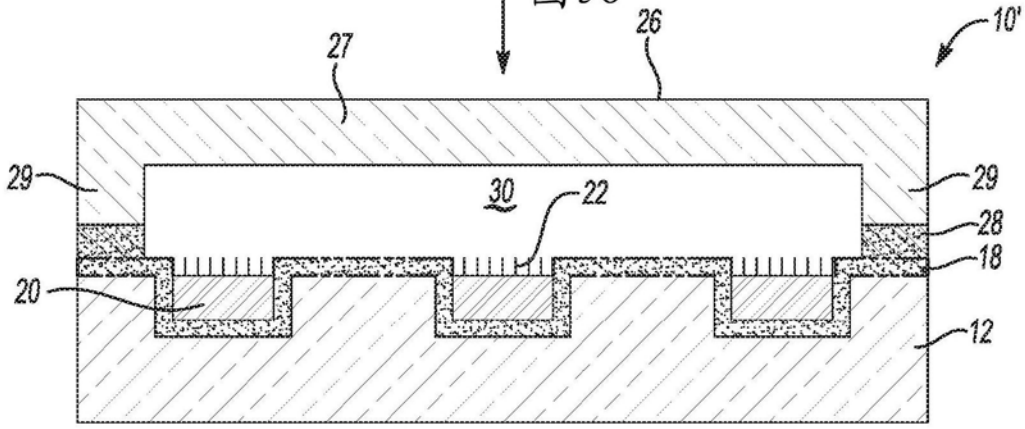


图5H

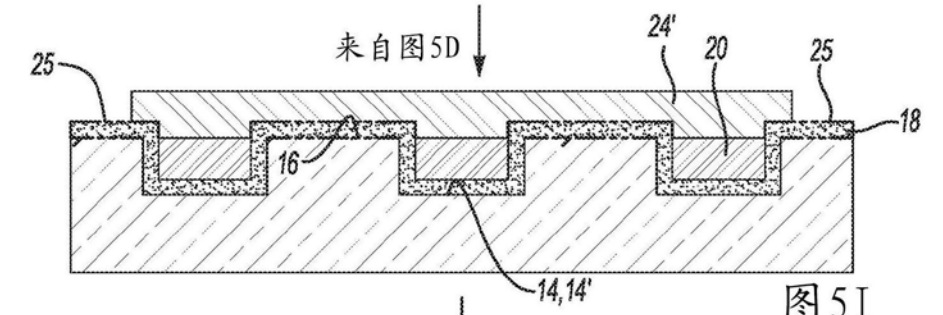


图5I

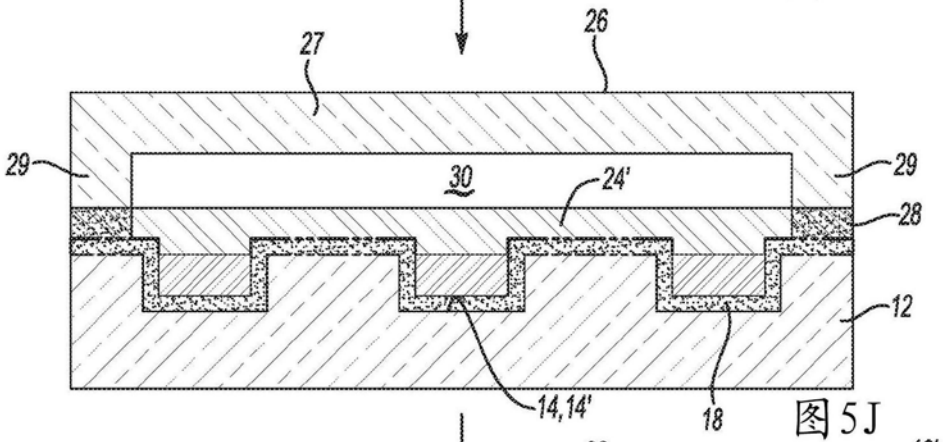


图5J

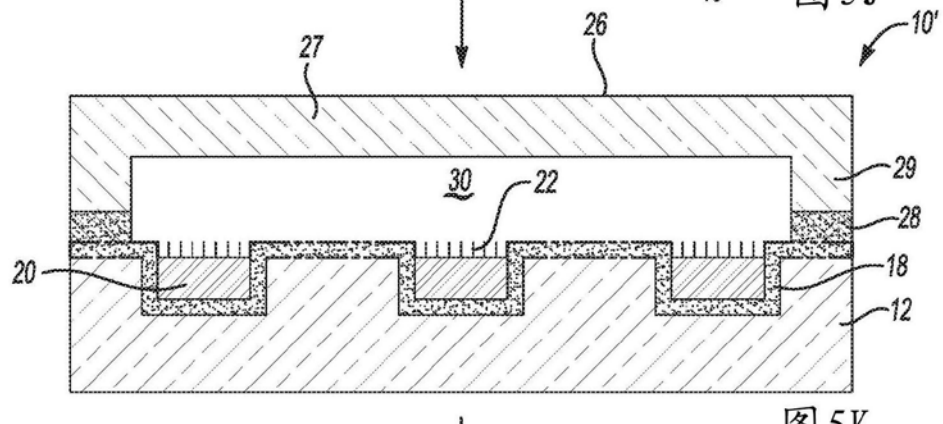


图5K

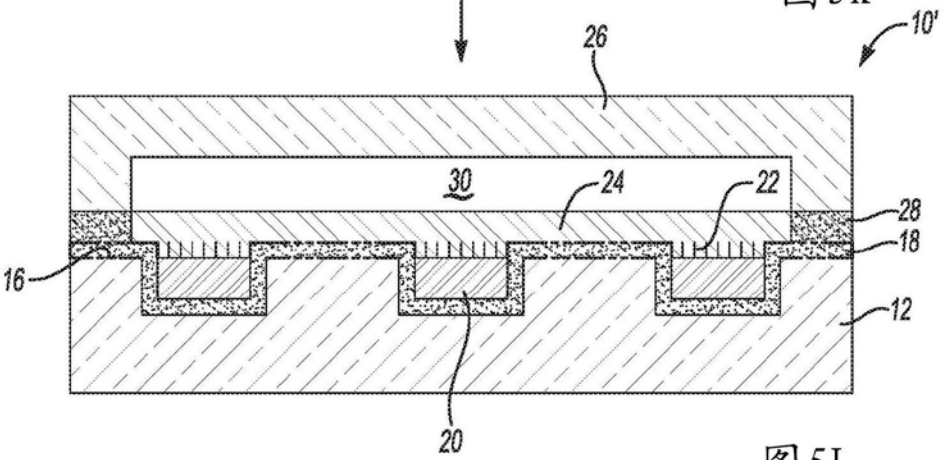


图5L

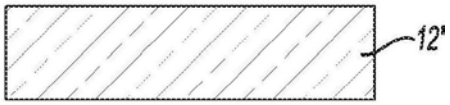


图6A

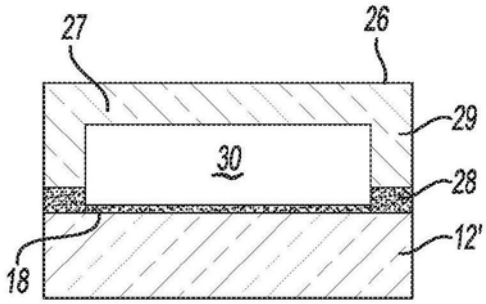


图6B

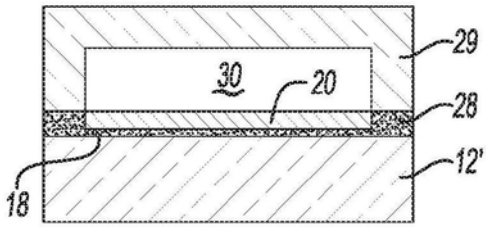


图6C

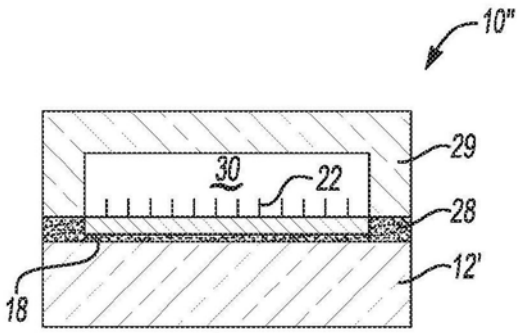


图6D

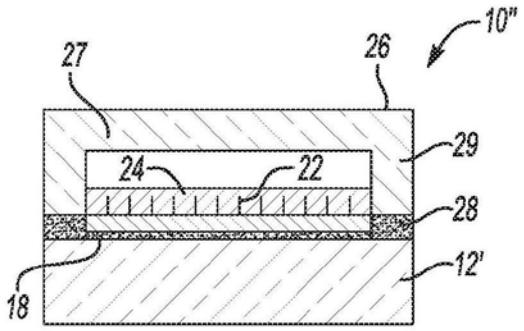

10"
27
26
29
24
22
28
12'
18

图6E

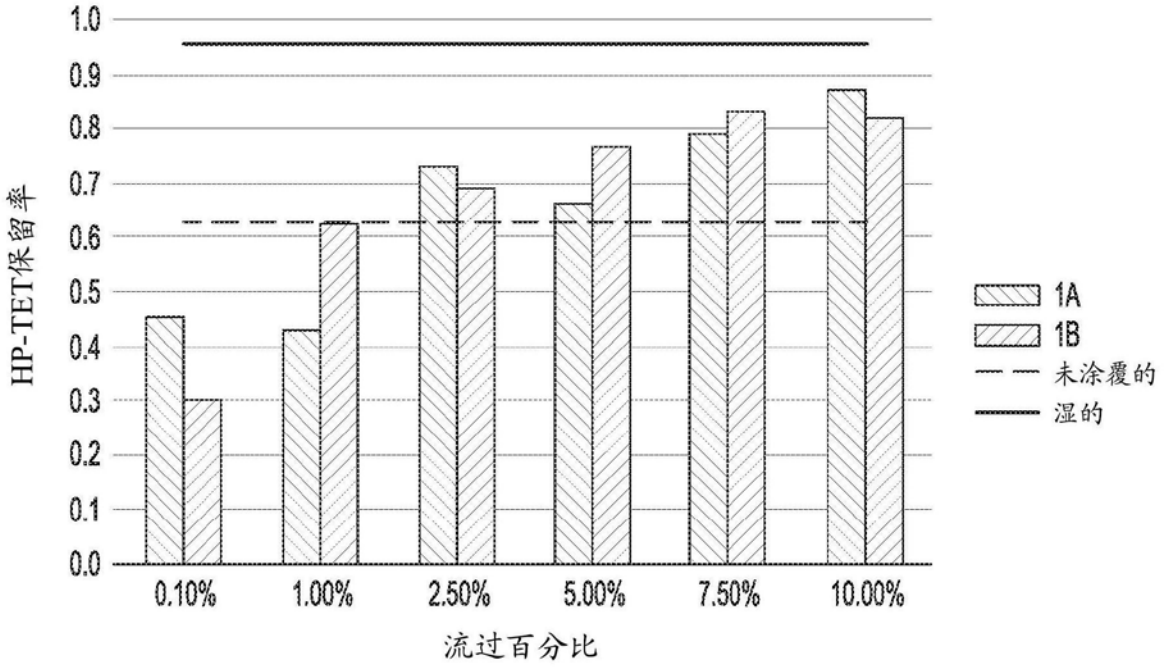

1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
HP-TET保留率
0.10%
1.00%
2.50%
5.00%
7.50%
10.00%
流过百分比
1A
1B
未涂覆的
湿的

图7

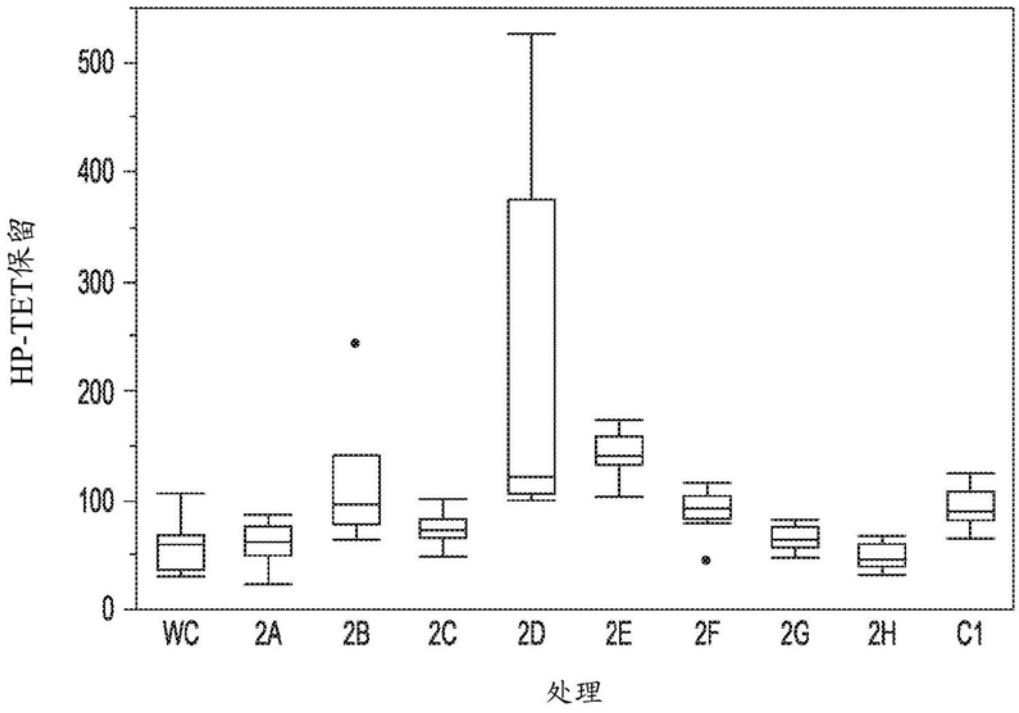

HP-TET保留
500
400
300
200
100
0
WC
2A
2B
2C
2D
2E
2F
2G
2H
C1
处理

图8

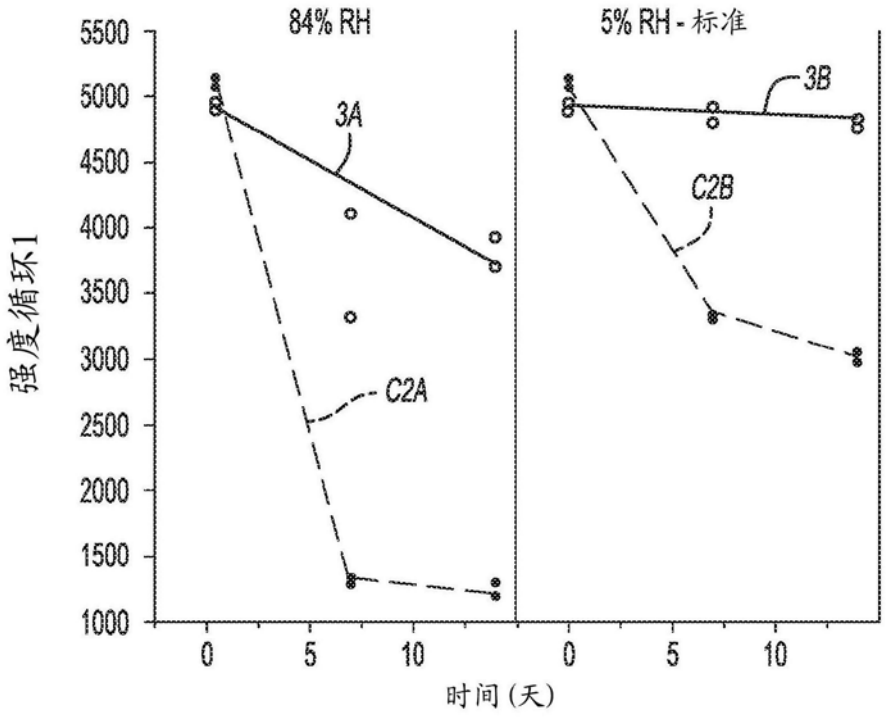

84% RH
5% RH - 标准
强度循环1
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
3A
C2A
3B
C2B
0
5
10
时间(天)

图9

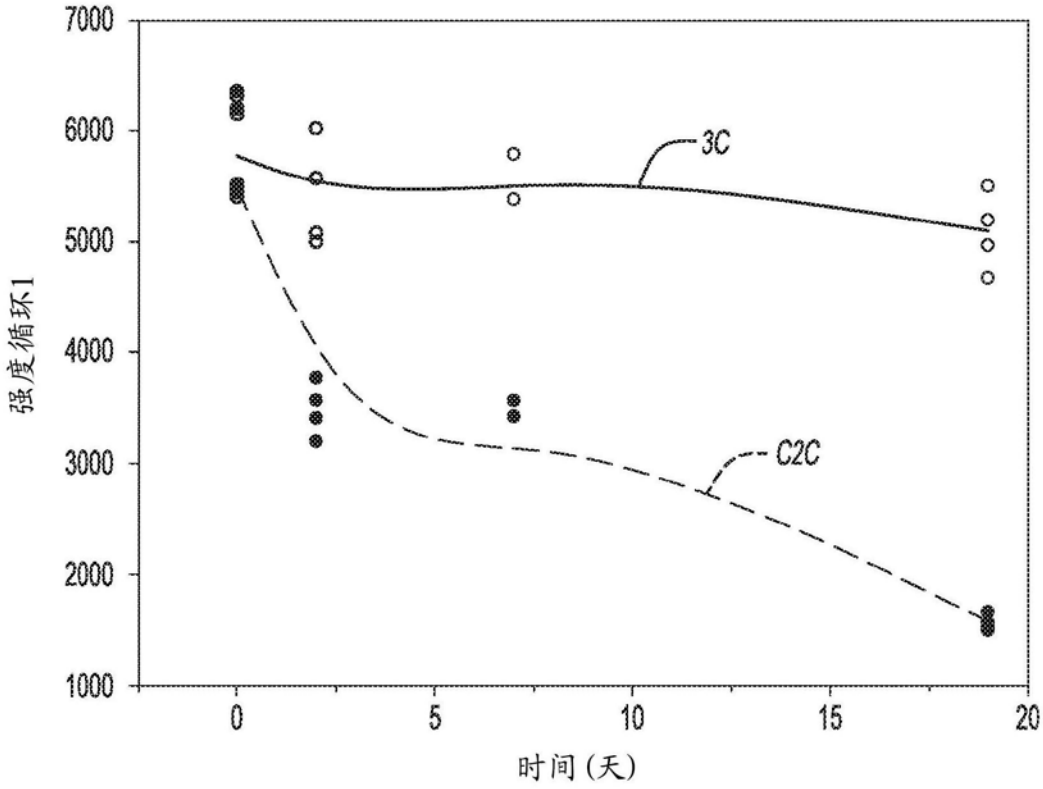

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
强度循环1
0
5
10
15
20
时间(天)
3C
C2C

图10

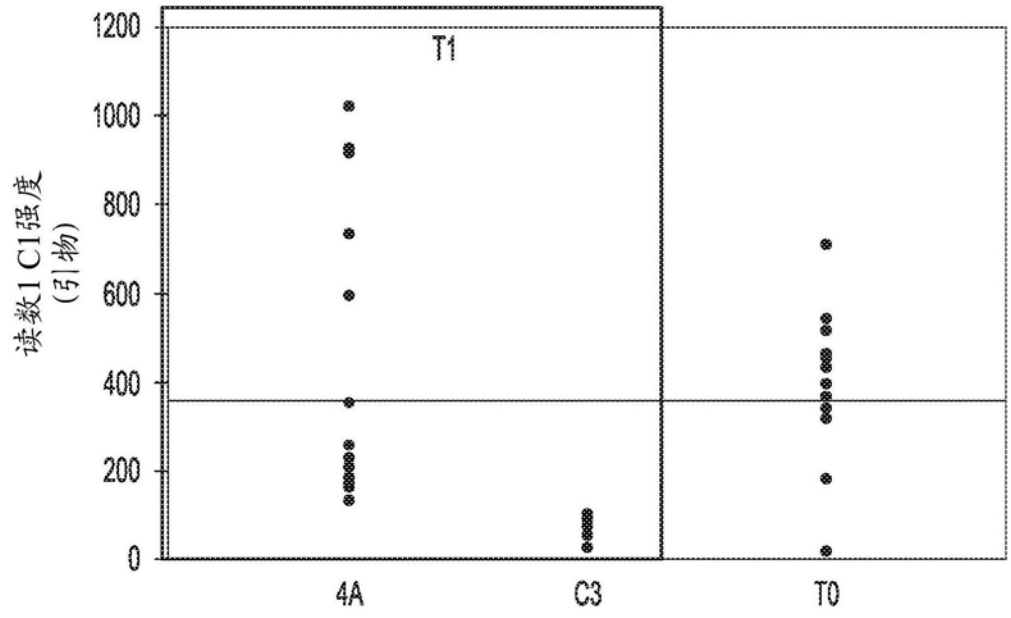

1200
1000
800
600
400
200
0
读数1 C1强度
(引物)
T1
4A
C3
T0

图11A

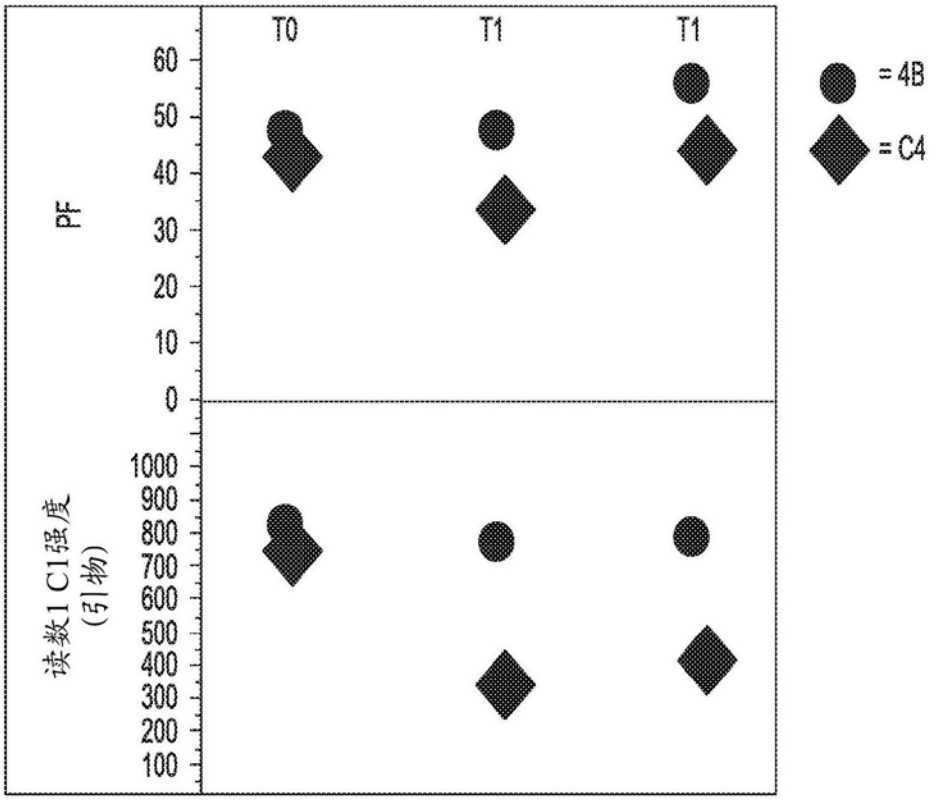

T0
T1
T1
= 4B
= C4
PF
60
50
40
30
20
10
0
读数1 C1强度
(引物)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100

图11B

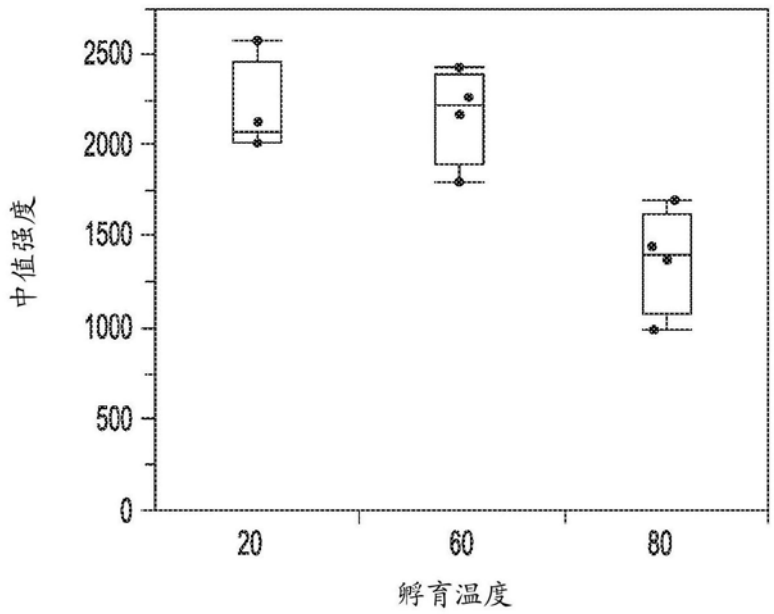

2500
2000
1500
1000
500
0
中值强度
20
60
80
孵育温度

图12A

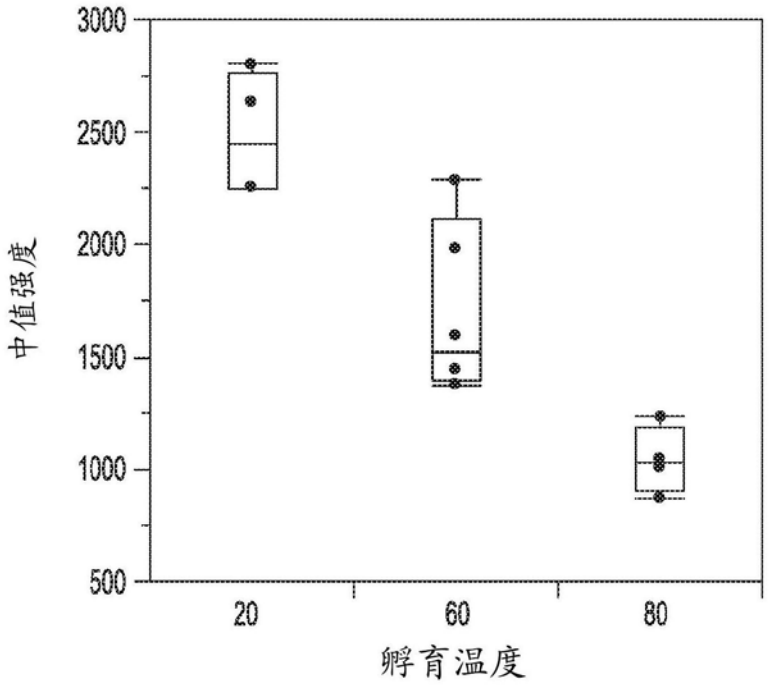

3000
2500
2000
1500
1000
500
中值强度
20
60
80
孵育温度

图12B

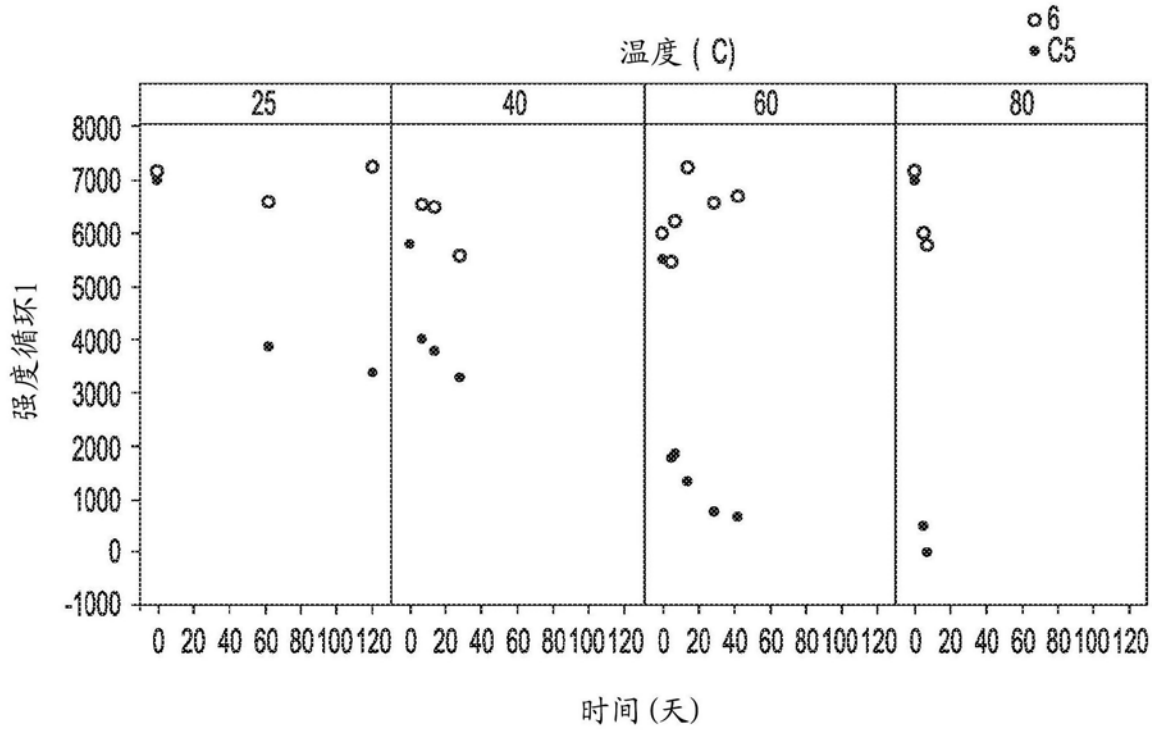

温度 (C)
6
C5
25
40
60
80
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
强度循环1
0 20 40 60 80 100 120
时间 (天)

图13

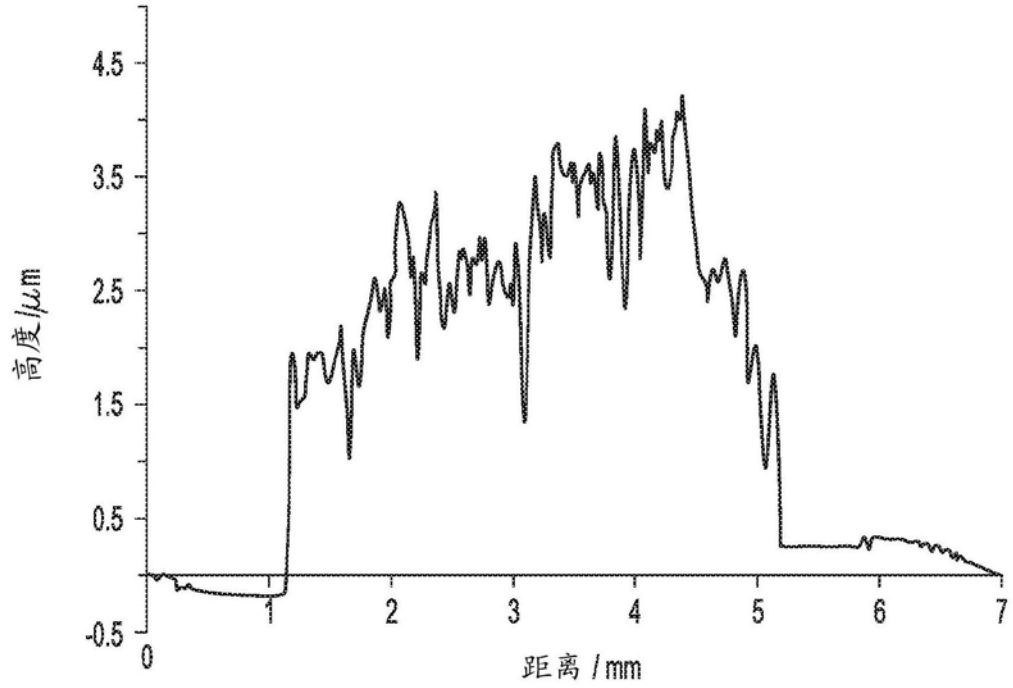

4.5
3.5
2.5
1.5
0.5
-0.5
高度/μm
0
1
2
3
4
5
6
7
距离 / mm

图14

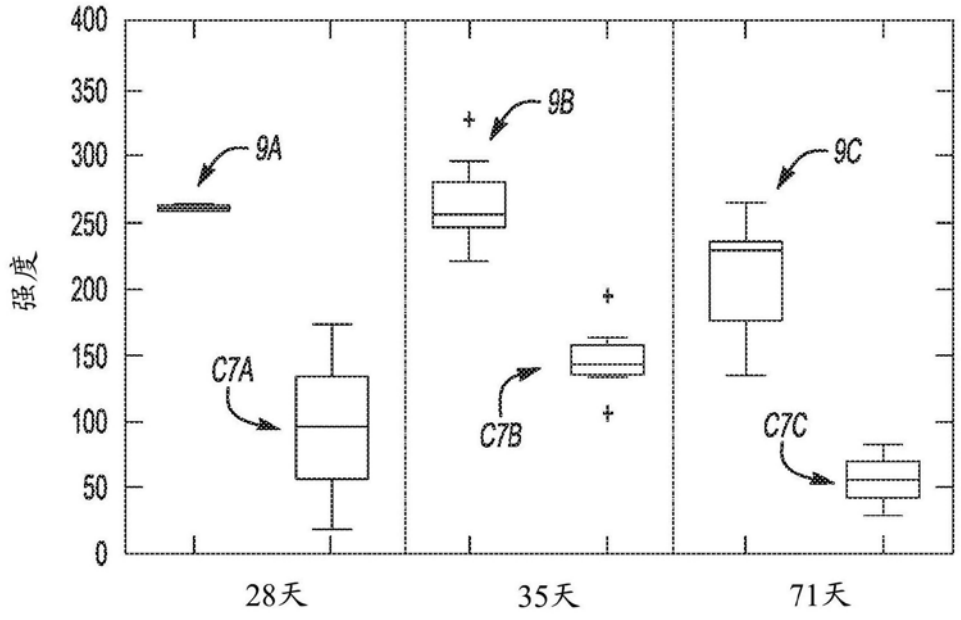

400
350
300
250
200
150
100
50
0
强度
9A
9B
9C
C7A
C7B
C7C
28天
35天
71天

图15

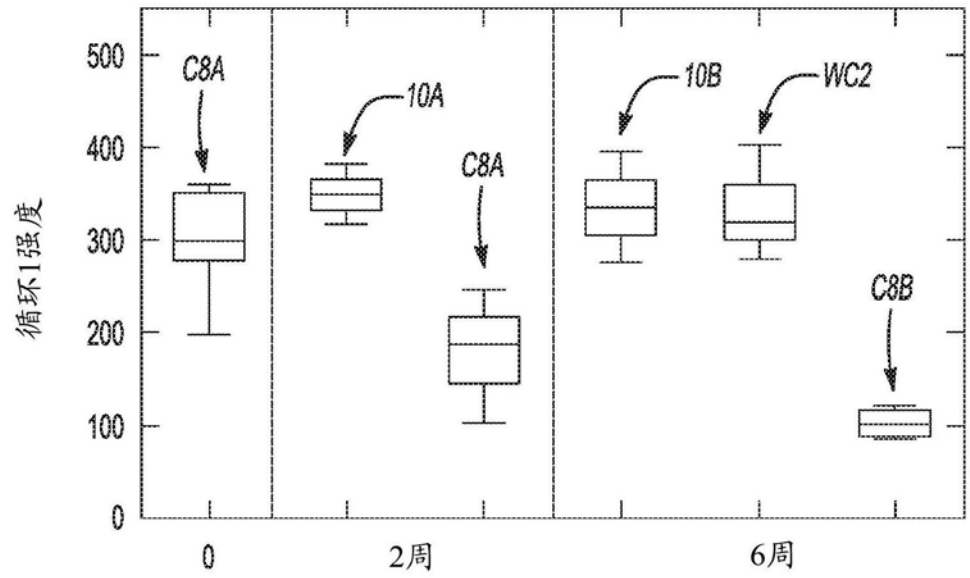

循环1强度
500
400
300
200
100
0
C8A
10A
C8A
10B
WC2
C8B
0
2周
6周

图16

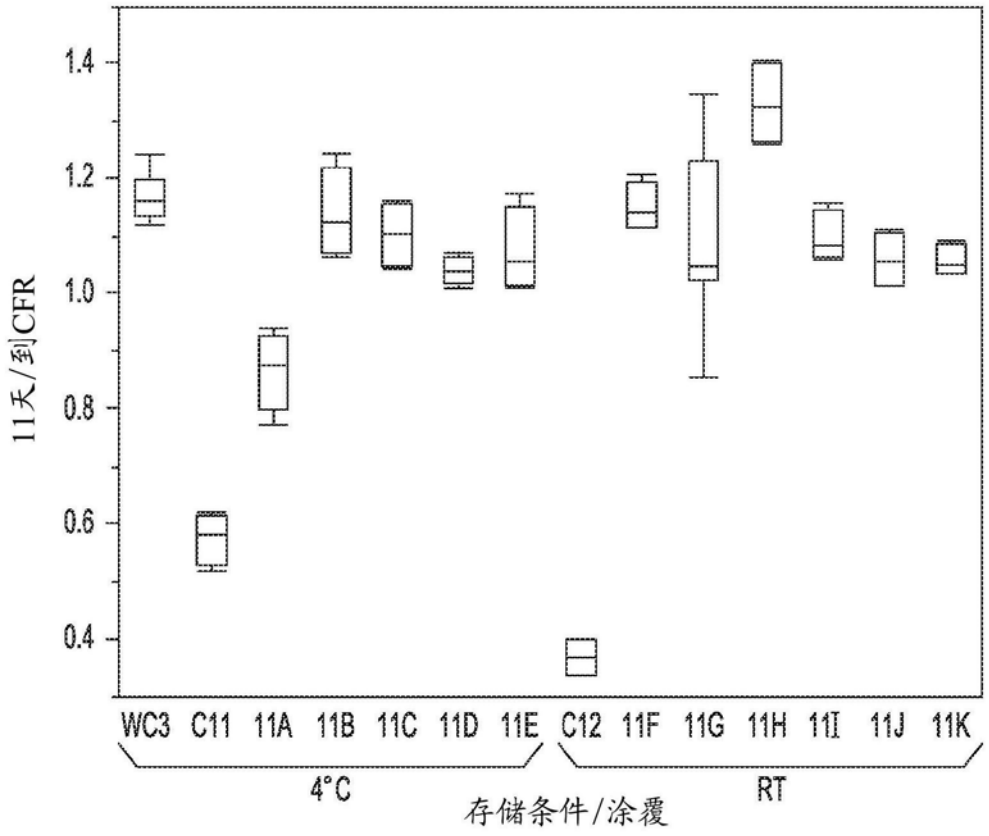

11天/到CFR
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
WC3 C11 11A 11B 11C 11D 11E C12 11F 11G 11H 11I 11J 11K
4°C
RT
存储条件/涂覆

图17

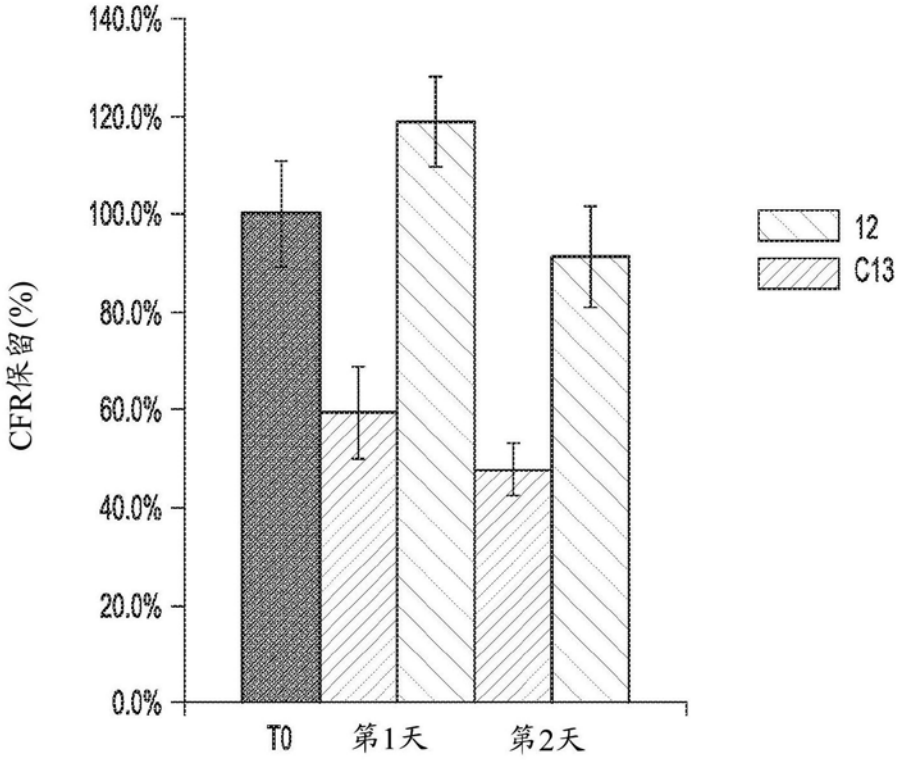

140.0%
120.0%
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
CFR保留(%)
T0
第1天
第2天
12
C13

图18

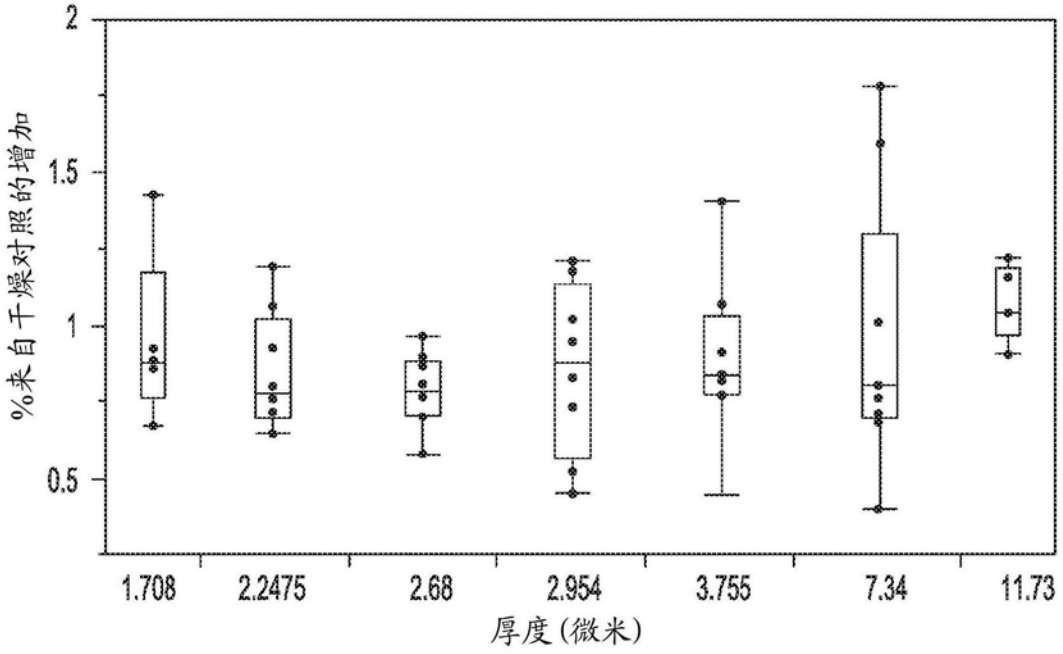

2
1.5
1
0.5
%来自干燥对照的增加
1.708
2.2475
2.68
2.954
3.755
7.34
11.73
厚度(微米)

图19

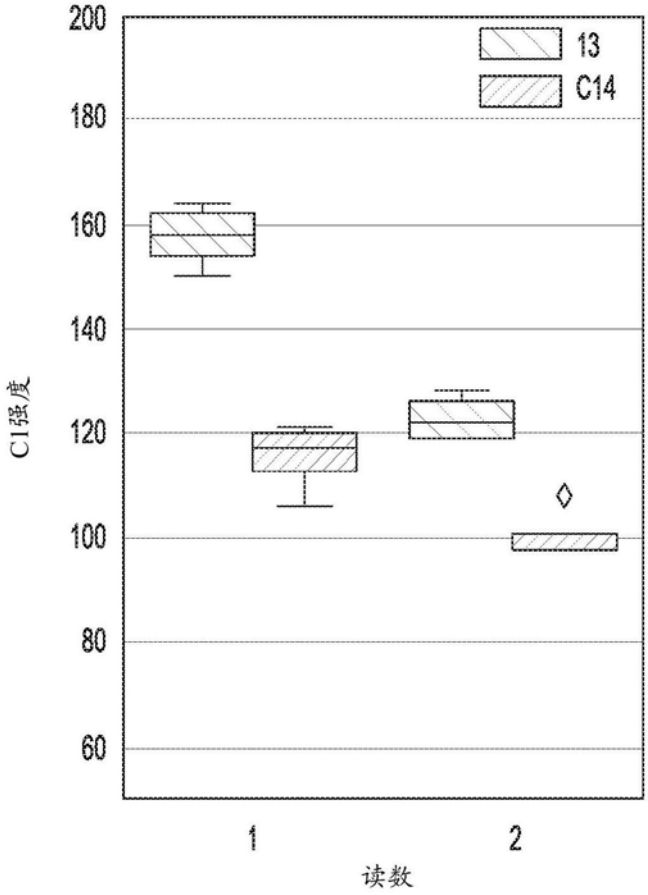

200
180
160
140
120
100
80
60
C1强度
13
C14
1
2
读数

图20

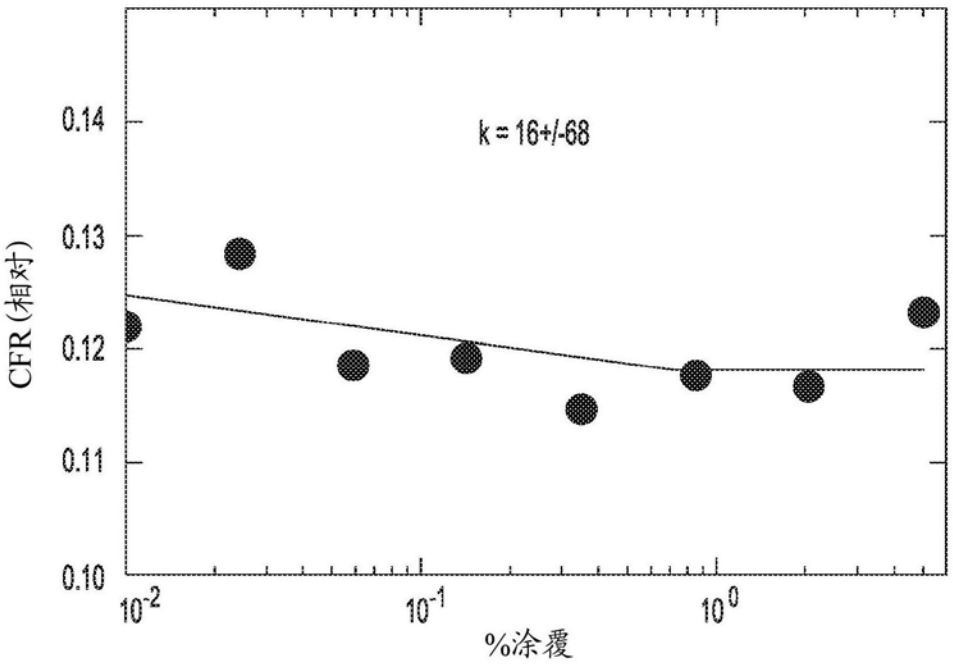

0.14
0.13
0.12
0.11
0.10
CFR (相对)
k = 16+/-68
10-2
10-1
100
%涂覆

图21

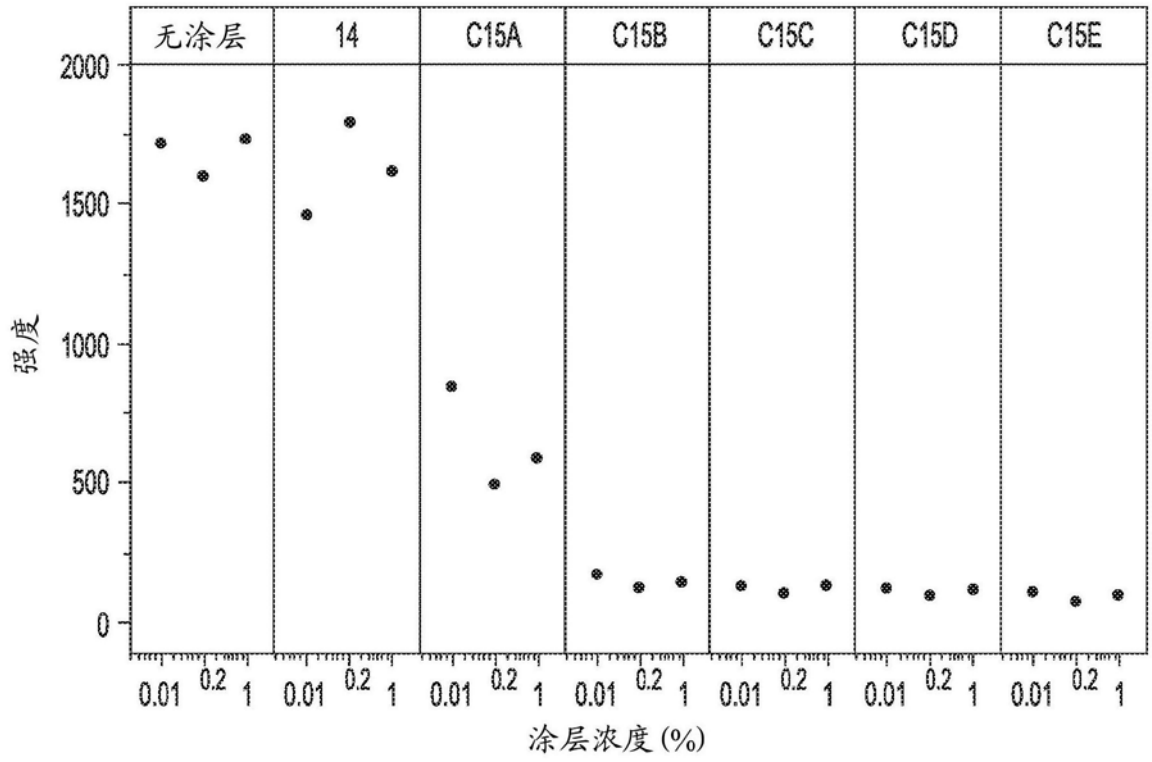

无涂层
14
C15A
C15B
C15C
C15D
C15E
2000
1500
1000
500
0
强度
0.01
0.2
1
涂层浓度(%)

图22