(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월16일
(11) 등록번호 10-2122632
(24) 등록일자 2020년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) *B01J 19/00* (2018.01)
C12N 15/66 (2006.01) *C40B 50/14* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1093 (2013.01)
B01J 19/0046 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7005273
(22) 출원일자(국제) 2014년08월05일
심사청구일자 2019년07월25일
(85) 번역문제출일자 2016년02월26일
(65) 공개번호 10-2016-0041046
(43) 공개일자 2016년04월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/049834
(87) 국제공개번호 WO 2015/021080
국제공개일자 2015년02월12일
(30) 우선권주장
61/862,445 2013년08월05일 미국(US)
61/862,457 2013년08월05일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2012154201 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
트위스트 바이오사이언스 코포레이션
미국, 캘리포니아 94158, 샌프란시스코, 스위트 545, 사우쓰, 미션 베이 불러바드 455
(72) 발명자
반야이 윌리엄
미국 94134 캘리포니아주 샌 프란시스코 웨이랜드 스트리트 738
펙 빌 제임스
미국 95051 캘리포니아주 산타 클라라 카를턴 플레이스 3086
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 김정태

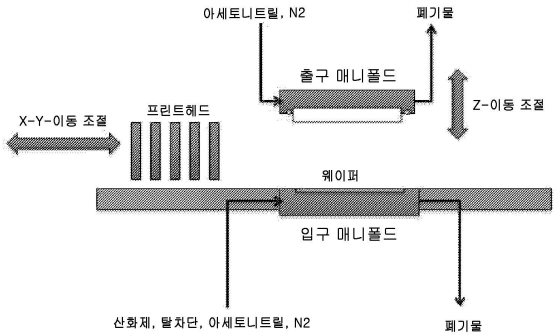
(54) 발명의 명칭 **드 노보 합성된 유전자 라이브러리**

(57) 요 약

핵산의 드 노보(De novo) 합성된 큰 라이브러리가 낮은 오류율로 본원에서 제공된다. 추가로, 고품질 빌딩 블록, 예컨대, 올리고뉴클레오티드의 제조를 위한 디바이스가 본원에 기재되어 있다. 마이크로플루이딕 조립체(microfluidic assemblies)를 이용하여 보다 더 긴 핵산들을 동시에 합성할 수 있다. 추가로, 본원의 방법은 긴 고품질 유전자들의 큰 라이브러리의 신속한 구축을 가능하게 한다. 긴 고품질 핵산들의 큰 라이브러리의 제조를 위한 디바이스도 본원에 기재되어 있다.

대 표 도

올리고 프린터



(52) CPC특허분류
C12N 15/66 (2013.01)
C40B 50/14 (2013.01)
B01J 2219/00317 (2013.01)
B01J 2219/00378 (2013.01)
B01J 2219/00587 (2013.01)
B01J 2219/0059 (2013.01)
B01J 2219/00619 (2013.01)
B01J 2219/00637 (2013.01)
B01J 2219/00722 (2013.01)
(72) 발명자
페르난데즈 안드레스
미국 94105 캘리포니아주 샌 프란시스코 빌 스트리트 400 샵 1406
첸 시유안
미국 94403 캘리포니아주 샌마테오 토욘 코트 1645
인더뮬 피에르
미국 94703 캘리포니아주 버클리 오레곤 스트리트 1817-에이

명 세 서

청구범위

청구항 1

30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드 라이브러리로서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 750개 이상의 유전자에 대한 서열을 코딩하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 합성되며 길이 100개 이상의 염기를 포함하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 80% 이상이 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드에 대한 예정된 서열과 비교하여 오류 없이 서열을 코딩하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 또 다른 상이한 폴리뉴클레오티드의 제2 중첩부에 상보적인 제1 중첩부를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 2

제1항에 있어서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 89% 이상이 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드에 대한 예정된 서열과 비교하여 오류 없이 서열을 코딩하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 3

제1항에 있어서, 라이브러리는 200,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 4

제3항에 있어서, 200,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 5000개 이상의 유전자를 코딩하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 5

30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드 라이브러리로서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 750개 이상의 유전자에 대한 서열을 코딩하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 합성되며 길이 100개 이상의 염기를 포함하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드에 대한 예정된 서열과 비교하여 1000개의 염기 중 1개 미만의 총 오류율로 서열을 코딩하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 또 다른 상이한 폴리뉴클레오티드의 제2 중첩부에 상보적인 제1 중첩부를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 6

제5항에 있어서, 라이브러리는 200,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 7

제6항에 있어서, 200,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 5000개 이상의 유전자를 코딩하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 8

30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드 라이브러리로서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 750개 이상의 유전자에 대한 서열을 코딩하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 합성되며 길이 100개 이상의 염기를 포함하고, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드의 복수의 서브세트를 포함하고, 폴리뉴클레오티드의 서브세트 각각은 750개의 유전자 중 하나를 집합적으로 코딩하고 길이의 범위 내에서 변화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 또 다른 상이한 폴리뉴클레오티드의 제2 중

첨부에 상보적인 제1 중첩부를 포함하고, 길이의 범위 내에서 변화하는 폴리뉴클레오티드의 각각은 상이한 길이인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 9

제8항에 있어서, 길이의 범위 내에서 변화하는 폴리뉴클레오티드가 10 이상의 상이한 길이인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 10

제1항에 있어서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 길이 100 내지 500개의 염기인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 11

삭제

청구항 12

제5항에 있어서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 길이 100 내지 500개의 염기인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 13

제5항에 있어서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 길이 100개의 염기인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 14

제5항에 있어서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드는 1500개의 염기 중 1개 미만의 총 오류율로 서열을 코딩하는 것인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 15

제8항에 있어서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 길이 100 내지 500개의 염기인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 16

제8항에 있어서, 30,000개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드의 각각은 길이 100개의 염기인 폴리뉴클레오티드 라이브러리.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **교차-참조**

[0002] 본원은 2013년 8월 5일자로 출원된 미국 가출원 제61/862445호 및 2013년 8월 5일자로 출원된 미국 가출원 제61/862457호(이 출원들은 본원에 참고로 도입됨)의 이익을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 신뢰도가 높고 비용이 낮은 고효율 화학적 유전자 합성은 생명공학 및 의약, 및 기초 생체의학 연구에서 중추적인 역할을 가진다.

[0004] 드 노보 유전자 합성은 기초 생물학적 연구 및 생명공학 적용을 위한 강력한 수단이다. 상대적으로 짧은 단편들을 소규모로 합성하는 다양한 방법들이 공지되어 있지만, 이 기법들은 확장가능성, 자동화, 속도, 정확성 및 비용의 문제점을 가지고 있다. 원하는 유전자의 성공적인 합성을 보장하고 자동화될 수 있는, 단순하고 재현가능하고 확장가능하고 오류가 덜 발생되고 비용 효과적인 방법을 위한 디바이스가 필요하다.

발명의 내용

[0005] 상기 인지된 바와 같이, 큰 유전자 라이브러리 또는 상대적으로 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드 단편을 보다 더 적은 오류로 효율적으로 신속히 합성할 수 있는 방법, 디바이스 및 시스템에 대한 절박한 필요성이 존재한다. 유사하게, 다수의 개별적으로 주소지정가능한(addressable) 반응들을 위해 마이크로플루이딕(microfluidic) 규모로 액체 시약들을 동시에 분할할 수 있고 혼합할 수 있는 방법에 대한 필요성도 존재한다. 본 발명은 이 필요성들을 다루고 관련된 이점도 제공한다.

[0006] 한 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 유전자 라이브러리를 제공한다. 상기 유전자 라이브러리는 유전자의 집합체를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 집합체는 상기 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 오류율로 0.5 kb 이상의 길이를 가질 수 있는 100개 이상의 상이한 미리 선택된 합성 유전자들을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 유전자들의 집합체를 포함하는 유전자 라이브러리도 제공한다. 상기 집합체는 각각 0.5 kb 이상의 길이를 가질 수 있는 100개 이상의 상이한 미리 선택된 합성 유전자들을 포함할 수 있다. 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 이 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 오

류율을 포함할 수 있다. 원하는 예정된 서열은 전형적으로 사용자, 예를 들면, 전산화된 시스템을 이용하여 데이터를 입력하는 사용자에 의해 임의의 방법에 의해 제공될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 일부 경우 예를 들면, 차세대 서열결정 방법을 이용하여 합성된 핵산의 적어도 일부를 서열결정함으로써 합성된 핵산을 이 예정된 서열과 비교한다. 본원에 기재된 유전자 라이브러리들 중 임의의 유전자 라이브러리와 관련된 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 이 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/5000 bp 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 0.05% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 0.5% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 이 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않거나 실질적으로 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 이 유전자를 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 결실률을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 이 유전자를 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 삽입률을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 이 유전자를 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 치환율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 10개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 100개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 1000개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 1000000개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자들의 집합체는 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 집합체는 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 집합체는 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 1 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 2 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 3 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 예정된 서열은 미리 선택된 합성 유전자에 비해 20 bp 미만을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 예정된 서열은 미리 선택된 합성 유전자에 비해 15 bp 미만을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 합성 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 합성 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 각각의 합성 유전자는 임의의 다른 합성 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 합성 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 합성 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 각각의 합성 유전자는 임의의 다른 합성 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 합성 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 합성 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 각각의 합성 유전자는 임의의 다른 합성 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 유전자의 미리 선택된 서열에 비해 1/20000 bp 미만의 오류율로 2 kb 미만인 합성 유전자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한(deliverable) 유전자들의 서브세트는 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 유전자들의 집합체의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 유전자들의 집합체를 구축하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료(biofuel)를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자들의 집합체의 제2 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리는 100 ㎥ 미만의 공간 내에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리는 1 ㎥ 미만의 공간 내에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리는 1 ㎥ 미만의 공간 내에 존재한다.

[0007] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유전자 라이브러리를 구축하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 제1 시점 전에 적어도 제1 유전자 목록 및 제2 유전자 목록을 컴퓨터 판독가능한 비-일시적 매체에 입력하는 단계로서, 이때 상기 유전자가 500 bp 이상이고 통합(joint) 목록으로 편집될 때 상기 통합 목록이 100개 이상의 유전자들을 포함하는 것인 단계; 및 제2 시점 전에 상기 통합 목록 내의 90% 초과의 유전자들을 합성함으로써 전달가능한 유전자를 가진 유전자 라이브러리를 구축하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 1개월 미만 만큼 떨어져 있다.

[0008] 본원에서 제공된 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 본원에 기재된 방법은 제2 시점에서 하나 이상의 유전자를 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에

서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자는 통합 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 통합 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 bp 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 서브세트 내의 유전자들은 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 제1, 제2 또는 통합 유전자 목록을 구축하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록의 제2 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록은 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록은 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록은 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 1 kb 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 2 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 3 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 25일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 5일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 2일 미만 만큼 떨어져 있다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0009] 또 다른 양태에서, 유전자 라이브러리를 구축하는 방법이 본원에서 제공된다. 상기 방법은 제1 시점에서 유전자 목록을 컴퓨터 판독가능한 비-일시적 매체에 입력하는 단계; 상기 유전자 목록의 90% 초과의 유전자들을 합성함으로써 전달가능한 유전자를 가진 유전자 라이브러리를 구축하는 단계; 및 제2 시점에서 전달가능한 유전자를 전달하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 100개 이상의 유전자들을 포함하고, 상기 유전자들은 500 bp 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 1개월 미만 만큼 떨어져 있다.

[0010] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 본원에 기재된 방법은 제2 시점에서 하나 이상의 유전자를 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자는 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 서브세트 내의 유전자들은 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리를 구축하는 방법은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 유전자 목록을 구축하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제2 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0011] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 유전자 목록은 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 1 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 2 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 3

kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리를 구축하는 방법에서 기재된 제2 시점은 제1 시점으로부터 25일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 5일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 2일 미만 만큼 떨어져 있다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기판(기재)(substrate) 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 a) 뉴클레오티드 커플링에 적합한 화학적 모이어티(moiety)로 작용화된(functionalized) 분해된 좌위들(resolved loci)을 가진 기판을 제공하는 단계; 및 b) 좌위 특이적 예정된 서열에 따라 시간당 12개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시킴으로써 n개 염기쌍 길이를 가진 복수의 올리고뉴클레오티드들을 합성하는 단계를 포함한다. 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법과 관련된 다양한 실시양태들이 본원에 기재되어 있다.

[0013] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중 임의의 방법에서, 상기 방법은 시간당 15개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 20개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 25개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/500 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/1000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/2000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/500 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/1000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/2000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다.

[0014] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 빌딩 블록은 아데닌(adenine), 구아닌(guanine), 타이민(thymine), 사이토신(cytosine) 또는 우리딘(uridine) 기, 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 디뉴클레오티드 또는 트리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 포스포라미다이트(phosphoramidite)를 포함한다. 일부 실시양태들에서, n-머 올리고뉴클레오티드의 n은 100 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 200 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 300 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 400 이상이다. 일부 실시양태들에서, 표면은 100,000개 이상의 분해된 좌위들을 포함하고, 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드들 중 2개 이상은 서로 상이할 수 있다.

[0015] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 커플링 전에 기판을 진공 건조하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 차단기(blocking group)를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 차단기는 산-불안정성 DMT를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 산-불안정성 DMT는 4,4'-디메톡시트리틸을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 산화 또는 황화를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 커플링되지 않은 올리고뉴클레오티드 쇄를 화학적으로 캡핑하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 차단기를 제거함으로써 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄를 탈차단하는(deblocking) 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 진공 건조 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 산화 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 캡핑 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 탈차단 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체

소통을 제공하는 10,000개 이상의 비아들(vias)을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 100,000개 이상의 비아들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 1,000,000개 이상의 비아들을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에서, 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하기 위한 시스템이 본원에서 제공된다. 상기 시스템은 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 표면; 및 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시스템은 복수의 분해된 반응기 캡들을 제1 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하여 제1 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적인 밀봉(seal)을 형성함으로써 제1 표면 상의 좌위들을 각각의 반응기 캡과 회합된 반응기 내로 2개 이상의 좌위들의 군들로 물리적으로 나눈다. 일부 실시양태들에서, 각각의 반응기는 제1 시약 세트를 보유한다.

[0017] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하기 위한 시스템들 중 임의의 시스템과 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 표면으로부터의 이형(분리) 시, 반응기 캡은 제1 시약 세트의 적어도 일부를 보유한다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 30%이다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 90%이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 ㎟당 1 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 ㎟당 10 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 ㎟당 100 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 상기 시스템은 ㎟당 0.1 이상의 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 시스템은 ㎟당 1 이상의 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 시스템은 ㎟당 10 이상의 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 추가로 포함한다.

[0018] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하기 위한 시스템들 중 임의의 시스템과 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 표면의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 또는 제2 표면에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한(planar) 표면적당 1.45 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1.25 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 0.001 $\mu m/\mu m^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이(nominal arclength)의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 0.01 $\mu m/\mu m^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 높은 에너지 표면을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면 및 제2 표면은 주어진 액체와의 상이한 표면 장력을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 높은 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 기판 상에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 캡핑 요소는 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인클로저들(enclosures)의 어레이도 제공한다. 상기 인클로저들의 어레이는 반응기 캡을 포함하는 제1 기판 및 제2 기판을 포함하는 복수의 분해된 반응기들; 및 각각의 반응기 내의 2개 이상의 분해된 좌위들을 포함한다. 일부 경우, 분해된 반응기들은 분리가능한(releasable) 밀봉으로 분리되어 있다. 일부 경우, 반응기 캡은 제2 기판이 제1 기판으로부터 이형될 때 반응기의 내용물의 적어도 일부를 보유한다.

일부 실시양태들에서, 제2 기판 상의 반응기 캡은 ㎟당 0.1 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제2 기판 상의 반응기 캡은 ㎟당 1 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제2 기판 상의 반응기 캡은 ㎟당 10 이상의 밀도를 가진다.

[0020] 본원에서 제공된 인클로저들의 어레이와 관련된 일부 실시양태들에서, 반응기 캡은 반응기의 내용물의 30% 이상을 보유한다. 일부 실시양태들에서, 반응기 캡은 반응기의 내용물의 90% 이상을 보유한다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 2/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 5개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 20개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 50개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 100개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다.

[0021] 본원에 기재된 인클로저들의 어레이와 관련된 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 상기 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도를 가진, 2개 이상의 채널들의 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 0.001 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도를 가진, 2개 이상의 채널들의 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 분해된 반응기들은 분리가능한 밀봉으로 분리되어 있다. 일부 실시양태들에서, 밀봉은 모세관 파열 밸브(capillary burst valve)를 포함한다.

[0022] 본원에 기재된 인클로저들의 어레이와 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 기판의 복수의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 기판의 복수의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 또는 제2 표면에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1 $㎛^2$ 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.25 $㎛^2$ 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.45 $㎛^2$ 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 제1 기판의 복수의 분해된 좌위들은 높은 에너지 표면을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 기판과 제2 기판은 주어진 액체와의 상이한 표면 장력을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들 또는 반응기 캡들은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 기판 상에 위치한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본 발명은 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 (a) 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 표면을 제공하는 단계; (b) 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소를 제공하는 단계; (c) 복수의 분해된 반응기 캡들을 제1 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하고 제1 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적인 밀봉을 형성함으로써 제1 표면 상의 좌위들을 2개 이상의 좌위들의 군으로 물리적으로 나누는 단계; (d) 제1 반응을 수행함으로써 제1 시약 세트를 형성하는 단계; 및 (e) 제1 표면으로부터 캡핑 요소를 이형시키는 단계를 포함하는데, 이때 각각의 반응기 캡은 제1 반응 부피로 제1 시약 세트의 적어도 일부를 보유한다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 30%이다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 90%이다.

[0024] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 (f) 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 제공하는 단계; (g) 복수의 분해된 반응기 캡들을 제2 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하고 제2 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적인 밀봉을 형성함으로써 제2 표면 상의 좌위들을 물리적으로 나누는 단계; (h) 제1 시약 세트의 일부를 사용하여 제2 반응을 수행함으로써 제2 시약 세트를 형성하는 단계; 및 (i) 제2 표면으로부터 캡핑 요소를 이형시키는 단계를 추가로 포함하는데, 이때 각각의 반응기 캡은 제2 반응 부피로 제2 시약 세트의 적어도 일부를 보유할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 30%이다. 일

부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 90%이다.

[0025] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 복수의 분해된 좌위들은 제1 표면 상에서 ㎟당 1 이상의 밀도를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제1 표면 상에서 ㎟당 10 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제1 표면 상에서 ㎟당 100 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 캡핑 요소 상에서 ㎟당 0.1 이상의 밀도를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 캡핑 요소 상에서 ㎟당 1 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 캡핑 요소 상에서 ㎟당 10 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제2 표면 상에서 ㎟당 0.1 초과의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제2 표면 상에서 ㎟당 1 초과의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제2 표면 상에서 ㎟당 10 초과의 밀도를 가진다.

[0026] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 캡핑 요소를 표면으로부터 이형시키는 단계들, 예컨대, 본원에 기재된 (e) 및 (i)에서의 이형 단계들은 상이한 속도로 수행될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 분해된 좌위들은 제1 반응을 위한 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 표면의 분해된 좌위들은 제2 반응을 위한 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 또는 제2 표면과 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1.25 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1.45 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 25 bp 이상이다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 200 bp 이상이다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 300 bp 이상이다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 분해된 좌위들은 높은 에너지 표면을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면과 제2 표면은 주어진 액체와의 상이한 표면 장력을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다.

[0027] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들 또는 분해된 반응기 캡들은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 기판 상에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 제1 반응 부피와 제2 반응 부피는 상이하다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 반응은 중합효소 순환 조립을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 반응은 효소적 유전자 합성, 어닐링(annealing) 및 라이게이션(ligation) 반응, 하이브리드 유전자를 통한 2개의 유전자들의 동시적인 합성, 숏건(shotgun) 라이게이션 및 공-라이게이션(co-ligation), 삽입 유전자 합성, DNA의 한 가닥을 통한 유전자 합성, 주형-유도된 라이게이션, 리가제(ligase) 연쇄 반응, 마이크로어레이-매개된 유전자 합성, 고체-상(phase) 조립, 슬로닝(Sloning) 빌딩 블록 기술 또는 RNA 라이게이션-매개된 유전자 합성을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 캡핑 요소를 냉각시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 제1 표면을 냉각시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 제2 표면을 냉각시키는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0028] 또 다른 양태에서, 본 발명은 작용화된 표면을 가진 기판을 제공한다. 작용화된 표면을 가진 기판은 복수의 분해된 좌위들을 가진 고체 지지체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 고체 지지체의 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 마이크로채널 상에 위치한다.

[0029] 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판과 관련된 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 1 nl 미만의 부피를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.036 ㎛/제곱 ㎛의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1 μm^2 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1.25 μm^2 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1.45 μm^2 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서,

복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 기판에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 고체 지지체는 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0030] 또 다른 양태에서, 본 발명은 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 (a) 하나 이상의 잉크젯 펌프를 통해 제1 시약의 하나 이상의 점적을 복수의 좌위들 중 제1 좌위에 적용하는 단계; (b) 음압을 기판에 적용하는 단계; 및 (c) 하나 이상의 잉크젯 펌프를 통해 제2 시약의 하나 이상의 점적을 제1 좌위에 적용하는 단계를 포함한다.

[0031] 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 제1 시약과 제2 시약은 상이할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 그의 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 상기 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 좌위들은 기판 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 상기 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 기판 표면은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다.

[0032] 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 시약 및/또는 제2 시약의 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 상기 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 상기 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.25 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판 주위의 압력은 1 mTorr 미만까지 감소된다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0033] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 제1 점적으로부터 유래하는 하나 이상의 제1 빌딩 블록을 제1 좌위 상의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 빌딩 블록은 차단기를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 차단기는 산-불안정성 DMT를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 산-불안정성 DMT는 4,4'-디메톡시트리틸을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 산화 또는 황화를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 커플링되지 않은 올리고뉴클레오티드 쇄를 화학적으로 캡핑하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 차단기를 제거함으로써 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄를 탈차단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동

안 기판의 위치는 커플링 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동안 기판의 위치는 산화 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동안 기판의 위치는 캡핑 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동안 기판의 위치는 탈차단 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 기판 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 산화 단계를 위한 하나 이상의 시약은 이 하나 이상의 시약을 포함하는 용액으로 마이크로구조물을 침수시킴으로써 제공된다. 일부 실시양태들에서, 캡핑 단계를 위한 하나 이상의 시약은 이 하나 이상의 시약을 포함하는 용액으로 마이크로구조물을 침수시킴으로써 제공된다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 기판 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재하고, 탈차단 단계를 위한 하나 이상의 시약은 이 하나 이상의 시약을 포함하는 용액으로 마이크로구조물을 침수시킴으로써 제공될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 상기 기판을 밀봉된 챔버 내에 봉입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 밀봉된 챔버는 제1 좌위로부터의 액체의 퍼징(purging)을 허용한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 제1 좌위에 작동가능하게 연결된 배출구(drain)를 통해 액체를 배출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 음압을 기판에 적용한 후, 기판 상의 수분 함량은 1 ppm 미만이다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응하도록 증가된다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0034] 또 다른 양태에서, 본 발명은 시약을 복수의 분해된 좌위들에 침착시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 잉크젯 펌프를 통해 제1 시약의 하나 이상의 점적을 복수의 좌위들 중 제1 좌위에 적용하는 단계; 및 잉크젯 펌프를 통해 제2 시약의 하나 이상의 점적을 복수의 분해된 좌위들 중 제2 좌위에 적용하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 좌위는 제1 좌위에 인접한다. 일부 실시양태들에서, 제1 시약과 제2 시약은 상이하다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위 및 제2 좌위는 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 100 ㎛ 초과의 깊이를 가진 하나 이상의 채널을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 시약을 복수의 분해된 좌위들에 침착시키는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 0.1% 미만의 제2 시약을 수용하고, 제2 좌위는 0.1% 미만의 제1 시약을 수용한다. 일부 실시양태들에서, 좌위는 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 좌위는 0.001 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위 및 제2 좌위는 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 기판에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 지지체 표면은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 1 /㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 100 /㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 마이크로플루이딕 시스템을 제공한다. 마이크로플루이딕 시스템은 ㎟당 10 이상의 밀도로 복수의 마이크로웰들(microwells)을 가진 제1 표면; 및 상기 복수의 마이크로웰들 중 하나 내부의 액적(점적)(droplet)을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들 중 하나 내부의 액적은 약 1 내지 1000의 범위에서 레이놀즈(Reynolds) 수를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 ㎟당 1 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 ㎟당 10 이상의 밀도로 존재한다.

[0037] 본원에서 제공된 마이크로플루이딕 시스템과 관련된 일부 실시양태들에서, 상기 마이크로플루이딕 시스템은 잉크젯 펌프를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 점적은 잉크젯 펌프에 의해 침착된다. 일부 실시양태들에

서, 점적은 제1 마이크로웰 치수의 하부 절반에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 점적은 제1 마이크로웰 치수의 중간 3분의 1에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 ㎟당 100 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 제1 마이크로웰 치수는 점적보다 더 크다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들 각각은 하나 이상의 마이크로채널에 유체 연결된다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 마이크로채널은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 지지체 상에서 형성된다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/$㎛^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.25 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.45 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다. 일부 실시양태들에서, 점적은 올리고뉴클레오티드 합성을 가능하게 하는 시약을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체이다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본 발명은 점적을 복수의 마이크로웰들에 침착시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 잉크젯 펌프를 통해 하나 이상의 점적을 복수의 마이크로웰들 중 제1 마이크로웰에 적용하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 복수의 마이크로웰들 중 하나 내부의 액적은 약 1 내지 1000의 범위에서 레이놀즈 수를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 1/㎟ 이상의 밀도를 가진다. 일부 경우, 복수의 마이크로웰들은 10/㎟ 이상의 밀도를 가진다.

[0039] 본원에서 제공된 바와 같이 점적을 복수의 마이크로웰들에 침착시키는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 복수의 마이크로웰은 100/㎟ 이상의 밀도를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 점적은 2 m/초 이상의 속도로 적용된다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들 각각은 하나 이상의 마이크로채널에 유체 연결된다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 마이크로채널은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 지지체 상에서 형성된다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/$㎛^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.25 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.45 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰 내부의 액적은 마이크로웰의 중간 3분의 1에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰 내부의 액적은 마이크로웰의 하부 절반에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 점적은 올리고뉴클레오티드 합성을 가능하게 하는 시약을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템

과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0040] 또 다른 양태에서, 본 발명은 분할(partitioning) 방법도 제공한다. 분할 방법은 복수의 제1 분해된 좌위들에서 액체를 포함하는 제1 표면을, 복수의 제2 분해된 좌위들을 포함하는 제2 표면과 접촉시키는 단계; 상기 액체의 원하는 분획이 복수의 제1 분해된 좌위들로부터 복수의 제2 분해된 좌위들에게 전달될 수 있도록 이형 속도를 결정하는 단계; 및 상기 속도로 제1 표면으로부터 제2 표면을 탈착시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면은 액체와의 제1 표면 장력을 포함하고, 제2 표면은 액체와의 제2 표면 장력을 포함할 수 있다.

[0041] 본원에서 제공된 분할 방법들 중 임의의 분할 방법을 실시함에 있어서, 제1 표면의 일부는 표면 장력을 증가시키는 모이어티로 코팅될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 표면 장력은 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 제2 표면의 표면 장력은 90도 초과의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 0.01 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 0.001 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.25 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 제1 분해된 좌위들은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 제1 분해된 좌위들은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 표면은 액체의 적어도 일부를 보유하는 마이크로채널을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 표면은 액체의 적어도 일부를 보유하는 나노반응기를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같은 분할 방법은 제3 표면을 복수의 제3 분해된 좌위들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 액체는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 원하는 분획은 30% 초과이다. 일부 실시양태들에서, 원하는 분획은 90% 초과이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 혼합 방법도 제공한다. 상기 방법은 (a) 그 내에 제작된 복수의 마이크로구조물들을 포함하는 제1 기판을 제공하는 단계; (b) 복수의 분해된 반응기 캡들을 포함하는 제2 기판을 제공하는 단계; (c) 복수의 제1 반응기 캡들이 제1 기판 내의 n개의 마이크로구조물들로부터 액체를 수용하도록 구성될 수 있게끔 제1 기판 및 제2 기판을 정렬하는 단계; 및 (d) 액체를 n개의 마이크로구조물들로부터 제1 반응기 캡 내로 전달함으로써 상기 n개의 마이크로구조물들로부터의 액체를 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함한다.

[0043] 본원에 기재된 혼합 방법들 중 임의의 혼합 방법을 실시함에 있어서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 0.1/㎟ 이상의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 10/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로구조물들 각각은 상이한 폭의 2개 이상의 채널들을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 상기 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 지지체 상에서 형성된다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.25 ㎛^{2} 이

상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로구조물들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 표면에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다.

[0044] 본원에 기재된 혼합 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 복수의 제1 반응기 캡들이 제1 기판 내의 n개의 마이크로구조물들로부터 액체를 수용하도록 구성될 수 있게끔 제1 기판 및 제2 기판을 정렬하는 단계인 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 100 ㎛ 미만의 갭(gap)이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 50 ㎛ 미만의 갭이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 20 ㎛ 미만의 갭이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 10 ㎛ 미만의 갭이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 혼합물은 갭 내로 부분적으로 퍼진다. 일부 실시양태들에서, 혼합 방법은 제1 기판과 제2 기판을 함께 더 가깝게 위치시킴으로써 상기 갭을 밀봉하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개의 채널들 중 하나는 20도 미만의 물 접촉각에 상응하는 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 전달은 압력에 의해 수행된다. 일부 실시양태들에서, 혼합물의 부피는 반응기 캡의 부피보다 더 크다. 일부 실시양태들에서, 액체는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태들에서, n은 10 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 25 이상이다. 일부 실시양태들에서, 액체가 혼합되어 혼합물을 형성하는 마이크로구조물의 수인 n은 50 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, n은 75 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 100 이상이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 뉴클레오티드 커플링에 적합한 화학적 모이어티로 작용화되어 있는 분해된 좌위들을 가진 기판을 제공하는 단계; 및 2개 이상의 빌딩 블록들의 커플링 사이에 기판을 수송하지 않으면서 좌위 특이적 예정된 서열에 따라 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시킴으로써 n개 염기쌍 길이를 가진 복수의 올리고뉴클레오티드들을 합성하는 단계를 포함한다.

[0046] 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 상기 방법은 시간당 12개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 15개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 20개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 25개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/500 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/1000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/2000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/500 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/1000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/2000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다.

[0047] 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 아데닌, 구아닌, 타이민, 사이토신 또는 우리딘 기, 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 디뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 포스포라미다이트를 포함한다. 일부 실시

양태들에서, n은 100 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 200 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 300 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 400 이상이다. 일부 실시양태들에서, 기판은 100,000개 이상의 분해된 좌위들을 포함하고, 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드들 중 2개 이상은 서로 상이하다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 커플링 전에 기판을 진공 건조하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 차단기를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 차단기는 산-불안정성 DMT를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 산-불안정성 DMT는 4,4'-디메톡시트리틸을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 산화 또는 황화를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 커플링되지 않은 올리고뉴클레오티드 쇄를 화학적으로 캡핑하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 차단기를 제거함으로써 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄를 탈차단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 10,000개 이상의 비아들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 100,000개 이상의 비아들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 1,000,000개 이상의 비아들을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0048] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 제1 시점에서 유전자 목록을 컴퓨터 판독가능한 비-일시적인 매체에 입력하는 단계로서, 이때 상기 목록이 100개 이상의 유전자들을 포함하고 상기 유전자들이 500 bp 이상인 단계; 상기 유전자 목록의 90% 초과의 유전자들을 합성함으로써 전달가능한 유전자들을 가진 유전자 라이브러리를 구축하는 단계; 상기 유전자 라이브러리를 대표하는(represent) 시퀀싱 라이브러리를 제조하는 단계; 서열 정보를 수득하는 단계; 서열 정보를 기초로 전달가능한 유전자들의 적어도 서브세트를 선택하는 단계; 및 선택된 전달가능한 유전자를 제2 시점에서 전달하는 단계로서, 이때 제2 시점이 제1 시점으로부터 1개월 미만 만큼 떨어져 있는 것인 단계를 포함한다.

[0049] 본원에 기재된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 서열 정보는 차세대 서열결정을 통해 수득될 수 있다. 서열 정보는 생거(Sanger) 서열결정에 의해 수득될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 제2 시점에서 하나 이상의 유전자를 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자는 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 서브세트는 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 유전자 목록을 구축하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제2 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 1 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 2 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 3 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 25일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 5일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 2일 미만 만큼 떨어져 있다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0050] 일부 실시양태들에서, 대향하는 표면들 사이에 m개 마이크로플루이딕 연결부 들(microfluidic connections)의 n개 군들을 포함하는 실질적으로 평평한 기판 부분을 포함하는, 핵산 합성을 위한 마이크로플루이딕 디바이스가 본원에서 제공되고, 이때 n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 중 각각 하나는 제1 채널 및 제2 채널을 포함하고,

이때 n개 군들 각각에서 제1 채널은 모든 m개 마이크로플루이딕 연결부들에 공통되고, 복수의 마이크로플루이딕 연결부들은 기판의 가장 작은 치수를 따라 실질적으로 평평한 기판 부분에 걸쳐 있고, n 및 m은 2 이상이다. 일부 실시양태들에서, 제2 채널은 디바이스에의 올리고뉴클레오티드의 부착을 용이하게 할 수 있는 코팅으로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 디바이스는 n개 군들 중 k개 군들에서 제2 채널에 부착되는 제1 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, k는 1이다. 일부 실시양태들에서, 디바이스는 n개 군들 중 l개 군들에 부착되는 제2 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, l은 1이다. 일부 실시양태들에서, l개 군들에서 어느 군도 k개 군들에 존재하지 않는다.

[0051] 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 10개 뉴클레오티드, 25개 뉴클레오티드, 50개 뉴클레오티드, 75개 뉴클레오티드, 100개 뉴클레오티드, 125개 뉴클레오티드, 150개 뉴클레오티드 또는 200개의 뉴클레오티드의 길이를 가진다.

[0052] 일부 실시양태들에서, 제1 올리고뉴클레오티드와 제2 올리고뉴클레오티드는 적어도 2개의 뉴클레오티드, 3개의 뉴클레오티드, 4개의 뉴클레오티드, 5개의 뉴클레오티드 또는 10개의 뉴클레오티드에 의해 상이하다.

[0053] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들은 최대 5 ㎜, 1.5 ㎜, 1.0 ㎜ 또는 0.5 ㎜의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널은 5 ㎜, 1.5 ㎜, 1.0 ㎜ 또는 0.5 ㎜ 이하의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널은 0.05 ㎜, 0.75 ㎜, 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜ 또는 0.4 ㎜ 이상의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널은 0.2 ㎜, 0.1 ㎜, 0.05 ㎜, 0.04 ㎜ 또는 0.03 ㎜ 이하의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널은 0.001 ㎜, 0.005 ㎜, 0.01 ㎜, 0.02 ㎜ 또는 0.03 ㎜ 이상의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널의 횡단면은 0.01 ㎜, 0.025 ㎜, 0.05 ㎜ 또는 0.075 ㎜ 이상이다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널의 횡단면은 1 ㎜, 0.5 ㎜, 0.25 ㎜, 0.1 ㎜ 또는 0.075 ㎜ 이하이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널의 횡단면은 0.001 ㎜, 0.05 ㎜, 0.01 ㎜, 0.015 ㎜ 또는 0.02 ㎜ 이상이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널의 횡단면은 0.25 ㎜, 0.125 ㎜, 0.050 ㎜, 0.025 ㎜ 또는 0.02 ㎜ 이하이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널의 횡단면에서의 표준 편차는 횡단면의 평균의 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 제2 채널들의 90% 이상에서 횡단면에서의 편차는 최대 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1%이다.

[0054] 일부 실시양태들에서, n은 적어도 10, 25, 50, 100, 1000 또는 10000 이다. 일부 실시양태들에서, m은 적어도 3, 4 또는 5 이다.

[0055] 일부 실시양태들에서, 기판은 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 실리콘을 포함한다.

[0056] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 제2 채널들의 90% 이상은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 75도, 50도, 30도 또는 20도 미만의 물 접촉각에 상응하는 수준까지 증가된다.

[0057] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 제2 채널들의 90% 이상에 대한 종횡비는 1, 0.5 또는 0.3 미만이다. 일부 실시양태들에서, n개 군들에서 제1 채널들의 90% 이상에 대한 종횡비는 0.5, 0.3 또는 0.2 미만이다.

[0058] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 적어도 10%, 25%, 50%, 75%, 90% 또는 95%의 총 길이는 실질적으로 평평한 기판의 가장 작은 치수의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% 또는 1000% 이내에 있다.

[0059] 일부 실시양태들에서, 디바이스의 실질적으로 평평한 부분은 SOI 웨이퍼로부터 제작된다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 핵산 증폭 방법에 관한 것이다: (a) 상이한 표적 서열을 각각 포함하는 n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 상의 하나 이상의 어댑터(adaptor) 혼성화 서열에 혼성화될 수 있는 제1 어댑터를 제공하는 단계; (c) m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 주형으로서 사용하여 제1 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공함으로써 m개의 단일 가닥 앰플리콘(amplicon) 핵산들을 생성하는 단계로서, 이때 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들 각각이 그의 주형으로부터의 표적 서열의 복수의 복제물들(replicas)을 포함하는 것인 단계; (d) 제1 어댑터에 혼성화될 수 있는 제1 보조 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계; 및 (e) 제1 물질(agent)이 복수의 절단 부위들에서 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 절단하기에 적

합한 조건 하에서 제1 물질을 제공함으로써 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 내의 표적 서열의 복수의 단일 가닥 복제물들을 생성하는 단계. 일부 실시양태들에서, n 또는 m은 2 이상이다. 일부 실시양태들에서, n 또는 m은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 또는 500 이다. 일부 실시양태들에서, m은 n 미만이다. 일부 실시양태들에서, n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 포함하는 샘플은 상이한 표적 서열들 중 하나를 각각 포함하는 n개 이상의 선형 단일 가닥 핵산들을 제공하고 n개의 선형 단일 가닥 핵산들을 환형화하여 n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 생성함으로써 형성된다. 일부 실시양태들에서, 제1 어댑터는 n개의 선형 단일 가닥 핵산들의 양 말단들에 동시에 혼성화될 수 있다. 일부 실시양태들에서, n개의 선형 단일 가닥 핵산들에서 상이한 표적 서열들은 제1 어댑터 혼성화 서열 및 제2 어댑터 혼성화 서열에 의해 플랭킹된다. 일부 실시양태들에서, n개 이상의 선형 단일 가닥 핵산들은 드 노보 올리고뉴클레오티드 합성에 의해 생성된다. 일부 실시양태들에서, n개의 선형 단일 가닥 핵산들 각각에서 제1 어댑터 혼성화 서열은 2개 이하의 뉴클레오티드 염기만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 어댑터 혼성화 서열은 5개 이상의 뉴클레오티드 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 어댑터 혼성화 서열은 최대 75개, 50개, 45개, 40개, 35개, 30개 또는 25개의 뉴클레오티드 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제1 어댑터가 선형 단일 가닥 핵산의 양 말단들에 동시에 혼성화될 때 n개의 선형 단일 가닥 핵산들의 말단들은 제1 어댑터 상의 인접한 염기들과 쌍을 형성한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들은 어댑터 혼성화 서열이 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산 복제물들의 나머지 서열 부분의 5% 이상으로부터 잘려지도록 위치한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열 이외의 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산 복제물들의 서열의 5% 이상은 절단되지 않은 상태로 남아있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들은 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열 외부에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들의 위치는 표적 서열과 무관하다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들의 위치는 제1 어댑터 또는 제1 보조 올리고뉴클레오티드의 서열 내의 하나 이상의 서열 요소에 의해 결정된다. 일부 실시양태들에서, 상기 서열 요소는 제한 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 위한 인식 부위를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 보조 올리고뉴클레오티드 또는 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 IIS형 제한 엔도뉴클레아제를 위한 인식 부위를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 인식 부위는 절단 부위로부터 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 뉴클레오티드만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들은 단일 가닥 핵산과 이중 가닥 핵산의 연접부에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 이중 가닥 핵산은 제1 어댑터 및 제1 보조 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 단일 가닥 핵산은 본질적으로 m개의 상이한 표적 서열들로 구성된다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 95% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 90% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 80% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 50% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산의 생성은 단일 치환 증폭을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 보조 올리고뉴클레오티드는 친화성 태그를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 친화성 태그는 바이오틴 또는 바이오틴 유도체를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 샘플로부터 이중 가닥 핵산을 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 단리는 친화성 정제, 크로마토그래피 또는 겔 정제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 2개 이상의 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 IIS형 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 닉킹(nicking) 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 2개 이상의 닉킹 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI 및 Nt.BspQI, 및 이들의 변이체들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 상기 나열된 제1 물질들 및 변이체들 중 임의의 제1 물질 또는 변이체와 본질적으로 동일한 기능을 포함하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 인식 서열을 인식하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 절단 부위에서 절단한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 제한 효소는 MlyI 및 BciVI, 또는 BfuCI 및 MlyI를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 (a) 샘플을 복수의 분획들로 분할하는 단계; (b) n개의 상이한 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 k개의 상이한 환형화된 단일 가닥 핵산들 상의 하나 이상의 어

댑터 혼성화 서열에 혼성화될 수 있는 제2 어댑터를 가진 하나 이상의 분획을 제공하는 단계; (c) k개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 주형으로서 사용하여 제2 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공함으로써 k개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 생성하는 단계로서, 이때 제2 단일 가닥 앰플리콘 핵산이 그의 주형으로부터의 표적 서열의 복수의 복제물들을 포함하는 것인 단계; (d) 제2 어댑터에 혼성화될 수 있는 제2 보조 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계; 및 (e) 제2 물질이 복수의 제2 절단 부위들에서 k개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 절단하기에 적합한 조건 하에서 제2 물질을 제공함으로써 k개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 내의 표적 서열의 복수의 단일 가닥 복제물들을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 어댑터와 제2 어댑터는 동일하다. 일부 실시양태들에서, 제1 보조 올리고뉴클레오티드와 제2 보조 올리고뉴클레오티드는 동일하다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질과 제2 물질은 동일하다. 일부 실시양태들에서, k + m은 n 미만이다. 일부 실시양태들에서, k는 2 이상이다. 일부 실시양태들에서, n개의 환형화된 단일 가닥 핵산을 포함하는 샘플은 단일 가닥 핵산 증폭에 의해 형성된다. 일부 실시양태들에서, 단일 가닥 핵산 증폭은 (a) m개 이상의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들에 혼성화될 수 있는 제1 전구체 어댑터를 제공하는 단계; (c) m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들을 주형으로서 사용하여 제1 전구체 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공함으로써 m개의 단일 가닥 전구체 앰플리콘 핵산을 생성하는 단계로서, 이때 상기 단일 가닥 앰플리콘 핵산이 m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들의 복수의 복제물들을 포함하는 것인 단계; (d) 제1 전구체 어댑터에 혼성화될 수 있는 제1 전구체 보조 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계; 및 (e) 제1 전구체 물질(agent)이 복수의 절단 부위들에서 제1 단일 가닥 전구체 앰플리콘 핵산을 절단하기에 적합한 조건 하에서 제1 전구체 물질을 제공함으로써 m개의 선형 전구체 핵산들을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 m개의 선형 전구체 핵산들을 환형화하여 m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들의 복제물들을 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들은 단일 가닥 복제물에서 적어도 10배, 100배, 250배, 500배, 750배, 1000배, 1500배, 2000배, 3000배, 4000배, 5000배, 10000배, 또는 그 이상만큼 증폭된다. 일부 실시양태들에서, m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 하나 이상은 최대 약 100 nM, 10 nM, 1 nM, 50 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM, 1 fM, 또는 그 이하의 농도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 환형화는 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 라이게이션은 T4 DNA 리가제, T3 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, 이. 콜라이(*E. coli*) DNA 리가제, Taq DNA 리가제 및 9N DNA 리가제로 구성된 군으로부터 선택된 리가제의 사용을 포함한다.

[0061] 추가 양태에서, 다양한 실시양태들에서 본 발명은 (a) 제1 어댑터; (b) 상기 어댑터에 혼성화될 수 있는 제1 보조 올리고뉴클레오티드; (c) 리가제; 및 (d) MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI 및 Nt.BspQI, 및 이들의 변이체들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함하는 제1 절단제를 포함하는 키트에 관한 것이다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 상기 나열된 제1 물질들 및 변이체들 중 임의의 제1 물질 또는 변이체와 본질적으로 동일한 기능을 포함하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 인식 서열을 인식하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 절단 부위에서 절단한다. 일부 실시양태들에서, 상기 키트는 제2 절단제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 절단제는 MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI 및 Nt.BspQI, 및 이들의 변이체들로 구성된 군으로부터 선택된 효소를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 물질은 상기 나열된 제2 물질들 및 변이체들 중 임의의 제2 물질 또는 변이체와 본질적으로 동일한 기능을 포함하거나, 동일한 또는 본질적으로 동

일한 인식 서열을 인식하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 절단 부위에서 절단한다. 일부 실시양태들에서, 제1 절단제는 MlyI를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 절단제는 BciVI 또는 BfuCI를 포함한다.

[0062] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 핵산 증폭 방법에 관한 것이다: (a) 상이한 표적 서열을 각각 포함하는 n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 상의 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열에 혼성화될 수 있는 제1 어댑터를 제공하는 단계; (c) m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 주형으로서 사용하여 제1 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공함으로써 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 생성하는 단계로서, 이때 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들 각각이 그의 주형으로부터의 표적 서열의 복수의 복제물들을 포함하는 것인 단계; (d) m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들 상에서 제1 물질에 대한 이중 가닥 인식 부위를 생성하는 단계; 및 (e) 제1 물질이 복수의 절단 부위들에서 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 절단하기에 적합한 조건 하에서 제1 물질을 제공함으로써 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 내의 표적 서열의 복수의 단일 가닥 복제물들을 생성하는 단계. 일부 실시양태들에서, 이중 가닥 인식 부위는 이중 가닥 인식 부위의 제1 가닥 상의 제1 어댑터의 제1 부분, 및 이중 가닥 인식 부위의 제2 가닥 상의 제1 어댑터의 제2 가닥을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 어댑터는 회문식(palindromic) 서열을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 이중 가닥 인식 부위는 제1 어댑터의 제1 부분과 제2 부분을 서로 혼성화시킴으로써 생성된다. 일부 실시양태들에서, m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들은 복수의 이중 가닥 자가-혼성화된 영역들을 포함한다.

[0063] 추가 양태에서, 본 발명은 긴 핵산 분자를 생성하는 방법으로서, (a) 표면 상에 고정화된 복수의 핵산들을 제공하는 단계로서, 이때 상기 복수의 핵산들이 중첩되는 상보적 서열들을 가진 핵산을 포함하는 것인 단계; (b) 상기 복수의 핵산들을 용액 내로 방출시키는 단계; 및 (c) i) 복수의 혼성화된 핵산들을 형성하기 위한 상기 중첩되는 상보적 서열들의 혼성화, 및 ii) 긴 핵산 분자를 합성하기 위한 상기 혼성화된 핵산의 연장 또는 라이게이션을 촉진하는 조건을 제공하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0064] 또 다른 양태에서, 본 발명은 화학 종을 포함하는 마이크로점적을 기판 상에 분무하기 위한 잉크젯 프린트헤드; 프린트헤드에 인접한 기판을 스캐닝하여 상기 마이크로점적을 특정된 부위에서 선택적으로 침착시키기 위한 스캐닝 수송기; 기판을 하나 이상의 선택된 유체에 노출시킴으로써 마이크로점적이 침착되어 있는 기판을 처리하기 위한 유동셀; 및 기판이 침착을 위해 프린트헤드에 인접하여 위치할 때마다 프린트헤드를 기준으로 기판을 정확히 정렬하기 위한 정렬 유닛(unit)을 포함하고, 유동셀에서의 처리를 위해 프린트헤드와 유동셀 사이에서 기판을 이동시키기 위한 처리 수송기를 포함하지 않는, 하나 이상의 기판을 프로세싱할 수 있는 자동화된 시스템으로서, 이때 상기 처리 수송기 및 상기 스캐닝 수송기가 상이한 요소인 자동화된 시스템에 관한 것이다.

[0065] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 기판을 프로세싱할 수 있고, 뉴클레오시드 또는 활성화된 뉴클레오시드를 포함하는 용액을 기판 상에 분무하기 위한 잉크젯 프린트헤드; 프린트헤드에 인접한 기판을 스캐닝하여 뉴클레오시드를 특정된 부위에서 선택적으로 침착시키기 위한 스캐닝 수송기; 기판을 하나 이상의 선택된 유체에 노출시킴으로써 단량체가 침착되어 있는 기판을 처리하기 위한 유동셀; 및 기판이 침착을 위해 프린트헤드에 인접하여 위치할 때마다 프린트헤드를 기준으로 기판을 정확히 정렬하기 위한 정렬 유닛을 포함하고, 유동셀에서의 처리를 위해 프린트헤드와 유동셀 사이에서 기판을 이동시키기 위한 처리 수송기를 포함하지 않는, 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 자동화된 시스템으로서, 이때 상기 처리 수송기 및 상기 스캐닝 수송기가 상이한 요소인 자동화된 시스템에 관한 것이다.

[0066] 추가 양태에서, 본 발명은 화학 종을 포함하는 마이크로점적을 기판 상에 분무하기 위한 잉크젯 프린트헤드; 프린트헤드에 인접한 기판을 스캐닝하여 상기 마이크로점적을 특정된 부위에서 선택적으로 침착시키기 위한 스캐닝 수송기; 기판을 하나 이상의 선택된 유체에 노출시킴으로써 마이크로점적이 침착되어 있는 기판을 처리하기 위한 유동셀; 및 기판이 침착을 위해 프린트헤드에 인접하여 위치할 때마다 프린트헤드를 기준으로 기판을 정확히 정렬하기 위한 정렬 유닛을 포함하는 자동화된 시스템으로서, 유동셀에서의 처리를 위해 프린트헤드와 유동셀 사이에서 기판을 이동시키기 위한 처리 수송기를 포함하지 않는 자동화된 시스템에 관한 것이다.

[0067] **참고도입**

[0068] 본 명세서에서 언급된 모든 공개문헌들, 특허들 및 특허출원들은 각각의 개별 공개문헌, 특허 또는 특허출원이 참고로 도입되는 것으로서 구체적으로 및 개별적으로 표시되어 있는 것처럼 동일한 정도로 본원에 참고로 도입된다.

도면의 간단한 설명

[0069] 본 발명의 신규 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 기재되어 있다. 본 발명의 특징 및 이점의 보다 더 우수한 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적 실시양태들이 기재되어 있는 하기 상세한 설명, 및 첨부된 도면을 참고함으로써 수득될 것이다.

도 1은 유전자 합성 및 나노반응기 기술을 요약하는 예시적 공정을 나타낸다. 도 1a는 잉크젯 프린터를 이용하여 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 예시적 공정을 보여주고; 도 1b는 분리된 인클로저 또는 나노반응기에서 유전자를 증폭하는 예시적 공정을 보여준다. 도 1c는 올리고뉴클레오티드 합성 및 유전자 조립을 위한 마이크로플루이딕 반응들을 병렬로 연결하는 복수의 웨이퍼들의 사용의 일례를 보여준다.

도 2a 내지 2c는 예시적 사업 공정 흐름을 나타내는 블록도이다. 합성된 유전자의 클로닝은 생략될 수 있다(도 2b). 도 2c에서, 합성된 유전자는 운반 전에 클로닝된다(도 2c).

도 3은 시약 침착을 위한 프린터, 예를 들면, 잉크젯 프린터, 기판(웨이퍼), 다수의 방향으로 시스템 요소들의 정렬을 개략적으로 나타내는 개략도, 및 시약 유동을 위한 예시적 셋업을 포함하는, 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 시스템의 예시적 개요를 나타낸다.

도 4는 기판(올리고뉴클레오티드 웨이퍼 반응기) 내에 구축된 마이크로구조물의 디자인의 일례를 보여준다.

도 5는 도 4에 예시된 마이크로구조물 내로의 시약 침착을 위한 예시적 공정을 나타내는 도면이다. 표면 작용화를 위한 선택된 영역은 습윤화 조건 하에서 보다 더 작은 작용화된 웰 내로의 시약 퍼짐을 허용한다.

도 6a는 도 4에 예시된 마이크로구조물을 더 예시하기 위한 예시도이다. 도 6b는 마이크로구조물을 위한 다양한 대안적 디자인들의 예시도이다. 도 6c는 기판(웨이퍼) 상의 마이크로구조물을 위한 배치 디자인을 보여준다.

도 7은 캡핑 요소 상의 반응기 캡의 예시적 배치를 보여준다.

도 8은 유전자 합성을 위한 예시적 공정 작업흐름을 운반까지 나타내는 도면이다.

도 9a는 개방된 또는 폐쇄된 덮개를 가진 예시적 유동셀의 예시도를 보여준다. 도 9b는 예시적 유동셀 및 폐기물 수집기 어셈블리의 횡단면도를 보여준다. 도 9c는 예시적 유동셀 및 폐기물 수집기 어셈블리의 확대된 횡단면도를 보여준다.

도 10a는 단일 1 내지 5 ㎜ 홈 및 198 ㎜ 직경을 가진 단일 홈 진공 척(chuck)의 일례를 보여준다. 도 10b는 기판(웨이퍼)과 진공 척 사이의 소결된 금속 삽입체, 및 수용 요소 내로 도입된 임의적 열 조절 요소를 보여준다. 도 10c는 도 10a에 예시된 단일 홈 진공 척의 횡단면도를 보여준다.

도 11은 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 예시적 적용 표준 포스포라미다이트 화학반응을 보여준다.

도 12는 중합효소 연쇄 조립(PCA)의 예시적 적용을 보여준다.

도 13은 보다 더 짧은(예를 들면, 약 50 kb) 올리고뉴클레오티드의 사용에 비해 보다 더 긴(예를 들면, 약 300 bp) 올리고뉴클레오티드의 사용의 이점을 나타내는 도면이다. 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드는 감소된 오류로 유전자 생성물의 조립에 사용될 수 있다.

도 14는 유전자 생성물로의 올리고뉴클레오티드의 조립을 위한 PCA와 깁슨(Gibson) 방법의 예시적 조합된 적용을 나타내는 도면이다.

도 15는 보다 더 높은 오류율을 가진 유전자 합성 생성물에의 적용에 특히 적합한 오류 보정 방법을 나타내는 도면이다.

도 16은 보다 더 낮은 오류율을 가진 유전자 합성 생성물에의 적용에 특히 적합한 오류 보정 방법을 나타내는 도면이다.

도 17은 분자적으로 바코딩된 시퀀싱 라이브러리의 생성, 및 차세대 서열결정(NGS)을 포함하는 품질 조절(QC) 공정을 위한 자물쇠(padlock) 프로브의 사용을 나타내는 도면이다.

도 18은 254 ㎛ 중심 상에서 256개의 노즐들을 가진 실리콘 오리피스 플레이트를 가진 10개의 잉크젯 헤드들, 및 100 ㎛ 비행(fly) 높이를 가진 잉크젯 조립체에 대한 일례를 보여준다.

도 19는 본 발명의 예시적 실시양태들과 관련하여 이용될 수 있는 컴퓨터 시스템의 일례를 보여준다.

도 20은 본 발명의 예시적 실시양태들과 관련하여 이용될 수 있는 컴퓨터 시스템(2000)의 제1 예시적 구조를 보

여주는 블록도이다.

도 21은 본 발명의 예시적 실시양태들과 관련하여 이용될 수 있는, 복수의 컴퓨터 시스템들, 복수의 휴대전화들 및 개인용 데이터 단말기들, 및 네트워크 부착된 저장장치(NAS)를 도입하도록 구성된 네트워크(2100)를 나타내는 도면이다.

도 22는 본 발명의 예시적 실시양태들과 관련하여 이용될 수 있는, 공유된 가상 주소 메모리 공간을 사용하는 멀티프로세서 컴퓨터 시스템(2200)의 블록도이다.

도 23은 기판(예를 들면, 실리콘 웨이퍼) 상에서 마이크로구조물을 제작하기 위한 프론트 엔드(front end) 프로세싱을 구성하는 예시적 단계들을 나타내는 도면이다.

도 24는 기판(예를 들면, 실리콘 웨이퍼) 상의 마이크로구조물 표면을 작용화하기 위한 백 엔드(back end) 프로세싱을 구성하는 예시적 단계들을 나타내는 도면이다.

도 25a 내지 25c는 고밀도의 군들을 포함하는 클러스터(cluster)의 상이한 조감도들(views)을 보여준다. 도 25d 및 25e는 실질적으로 평평한 기판 부분을 포함하는 마이크로플루이딕 디바이스의 도면의 상이한 조감도들을 보여준다. 도 25f는 108개의 반응 웰들 및 표지를 위한 지정된 영역을 가진 실질적으로 평평한 기판 부분을 포함하는 마이크로플루이딕 디바이스의 도면의 디바이스 조감도를 보여준다. 도 25g는 109개의 군들을 포함하는 클러스터의 디바이스 조감도를 보여준다.

도 26a는 11개의 웰들을 포함하는 한 줄의 나노반응기들을 보여주는, 나노반응기 도면의 횡단면도를 보여준다. 도 26b는 108개의 상승된 웰들을 포함하는 나노반응기 도면의 디바이스 조감도를 보여준다. 세부도 F는 나노반응기의 한 웰의 세부도를 보여준다. 도 26c는 도 26b에 나타낸 나노반응기 도면의 각진 디바이스 조감도를 보여준다. 도 26d는 나노반응기 도면의 핸들 조감도를 보여준다. 세부도 H는 나노반응기의 핸들 면 상의 기준 마킹의 세부도를 보여준다. 도 26e는 108개의 웰들 및 표지를 포함하는 나노반응기 도면의 디바이스 조감도를 보여준다.

도 27은 상이하게 작용화되는 예시적 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 디자인 특징을 상세하게 보여준다.

도 28은 도 15에서의 예시적 디바이스에 대한 프론트-엔드 제작 공정에 대한 작업흐름을 보여준다.

도 29는 차별 작용화를 위한 도 15의 예시적 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 백-엔드 제작에 대한 예시적 기준 공정 흐름을 보여준다.

도 30은 핵산 합성을 위한 조절된 밀도의 활성 기를 가진 작용화된 표면을 보여준다.

도 31은 본원에 기재된 방법에 따라 제작된 디바이스의 영상을 보여준다.

도 32는 예시적 나노반응기 디바이스의 디자인 세부사항을 보여준다.

도 33은 도 20에 기재된 예시적 디바이스의 프론트-엔드 제작에 대한 예시적 기준 공정 흐름을 보여준다.

도 34는 작용화를 위한 도 20의 예시적 나노반응기 디바이스의 백-엔드 제작에 대한 예시적 기준 공정 흐름을 보여준다.

도 35는 본원에 기재된 바와 같이 제작된 나노반응기 디바이스 내의 나노웰을 보여준다. 도 35b는 도 35a에 예시된 나노웰의 근접촬영도를 보여준다.

도 36a 내지 36f는 차별 작용화를 위한 다양한 배열을 보여준다. 각각의 도면에서, 밝은 음영 선은 능동 표면을 표시하는 반면, 어두운 선은 수동 표면을 표시한다.

도 36a는 균일하게 작용화된 표면을 보여준다. 도 36b 내지 36f는 상이하게 작용화된 표면들을 다양한 배열들로 보여준다.

도 37a 내지 37f는 디바이스 작용화에 대한 공정 흐름을 보여준다.

도 38은 레지스트(resist) 적용의 예시도를 보여주는데, 이때 레지스트는 작은 구조물 내로 끌어당겨지고 날카로운 가장자리에 의해 중단된다.

도 39a 및 39b는 예시적 실시양태에서 레지스트 적용을 중단하거나 위킹하기 위한 기저 구조물의 사용을 보여준다.

도 40a 내지 40c는 예시적 차별 작용화 배열에서 리쏘그래피 후 레지스트 패턴을 보여준다. 도 40a는 리쏘그래피 후 레지스트 패턴의 명시야를 보여준다. 도 40b는 리쏘그래피 후 레지스트 패턴의 암시야를 보여준다. 도 40c는 리쏘그래피 후 레지스트 패턴의 개략적인 횡단면도를 보여준다.

도 41a 내지 41c는 또 다른 예시적 차별 작용화 배열에서 리쏘그래피 후 레지스트 패턴을 보여준다. 도 41a는 리쏘그래피 후 레지스트 패턴의 명시야를 보여준다. 도 41b는 리쏘그래피 후 레지스트 패턴의 암시야를 보여준다. 도 41c는 리쏘그래피 후 레지스트 패턴의 개략적인 횡단면도를 보여준다.

도 42a 내지 42c는 플루오로실란을 사용한 작용화 후 레지스트 스트립(strip) 후를 보여준다. 도 42a는 명시야를 보여준다. 도 42b는 암시야를 보여준다. 도 42c는 개략적인 횡단면도를 보여준다.

도 43a 내지 43c는 전체적으로 DMSO로 적재된 예시적 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스("케라틴 칩")를 보여준다. 도 43a는 전체적으로 DMSO로 적재된 케라틴 칩의 명시야를 보여준다. 친수성 영역 및 소수성 영역이 표시되어 있다. 도 43b는 전체적으로 DMSO로 적재된 케라틴 칩의 암시야를 보여준다. 도 43c는 리볼버(revolver)의 자발적 습윤화를 표시하는, 전체적으로 DMSO로 적재된 케라틴 칩의 개략적인 횡단면도를 보여준다.

도 44a 내지 44f는 도 36에 예시된 배열 6에 대한 예시적 공정 흐름을 요약한다.

도 45a 및 45b는 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스로부터의 스폿(spot) 샘플링 배열(도 45a) 및 도 45a의 5개 스폿들 각각에 대한 상응하는 생물분석기(BioAnalyzer) 데이터(B)를 표시한다.

도 46은 실리콘 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서 합성된, 표면 추출된 100-머 올리고뉴클레오티드의 생물분석기 데이터를 표시한다.

도 47은 PCR 증폭 후 실리콘 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서 합성된, 표면 추출된 100-머 올리고뉴클레오티드의 생물분석기 데이터를 표시한다.

도 48은 스폿 8로부터 채취된 샘플에 대한 서열 정렬을 나타내고, 이때 "x"는 단일 염기 결실을 표시하고, "별표시"는 단일 염기 돌연변이를 표시하고, "+"는 생거 서열결정에서의 저품질 스폿을 표시한다.

도 49는 스폿 7로부터 채취된 샘플에 대한 서열 정렬을 나타내고, 이때 "x"는 단일 염기 결실을 표시하고, "별표시"는 단일 염기 돌연변이를 표시하고, "+"는 생거 서열결정에서의 저품질 스폿을 표시한다.

도 50a 및 50b는 추출 후(도 50a) 및 PCR 증폭 후(도 50b) 3차원 올리고뉴클레오티드 디바이스 상에서 합성된 100-머 올리고뉴클레오티드에 대한 생물분석기 결과를 제공한다.

도 51은 3D 올리고뉴클레오티드 디바이스 상에서 합성된 100-머 올리고뉴클레오티드의 PCR 증폭된 샘플에 대한 서열 정렬 맵을 나타낸다.

도 52는 CorrectASE를 이용한 2 라운드의 오류 보정의 적용을 통한 보정 결과를 나타낸다.

도 53a 내지 53c는 작용화 후 예시적 차별 작용화 배열로 표면 작용화 패턴을 보여준다. 도 53a는 명시야를 보여준다. 도 53b는 암시야를 보여준다. 도 53c는 표면 작용화 패턴, 및 소수성 영역을 회피하는 수성 유체 돌출부의 개략적인 횡단면도를 보여준다.

도 54는 나노반응기 디바이스의 작용화를 위한 예시적 작업흐름을 보여준다. 세정에 이어서 레지스트 침착, 작용화 및 최종적으로 레지스트 스트립이 수행된다.

도 55는 블롯팅 방법 후 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스로부터의 개별 나노반응기 웰 내로 전달된 다수의 올리고뉴클레오티드들에 대한 생물분석기 결과를 보여준다. 도 56a 및 56b는 대안적 유동셀 디자인을 보여준다.

도 56a는 유동셀을 위한 라인 공급구(source)/라인 배출구 디자인을 보여준다.

도 56b는 유동셀을 위한 포인트 공급구/포인트 배출구 디자인을 보여준다.

도 57은 50 ㎛ 갭을 가진 배열로 장착된 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 및 나노반응기 디바이스를 보여준다. 예시적 실시양태에서, 상기 디바이스들은 10분 동안 이 배열로 유지된다.

도 58a 및 58b는 이론에 의해 구속받지 않지만 올리고뉴클레오티드들이 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스부터 나노반응기 디바이스까지 시간의 경과에 따라 확산에 의해 재분포된다는 것을 보여준다.

도 58a는 리볼버 채널 내의 액체에서 농축된 올리고뉴클레오티드, 및 나노반응기 챔버 내에 거의 또는 전혀 없

는 올리고뉴클레오티드를 보여준다. 도 58b는 도 58a에 비해 더 늦은 시점에서 리볼버 챔버 및 나노반응기 챔버에서 액체를 통해 균일하게 분포된 올리고뉴클레오티드를 개략적으로 보여준다.

도 59는 PCA 반응 전 및 후 유전자 조립을 위해 이용된 나노반응기 웰 어레이의 조감도를 보여준다.

도 60a 내지 60c는 나노반응기 디바이스의 다양한 웰들에서 유전자의 조립의 결과를 보여준다. 도 60a는 올리고뉴클레오티드가 합성된 디바이스를 보여준다. 웰 1 내지 10이 표시되어 있다. 도 60b는 도 60a의 웰들에서 조립된 유전자의 분석을 보여준다. 각각의 웰에서 유전자에 상응하는 피크는 웰 번호로 표지되어 있다. 도 60c는 도 60b에서 분석된 올리고뉴클레오티드의 전기영동을 보여준다.

도 61a 및 61b는 본원의 개시내용과 일치하는 고성능 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 블록도를 제공한다. 도 61a는 본원에 개시된 블록의 전체 각진 조감도를 제공한다. 도 61b는 본원에 개시된 블록을 통한 횡단면 슬라이스의 각진 조감도를 제공한다.

도 62는 그의 표면 상에 표면적을 증가시키는 포스트들(posts)의 어레이를 가진, 본원의 개시내용과 일치하는 또 다른 고성능 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 블록도를 보여준다.

도 63은 롤링 서클(rolling circle) 증폭을 이용함으로써 증폭된 단일 가닥 핵산의 전기영동을 보여주는데, 이때 증폭 생성물은 절단제들의 다양한 조합들로 절단된다.

도 64a 내지 64f는 단일 가닥 핵산의 증폭 방법을 나타낸다.

도 65a 내지 65f는 도 64에 예시된 방법에 커플링될 수 있는, 단일 가닥 핵산의 증폭 방법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 본 개시내용 전체에서, 본 발명의 다양한 양태들이 범위 형식으로 제공될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의 및 간결함을 위한 것이고 본 발명의 범위에 대한 변경불가능한 제한으로서 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 문맥이 달리 명시하지 않은 한, 범위의 설명은 그 범위 내의 개별 수치적 값들뿐만 아니라 모든 가능한 하위범위들도 하한의 단위의 10분의 1까지 구체적으로 개시한 것으로서 간주되어야 한다. 예를 들면, 범위, 예컨대, 1 내지 6의 설명은 그 범위 내의 개별 값들, 예를 들면, 1.1, 2, 2.3, 5 및 5.9뿐만 아니라 하위범위들, 예컨대, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등도 구체적으로 개시한 것으로서 간주되어야 한다. 이것은 범위의 넓이와 관계없이 적용된다. 이 개재 범위들의 상한 및 하한은 독립적으로 보다 더 작은 범위 내에 포함될 수 있고, 이들도 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계를 제외하고 본 발명 내에 포괄된다. 문맥이 달리 명시하지 않은 한, 언급된 범위가 한계들 중 하나 또는 둘다를 포함하는 경우, 포함된 한계들 중 하나 또는 둘다를 배제한 범위도 본 발명 내에 포함된다.

[0071] 한 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 유전자 라이브러리를 제공한다. 상기 유전자 라이브러리는 유전자들의 집합체를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 집합체는 상기 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 오류율로 0.5 kb 이상의 길이를 가질 수 있는 100개 이상의 상이한 미리 선택된 합성 유전자들을 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 유전자들의 집합체를 포함하는 유전자 라이브러리도 제공한다. 상기 집합체는 0.5 kb 이상의 길이를 각각 가질 수 있는 100개 이상의 상이한 미리 선택된 합성 유전자들을 포함할 수 있다. 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 이 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 오류율을 포함할 수 있다. 원하는 예정된 서열은 전형적으로 사용자, 예를 들면, 전산화된 시스템을 이용하여 데이터를 입력하는 사용자에 의해 임의의 방법에 의해 제공될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 일부 경우 예를 들면, 차세대 서열결정 방법을 이용하여 합성된 핵산의 적어도 일부를 서열결정함으로써 합성된 핵산을 이 예정된 서열과 비교한다. 본원에 기재된 유전자 라이브러리들 중 임의의 유전자 라이브러리와 관련된 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 이 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/5000 bp 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 0.05% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 0.5% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 이 유전자들을 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않거나 실질적으로 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 이 유전자를 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 결실률을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 이 유전자를 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 삽입률을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 이 유전자를 포함하는 예정된 서열에 비해 1/3000 bp 미만의 치환율을 포함한다. 일부 실시양

태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 10개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 100개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 1000개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 각각의 합성 유전자의 1000000개 이상의 카피들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자들의 집합체는 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 집합체는 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 집합체는 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 1 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 2 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 미리 선택된 합성 유전자는 3 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 예정된 서열은 미리 선택된 합성 유전자에 비해 20 bp 미만을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 예정된 서열은 미리 선택된 합성 유전자에 비해 15 bp 미만을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 합성 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 합성 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 각각의 합성 유전자는 임의의 다른 합성 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 합성 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 합성 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 각각의 합성 유전자는 임의의 다른 합성 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 합성 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 합성 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 각각의 합성 유전자는 임의의 다른 합성 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 유전자의 미리 선택된 서열에 비해 1/20000 bp 미만의 오류율로 2 kb 미만인 합성 유전자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 서브세트는 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 유전자들의 집합체의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 유전자 라이브러리는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 유전자들의 집합체를 구축하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자들의 집합체의 제2 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리는 100 ㎥ 미만의 공간 내에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리는 1 ㎥ 미만의 공간 내에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리는 1 ㎥ 미만의 공간 내에 존재한다.

[0072] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유전자 라이브러리를 구축하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 제1 시점 전에 적어도 제1 유전자 목록 및 제2 유전자 목록을 컴퓨터 판독가능한 비-일시적 매체에 입력하는 단계로서, 이때 상기 유전자가 500 bp 이상이고 통합 목록으로 편집될 때 상기 통합 목록이 100개 이상의 유전자들을 포함하는 것인 단계; 및 제2 시점 전에 상기 통합 목록 내의 90% 초과의 유전자들을 합성함으로써 전달가능한 유전자를 가진 유전자 라이브러리를 구축하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 1개월 미만 만큼 떨어져 있다.

[0073] 본원에서 제공된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 본원에 기재된 방법은 제2 시점에서 하나 이상의 유전자를 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자는 통합 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 통합 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 bp 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 서브세트 내의 유전자들은 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 제1, 제2 또는 통합 유전자 목록을 구축하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록의 제2 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록은 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록

은 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 통합 유전자 목록은 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 1 kb 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 2 kb 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 3 kb 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 25일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 5일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 2일 미만 만큼 떨어져 있다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0074] 또 다른 양태에서, 유전자 라이브러리를 구축하는 방법이 본원에서 제공된다. 상기 방법은 제1 시점에서 유전자 목록을 컴퓨터 판독가능한 비-일시적 매체에 입력하는 단계; 상기 유전자 목록의 90% 초과의 유전자들을 합성함으로써 전달가능한 유전자를 가진 유전자 라이브러리를 구축하는 단계; 및 제2 시점에서 전달가능한 유전자를 전달하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 100개 이상의 유전자들을 포함하고, 상기 유전자들은 500 bp 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 1개월 미만 만큼 떨어져 있다.

[0075] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 본원에 기재된 방법은 제2 시점에서 하나 이상의 유전자를 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자는 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 서브세트 내의 유전자들은 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리를 구축하는 방법은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 유전자 목록을 구축하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제2 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0076] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 유전자 목록은 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 1 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 2 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 3 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리를 구축하는 방법에서 기재된 제2 시점은 제1 시점으로부터 25일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 5일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 2일 미만 만큼 떨어져 있다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0077] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 a) 뉴클레오티드 커플링에 적합한 화학적 모이어티로 작용화되어 있는 분해된 좌위들을 가진 기판을 제공하는 단계; 및 b) 좌위 특이적 예정된 서열에 따라 시간당 12개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시킴으로써 n개 염기쌍 길이를 가진 복수의 올리고뉴클레오티드들을 합성하는 단계를 포함한다. 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법과 관련된 다양한 실시양태들이 본원에 기재되어 있다.

[0078] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중

임의의 방법에서, 상기 방법은 시간당 15개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 20개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 25개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/500 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/1000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/2000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/500 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/1000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/2000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다.

[0079] 일부 실시양태들에서, 본원에서 제공된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 빌딩 블록은 아데닌, 구아닌, 타이민, 사이토신 또는 우리딘 기, 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 디뉴클레오티드 또는 트리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 포스포라미다이트를 포함한다. 일부 실시양태들에서, n-머 올리고뉴클레오티드의 n은 100 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 200 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 300 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 400 이상이다. 일부 실시양태들에서, 표면은 100,000개 이상의 분해된 좌위들을 포함하고, 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드들 중 2개 이상은 서로 상이할 수 있다.

[0080] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 커플링 전에 기판을 진공 건조하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 차단기를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 차단기는 산-불안정성 DMT를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 산-불안정성 DMT는 4,4'-디메톡시트리틸을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 산화 또는 황화를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 커플링되지 않은 올리고뉴클레오티드 쇄를 화학적으로 캡핑하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 차단기를 제거함으로써 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄를 탈차단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 진공 건조 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 산화 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 캡핑 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 커플링 단계 동안 기판의 위치는 탈차단 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 10,000개 이상의 비아들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 100,000개 이상의 비아들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 1,000,000개 이상의 비아들을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0081] 본 발명의 또 다른 양태에서, 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하기 위한 시스템이 본원에서 제공된다. 상기 시스템은 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 표면; 및 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시스템은 복수의 분해된 반응기 캡들을 제1 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하여 제1 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적인 밀봉을 형성함으로써, 제1 표면 상의 좌위들을 각각의 반응기 캡과 회합된 반응기 내로 2개 이상의 좌위들의 군들로 물리적으로 나눈다. 일부 실시양태들에서, 각각의 반응기는 제1 시약 세트를 보유한다.

[0082] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하기 위한 시스템들 중 임의의 시스템과 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 표면으로부터의 이형 시, 반응기 캡은 제1 시약 세트의 적어도 일부를 보유한다. 일부 실

시양태들에서, 상기 일부는 약 30%이다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 90%이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 ㎟당 1 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 ㎟당 10 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 ㎟당 100 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 상기 시스템은 ㎟당 0.1 이상의 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 시스템은 ㎟당 1 이상의 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 시스템은 ㎟당 10 이상의 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 추가로 포함한다.

[0083] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하기 위한 시스템들 중 임의의 시스템과 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 표면의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 또는 제2 표면에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1.45 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1.25 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 μm^2의 평평한 표면적당 1 μm^2 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 0.001 $\mu m/\mu m^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 0.01 $\mu m/\mu m^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 높은 에너지 표면을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면 및 제2 표면은 주어진 액체와의 상이한 표면 장력을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 높은 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 기판 상에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 캡핑 요소는 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0084] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인클로저들의 어레이도 제공한다. 상기 인클로저들의 어레이는 반응기 캡을 포함하는 제1 기판 및 제2 기판을 포함하는 복수의 분해된 반응기들; 및 각각의 반응기 내의 2개 이상의 분해된 좌위들을 포함한다. 일부 경우, 분해된 반응기들은 분리가능한 밀봉으로 분리되어 있다. 일부 경우, 반응기 캡은 제2 기판이 제1 기판으로부터 이형될 때 반응기의 내용물의 적어도 일부를 보유한다. 일부 실시양태들에서, 제2 기판 상의 반응기 캡은 ㎟당 0.1 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제2 기판 상의 반응기 캡은 ㎟당 1 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제2 기판 상의 반응기 캡은 ㎟당 10 이상의 밀도를 가진다.

[0085] 본원에서 제공된 인클로저들의 어레이와 관련된 일부 실시양태들에서, 반응기 캡은 반응기의 내용물의 30% 이상을 보유한다. 일부 실시양태들에서, 반응기 캡은 반응기의 내용물의 90% 이상을 보유한다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 2/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 5개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 20개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 50개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 인클로저들의 어레이는 각각의 반응기에서 100개 이상의 분해된 좌위들을 추가로 포함한다.

[0086] 본원에 기재된 인클로저들의 어레이와 관련된 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 상기 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서,

채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도를 가진, 2개 이상의 채널들의 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 0.001 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도를 가진, 2개 이상의 채널들의 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 분해된 반응기들은 분리가능한 밀봉으로 분리되어 있다. 일부 실시양태들에서, 밀봉은 모세관 파열 밸브를 포함한다.

[0087] 본원에 기재된 인클로저들의 어레이와 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 기판의 복수의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 기판의 복수의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 또는 제2 표면에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1 $㎛^2$ 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.25 $㎛^2$ 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.45 $㎛^2$ 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 제1 기판의 복수의 분해된 좌위들은 높은 에너지 표면을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 기판과 제2 기판은 주어진 액체와의 상이한 표면 장력을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들 또는 반응기 캡들은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 기판 상에 위치한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0088] 또 다른 양태에서, 본 발명은 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 (a) 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 표면을 제공하는 단계; (b) 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소를 제공하는 단계; (c) 복수의 분해된 반응기 캡들을 제1 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하고 제1 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적인 밀봉을 형성함으로써 제1 표면 상의 좌위들을 2개 이상의 좌위들의 군으로 물리적으로 나누는 단계; (d) 제1 반응을 수행함으로써 제1 시약 세트를 형성하는 단계; 및 (e) 제1 표면으로부터 캡핑 요소를 이형시키는 단계를 포함하는데, 이때 각각의 반응기 캡은 제1 반응 부피로 제1 시약 세트의 적어도 일부를 보유한다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 30%이다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 90%이다.

[0089] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 (f) 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 제공하는 단계; (g) 복수의 분해된 반응기 캡들을 제2 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하고 제2 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적인 밀봉을 형성함으로써 제2 표면 상의 좌위들을 물리적으로 나누는 단계; (h) 제1 시약 세트의 일부를 사용하여 제2 반응을 수행함으로써 제2 시약 세트를 형성하는 단계; 및 (i) 제2 표면으로부터 캡핑 요소를 이형시키는 단계를 추가로 포함하는데, 이때 각각의 반응기 캡은 제2 반응 부피로 제2 시약 세트의 적어도 일부를 보유할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 30%이다. 일부 실시양태들에서, 상기 일부는 약 90%이다.

[0090] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 복수의 분해된 좌위들은 제1 표면 상에서 ㎟당 1 이상의 밀도를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제1 표면 상에서 ㎟당 10 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제1 표면 상에서 ㎟당 100 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 캡핑 요소 상에서 ㎟당 0.1 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 캡핑 요소 상에서 ㎟당 1 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 캡핑 요소 상에서 ㎟당 10 이상의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제2 표면 상에서 ㎟당 0.1 초과의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제2 표면 상에서 ㎟당 1 초과의 밀도를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 제2 표면 상에서 ㎟당 10 초과의 밀도를 가진다.

[0091] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 캡핑 요소를 표면으로부터 이형시키는 단계들, 예컨대, 본원에 기재된 (e) 및 (i)에서의 이형 단계들은 상이한 속도로 수행될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 분해된 좌위들은 제1 반응을 위한 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 표면의 분해된 좌위들은 제2 반응을 위한 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 또는 제2 표면에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클

레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1 ㎛^{2} 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.25 ㎛^{2} 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 표면적을 가진다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 25 bp 이상이다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 200 bp 이상이다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 300 bp 이상이다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 분해된 좌위들은 높은 에너지 표면을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면과 제2 표면은 주어진 액체와의 상이한 표면 장력을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다.

[0092] 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들 또는 분해된 반응기 캡들은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 기판 상에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 제1 반응 부피와 제2 반응 부피는 상이하다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 반응은 중합효소 순환 조립을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 반응은 효소적 유전자 합성, 어닐링 및 라이게이션 반응, 하이브리드 유전자를 통한 2개의 유전자들의 동시적인 합성, 숏건 라이게이션 및 공-라이게이션, 삽입 유전자 합성, DNA의 한 가닥을 통한 유전자 합성, 주형-유도된 라이게이션, 리가제 연쇄 반응, 마이크로어레이-매개된 유전자 합성, 고체-상 조립, 슬로닝 빌딩 블록 기술 또는 RNA 라이게이션-매개된 유전자 합성을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 캡핑 요소를 냉각시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 제1 표면을 냉각시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 방법은 제2 표면을 냉각시키는 단계를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0093] 또 다른 양태에서, 본 발명은 작용화된 표면을 가진 기판을 제공한다. 작용화된 표면을 가진 기판은 복수의 분해된 좌위들을 가진 고체 지지체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 고체 지지체의 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 마이크로채널 상에 위치한다.

[0094] 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판과 관련된 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 1 nl 미만의 부피를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.036 ㎛/제곱 ㎛의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.25 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들에서 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 기판에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 고체 지지체는 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0095] 또 다른 양태에서, 본 발명은 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 (a) 하나 이상의 잉크젯 펌프를 통해 제1 시약의 하나 이상의 점적을 복수의 좌위들 중 제1 좌위에 적용하는 단계; (b) 음압을 기판에 적용하는 단계; 및 (c) 하나 이상의 잉크젯 펌프를 통해 제2 시약의 하나 이상의 점적을 제1 좌위에 적용하는 단계를 포함한다.

[0096] 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중 임의의

방법을 실시함에 있어서, 제1 시약과 제2 시약은 상이할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 그의 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 상기 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 좌위들은 기판 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 상기 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 기판 표면은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다.

[0097] 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 제1 시약 및/또는 제2 시약의 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 상기 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 상기 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.25 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 작용화된 표면은 기판의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판 주위의 압력은 1 mTorr 미만까지 감소된다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0098] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 제1 점적으로부터 유래하는 하나 이상의 제1 빌딩 블록을 제1 좌위 상의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 빌딩 블록은 차단기를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 차단기는 산-불안정성 DMT를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 산-불안정성 DMT는 4,4'-디메톡시트리틸을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 산화 또는 황화를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 커플링되지 않은 올리고뉴클레오티드 쇄를 화학적으로 캡핑하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 차단기를 제거함으로써 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄를 탈차단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동안 기판의 위치는 커플링 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동안 기판의 위치는 산화 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동안 기판의 위치는 캡핑 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 음압 적용 동안 기판의 위치는 탈차단 단계 동안 기판의 위치의 10 cm 이내에 있다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 기판 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 산화 단계를 위한 하나 이상의 시약은 이 하나 이상의 시약을 포함하는 용액으로 마이크로구조물을 침수시킴으로써 제공된다. 일부 실시양태들에서, 캡핑 단계를 위한 하나 이상의 시약은 이 하나 이상의 시약을 포함하는 용액으로 마이크로구조물을 침수시킴으로써 제공된다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 기판 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재하고, 탈차단 단계를 위한 하나 이상의 시약은 이 하나 이상의 시약을 포함하는 용액으로 마이크로구조물을 침수시킴으로써 제공될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 상기 기판을 밀봉된 챔버 내에 봉입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 밀봉된 챔버는 제1 좌위로부터의 액체의 퍼징을 허용한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법은 제1 좌위에 작동가능하게 연결된 배출구를 통해 액체를 배출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 음압을 기판에 적용한 후, 기판 상의 수분 함량은 1 ppm 미만이다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응하도록 증가된다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0099] 또 다른 양태에서, 본 발명은 시약을 복수의 분해된 좌위들에 침착시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 잉크젯 펌프를 통해 제1 시약의 하나 이상의 점적을 복수의 좌위들 중 제1 좌위에 적용하는 단계; 및 잉크젯 펌프를 통해 제2 시약의 하나 이상의 점적을 복수의 분해된 좌위들 중 제2 좌위에 적용하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 좌위는 제1 좌위에 인접한다. 일부 실시양태들에서, 제1 시약과 제2 시약은 상이하다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위 및 제2 좌위는 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 100 ㎛ 초과의 깊이를 가진 하나 이상의 채널을 포함한다.

[0100] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같이 시약을 복수의 분해된 좌위들에 침착시키는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 2개 이상의 채널들은 상이한 길이를 가진 2개의 채널들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위는 0.1% 미만의 제2 시약을 수용하고, 제2 좌위는 0.1% 미만의 제1 시약을 수용한다. 일부 실시양태들에서, 좌위는 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 좌위는 0.001 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 좌위 및 제2 좌위는 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 기판에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 지지체 표면은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0101] 또 다른 양태에서, 본 발명은 마이크로플루이딕 시스템을 제공한다. 마이크로플루이딕 시스템은 ㎟당 10 이상의 밀도로 복수의 마이크로웰들을 가진 제1 표면; 및 상기 복수의 마이크로웰들 중 하나 내부의 액적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들 중 하나 내부의 액적은 약 1 내지 1000의 범위에서 레이놀즈 수를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 ㎟당 1 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 ㎟당 10 이상의 밀도로 존재한다.

[0102] 본원에서 제공된 마이크로플루이딕 시스템과 관련된 일부 실시양태들에서, 상기 마이크로플루이딕 시스템은 잉크젯 펌프를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 점적은 잉크젯 펌프에 의해 침착된다. 일부 실시양태들에서, 점적은 제1 마이크로웰 치수의 하부 절반에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 점적은 제1 마이크로웰 치수의 중간 3분의 1에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 ㎟당 100 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 제1 마이크로웰 치수는 점적보다 더 크다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들 각각은 하나 이상의 마이크로채널에 유체 연결된다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 마이크로채널은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 지지체 상에서 형성된다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/$㎛^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.25 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.45 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의

의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다. 일부 실시양태들에서, 점적은 올리고뉴클레오티드 합성을 가능하게 하는 시약을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체이다.

[0103] 또 다른 양태에서, 본 발명은 점적을 복수의 마이크로웰들에 침착시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 잉크젯 펌프를 통해 하나 이상의 점적을 복수의 마이크로웰들 중 제1 마이크로웰에 적용하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 복수의 마이크로웰들 중 하나 내부의 액적은 약 1 내지 1000의 범위에서 레이놀즈 수를 가진다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들은 1/㎟ 이상의 밀도를 가진다. 일부 경우, 복수의 마이크로웰들은 10/㎟ 이상의 밀도를 가진다.

[0104] 본원에서 제공된 바와 같이 점적을 복수의 마이크로웰들에 침착시키는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 복수의 마이크로웰은 100/㎟ 이상의 밀도를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 점적은 2 m/초 이상의 속도로 적용된다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 2 pl 이상이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 약 40 pl이다. 일부 실시양태들에서, 점적의 부피는 100 pl 이하이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로웰들 각각은 하나 이상의 마이크로채널에 유체 연결된다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 마이크로웰은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 지지체 상에서 형성된다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/$㎛^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.25 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.45 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰 내부의 액적은 마이크로웰의 중간 3분의 1에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로웰 내부의 액적은 마이크로웰의 하부 절반에서 이동한다. 일부 실시양태들에서, 점적은 올리고뉴클레오티드 합성을 가능하게 하는 시약을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약은 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0105] 또 다른 양태에서, 본 발명은 분할 방법도 제공한다. 분할 방법은 복수의 제1 분해된 좌위들에서 액체를 포함하는 제1 표면을 복수의 제2 분해된 좌위들을 포함하는 제2 표면과 접촉시키는 단계; 상기 액체의 원하는 분획이 복수의 제1 분해된 좌위들로부터 복수의 제2 분해된 좌위들에게 전달될 수 있도록 이형 속도를 결정하는 단계; 및 상기 속도로 제1 표면으로부터 제2 표면을 탈착시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면은 액체와의 제1 표면 장력을 포함하고, 제2 표면은 액체와의 제2 표면 장력을 포함할 수 있다.

[0106] 본원에서 제공된 바와 같은 분할 방법들 중 임의의 분할 방법을 실시함에 있어서, 제1 표면의 일부는 표면 장력을 증가시키는 모이어티로 코팅될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면의 표면 장력은 20도 미만의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 제2 표면의 표면 장력은 90도 초과의 물 접촉각에 상응한다. 일부 실시양태들에서, 제1 표면은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 0.01 ㎛/$㎛^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 0.001 ㎛/$㎛^2$ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 $㎛^2$의 평평한 표면적당 1.25 $㎛^2$ 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면

은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 제1 분해된 좌위들은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 제1 분해된 좌위들은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 표면은 액체의 적어도 일부를 보유하는 마이크로채널을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 표면은 액체의 적어도 일부를 보유하는 나노반응기를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 바와 같은 분할 방법은 제3 표면을 복수의 제3 분해된 좌위들과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 액체는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 원하는 분획은 30% 초과이다. 일부 실시양태들에서, 원하는 분획은 90% 초과이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0107] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 혼합 방법도 제공한다. 상기 방법은 (a) 그 내에 제작된 복수의 마이크로구조물들을 포함하는 제1 기판을 제공하는 단계; (b) 복수의 분해된 반응기 캡들을 포함하는 제2 기판을 제공하는 단계; (c) 복수의 제1 반응기 캡들이 제1 기판 내의 n개의 마이크로구조물들로부터 액체를 수용하도록 구성될 수 있게끔 제1 기판 및 제2 기판을 정렬하는 단계; 및 (d) 액체를 n개의 마이크로구조물들로부터 제1 반응기 캡 내로 전달함으로써 상기 n개의 마이크로구조물들로부터의 액체를 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함한다.

[0108] 본원에 기재된 혼합 방법들 중 임의의 혼합 방법을 실시함에 있어서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 0.1/㎟ 이상의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 10/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로구조물들 각각은 상이한 폭의 2개 이상의 채널들을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 100 ㎛보다 더 길다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 1000 ㎛보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 직경에서 50 ㎛보다 더 넓다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 직경에서 100 ㎛보다 더 좁다. 일부 실시양태들에서, 상기 채널들 중 하나 이상은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 상기 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, PDMS 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 고체 지지체 상에서 형성된다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.01 ㎛/제곱 ㎛ 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널은 0.001 ㎛/㎛^{2} 이상의 밀도로 공칭 아크길이의 둘레를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.25 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 모이어티로 코팅된 표면은 제1 표면의 1.0 ㎛^{2}의 평평한 표면적당 1.45 ㎛^{2} 이상의 공칭 표면적을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로구조물들은 시약의 코팅을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 표면에 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 1/㎟ 이상의 밀도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물은 100/㎟ 이상의 밀도로 존재한다.

[0109] 본원에 기재된 혼합 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 복수의 제1 반응기 캡들이 제1 기판 내의 n개의 마이크로구조물들로부터 액체를 수용하도록 구성될 수 있게끔 제1 기판 및 제2 기판을 정렬하는 단계인 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 100 ㎛ 미만의 갭이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 50 ㎛ 미만의 갭이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 20 ㎛ 미만의 갭이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 단계 (c) 후, 제1 기판과 제2 기판 사이에 10 ㎛ 미만의 갭이 존재한다. 일부 실시양태들에서, 혼합물은 갭 내로 부분적으로 퍼진다. 일부 실시양태들에서, 혼합 방법은 제1 기판과 제2 기판을 함께 더 가깝게 위치시킴으로써 상기 갭을 밀봉하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 2개의 채널들 중 하나는 20도 미만의 물 접촉각에 상응하는 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 코팅된다. 일부 실시양태들에서, 모이어티는 화학적 불활성 모이어티이다. 일부 실시양태들에서, 전달은 압력에 의해 수행된다. 일부 실시양태들에서, 혼합물의 부피는 반응기 캡의 부피보다 더 크다. 일부 실시양태들에서, 액체는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태들에서, n은 10 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 25 이상이다. 일부 실시양태들에서, 액체가 혼합되어 혼합물을 형성하는 마이크로구조물의 수인 n은 50 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, n은 75 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 100 이상이다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의

실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0110] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 뉴클레오티드 커플링에 적합한 화학적 모이어티로 작용화되어 있는 분해된 좌위들을 가진 기판을 제공하는 단계; 및 2개 이상의 빌딩 블록들의 커플링 사이에 기판을 수송하지 않으면서 좌위 특이적 예정된 서열에 따라 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시킴으로써 n개 염기쌍 길이를 가진 복수의 올리고뉴클레오티드들을 합성하는 단계를 포함한다.

[0111] 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 상기 방법은 시간당 12개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 15개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 20개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 시간당 25개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 2개 이상의 빌딩 블록들을 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/500 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/1000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 분해된 좌위는 1/2000 bp 미만의 오류율로 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어나는 n-머 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/500 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/1000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다. 일부 실시양태들에서, 기판 상의 복수의 올리고뉴클레오티드들은 1/2000 bp 미만의 오류율로 각각의 좌위 특이적 예정된 서열로부터 벗어난다.

[0112] 본원에 기재된 바와 같이 기판 상에서 n-머 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법과 관련된 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 아데닌, 구아닌, 타이민, 사이토신 또는 우리딘 기, 또는 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 디뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 포스포라미다이트를 포함한다. 일부 실시양태들에서, n은 100 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 200 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 300 이상이다. 일부 실시양태들에서, n은 400 이상이다. 일부 실시양태들에서, 기판은 100,000개 이상의 분해된 좌위들을 포함하고, 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드들 중 2개 이상은 서로 상이하다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 커플링 전에 기판을 진공 건조하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 빌딩 블록은 차단기를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 차단기는 산-불안정성 DMT를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 산-불안정성 DMT는 4,4'-디메톡시트리틸을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 산화 또는 황화를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 커플링되지 않은 올리고뉴클레오티드 쇄를 화학적으로 캡핑하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 차단기를 제거함으로써 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄를 탈차단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 10,000개 이상의 비아들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 100,000개 이상의 비아들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 1,000,000개 이상의 비아들을 포함한다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0113] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법도 제공한다. 상기 방법은 제1 시점에서 유전자 목록을 컴퓨터 판독가능한 비-일시적인 매체에 입력하는 단계로서, 이때 상기 목록이 100개 이상의 유전자들을 포함하고 상기 유전자들이 500 bp 이상인 단계; 상기 유전자 목록의 90% 초과의 유전자들을 합성함으로써 전달가능한 유전자들을 가진 유전자 라이브러리를 구축하는 단계; 상기 유전자 라이브러리를 대표하는 시퀀싱 라이브러리를 제조하는 단계; 서열 정보를 수득하는 단계; 서열 정보를 기초로 전달가능

한 유전자들의 적어도 서브세트를 선택하는 단계; 및 선택된 전달가능한 유전자를 제2 시점에서 전달하는 단계로서, 이때 제2 시점이 제1 시점으로부터 1개월 미만 만큼 떨어져 있는 것인 단계를 포함한다.

[0114] 본원에 기재된 바와 같이 유전자 라이브러리를 구축하는 방법들 중 임의의 방법을 실시함에 있어서, 서열 정보는 차세대 서열결정을 통해 수득될 수 있다. 서열 정보는 생거 서열결정에 의해 수득될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 제2 시점에서 하나 이상의 유전자를 전달하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 0.1% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 10% 이상만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 유전자들 중 하나 이상은 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리에서 각각의 유전자는 임의의 다른 유전자와 2개 이상의 염기쌍만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 오류를 포함하지 않는다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자는 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 90% 이상은 유전자 목록 내의 유전자의 서열로부터 벗어나는 서열의 생성을 초래하는 1/3000 미만의 오류율을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 전달가능한 유전자들의 서브세트는 함께 공유연결된다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 선택함으로써 유전자 목록을 구축하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오연료를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자 목록의 제1 서브세트는 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 성분을 코딩한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 500개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 5000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 목록은 10000개 이상의 유전자들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 1 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 2 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 유전자는 3 kb 이상이다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 25일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 5일 미만 만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 시점은 제1 시점으로부터 2일 미만 만큼 떨어져 있다. 본원에 기재된 실시양태들 중 임의의 실시양태는 본 발명에서 제공된 방법들, 디바이스들, 어레이들, 기판들 또는 시스템들 중 임의의 방법, 디바이스, 어레이, 기판 또는 시스템과 조합될 수 있다는 것이 인지된다.

[0115] 일부 실시양태들에서, 대향하는 표면들 사이에 m개 마이크로플루이딕 연결부들의 n개 군들을 포함하는 실질적으로 평평한 기판 부분을 포함하는, 핵산 합성을 위한 마이크로플루이딕 디바이스가 본원에서 제공되는데, 이때 n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각 하나는 제1 채널 및 제2 채널을 포함하고, 이때 n개 군들 각각에서 제1 채널은 모든 m개 마이크로플루이딕 연결부들에 공통되고, 복수의 마이크로플루이딕 연결부들은 기판의 가장 작은 치수를 따라 실질적으로 평평한 기판 부분에 걸쳐 있고, n 및 m은 2 이상이다. 일부 실시양태들에서, 제2 채널은 디바이스에의 올리고뉴클레오티드의 부착을 용이하게 할 수 있는 코팅으로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 디바이스는 n개 군들 중 k개 군들에서 제2 채널에 부착되는 제1 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, k는 1이다. 일부 실시양태들에서, 디바이스는 n개 군들 중 l개 군들에 부착되는 제2 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, l은 1이다. 일부 실시양태들에서, l개 군들에서 어느 군도 k개 군들에 존재하지 않는다.

[0116] 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 10개 이상의 뉴클레오티드, 25개 이상의 뉴클레오티드, 50개 이상의 뉴클레오티드, 75개 이상의 뉴클레오티드, 100개 이상의 뉴클레오티드, 125개 이상의 뉴클레오티드, 150개 이상의 뉴클레오티드 또는 200개 이상의 뉴클레오티드의 길이를 가진다.

[0117] 일부 실시양태들에서, 제1 올리고뉴클레오티드와 제2 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 뉴클레오티드, 3개 이상의 뉴클레오티드, 4개 이상의 뉴클레오티드, 5개 이상의 뉴클레오티드 또는 10개 이상의 뉴클레오티드에 의해 상이하다.

[0118] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들은 5 ㎜, 1.5 ㎜, 1.0 ㎜ 또는 0.5 ㎜ 이하의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널은 5 ㎜, 1.5 ㎜, 1.0 ㎜ 또는 0.5 ㎜ 이하의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널은 0.05 ㎜, 0.75 ㎜, 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜ 또는 0.4 ㎜ 이상의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널은 0.2 ㎜, 0.1 ㎜, 0.05 ㎜, 0.04 ㎜ 또는 0.03 ㎜ 이하의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로

플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널은 0.001 mm, 0.005 mm, 0.01 mm, 0.02 mm 또는 0.03 mm 이상의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널의 횡단면은 0.01 mm, 0.025 mm, 0.05 mm 또는 0.075 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, n개 군들 각각에서 제1 채널의 횡단면은 1 mm, 0.5 mm, 0.25 mm, 0.1 mm 또는 0.075 mm 이하이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널의 횡단면은 0.001 mm, 0.05 mm, 0.01 mm, 0.015 mm 또는 0.02 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널의 횡단면은 0.25 mm, 0.125 mm, 0.050 mm, 0.025 mm 또는 0.02 mm 이하이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들 각각에서 제2 채널의 횡단면에서의 표준 편차는 횡단면의 평균의 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1% 미만이다. 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 제2 채널의 90% 이상 내에서 횡단면에서의 편차는 25%, 20%, 15%, 10%, 5% 또는 1% 이하이다.

[0119] 일부 실시양태들에서, n은 10, 25, 50, 100, 1000 또는 10000 이상이다. 일부 실시양태들에서, m은 3, 4 또는 5 이상이다.

[0120] 일부 실시양태들에서, 기판은 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 실리콘을 포함한다.

[0121] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 제2 채널의 90% 이상은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티로 작용화된다. 일부 실시양태들에서, 표면 에너지는 75도, 50도, 30도 또는 20도 미만의 물 접촉각에 상응하는 수준까지 증가된다.

[0122] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 제2 채널의 90% 이상에 대한 종횡비는 1, 0.5 또는 0.3 미만이다. 일부 실시양태들에서, n개 군들에서 제1 채널의 90% 이상에 대한 종횡비는 0.5, 0.3 또는 0.2 미만이다.

[0123] 일부 실시양태들에서, n*m개 마이크로플루이딕 연결부들의 10%, 25%, 50%, 75%, 90% 또는 95% 이상의 총 길이는 실질적으로 평평한 기판의 가장 작은 치수의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% 또는 1000% 이내에 있다.

[0124] 일부 실시양태들에서, 디바이스의 실질적으로 평평한 부분은 SOI 웨이퍼로부터 제작된다.

[0125] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 핵산 증폭 방법에 관한 것이다: (a) 상이한 표적 서열을 각각 포함하는 n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 상의 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열에 혼성화될 수 있는 제1 어댑터를 제공하는 단계; (c) m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 주형으로서 사용하여 제1 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공함으로써 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 생성하는 단계로서, 이때 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들 각각이 그의 주형으로부터의 표적 서열의 복수의 복제물들을 포함하는 것인 단계; (d) 제1 어댑터에 혼성화될 수 있는 제1 보조 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계; 및 (e) 제1 물질이 복수의 절단 부위들에서 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 절단하기에 적합한 조건 하에서 제1 물질을 제공함으로써 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 내의 표적 서열의 복수의 단일 가닥 복제물들을 생성하는 단계. 일부 실시양태들에서, n 또는 m은 2 이상이다. 일부 실시양태들에서, n 또는 m은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 또는 500 이상이다. 일부 실시양태들에서, m은 n 미만이다. 일부 실시양태들에서, n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 포함하는 샘플은 상이한 표적 서열들 중 하나를 각각 포함하는 n개 이상의 선형 단일 가닥 핵산들을 제공하고 n개의 선형 단일 가닥 핵산들을 환형화하여 n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 생성함으로써 형성된다. 일부 실시양태들에서, 제1 어댑터는 n개의 선형 단일 가닥 핵산들의 양 말단들에 동시에 혼성화될 수 있다. 일부 실시양태들에서, n개의 선형 단일 가닥 핵산들에서 상이한 표적 서열들은 제1 어댑터 혼성화 서열 및 제2 어댑터 혼성화 서열에 의해 플랭킹된다. 일부 실시양태들에서, n개 이상의 선형 단일 가닥 핵산들은 드 노보 올리고뉴클레오티드 합성에 의해 생성된다. 일부 실시양태들에서, n개의 선형 단일 가닥 핵산들 각각에서 제1 어댑터 혼성화 서열은 2개 이하의 뉴클레오티드 염기만큼 상이하다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 어댑터 혼성화 서열은 5개 이상의 뉴클레오티드 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제1 또는 제2 어댑터 혼성화 서열은 75개, 50개, 45개, 40개, 35개, 30개 또는 25개 이하의 뉴클레오티드 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제1 어댑터가 선형 단일 가닥 핵산들의 양 말단들에 동시에 혼성화될 때 n개의 선형 단일 가닥 핵산들의 말단은 제1 어댑터 상의 인접한 염기들과 쌍을 형성한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들은 어댑터 혼성화 서열이 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산 복제물들의 나머지 서열 부분의 5% 이상으로부터 잘려지도록 위치한다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열 이외의 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산 복제물들의 서열의 5% 이상은 절단되지 않은 상태로 남아있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들은 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열 외부에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들의 위치는 표적

서열과 무관하다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들의 위치는 제1 어댑터 또는 제1 보조 올리고뉴클레오티드의 서열 내의 하나 이상의 서열 요소에 의해 결정된다. 일부 실시양태들에서, 상기 서열 요소는 제한 엔도뉴클레아제를 위한 인식 부위를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 보조 올리고뉴클레오티드 또는 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드는 IIS형 제한 엔도뉴클레아제를 위한 인식 부위를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 인식 부위는 절단 부위로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 뉴클레오티드만큼 떨어져 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 절단 부위들은 단일 가닥 핵산과 이중 가닥 핵산의 연접부에 위치한다. 일부 실시양태들에서, 이중 가닥 핵산은 제1 어댑터 및 제1 보조 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 단일 가닥 핵산은 본질적으로 m개의 상이한 표적 서열들로 구성된다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 95% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 90% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 80% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 상이한 표적 서열들은 50% 이하의 쌍별 유사성을 가진다. 일부 실시양태들에서, m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산의 생성은 단일 치환 증폭을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 보조 올리고뉴클레오티드는 친화성 태그를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 친화성 태그는 바이오틴 또는 바이오틴 유도체를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 샘플로부터 이중 가닥 핵산을 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 단리는 친화성 정제, 크로마토그래피 또는 겔 정제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 2개 이상의 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 IIS형 제한 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 닉킹 엔도뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 2개 이상의 닉킹 엔도뉴클레아제들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI 및 Nt.BspQI, 및 이들의 변이체들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 상기 나열된 제1 물질들 및 변이체들 중 임의의 제1 물질 또는 변이체와 본질적으로 동일한 기능을 포함하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 인식 서열을 인식하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 절단 부위에서 절단한다. 일부 실시양태들에서, 2개 이상의 제한 효소들은 MlyI 및 BciVI, 또는 BfuCI 및 MlyI를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 (a) 샘플을 복수의 분획들로 분할하는 단계; (b) n개의 상이한 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 k개의 상이한 환형화된 단일 가닥 핵산들 상의 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열에 혼성화될 수 있는 제2 어댑터를 가진 하나 이상의 분획을 제공하는 단계; (c) k개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 주형으로서 사용하여 제2 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공하여 k개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 생성하는 단계로서, 이때 제2 단일 가닥 앰플리콘 핵산이 그의 주형으로부터의 표적 서열의 복수의 복제물들을 포함하는 것인 단계; (d) 제2 어댑터에 혼성화될 수 있는 제2 보조 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계; 및 (e) 제2 물질이 복수의 제2 절단 부위들에서 k개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 절단하기에 적합한 조건 하에서 제2 물질을 제공함으로써, k개의 환형화된 단일 가닥 핵산 내의 표적 서열의 복수의 단일 가닥 복제물들을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제1 어댑터와 제2 어댑터는 동일하다. 일부 실시양태들에서, 제1 보조 올리고뉴클레오티드와 제2 보조 올리고뉴클레오티드는 동일하다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질과 제2 물질은 동일하다. 일부 실시양태들에서, k + m은 n 미만이다. 일부 실시양태들에서, k는 2 이상이다. 일부 실시양태들에서, n개의 환형화된 단일 가닥 핵산을 포함하는 샘플은 단일 가닥 핵산 증폭에 의해 형성된다. 일부 실시양태들에서, 단일 가닥 핵산 증폭은 (a) m개 이상의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들에 혼성화될 수 있는 제1 전구체 어댑터를 제공하는 단계; (c) m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산들을 주형으로서 사용하여 제1 전구체 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공함으로써 m개의 단일 가닥 전구체 앰플리콘 핵산을 생성하는 단계로서, 이때 상기 단일 가닥 앰플리콘 핵산이 m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산의 복수의 복제물들을 포함하는 것인 단계; (d) 제1 전구체 어댑터에 혼성화될 수 있는 제1 전구체 보조 올리고뉴클레오티드를 제공하는 단계; 및 (e) 제1 전구체 물질이 복수의 절단 부위들에서 제1 단일 가닥 전구체 앰플리콘 핵산을 절단하기에 적합한 조건 하에서 제1 전구체 물질을 제공함으로써 m개의 선형 전구체 핵산들을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 상기 방법은 m개의 선형 전구체 핵산들을 환형화

하여 m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산의 복제물을 형성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, m개의 환형화된 단일 가닥 전구체 핵산은 단일 가닥 복제물에서 10배, 100배, 250배, 500배, 750배, 1000배, 1500배, 2000배, 3000배, 4000배, 5000배 또는 10000배 이상만큼 증폭된다. 일부 실시양태들에서, m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 하나 이상은 약 100 nM, 10 nM, 1 nM, 50 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM 또는 1 fM 이하의 농도로 존재한다. 일부 실시양태들에서, 환형화는 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 라이게이션은 T4 DNA 리가제, T3 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, 이. 콜라이 DNA 리가제, Taq DNA 리가제 및 9N DNA 리가제로 구성된 군으로부터 선택된 리가제의 사용을 포함한다.

[0126] 추가 양태에서, 다양한 실시양태들에서 본 발명은 (a) 제1 어댑터; (b) 상기 어댑터에 혼성화될 수 있는 제1 보조 올리고뉴클레오티드; (c) 리가제; 및 (d) MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI 및 Nt.BspQI, 및 이들의 변이체들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소를 포함하는 제1 절단제를 포함하는 키트에 관한 것이다. 일부 실시양태들에서, 제1 물질은 상기 나열된 제1 물질들 및 변이체들 중 임의의 제1 물질 또는 변이체와 본질적으로 동일한 기능을 포함하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 인식 서열을 인식하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 절단 부위에서 절단한다. 일부 실시양태들에서, 상기 키트는 제2 절단제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 절단제는 MlyI, SchI, AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI, LguI, BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI, Psp6I, MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI, BscCI, NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, Hin1II, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI, TseFI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I, UbaPI, Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI 및 Nt.BspQI, 및 이들의 변이체들로 구성된 군으로부터 선택된 효소를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 물질은 상기 나열된 제2 물질들 및 변이체들 중 임의의 제2 물질 또는 변이체와 본질적으로 동일한 기능을 포함하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 인식 서열을 인식하거나, 동일한 또는 본질적으로 동일한 절단 부위에서 절단한다. 일부 실시양태들에서, 제1 절단제는 MlyI를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 제2 절단제는 BciVI 또는 BfuCI를 포함한다.

[0127] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 핵산 증폭 방법에 관한 것이다: (a) 상이한 표적 서열을 각각 포함하는 n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 포함하는 샘플을 제공하는 단계; (b) n개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 중 m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 상의 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열에 혼성화될 수 있는 제1 어댑터를 제공하는 단계; (c) m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들을 주형으로서 사용하여 제1 어댑터를 연장시키기에 적합한 조건을 제공함으로써 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 생성하는 단계로서, 이때 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들 각각이 그의 주형으로부터의 표적 서열의 복수의 복제물들을 포함하는 것인 단계; (d) m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들 상에서 제1 물질에 대한 이중 가닥 인식 부위를 생성하는 단계; 및 (e) 제1 물질이 복수의 절단 부위들에서 m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들을 절단하기에 적합한 조건 하에서 제1 물질을 제공함으로써, m개의 환형화된 단일 가닥 핵산들 내의 표적 서열의 복수의 단일 가닥 복제물들을 생성하는 단계. 일부 실시양태들에서, 이중 가닥 인식 부위는 이중 가닥 인식 부위의 제1 가닥 상의 제1 어댑터의 제1 부분, 및 이중 가닥 인식 부위의 제2 가닥 상의 제1 어댑터의 제2 가닥을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 어댑터는 회문식 서열을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 이중 가닥 인식 부위는 제1 어댑터의 제1 부분과 제2 부분을 서로 혼성화시킴으로써 생성된다. 일부 실시양태들에서, m개의 단일 가닥 앰플리콘 핵산들은 복수의 이중 가닥 자가-혼성화된 영역들을 포함한다.

[0128] 추가 양태에서, 본 발명은 긴 핵산 분자를 생성하는 방법으로서, (a) 표면 상에 고정화된 복수의 핵산들을 제공하는 단계로서, 이때 상기 복수의 핵산들이 중첩되는 상보적 서열들을 가진 핵산을 포함하는 것인 단계; (b) 상기 복수의 핵산들을 용액 내로 방출시키는 단계; 및 (c) i) 복수의 혼성화된 핵산들을 형성하기 위한 상기 중첩

되는 상보적 서열들의 혼성화, 및 ii) 긴 핵산 분자를 합성하기 위한 상기 혼성화된 핵산의 연장 또는 라이게이션을 촉진하는 조건을 제공하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0129] 또 다른 양태에서, 본 발명은 화학 종을 포함하는 마이크로점적을 기판 상에 분무하기 위한 잉크젯 프린트헤드; 프린트헤드에 인접한 기판을 스캐닝하여 상기 마이크로점적을 특정된 부위에서 선택적으로 침착시키기 위한 스캐닝 수송기; 기판을 하나 이상의 선택된 유체에 노출시킴으로써 마이크로점적이 침착되어 있는 기판을 처리하기 위한 유동셀; 및 기판이 침착을 위해 프린트헤드에 인접하여 위치할 때마다 프린트헤드를 기준으로 기판을 정확히 정렬하기 위한 정렬 유닛을 포함하고, 유동셀에서의 처리를 위해 프린트헤드와 유동셀 사이에서 기판을 이동시키기 위한 처리 수송기를 포함하지 않는, 하나 이상의 기판을 프로세싱할 수 있는 자동화된 시스템으로서, 이때 상기 처리 수송기 및 상기 스캐닝 수송기가 상이한 요소인 자동화된 시스템에 관한 것이다.

[0130] 또 다른 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 기판을 프로세싱할 수 있고, 뉴클레오시드 또는 활성화된 뉴클레오시드를 포함하는 용액을 기판 상에 분무하기 위한 잉크젯 프린트헤드; 프린트헤드에 인접한 기판을 스캐닝하여 뉴클레오시드를 특정된 부위에서 선택적으로 침착시키기 위한 스캐닝 수송기; 기판을 하나 이상의 선택된 유체에 노출시킴으로써 단량체가 침착되어 있는 기판을 처리하기 위한 유동셀; 및 기판이 침착을 위해 프린트헤드에 인접하여 위치할 때마다 프린트헤드를 기준으로 기판을 정확히 정렬하기 위한 정렬 유닛을 포함하고, 유동셀에서의 처리를 위해 프린트헤드와 유동셀 사이에서 기판을 이동시키기 위한 처리 수송기를 포함하지 않는, 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 자동화된 시스템으로서, 이때 상기 처리 수송기 및 상기 스캐닝 수송기가 상이한 요소인 자동화된 시스템에 관한 것이다.

[0131] 추가 양태에서, 본 발명은 화학 종을 포함하는 마이크로점적을 기판 상에 분무하기 위한 잉크젯 프린트헤드; 프린트헤드에 인접한 기판을 스캐닝하여 상기 마이크로점적을 특정된 부위에서 선택적으로 침착시키기 위한 스캐닝 수송기; 기판을 하나 이상의 선택된 유체에 노출시킴으로써 마이크로점적이 침착되어 있는 기판을 처리하기 위한 유동셀; 및 기판이 침착을 위해 프린트헤드에 인접하여 위치할 때마다 프린트헤드를 기준으로 기판을 정확히 정렬하기 위한 정렬 유닛을 포함하는 자동화된 시스템으로서, 유동셀에서의 처리를 위해 프린트헤드와 유동셀 사이에서 기판을 이동시키기 위한 처리 수송기를 포함하지 않는 자동화된 시스템에 관한 것이다.

[0132] 전술된 내용을 유념하면서, 도 1 및 2에서 조성물, 시스템 및 방법으로 구현된 본 발명을 예시 목적으로 보여주는 도면을 보다 더 구체적으로 참조한다. 상기 방법, 시스템 및 조성물이 본 발명의 다양한 실시양태들에서 배열 및 개별 부분의 세부사항 면에서 변경될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 또한, 상기 방법은 사건 또는 행위의 세부사항 및 순서 면에서 변경될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 본 발명은 주로 핵산, 특히 DNA 올리고머 및 폴리뉴클레오티드와의 사용 면에서 기재된다. 그러나, 본 발명은 RNA 또는 다른 핵산, 펩티드, 단백질, 또는 관심있는 다른 분자를 비롯한 다양한 상이한 유형의 분자들과 함께 사용될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 이들 관심있는 보다 더 큰 분자들 각각에 대한 적합한 빌딩 블록은 당분야에서 공지되어 있다.

[0133] 본 발명은 핵산, 폴리펩티드, 단백질 및 이들의 조합을 비롯한 관심있는 분자들의 라이브러리의 제조 및 합성에 유용한 조성물, 시스템 및 방법을 제공한다. 다양한 실시양태들에서, 본 발명은 마이크로리터, 나노리터 또는 피코리터 규모 반응들을 동시에 수행하기 위한 정적 웨이퍼 및 동적 웨이퍼, 예를 들면, 실리콘 기판으로부터 제작된 정적 웨이퍼 및 동적 웨이퍼의 사용을 고려한다. 추가로, 동일한 사항이 분리된 부피의 복수의 반응들을 연결하는 것을 허용하도록 동시에 유체의 마이크로리터, 나노리터 또는 피코리터 조작에 적용될 수 있다. 유체의 조작은 유동, 조합, 혼합, 분획화, 점적의 생성, 가열, 응축, 증발, 밀봉, 계층화, 가압, 건조, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 유체 조작을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 웨이퍼는 표면 내에 구축된, 유체 조작을 위한 구조물을 제공한다. 다양한 모양 및 크기의 특징부가 웨이퍼 기판 내부에 또는 웨이퍼 기판을 통해 구조화될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 생물학적 분자의 합성을 위해 본원에 더 상세히 예시된 구체적으로 구조화된 디바이스를 이용한다. 구체적으로, 본 발명은 반응 조건, 예컨대, 시간, 용량 및 온도를 정밀하게 조절함으로써, 예를 들면, 표준 포스포라미다이트 화학반응 및 적합한 유전자 조립 기법을 이용하여 긴 고품질 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드를 포함하는 큰 고밀도 라이브러리의 드 노보 합성을 제공한다.

[0134] 지금부터 도 1c를 참조하건대, 다양한 실시양태들에서 본 발명은 유체 조작을 위한 하나 이상의 정적 또는 동적 웨이퍼의 사용을 예상한다. 상기 웨이퍼는 본원에 더 기재된 다수의 적합한 물질들, 예를 들면, 실리콘으로부터 구축될 수 있다. 나노반응기 웨이퍼는 복수의 특징부에서 액체를 수용하고 보유하도록 구성될 수 있다. 추가 웨이퍼, 예를 들면, 제자리(in situ) 합성 반응을 위해 사용되는 웨이퍼를 나노반응기 웨이퍼와 접촉시켜 액체를 수집할 수 있고/있거나 혼합할 수 있다. 나노반응기는 복수의 추가 웨이퍼들로부터 액체를 수집할 수 있다. 전

형적으로, 나노반응기 웨이퍼가 접촉될 때, 나노반응기는 추가 웨이퍼 상의 하나 이상의 분해된 좌위와 정렬된다. 시약 및 용매가 접촉 전에 나노반응기 내에 제공될 수 있다. 대안적으로, 나노반응기는 추가 웨이퍼와 접촉하기 전에 빈 상태일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 나노반응기는 DNA 합성 웨이퍼의 하나 이상의 분해된 좌위에서 합성된 올리고뉴클레오티드들을 수집한다. 이 올리고뉴클레오티드들은 나노반응기 내에서 보다 더 긴 유전자로 조립될 수 있다. 나노반응기는 추가 웨이퍼의 정렬 및 접촉 시 임의의 적합한 수단, 예를 들면, 모세관 파열 밸브, 압력, 접착제, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 밀봉 수단에 의해 밀봉될 수 있다. 밀봉은 분리될 수 있다. 나노반응기 웨이퍼 내에서의 반응은 밀봉된 부피로 수행될 수 있고, 예를 들면, PCR 또는 PCA에서 적용된 바와 같은 온도 순환을 포함할 수 있다. 등온 반응, 예컨대, 등온 증폭도 본 발명의 범위 내에 있다. DNA 합성 웨이퍼는 정밀한 조절로 표면 상의 또는 내부의 분해된 좌위들에서 올리고뉴클레오티드의 제자리 합성을 수행하도록 구성될 수 있다. 잉크젯 프린트헤드를 이용하여 합성, 예를 들면, 표준 포스포라미다이트 합성을 위한 시약의 점적을 합성 웨이퍼의 분해된 좌위들 상에 전달할 수 있다. 복수의 분해된 좌위들에 공통된 다른 시약은 대량으로 상기 좌위들을 통과할 수 있다. 일부 실시양태들에서, DNA 합성 웨이퍼는 본원의 다른 부분에 더 기재된 바와 같이 DNA 올리고뉴클레오티드 이외의 분자의 제자리 합성을 위한 합성 웨이퍼로 대체된다. 따라서, 본 발명은 반응 조건의 정밀한 조절을 통해 복수의 작은 부피로 고품질을 가진 올리고뉴클레오티드 및 긴 유전자의 큰 라이브러리를 신속히 합성하는 것을 예상한다. 본 발명의 추가 이점은 당분야에서 공지되어 있는 전통적인 합성 방법에 비해 감소된 시약 사용이다.

[0135] 낮은 오류율로 유전자 라이브러리를 드 노보 합성하기 위해 다양한 방법들이 고려된다. 도 2는 긴 서열을 가진 큰 고품질 유전자 라이브러리들을 동시에 합성하기 위한 본 발명의 방법 및 조성물의 예시적 적용을 보여준다. 다양한 실시양태들에서, 정적 웨이퍼 및 동적 웨이퍼는 공정 흐름에서 복수의 반응들을 가능하게 한다. 예를 들면, 전형적으로 DNA 합성 웨이퍼 상에서의 제자리 올리고뉴클레오티드 합성에 이어서, 합성된 올리고뉴클레오티드의 유전자 조립 반응, 예컨대, 중합효소 순환 조립(PCA)을 수행하여 보다 더 긴 서열로 조립할 수 있다. 조립된 서열은 예를 들면, PCR을 통해 증폭될 수 있다. 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 적합한 오류 보정 반응을 이용하여 표적 서열로부터 벗어나는 조립된 서열의 수를 최소화할 수 있다. 시퀀싱 라이브러리를 구축할 수 있고, 서열결정, 예컨대, 차세대 서열결정(NGS)을 위해 생성물의 분획을 분취할 수 있다.

[0136] 도 2에 예시된 유전자 합성 공정은 요청자의 요구에 따라 조절될 수 있다. 초기 서열결정 단계, 예를 들면, NGS로부터 수득된 결과에 따라, 허용가능한 오류율을 가진, 예를 들면, 플레이트 상의 조립된 유전자는 요청자에게 운반될 수 있다(도 2b). 대안적 오류 역치가 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 바와 같이 설정될 수 있지만, 본 발명의 방법 및 조성물은 약 1/10 kb 미만의 오류율이 용이하게 달성될 수 있게 한다. 보다 더 높은 순도를 달성하기 위해, 드 노보 합성된/조립된 서열을 단일 콜로니로부터 클로닝 정제할 수 있다. 서열결정, 예를 들면, NGS를 통해 정확한 원하는 서열의 정체를 시험할 수 있다. 임의적으로, 서열결정 정보의 정확성에 대한 보다 더 높은 신뢰도는 예를 들면, 또 다른 서열결정 방법, 예컨대, 생거 서열결정을 통해 수득될 수 있다. 예를 들면, 플레이트 상의 검증된 서열은 요청자에게 운반될 수 있다(도 2c). 시퀀싱 라이브러리 생성 방법은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있다.

[0137] **기판/웨이퍼**

[0138] 한 양태에서, 본원에 기재된 방법들 중 임의의 방법에 의해 제조된 작용화된 표면을 가진 기판, 및 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 기판은 복수의 분해된 좌위들을 가진 고체 지지체를 포함할 수 있다. 복수의 분해된 좌위들은 임의의 형상, 배향 또는 조직구성을 가질 수 있다. 분해된 좌위들은 임의의 규모(예를 들면, 마이크로 규모 또는 나노 규모)로 존재할 수 있거나, 기판 표면 내에 제작된 마이크로구조물을 함유할 수 있다. 분해된 좌위들은 하나 이상의 차원을 가진 마이크로채널 상에 위치할 수 있다. 기판의 개별 분해된 좌위들은 서로 유체 연결되어 있지 않을 수 있고, 예를 들면, 제1 올리고뉴클레오티드의 합성을 위한 제1 분해된 좌위는 기판의 2개 표면들 사이의 제1 비아 상에 존재할 수 있고, 제2 올리고뉴클레오티드의 합성을 위한 제2 분해된 좌위는 기판의 2개 표면들 사이의 제2 비아 상에 존재할 수 있고, 제1 비아 및 제2 비아는 기판 내에서 유체 연결되어 있지 않으나, 기판의 동일한 2개 표면들로부터 출발하고 종결한다. 일부 경우, 분리된 좌우들의 마이크로구조물은 2-D 또는 3-D의 마이크로채널 또는 마이크로웰일 수 있다. "3-D" 마이크로채널은 마이크로채널의 캐비티(cavity)가 고체 지지체 내에서 서로 연결될 수 있거나 확장될 수 있다는 것을 의미한다. 마이크로채널 또는 마이크로웰 내에는 임의의 형상, 배향 또는 조직구성을 가진 이차 마이크로구조물 또는 특징부가 존재할 수 있다. 이차 특징부의 표면은 이차 특징부의 표면의 표면 에너지를 감소시킬 수 있는 모이어티로 작용화될 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 합성하기 위한 시약의 점적은 마이크로채널 또는 마이크로웰 내에 침착될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 마이크로웰은 액체를 보유할 수

있는 마이크로플루이딕 규모의 구조물을 지칭한다. 다양한 실시양태들에서, 마이크로웰은 각각의 말단 상의 유체 개구를 통해 상부 말단과 하부 말단 사이에 유체 유동을 허용하므로 마이크로채널처럼 작용한다. 이 상황에서, 용어 마이크로웰과 마이크로채널은 본 명세서 전체에서 상호교환적으로 사용된다.

[0139] 도 3은 제1 기판 및 임의적으로 본원에 기재된 제2 기판을 포함하는, 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 시스템의 일례를 보여준다. 잉크젯 프린터 프린트헤드는 제1 기판의 위치에 대해 X-Y 방향으로 이동할 수 있다. 제2 기판은 Z 방향으로 이동하여 제1 기판과 밀봉됨으로써 분해된 반응기를 형성할 수 있다. 합성된 올리고뉴클레오티드는 제1 기판으로부터 제2 기판에게 전달될 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 올리고뉴클레오티드 조립을 위한 시스템에 관한 것이기도 하다. 올리고뉴클레오티드 조립을 위한 시스템은 웨이퍼 취급을 위한 시스템을 포함할 수 있다. 도 4는 본 발명의 다양한 실시양태들에 따라 기판의 배치 디자인에 대한 일례를 보여준다. 기판은 복수의 마이크로웰들을 포함할 수 있고, 마이크로웰들은 균일한 피치(pitch), 예를 들면, 1.5 ㎜ 피치 상에서 정렬될 수 있다. 대안적으로, 다수의 피치들은 배치의 상이한 방향으로 선별될 수 있고, 마이크로구조물의 줄(row)은 제1 피치에 의해 정해질 수 있고, 각각의 줄 내에서 마이크로구조물은 제2 피치에 의해 분리될 수 있다. 피치는 임의의 적합한 크기, 예를 들면, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.5, 4, 4.5 또는 5 ㎜를 포함할 수 있다. 임의의 적합한 치수, 예를 들면, 도 4에 예시된 바와 같이 80 ㎛의 직경, 또는 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 또는 500 ㎛를 포함하는 임의의 적합한 직경을 가진 마이크로웰들을 디자인할 수 있고, 상기 마이크로웰들을 복수의 보다 더 작은 마이크로웰들에 연결할 수 있다. 보다 더 작은 마이크로웰들의 표면을 예를 들면, 고에너지 표면 작용화를 통해 선택된 영역에서 작용화하여, 시약의 액체가 내부로 유동하는 것을 용이하게 할 수 있다. 도 4에 예시된 바와 같이, 보다 더 작은 마이크로웰들의 직경은 약 20 ㎛, 또는 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 또는 80 ㎛를 포함하는 임의의 적합한 직경일 수 있다. 도 5는 시약의 점적이 잉크젯 프린터에 의해 마이크로웰 내에 침착되는 경우를 보여준다. 액체 점적은 보다 더 작은 마이크로웰들 상에서 퍼져 이 마이크로웰들을 채울 수 있는데, 이것은 일부 경우 인접 표면에 비해 상기 마이크로웰의 표면의 고에너지 표면 변경에 의해 용이해질 수 있다.

[0140] 작용화된 표면을 가진 기판 상에서 고밀도의 분해된 좌위들을 갖는 것은 작은 디바이스를 갖고/갖거나, 작은 디바이스로 다수의 분자들을 합성하고/하거나, 다수의 상이한 분자들을 합성하는 데에 바람직할 수 있다. 기판의 작용화된 표면은 임의의 적합한 밀도(예를 들면, 합성될 총 상이한 올리고뉴클레오티드들의 수가 주어졌거나, 합성 공정을 위한 시간의 양이 주어졌거나, 올리고뉴클레오티드, 유전자 또는 라이브러리당 비용이 주어졌을 때 올리고뉴클레오티드를 합성하기에 적합한 밀도)의 분해된 좌위들을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표면은 1 ㎟당 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 약 50개, 약 75개, 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 900개, 약 1000개, 약 1500개, 약 2000개, 약 3000개, 약 4000개, 약 5000개, 약 6000개, 약 7000개, 약 8000개, 약 9000개, 약 10000개, 약 20000개, 약 40000개, 약 60000개, 약 80000개, 약 100000개 또는 약 500000개 부위의 밀도로 분해된 좌위들을 가진다. 일부 실시양태들에서, 표면은 1 ㎟당 약 50개 이상, 약 75개 이상, 약 100개 이상, 약 200개 이상, 약 300개 이상, 약 400개 이상, 약 500개 이상, 약 600개 이상, 약 700개 이상, 약 800개 이상, 약 900개 이상, 약 1000개 이상, 약 1500개 이상, 약 2000개 이상, 약 3000개 이상, 약 4000개 이상, 약 5000개 이상, 약 6000개 이상, 약 7000개 이상, 약 8000개 이상, 약 9000개 이상, 약 10000개 이상, 약 20000개 이상, 약 40000개 이상, 약 60000개 이상, 약 80000개 이상, 약 100000개 이상 또는 약 500000개 이상의 부위의 밀도로 분해된 좌위들을 가진다. 기판 상의 분해된 좌위들은 임의의 상이한 조직구성을 가질 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않지만, 분해된 좌위들은 가깝게 인접하여 밀집되어 하나 이상의 원형 영역, 직사각형 영역, 타원형 영역, 불규칙한 영역 등을 형성할 수 있다. 한 양태에서, 분해된 좌위들은 조밀하게 팩킹되고 낮은 양으로 교차-오염을 갖거나 교차-오염을 전혀 갖지 않는다(예를 들면, 1개의 분해된 좌위 내에 침착되는 시약의 점적은 또 다른 가장 가까운 분해된 좌위 내에 침착되는 시약의 점적과 실질적으로 혼합되지 않을 것이다). 기판 상의 분해된 좌위들의 조직구성은 각각의 하위영역 또는 전체 영역이 함께 덮여져 밀봉된 캐비티에서 조절된 습도, 압력 또는 기체 함량을 가진 밀봉된 캐비티를 생성할 수 있게 함으로써, 상기 각각의 하위영역 또는 전체 영역이 유체 연결된 조건 하에서 허용된 습도, 압력 또는 기체 함량과 동일한 습도, 압력 또는 기체 함량, 또는 실질적으로 유사한 습도, 압력 또는 기체 함량을 가질 수 있도록 디자인될 수 있다. 기판 상의 분해된 좌위들에 대한 상이한 디자인들의 일부 예들은 도 6에 제시되어 있다. 예를 들면, 도 6b의 b는 홀들(Holes)의 어레이로서 지칭된 배치의 디자인이고; 도 6b의 c는 플로워

(Flowers)로서 지칭된 배치의 디자인이고; 도 6b의 d는 건사이트(Gunsight)로서 지칭된 배치의 디자인이고; 도 6b의 e는 방사형 플로워(Radial Flower)로서 지칭된 배치의 디자인이다. 도 6c는 97.765 ㎛ 스텐실(stencil) 상의 일련의 마이크로웰들로 덮여진 기판의 디자인을 예시한다. 도 6c에 예시된 마이크로웰들은 섬으로 밀집되어 있다. 마이크로웰들은 잉크젯 헤드로부터의 시약으로 채워질 수 있다.

[0141] 기판 상의 분해된 좌위들 각각은 당분야에서 공지되어 있는 임의의 모양, 또는 당분야에서 공지되어 있는 방법에 의해 제조될 수 있는 모양을 가질 수 있다. 예를 들면, 분해된 좌위들 각각은 원형 모양, 직사각형 모양, 타원형 모양 또는 불규칙한 모양으로 존재하는 영역을 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 액체가 기포를 생성하지 않으면서 용이하게 관통할 수 있게 하는 모양으로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 분해된 좌위들은 약 1 마이크로리터(㎛), 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 ㎛, 500 ㎛, 550 ㎛, 600 ㎛, 650 ㎛, 700 ㎛ 또는 750 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있는 직경을 가진 원형 모양을 가질 수 있다. 분해된 좌위들은 단분산 크기 분포를 가질 수 있다. 즉, 모든 마이크로구조물들은 대략 동일한 폭, 높이 및/또는 길이를 가질 수 있다. 대안적으로, 분해된 좌위들은 한정된 수의 모양 및/또는 크기를 가질 수 있고, 예를 들면, 분해된 좌위들은 단분산 크기를 각각 가진 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개, 15개 또는 20개 이상의 구별되는 모양으로 표시될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 동일한 모양은 다수의 단분산 크기 분포들, 예를 들면, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개, 15개 또는 20개 이상의 단분산 크기 분포들로 반복될 수 있다. 단분산 분포는 모드의 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2%, 1%, 0.1%, 0.05%, 0.01% 또는 0.001% 미만의 표준 편차를 가진 단일모듈 분포로 반영될 수 있다.

[0142] 고밀도의 분해된 좌위들을 가진 기판은 전형적으로 분해된 좌위가 작은 면적 내에 있게 한다. 결과적으로, 이것은 작은 마이크로채널을 생성할 수 있다. 마이크로채널은 상이한 부피로 시약의 침착된 점적을 함유할 수 있다. 마이크로채널은 본 발명의 다양한 실시양태들을 위한 충분히 큰 표면적 및/또는 부피를 허용하는 임의의 적합한 치수를 가질 수 있다. 한 양태에서, 마이크로채널의 부피는 마이크로채널 내에 침착된 점적 내의 시약이 올리고뉴클레오티드 합성 동안 완전히 고갈되지 않을 정도로 적절하게 크다. 이 양태들에서, 특히 웰 구조물의 부피는 올리고뉴클레오티드가 합성될 수 있는 시간 또는 밀도를 좌우할 수 있다.

[0143] 분해된 좌위들 각각은 본원에 기재된 본 발명의 다양한 실시양태들에 따라 반응을 수행하기 위한 임의의 적합한 면적을 가질 수 있다. 일부 경우, 복수의 분해된 좌위들은 기판의 총 표면적의 임의의 적합한 백분율을 점유할 수 있다. 일부 경우, 분해된 좌위의 면적은 기판 내에 구축된 마이크로채널 또는 마이크로웰의 횡단면적일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 마이크로구조물들 또는 분해된 좌위들은 직접적으로 기판의 표면의 약 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%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상 또는 이하를 점유할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 총 면적의 약 10 ㎟, 11 ㎟, 12 ㎟, 13 ㎟, 14 ㎟, 15 ㎟, 16 ㎟, 17 ㎟, 18 ㎟, 19 ㎟, 20 ㎟, 25 ㎟, 30 ㎟, 35 ㎟, 40 ㎟, 50 ㎟, 75 ㎟, 100 ㎟, 200 ㎟, 300 ㎟, 400 ㎟, 500 ㎟, 600 ㎟, 700 ㎟, 800 ㎟, 900 ㎟, 1000 ㎟, 1500 ㎟, 2000 ㎟, 3000 ㎟, 4000 ㎟, 5000 ㎟, 7500 ㎟, 10000 ㎟, 15000 ㎟, 20000 ㎟, 25000 ㎟, 30000 ㎟, 35000 ㎟, 40000 ㎟, 50000 ㎟, 60000 ㎟, 70000 ㎟, 80000 ㎟, 90000 ㎟, 100000 ㎟, 200000 ㎟ 또는 300000 ㎟ 이상 또는 이하를 점유할 수 있다.

[0144] 기판 내에 구축된 마이크로구조물은 마이크로채널 또는 마이크로웰을 포함할 수 있는데, 이때 마이크로구조물은 기판의 상부 또는 하부 표면으로부터 시작되고, 일부 경우 전형적으로 대향하는 표면(예를 들면, 하부 또는 상부)에 유체 연결된다. 용어 "상부" 및 "하부"는 반드시 임의의 주어진 시간에서 중력에 대한 기판의 위치를 의미하지는 않으나, 일반적으로 편의 및 간결함을 위해 사용된다. 마이크로채널 또는 마이크로웰은 임의의 적합한 깊이 또는 길이를 가질 수 있다. 일부 경우, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 깊이 또는 길이는 기판의 표면(및/또는 고체 지지체의 하부)부터 고체 지지체의 상부까지 측정된다. 일부 경우, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 깊이 또는 길이는 고체 지지체의 두께와 대략 동등하다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰은 약 1 마이크로미터(㎛), 2 ㎛, 3 ㎛, 4 ㎛, 5 ㎛, 6 ㎛, 7 ㎛, 8 ㎛, 9 ㎛, 10 ㎛, 15 ㎛, 20 ㎛, 25 ㎛, 30 ㎛, 35 ㎛, 40 ㎛, 45 ㎛, 50 ㎛, 55 ㎛, 60 ㎛, 65 ㎛, 70 ㎛, 75 ㎛, 80 ㎛, 85 ㎛, 90 ㎛, 95 ㎛, 100 ㎛, 125 ㎛, 150 ㎛, 175 ㎛, 200 ㎛, 300 ㎛, 400 ㎛ 또는 500 ㎛ 이하 또는 이상의 깊이 또는 길이를 가진다. 마이크로채널 또는 마이크로웰은 본원에 기재된 본 발명의 실시양태들에 적합한 임의의 길이의 둘레를 가질 수 있다. 일부 경우, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 둘레는 횡단면, 예를 들면, 상기 마이크로채널 또는 마이크로

웰을 통한 유체 유동 방향과 수직인 횡단면의 둘레로서 측정된다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰은 둘레에서 약 1 마이크로미터(㎛), 2 ㎛, 3 ㎛, 4 ㎛, 5 ㎛, 6 ㎛, 7 ㎛, 8 ㎛, 9 ㎛, 10 ㎛, 15 ㎛, 20 ㎛, 25 ㎛, 30 ㎛, 31 ㎛, 35 ㎛, 40 ㎛, 45 ㎛, 50 ㎛, 55 ㎛, 60 ㎛, 65 ㎛, 70 ㎛, 75 ㎛, 80 ㎛, 85 ㎛, 90 ㎛, 95 ㎛, 100 ㎛, 125 ㎛, 150 ㎛, 175 ㎛, 200 ㎛, 300 ㎛, 400 ㎛ 또는 500 ㎛ 이하 또는 이상의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 공칭 아크길이 밀도는 평평한 기판 면적의 $㎛^2$당 임의의 적합한 아크길이를 가질 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 아크길이 밀도는 평평한 기판의 표면적당 마이크로채널 또는 마이크로웰의 횡단면의 둘레의 길이를 지칭한다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 공칭 아크길이 밀도는 적어도 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025, 0.03, 0.035, 0.04, 0.045, 0.05, 0.055, 0.06, 0.065, 0.07, 0.075, 0.08, 0.085, 0.09, 0.095, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 $㎛/㎛^2$, 또는 그 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로체널 또는 마이크로웰의 공칭 아크길이 밀도는 0.036 $㎛/㎛^2$일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로체널 또는 마이크로웰의 공칭 아크길이 밀도는 0.001 $㎛/㎛^2$ 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로체널 또는 마이크로웰의 공칭 아크길이 밀도는 0.01 $㎛/㎛^2$ 이상일 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 반응에 적합한 마이크로채널 또는 마이크로웰의 공칭 표면적은 예를 들면, 적합한 모이어티를 사용한 표면 코팅을 통해 최대화될 수 있다. 본원에 기재된 적합한 모이어티로 코팅되는 마이크로채널 또는 마이크로웰의 표면적은 표면에의 올리고뉴클레오티드의 부착을 용이하게 할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 반응, 예컨대, 올리고뉴클레오티드 합성에 적합한 마이크로채널 또는 마이크로웰의 공칭 표면적은 평평한 기판 면적의 적어도 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.05, 1.1, 1.15, 1.2, 1.25, 1.3, 1.35, 1.4, 1.45, 1.5, 1.55, 1.6, 1.65, 1.7, 1.75, 1.8, 1.85, 1.9, 1.95, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.5, 4, 4.5 또는 5 $㎛^2$이다.

[0145] 마이크로채널 또는 마이크로웰은 본원에 기재된 방법 및 조성물에 적합한 임의의 부피를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰은 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 950 피코리터(pl) 미만, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 990 나노리터(nl) 미만, 약 0.5 마이크로리터(㎕) 미만, 약 1 ㎕ 미만, 약 1.5 ㎕ 미만, 약 2 ㎕ 미만, 약 2.5 ㎕ 미만, 약 3 ㎕ 미만, 약 3.5 ㎕ 미만, 약 4 ㎕ 미만, 약 4.5 ㎕ 미만, 약 5 ㎕ 미만, 약 5.5 ㎕ 미만, 약 6 ㎕ 미만, 약 6.5 ㎕ 미만, 약 7 ㎕ 미만, 약 7.5 ㎕ 미만, 약 8 ㎕ 미만, 약 8.5 ㎕ 미만, 약 9 ㎕ 미만, 약 9.5 ㎕ 미만, 약 10 ㎕ 미만, 약 11 ㎕ 미만, 약 12 ㎕ 미만, 약 13 ㎕ 미만, 약 14 ㎕ 미만, 약 15 ㎕ 미만, 약 16 ㎕ 미만, 약 17 ㎕ 미만, 약 18 ㎕ 미만, 약 19 ㎕ 미만, 약 20 ㎕ 미만, 약 25 ㎕ 미만, 약 30 ㎕ 미만, 약 35 ㎕ 미만, 약 40 ㎕ 미만, 약 45 ㎕ 미만, 약 50 ㎕ 미만, 약 55 ㎕ 미만, 약 60 ㎕ 미만, 약 65 ㎕ 미만, 약 70 ㎕ 미만, 약 75 ㎕ 미만, 약 80 ㎕ 미만, 약 85 ㎕ 미만, 약 90 ㎕ 미만, 약 95 ㎕ 미만 또는 약 100 ㎕ 미만인 부피를 가진다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰은 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 950 피코리터(pl) 이상, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 990 나노리터(nl) 이상, 또는 약 0.5 마이크로리터(㎕), 약 1 ㎕, 약 1.5 ㎕, 약 2 ㎕, 약 2.5 ㎕, 약 3 ㎕, 약 3.5 ㎕, 약 4 ㎕, 약 4.5 ㎕, 약 5 ㎕, 약 5.5 ㎕, 약 6 ㎕, 약 6.5 ㎕, 약 7 ㎕, 약 7.5 ㎕, 약 8 ㎕, 약 8.5 ㎕, 약 9 ㎕, 약 9.5 ㎕, 약 10 ㎕, 약 11 ㎕, 약 12 ㎕, 약 13 ㎕, 약 14 ㎕, 약 15 ㎕, 약 16 ㎕, 약 17 ㎕, 약 18 ㎕, 약 19 ㎕, 약 20 ㎕, 약 25 ㎕, 약 30 ㎕, 약 35 ㎕, 약 40 ㎕, 약 45 ㎕, 약 50 ㎕, 약 55 ㎕, 약 60 ㎕, 약 65 ㎕, 약 70 ㎕, 약 75 ㎕, 약 80 ㎕, 약 85 ㎕, 약 90 ㎕, 약 95 ㎕ 또는 약 100 ㎕ 이상인 부피를 가진다.

[0146] 마이크로채널 또는 마이크로웰은 1 미만의 종횡비를 가질 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "종횡비"는 채널의 폭 대 그 채널의 깊이의 비를 지칭한다. 따라서, 1 미만의 종횡비를 가진 채널은 그의 폭보다 더 깊은 반면, 1 초과의 종횡비를 가진 채널은 그의 깊이보다 더 넓다. 일부 양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 종횡비는 약 0.5, 약 0.2, 약 0.1 또는 약 0.05 이하일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 종횡비는 약 0.1일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로채널 또는 마이크로웰의 종횡비는 약 0.05일 수 있다. 1, 0.1 또는 0.05 미만의 종횡비를 가진, 본원에 기재된 마이크로구조물, 예를 들면, 마이

크로채널 또는 마이크로웰은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이상의 모서리, 회전 등을 가진 채널을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 마이크로구조물은 특정 분해된 좌위 내에 함유된 모든 마이크로채널들 또는 마이크로웰들, 예를 들면, 하나 이상의 교차 채널들, 이 채널들의 일부, 단일 채널 및 심지어 하나 이상의 마이크로채널 또는 마이크로웰의 한 부분 또는 부분들에 대하여 기재된 종횡비, 예를 들면, 1, 0.1 또는 0.05 미만의 종횡비를 포함할 수 있다. 낮은 종횡비를 가진 마이크로채널을 제작하는 다른 디자인 및 방법은 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,842,787호에 기재되어 있다.

[0147] 복수의 분해된 좌위들을 가진 기판 상의 마이크로구조물, 예컨대, 마이크로채널 또는 마이크로웰은 본원에 기재되어 있거나 당분야에 공지되어 있는 임의의 방법(예를 들면, 마이크로제작 공정)에 의해 제작될 수 있다. 본원에 개시된 기판의 제조에 이용될 수 있는 마이크로제작 공정은 리쏘그래피(lithography); 식각 기법, 예컨대, 습식 화학적, 건조 및 포토레지스트(photoresist) 제거; 마이크로플루이딕스/랩-온-어-칩(lab-on-a-chip), 광학 MEMS(MOEMS로서도 지칭됨), RF MEMS, PowerMEMS, 및 BioMEMS 기법을 비롯한 마이크로전기기계적(MEMS) 기법, 및 깊은 반응성 이온 식각(DRIE); 나노전기기계적(NEMS) 기법; 실리콘의 열 산화; 전기도금 및 무전해 도금; 확산 공정, 예컨대, 붕소, 인, 비소 및 안티몬 확산; 이온 주입; 필름 침착, 예컨대, 증발(필라멘트, 전자 빔, 플래쉬(flash) 및 쉐도윙(shadowing) 및 단계 커버리지(coverage)), 스퍼터링, 화학적 증착(CVD), 에피택시(epitaxy)(증기상, 액체상 및 분자 빔), 전기도금, 스크린 프린팅 및 적층을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일반적으로 문헌(Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988)); 문헌(Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990)); 문헌(Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998); 및 문헌(Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997))을 참조한다.

[0148] 한 양태에서, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법을 이용하여 복수의 분해된 좌위들을 가진 기판을 제작할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들을 가진 기판의 재료는 반도체 기판, 예컨대, 이산화규소일 수 있다. 기판의 재료는 다른 화합물 III-V 또는 II-VI 물질, 예컨대, 쵸크랄스키(Czochralski) 공정(Grovenor, C. (1989). Microelectronic Materials. CRC Press. pp. 113-123)을 통해 생성된 반도체인 갈륨 비소(GaAs)일 수도 있다. 상기 재료는 그의 표면과의 접촉 시 반응성 산화물(-OH) 기의 균일한 덮임을 나타내는 평평한 경질 표면을 용액에게 제공할 수 있다. 이 산화물 기는 후속 실란화 공정을 위한 부착점일 수 있다. 대안적으로, 산화규소의 식각 특성을 모방하는 친유성 표면 재료 및 소수성 표면 재료가 침착될 수 있다. 질화규소 및 탄화규소 표면도 본 발명의 다양한 실시양태들에 따라 적합한 기판의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0149] 일부 실시양태들에서, 부동화(passivation) 층이 반응성 산화물 기를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있는 기판 상에 침착될 수 있다. 부동화 층은 질화규소(Si_3N_4) 또는 폴리마이드를 포함할 수 있다. 일부 경우, 포토리쏘그래피 단계를 이용하여 분해된 좌위들이 부동화 층을 형성하는 영역을 한정할 수 있다.

[0150] 복수의 분해된 좌위들을 가진 기판을 제조하는 방법은 기판으로 시작될 수 있다. 기판(예를 들면, 실리콘)은 전도층, 예컨대, 금속을 포함하나 이것으로 한정되지 않는, 그 위에 배치된 임의의 수의 층을 가질 수 있다. 일부 경우, 전도층은 알루미늄일 수 있다. 일부 경우, 기판은 보호층(예를 들면, 질화티타늄)을 가질 수 있다. 일부 경우, 기판은 높은 표면 에너지를 가진 화학층을 가질 수 있다. 다양한 침착 기법들, 예를 들면, 화학적 증착(CVD), 원자 층 침착(ALD), 플라스마 향상된 CVD(PECVD), 플라스마 향상된 ALD(PEALD), 금속 유기 CVD(MOCVD), 고온 와이어 CVD(HWCVD), 개시된 CVD(iCVD), 변형된 CVD(MCVD), 증기 축 침착(VAD), 외부 증착(OVD) 및 물리적 증착(예를 들면, 스퍼터 침착, 증발 침착)을 이용하여 층을 침착시킬 수 있다.

[0151] 일부 경우, 산화물 층이 기판 상에 침착된다. 일부 경우, 산화물 층은 이산화규소를 포함할 수 있다. 이산화규소는 테트라에틸 오르쏘실리케이트(TEOS), 고밀도 플라스마(HDP) 또는 이들의 임의의 조합을 이용함으로써 침착될 수 있다.

[0152] 일부 경우, 이산화규소는 저온 기법을 이용함으로써 침착될 수 있다. 일부 경우, 공정은 이산화규소의 저온 화학적 증착이다. 온도는 일반적으로 칩 상의 기존 금속이 손상되지 않을 정도로 충분히 낮다. 침착 온도는 약 50℃, 약 100℃, 약 150℃, 약 200℃, 약 250℃, 약 300℃, 약 350℃ 등일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 침착 온도는 약 50℃ 미만, 약 100℃ 미만, 약 150℃ 미만, 약 200℃ 미만, 약 250℃ 미만, 약 300℃ 미만, 약 350℃ 미만 등이다. 침착은 임의의 적합한 압력에서 수행될 수 있다. 일부 경우, 침착 공정은 RF 플라스마 에너지를 이용한다.

[0153] 일부 경우, 산화물은 건식 열적으로 성장된 산화물 절차(예를 들면, 1,000℃ 근처 또는 초과의 온도를 이용할 수 있는 절차)에 의해 침착된다. 일부 경우, 산화규소가 습식 증기 공정에 의해 생성된다.

[0154] 이산화규소는 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 적합한 마이크로구조물의 제작에 적합한 두께까지 침착될 수 있다.

[0155] 이산화규소는 임의의 적합한 두께까지 침착될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 이산화규소 층은 약 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 1 ㎛, 1.1 ㎛, 1.2 ㎛, 1.3 ㎛, 1.4 ㎛, 1.5 ㎛, 1.6 ㎛, 1.7 ㎛, 1.8 ㎛, 1.9 ㎛ 또는 2.0 ㎛ 이상의 두께를 가질 수 있다. 이산화규소 층은 약 2.0 ㎛, 1.9 ㎛, 1.8 ㎛, 1.7 ㎛, 1.6 ㎛, 1.5 ㎛, 1.4 ㎛, 1.3 ㎛, 1.2 ㎛, 1.1 ㎛, 1.0 ㎛, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 nm, 10 nm, 9 nm, 8 nm, 7 nm, 6 nm, 5 nm, 4 nm, 3 nm, 2 nm 또는 1 nm 이하의 두께를 가질 수 있다. 이산화규소 층은 1.0 nm 내지 2.0 ㎛, 1.1 ㎛ 내지 1.9 ㎛, 1.2 ㎛ 내지 1.8 nm, 1.3 ㎛ 내지 1.7 ㎛, 또는 1.4 ㎛ 내지 1.6 ㎛의 두께를 가질 수 있다. 당업자는 이산화규소 층이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 1.5 ㎛ 내지 1.9 ㎛ 내에 속하는 두께를 가질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 이산화규소는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속하는 두께를 가질 수 있다. 당분야에서 공지되어 있는 다양한 제작 기법들을 이용하여 이산화규소 기판에서 분해된 좌위들(예를 들면, 마이크로채널들 또는 마이크로웰들)을 생성할 수 있다. 이러한 기법들은 반도체 제작 기법을 포함할 수 있다. 일부 경우, 포토리쏘그래피 기법, 예컨대, 반도체 산업에서 이용되는 포토리쏘그래피 기법을 이용하여 분해된 좌위들을 생성한다. 예를 들면, 포토레지스트(예를 들면, 전자기적 방사선에 노출되었을 때 성질을 변화시키는 물질)는 (예를 들면, 웨이퍼의 회전 코팅에 의해) 임의의 적합한 두께까지 이산화규소 상에 코팅될 수 있다. 포토레지스트를 포함하는 기판은 전자기적 방사선 공급원에 노출될 수 있다. 분해된 좌위들의 영역을 한정하기 위해 마스크를 이용하여 포토레지스트의 부분으로부터의 방사선을 차폐할 수 있다. 포토레지스트는 음성 레지스트 또는 양성 레지스트일 수 있다(예를 들면, 분해된 좌위들의 영역을 전자기적 방사선에 노출시킬 수 있거나, 분해된 좌위들 이외의 영역을 마스크에 의해 한정된 전자기적 방사선에 노출시킬 수 있다). 분해된 좌위들이 생성될 위치 위에 놓인 영역을 전자기적 방사선에 노출시켜, 이산화규소 층에서 분해된 좌위들의 위치 및 분포에 상응하는 패턴을 한정한다. 분해된 좌위들에 상응하는 패턴을 한정하는 마스크를 통해 포토레지스트를 전자기적 방사선에 노출시킬 수 있다. 다음으로, 예를 들면, 세척 작업(예를 들면, 탈이온수)을 이용하여 포토레지스트의 노출된 부분을 제거할 수 있다. 그 다음, 마스크의 제거된 부분을 화학적 식각제에 노출시켜 기판을 식각할 수 있고 분해된 좌위들의 패턴을 이산화규소 층 내로 전달할 수 있다. 식각제는 산, 예를 들면, 황산(H_2SO_4)을 포함할 수 있다. 이산화규소 층을 이방성 방식으로 식각할 수 있다. 본원에 기재된 방법을 이용하여 높은 이방성 제작 방법, 예컨대, DRIE를 적용함으로써, 기판의 표면에 대하여 수직으로부터 약 $\pm 3^{\circ}$, 2°, 1°, 0.5° 또는 0.1° 미만 만큼 벗어나는 측벽을 가진 기판 상에서 또는 내에서 마이크로구조물, 예컨대, 합성 좌위를 포함하는 마이크로웰 또는 마이크로채널을 제작할 수 있다. 약 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 또는 0.1 ㎛ 미만의 언더컷(undercut) 값을 달성하여 매우 균일한 마이크로구조물을 생성할 수 있다.

[0156] 다양한 식각 절차들을 이용하여 분해된 좌위들이 형성될 영역에서 이산화규소를 식각할 수 있다. 식각은 등방성 식각(즉, 한 방향을 따른 식각 속도가 직교 방향을 따른 식각 속도와 동등하거나 실질적으로 동등함) 또는 이방성 식각(즉, 한 방향을 따른 식각 속도가 직교 방향을 따른 식각 속도보다 더 작음), 또는 이들의 변법일 수 있다. 식각 기법은 습식 실리콘 식각, 예컨대, KOH, TMAH, EDP 등, 및 건식 플라스마 식각(예를 들면, DRIE) 둘 다일 수 있다. 상기 둘 다를 이용하여 상호연결을 통해 마이크로구조물 웨이퍼를 식각할 수 있다.

[0157] 일부 경우, 이방성 식각은 분해된 좌위들의 부피의 대부분을 제거한다. 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 95%를 포함하는 임의의 적합한 백분율의 분해된 좌위 부피가 제거될 수 있다. 일부 경우, 이방성 식각에서 물질의 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상이 제거된다. 일부 경우, 이방성 식각에서 물질의 약 60% 이하, 약 70% 이하, 약 80% 이하, 약 90% 이하 또는 약 95% 이하가 제거된다. 일부 실시양태들에서, 이방성 식각은 항상 기판을 통해 이산화규소 물질을 제거하지는 않는다. 일부 실시양태들에 따라, 등방성 식각은 항상 홀을 생성하는 기판을 통해 물질을 제거하는 데에 이용된다.

[0158] 일부 경우, 포토리쏘그래피 단계를 이용하여 웰을 식각하여 분해된 좌위들을 한정한 후, 하이브리드 건식-습식 식각을 수행한다. 포토리쏘그래피 단계는 포토레지스트를 사용하여 이산화규소를 코팅하는 것, 및 분해된 좌위

들을 한정하는 패턴을 가진 마스크(또는 레티클(reticle))을 통해 포토레지스트를 전자기적 방사선에 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우, 하이브리드 건식-습식 식각은 (a) 포토리쏘그래피 단계에 의해 포토레지스트에서 한정된 분해된 좌위들의 영역에서 이산화규소의 대부분을 제거하기 위한 건식 식각; (b) 기판의 세정; 및 (c) 분해된 좌위들의 영역에서 남은 이산화규소를 기판으로부터 제거하기 위한 습식 식각을 포함한다.

[0159] 플라스마 식각 화학반응, 또는 산화제, 예를 들면, H_2O_2, O_2, O_3, H_2SO_4 또는 이들의 조합, 예컨대, H_2O_2와 H_2SO_4의 조합에의 노출을 이용하여 기판을 세정할 수 있다. 세정은 잔류 중합체의 제거, 습식 식각을 차단할 수 있는 물질의 제거, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우, 세정은 플라스마 세정이다. 세정 단계는 임의의 적합한 시간(예를 들면, 15초 내지 20초) 동안 진행될 수 있다. 일례에서, 100 mT, 200 W, 20 G 및 20 O_2의 세팅을 가진 어플라이드 매트리얼스(Applied Materials) eMAx-CT 기계로 20초 동안 세정을 수행할 수 있다.

[0160] 건식 식각은 실질적으로 수직으로(예를 들면, 기판을 향하여) 식각하되 측면으로 또는 실질적으로 측면으로(예를 들면, 기판에 평행하게) 식각하지 않는 이방성 식각일 수 있다. 일부 경우, 건식 식각은 불소-기제 식각제, 예컨대, CF_4, CHF_3, C_2F_6, C_3F_6 또는 이들의 임의의 조합을 사용한 식각을 포함한다. 한 경우에서, 100 mT, 1000 W, 20 G 및 50 CF_4의 세팅을 가진 어플라이드 매트리얼스 eMax-CT 기계로 400초 동안 식각을 수행한다. 본원에 기재된 기판은 깊은 반응성 이온 식각(DRIE)에 의해 식각될 수 있다. DRIE는 전형적으로 높은 종횡비를 가진 웨이퍼/기판에서 깊은 침투, 측면으로 경사진 홀 및 도랑을 생성하는 데에 이용된 고도 이방성 식각 공정이다. 고속 DRIE를 위한 2종의 주요 기술인 극저온(cryogenic) 및 보슈(Bosch)를 이용하여 기판을 식각할 수 있다. DRIE를 적용하는 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5501893호에 기재되어 있다.

[0161] 습식 식각은 모든 방향들에서 물질을 제거하는 등방성 식각일 수 있다. 일부 경우, 습식 식각은 포토레지스트를 언더컷팅한다. 포토레지스트의 언더컷팅은 포토레지스트가 후속 단계(예를 들면, 포토레지스트 "리프트 오프(lift off)")에서 보다 더 용이하게 제거되게 만들 수 있다. 한 실시양태에서, 습식 식각은 완충된 산화물 식각(BOE)이다. 일부 경우, 식각 속도를 늦추도록 (예를 들면, 불화암모늄으로) 완충될 수 있는 불산 염기를 사용하여 실온에서 습식 산화물 식각을 수행한다. 식각 속도는 식각될 필름 및 HF 및/또는 NH_4F의 구체적인 농도에 의존할 수 있다. 산화물 층을 완전히 제거하기 위해 필요한 식각 시간은 전형적으로 실험적으로 결정된다. 일례에서, 15:1 BOE(완충된 산화물 식각)로 22℃에서 식각을 수행한다.

[0162] 이산화규소 층은 기저 물질 층까지 식각될 수 있다. 예를 들면, 이산화규소 층은 질화티타늄 층까지 식각될 수 있다.

[0163] 한 양태에서, 복수의 분해된 좌위들을 가진 기판을 제조하는 방법은 (a) 분해된 좌위들을 한정하기 위한 포토리쏘그래피 단계; (b) 포토리쏘그래피 단계에 의해 한정된 분해된 좌위들의 영역에서 이산화규소의 대부분을 제거하기 위한 건식 식각; 및 (c) 분해된 좌위들의 영역에서 기판으로부터 남은 이산화규소를 제거하기 위한 습식 식각을 이용하여 분해된 좌위들, 예컨대, 마이크로웰들 또는 마이크로채널들을 기판, 예컨대, 상부에 코팅된 이산화규소 층을 포함하는 실리콘 기판 내에 식각하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 상기 방법은 잔류 중합체를 제거하는 단계, 습식 식각을 차단할 수 있는 물질을 제거하는 단계, 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다. 상기 방법은 플라스마 세정 단계를 포함할 수 있다.

[0164] 일부 실시양태들에서, 포토레지스트는 일부 경우 포토리쏘그래피 단계 또는 하이브리드 습식-건식 식각 후 이산화규소로부터 제거되지 않는다. 남은 포토레지스트는 후속 단계에서 금속을 분해된 좌위들 내로 선택적으로 향하게 하고 이산화규소 층의 상부 표면 상으로 향하게 하지 않는 데에 사용될 수 있다. 일부 경우, 기판은 금속(예를 들면, 알루미늄)으로 코팅되고, 습식 식각은 금속 상의 특정 성분, 예를 들면, 금속을 부식으로부터 보호하는 성분(예를 들면, 질화타타늄(TiN))을 제거하지 않는다. 그러나, 일부 경우, 예컨대, 화학 기계적 평탄화(planarization)(CMP)를 이용하여 포토레지스트 층을 제거할 수 있다.

[0165] **기판의 차별 작용화**

[0166] 본원에 기재된 바와 같이, 표면, 예를 들면, 실리콘 웨이퍼의 표면의 작용화는 물질의 표면 성질이 표면 상의 화학 종의 침착에 의해 변경되는 임의의 과정을 지칭할 수 있다. 작용화를 달성하는 통상의 방법은 화학적 증착에 의한 유기실란 분자의 침착이다. 이것은 습식 실란화 공정으로 수행될 수도 있다.

[0167] 통상적으로 "선택적 영역 침착" 또는 "선택적 영역 작용화"로서도 지칭되는 차별(differential) 작용화는 단일체(monolithic) 구조물 상에서 2개 이상의 상이한 영역들을 생성하는 임의의 과정을 지칭할 수 있는데, 이때 하나 이상의 영역은 동일한 구조물 상의 다른 영역들과 상이한 표면 또는 화학적 성질을 가진다. 상기 성질은 표

면 에너지, 화학적 종결, 화학적 모이어티의 표면 농도 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상이한 영역들은 인접할 수 있다.

[0168] 능동(active) 작용화는 일부 하류(downstream) 제조 단계, 예컨대, DNA 합성, 또는 DNA 또는 단백질 결합에 참여할 표면의 작용화를 지칭할 수 있다. 따라서, 본원의 다른 부분에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 적합한 작용화 방법은 특정 하류 제조 단계가 표면 상에서 일어날 수 있도록 선택된다.

[0169] 수동(passive) 작용화는 영역들을 활성 영역의 기본 기능에서 비효과적이게 만들 표면의 작용화를 지칭할 수 있다. 예를 들면, 능동 작용화가 DNA에 결합하도록 디자인되는 경우, 수동 작용화된 영역은 DNA에 결합하지 않을 것이다.

[0170] 포토레지스트는 전형적으로 패턴화된 코팅을 형성하기 위해 표준 산업 공정, 예컨대, 포토리쏘그래피에서 통상적으로 사용되는 감광성 물질을 지칭한다. 이 물질은 액체로서 적용되지만, 혼합물 중의 휘발성 용매가 증발할 때 기판 상에서 고체화된다. 상기 물질은 박막(1 ㎛ 내지 100 ㎛)으로서 회전 코팅 공정에서 평평한 기판에 적용될 수 있다. 상기 물질은 마스크 또는 레티클을 통해 이를 광에 노출시켜 현상제에서의 그의 용해 속도를 변화시킴으로써 패턴화될 수 있다. 상기 물질은 "양성"(광 노출이 용해를 증가시킴) 또는 "음성"(광 노출이 용해를 감소시킴)일 수 있다. 상기 물질은 기저 기판을 변경시키는 후속 단계(예컨대, 식각)을 위한 차단층으로서 작용하는 희생층(sacrificial layer)으로서 사용될 수 있다. 일단 변경이 완료되면, 레지스트는 제거된다.

[0171] 포토리쏘그래피는 기판을 패턴화하는 공정을 지칭할 수 있다. 공통된 기본 공정은 1) 포토레지스트를 기판에 적용하는 단계, 2) 일부 영역들에서 불투명하고 다른 영역들에서 투명한 이원 마스크를 통해 상기 레지스트를 광에 노출시키는 단계, 및 그 다음 3) 상기 레지스트를 현상하여 어떤 영역이 노출되었는지를 기초로 상기 레지스트를 패턴화하는 단계를 포함한다. 현상 후, 패턴화된 레지스트는 후속 프로세싱 단계, 예컨대, 식각, 이온 주입 또는 침착을 위한 마스크로서 작용한다. 프로세싱 단계 후, 레지스트는 전형적으로 예를 들면, 플라스마 스트립핑 또는 습식 화학적 제거를 통해 제거된다.

[0172] 다양한 실시양태들에서, 포토레지스트를 사용하는 방법이 이용되는데, 이때 포토레지스트는 차별 작용화를 이용한 기판의 제작을 용이하게 한다.

[0173] 일련의 제작 단계들은 차별 작용화 공정의 기초를 형성할 수 있는데, 이때 개별 단계들은 본 발명의 다양한 실시양태들에 따라 표면 상에서 원하는 작용화 패턴을 달성하기 위해 변경될 수 있거나, 제거될 수 있거나 추가 단계로 보충될 수 있다. 첫째, 표적 표면의 초기 제조는 예를 들면, 화학적 세정에 의해 달성될 수 있고 초기 능동 또는 수동 표면 작용화를 포함할 수 있다.

[0174] 둘째, 포토레지스트의 적용은 다양한 상이한 기법들에 의해 달성될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 구조물의 상이한 부분들 내로의 레지스트의 유동은 구조물의 디자인에 의해, 예를 들면, 구조물의 다양한 점들에서, 예컨대, 날카로운 단계 가장자리에서 유체의 고유 피닝(intrinsic pinning) 성질을 이용함으로써 조절된다. 일단 레지스트의 수송 용매가 증발되면, 포토레지스트는 고체 필름을 남긴다.

[0175] 셋째, 포토리쏘그래피는 기판의 일부 특정 영역들이 더 변경될 수 있도록 상기 영역들에서 레지스트를 제거하는 데에 임의적으로 이용될 수 있다.

[0176] 넷째, 예를 들면, 산소 플라스마를 사용한 플라스마 디스컴(descum), 전형적으로 짧은 플라스마 세정 단계는 레지스트 세정된 영역에서 임의의 잔류 유기 오염물질의 제거를 용이하게 하는 데에 이용될 수 있다.

[0177] 다섯째, 표면은 작용화될 수 있는 반면, 레지스트로 덮인 영역은 임의의 능동 또는 수동 작용화로부터 보호된다. 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는, 표면의 화학적 성질을 변화시키는 임의의 적합한 공정, 예를 들면, 유기실란의 화학적 증착을 이용하여 표면을 작용화할 수 있다. 전형적으로, 이것은 작용화 종의 자가-조립된 단일층(SAM)의 침착을 초래한다.

[0178] 여섯째, 레지스트는 예를 들면, 이를 적합한 유기 용매에 용해시키고 플라스마 식각, 노출 및 현상 등을 수행하여, 레지스트에 의해 덮인 기판의 영역을 노출시킴으로써 스트립핑될 수 있고 제거될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 작용화 기를 제거하지 않거나 작용화된 표면을 달리 손상시키지 않을 방법이 레지스트 스트립을 위해 선택된다.

[0179] 일곱째, 능동 또는 수동 작용화를 수반하는 제2 작용화 단계가 임의적으로 수행될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제1 작용화 단계에 의해 작용화된 영역은 제2 작용화 단계에서 사용된 작용기의 침착을 차단한다.

[0180] 다양한 실시양태들에서, 차별 작용화는 DNA가 합성되는 칩 상의 영역의 공간적 조절을 용이하게 한다. 일부 실시양태들에서, 차별 작용화는 칩의 유체 성질을 조절하기 위한 개선된 유연성을 제공한다. 따라서, 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스로부터 나노웰 디바이스에게 전달되는 공정은 차별 작용화에 의해 개선된다. 일부 실시양태들에서, 차별 작용화는 디바이스, 예를 들면, 나노반응기 또는 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 제작을 제공하는데, 이때 웰 또는 채널의 벽은 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이 상대적으로 친수성을 나타내고, 외부 표면은 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이 상대적으로 소수성을 나타낸다.

[0181] 도 36은 본 발명의 다양한 실시양태들에 따른 마이크로플루이딕 디바이스 상에서의 차별 작용화의 예시적 적용을 보여준다. 능동 작용화 영역 및 수동 작용화 영역은 표시된 바와 같이 상이하게 음영으로 표시되어 있다. 특히, 연결되어 소위 리볼버 패턴을 형성하는 제1 채널(비아) 및 제2 채널은 차별 작용화를 3차원으로 보여주기 위해 이 예들에서 사용된다. 레지스트의 적용을 조절하는 데에 도움을 주는 소수의 지침을 제외하고, 이 예시적 기판들 내의 3차원 특징부의 구체적인 배치는 작용화 공정에 그다지 중요하지 않다.

[0182] 도 37은 도 37b 내지 37d에 예시된 차별 작용화 패턴들의 생성을 위한 예시적 작업흐름을 보여준다. 따라서, 예를 들면, 피라나(piranha) 용액을 사용하여 기판을 먼저 세정한 후, O_2 플라스마에 노출시킬 수 있다(도 37a).

포토레지스트는 제2 채널을 매립하는 디바이스 층(리볼버로서도 공지되어 있음; 도 37b)에 적용될 수 있다. 포토리쏘그래피 및/또는 플라스마 디스컴 단계는 패턴에 적합한 마스크를 사용하여 기판 상에서 포토레지스트의 원하는 패턴을 생성하는 데에 이용될 수 있다(도 37c). 마스크 패턴은 포토레지스트가 머물고 세정되는 장소를 조절하도록 변경될 수 있다. 예를 들면, 플루오로실란, 탄화수소 실란, 또는 표면을 부동화할 수 있는 유기층을 형성하는 임의의 기를 사용한 작용화 단계를 수행하여 디바이스 상에서 수동 작용화된 영역을 한정할 수 있다(도 37d). 본원의 다른 부분에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 적합한 방법을 이용하여 레지스트를 스트립핑할 수 있다(도 37e). 일단 레지스트가 제거되면, 노출된 영역을 능동 작용화로 처리하여 원하는 차별 작용화 패턴을 남길 수 있다(도 37f).

[0183] 다양한 실시양태들에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 선택된 영역에서 변경된 표면 성질을 생성하기 위한 포토레지스트의 적용에 관한 것으로서, 이때 포토레지스트의 적용은 포토레지스트의 공간적 분포를 한정하는 기판의 유체 성질에 의존한다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 적용된 유체와 관련된 표면 장력 효과는 포토레지스트의 유동을 한정할 수 있다. 예를 들면, 표면 장력 및/또는 모세관 작용 효과는 레지스트 용매가 증발하기 전에 포토레지스트가 조절된 방식으로 작은 구조물 내에 빨려들어가는 것을 용이하게 할 수 있다(도 38). 한 실시양태에서, 레지스트 접촉점을 날카로운 가장자리로 피닝하여 유체의 진행을 조절한다. 기저 구조물은 제작 및 작용화 공정 동안 포토레지스트를 적용하는 데에 사용된 원하는 유동 패턴을 기초로 디자인될 수 있다. 용매가 증발한 후 남은 고체 유기층을 사용하여 제작 공정의 후속 단계를 추적할 수 있다.

[0184] 기판은 인접하는 유체 경로 내로의 위킹(wicking) 효과를 용이하게 하거나 억제함으로써 유체의 유동을 조절하도록 디자인될 수 있다. 예를 들면, 도 39a는 상부 구조물 내에서의 유체의 유지를 용이하게 하여 레지스트의 특정 배치를 허용하는, 상부 가장자리와 하부 가장자리 사이의 중첩을 피하는 디자인을 보여준다. 대조적으로, 도 39b는 상부 가장자리와 하부 가장자리가 중첩되어 하부 구조물 내로의 적용된 유체의 위킹을 유발하는 대안적 디자인을 보여준다. 따라서, 레지스트의 원하는 적용에 따라 적절한 디자인이 선택될 수 있다.

[0185] 도 40은 포토리쏘그래피 후 도 40c에 예시된 작은 원반 포토레지스트 패턴에 따라 레지스트로 처리된 디바이스의 명시야 영상(도 40a) 및 암시야 영상(도 40b)을 보여준다.

[0186] 도 41은 포토리쏘그래피 후 도 41c에 예시된 전체 원반 포토레지스트 패턴에 따라 레지스트로 처리된 디바이스의 명시야 영상(도 41a) 및 암시야 영상(도 41b)을 보여준다.

[0187] 도 42는 레지스트의 수동 작용화 및 스트립핑 후 도 42c의 패턴에 따라 작용화된 디바이스의 명시야 영상(도 42a) 및 암시야 영상(도 42b)을 보여준다.

[0188] 도 43은 디메틸설폭사이드(DMSO)를 유체로서 사용하여 도 43c의 패턴에 따라 차별적으로 작용화된 표면의 상이한 유체 성질을 명시야 영상(도 43a) 및 암시야 영상(도 43b)으로 보여준다. 소수성 영역에 의해 둘러싸인 리볼버 내의 친수성 표면을 사용하여 리볼버의 자발적 습윤화를 달성하였다.

[0189] 도 44는 도 36f에 예시된 차별 작용화 패턴들의 생성을 위한 또 다른 예시적 작업흐름을 보여준다. 따라서, 예를 들면, 피라나 용액을 사용하여 기판을 먼저 세정한 후, O_2 플라스마에 노출시킬 수 있다(도 44a). 예를

들면, 플루오로실란, 탄화수소 실란, 또는 표면을 부동화할 수 있는 유기층을 형성할 수 있는 임의의 기를 사용한 작용화 단계를 수행하여 디바이스 상에서 수동 작용화된 영역을 한정할 수 있다(도 44b). 포토레지스트는 제2 채널을 매립하는 디바이스 층(리볼버로서도 공지되어 있음; 도 44c)에 적용될 수 있다. 포토리쏘그래피 및/또는 식각 단계는 패턴에 적합한 마스크를 사용하여 기판 상에서 포토레지스트의 원하는 패턴을 생성하는 데에 이용될 수 있다(도 44d). 마스크 패턴은 포토레지스트가 머물고 세정되는 장소를 조절하도록 변경될 수 있다. 본원의 다른 부분에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 적합한 방법을 이용하여 레지스트를 스트립핑할 수 있다(도 44e). 일단 레지스트가 제거되면, 노출된 영역을 능동 작용화로 처리하여 원하는 차별 작용화 패턴을 남길 수 있다(도 44f).

[0190] 또 다른 실시양태에서, 작용화 작업흐름은 레지스트가 비아(하부)면으로부터 적용되고 비아 및 리볼버 내로 유동하도록 디자인된다. 외부 표면 상의 노출된 영역은 작용화로 처리될 수 있다. 리쏘그래피 또는 식각을 이용하여 예를 들면, 디바이스의 후(하부)면부터 레지스트를 제거하여, 노출된 영역에서 능동 작용화를 허용함으로써 도 36e에 기재된 패턴을 이끌어낼 수 있다.

[0191] 또 다른 실시양태에서, 중첩 디자인은 도 39b에 나타낸 바와 같이 비아와 리볼버 채널 가장자리 사이에서 선택될 수 있다. 레지스트를 전(상부)면부터 적용하여 유체를 비아 내로 위킹할 수 있다. 수동 작용화, 레지스트의 스트립핑에 이은 능동 작용화는 도 36e에 예시된 패턴의 제작을 이끌어낼 것이다.

[0192] 실질적으로 평평한 기판 부분을 포함하는 예시적 마이크로플루이딕 디바이스는 도 25d에서 도면으로서 제시되어 있다. 상기 도면의 횡단면은 도 25e에 제시되어 있다. 기판은 복수의 클러스터들을 포함하는데, 이때 각각의 클러스터는 복수의 유체 연결 군들을 포함한다. 각각의 군은 제1 채널로부터 확장되는 복수의 제2 채널들을 포함한다. 도 25a는 고밀도의 군들을 포함하는 클러스터의 디바이스 조감도이다. 도 25c는 도 25a의 클러스터의 핸들 조감도이다. 도 25b는 도 25a의 단면도이다.

[0193] 군들의 클러스터는 임의의 수의 배열로 정렬될 수 있다. 도 25a에서, 군들은 오프셋(offset) 줄로 정렬되어 원유사 패턴으로 클러스터를 형성한다. 도 25c는 예시적 마이크로플루이딕 디바이스 상에서의 복수의 이러한 클러스터들의 정렬을 보여준다. 일부 실시양태들에서, 개별 클러스터들은 그들의 내부가 볼록한 세트를 형성하는 개별 클러스터 영역들 내에 함유된다. 일부 실시양태들에서, 개별 클러스터 영역들은 서로 중첩되지 않는다. 개별 클러스터 영역들은 원 또는 임의의 다른 적합한 다각형, 예를 들면, 삼각형, 정사각형, 직사각형, 평행사변형, 육각형 등일 수 있다. 2503으로 표시된 바와 같이, 3줄의 군들 사이의 예시적 거리는 각각의 군의 중심부터 측정될 때 약 0.05 ㎜ 내지 약 1.25 ㎜일 수 있다. 2, 3, 4 또는 5줄 이상의 군들 사이의 거리는 약 0.05 ㎜, 0.1 ㎜, 0.15 ㎜, 0.2 ㎜, 0.25 ㎜, 0.3 ㎜, 0.35 ㎜, 0.4 ㎜, 0.45 ㎜, 0.5 ㎜, 0.55 ㎜, 0.6 ㎜, 0.65 ㎜, 0.7 ㎜, 0.75 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.2 ㎜ 또는 1.3 ㎜ 이상일 수 있다. 2, 3, 4 또는 5줄 이상의 군들 사이의 거리는 약 1.3 ㎜, 1.2 ㎜, 1.1 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.75 ㎜, 0.65 ㎜, 0.6 ㎜, 0.55 ㎜, 0.5 ㎜, 0.45 ㎜, 0.4 ㎜, 0.35 ㎜, 0.3 ㎜, 0.25 ㎜, 0.2 ㎜, 0.15 ㎜, 0.1 ㎜ 또는 0.05 ㎜ 이하일 수 있다. 2, 3, 4 또는 5줄 이상의 군들 사이의 거리는 0.05 ㎜ 내지 1.3 ㎜, 0.1 ㎜ 내지 1.2 ㎜, 0.15 ㎜ 내지 1.1 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 1 ㎜, 0.25 ㎜ 내지 0.9 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 0.8 ㎜, 0.35 ㎜ 내지 0.8 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 0.7 ㎜, 0.45 ㎜ 내지 0.75 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 0.6 ㎜, 0.55 ㎜ 내지 0.65 ㎜, 또는 0.6 ㎜ 내지 0.65 ㎜일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.05 ㎜ 내지 0.8 ㎜에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 2506으로 표시된 바와 같이, 한 줄의 군들에서 2개의 군들 사이의 예시적 거리는 각각의 군의 중심으로부터 측정될 때 약 0.02 ㎜ 내지 약 0.5 ㎜일 수 있다. 한 줄의 군들에서 2개의 군들 사이의 거리는 약 0.02 ㎜, 0.04 ㎜, 0.06 ㎜, 0.08 ㎜, 0.1 ㎜, 0.12 ㎜, 0.14 ㎜, 0.16 ㎜, 0.18 ㎜, 0.2 ㎜, 0.22 ㎜, 0.24 ㎜, 0.26 ㎜, 0.28 ㎜, 0.3 ㎜, 0.32 ㎜, 0.34 ㎜, 0.36 ㎜, 0.38 ㎜, 0.4 ㎜, 0.42 ㎜, 0.44 ㎜, 0.46 ㎜, 0.48 ㎜ 또는 0.5 ㎜ 이상일 수 있다. 한 줄의 군들에서 2개의 군들 사이의 거리는 약 0.5 ㎜, 0.48 ㎜, 0.46 ㎜, 0.44 ㎜, 0.42 ㎜, 0.4 ㎜, 0.38 ㎜, 0.36 ㎜, 0.34 ㎜, 0.32 ㎜, 0.3 ㎜, 0.28 ㎜, 0.26 ㎜, 0.24 ㎜, 0.22 ㎜, 0.2 ㎜, 0.18 ㎜, 0.16 ㎜, 0.14 ㎜, 0.12 ㎜, 0.1 ㎜, 0.08 ㎜, 0.06 ㎜, 0.04 ㎜ 또는 0.2 ㎜ 이하일 수 있다. 2개의 군들 사이의 거리는 0.02 ㎜ 내지 0.5 ㎜, 0.04 ㎜ 내지 0.4 ㎜, 0.06 ㎜ 내지 0.3 ㎜, 또는 0.08 ㎜ 내지 0.2 ㎜일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.04 ㎜ 내지 0.2 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0194] 각각의 군의 제1 채널 및 제2 채널의 길이 및 폭은 실험 조건에 따라 최적화될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 2504로 표시된, 군 내의 제1 채널의 횡단면은 약 0.01 ㎜, 0.015 ㎜, 0.02 ㎜, 0.025 ㎜, 0.03 ㎜, 0.035 ㎜, 0.04 ㎜, 0.045 ㎜, 0.05 ㎜, 0.055 ㎜, 0.06 ㎜, 0.065 ㎜, 0.07 ㎜, 0.075 ㎜, 0.08 ㎜, 0.085 ㎜, 0.09 ㎜, 0.1 ㎜, 0.15 ㎜, 0.2 ㎜, 0.25 ㎜, 0.3 ㎜, 0.35 ㎜, 0.4 ㎜, 0.45 m 또는 0.5 ㎜ 이상이다. 일부 실시양

태들에서, 군 내의 제1 채널의 횡단면은 약 0.5 mm, 0.45 mm, 0.4 mm, 0.35 mm, 0.3 mm, 0.25 mm, 0.2 mm, 0.15 mm, 0.1 mm, 0.09 mm, 0.085 mm, 0.08 mm, 0.075 mm, 0.07 mm, 0.065 mm, 0.06 mm, 0.055 mm, 0.05 mm, 0.045 mm, 0.04 mm, 0.035 mm, 0.03 mm, 0.025 mm, 0.02 mm, 0.015 mm 또는 0.01 mm 이하이다. 군 내의 제1 채널의 횡단면은 0.01 mm 내지 0.5 mm, 0.02 mm 내지 0.45 mm, 0.03 mm 내지 0.4 mm, 0.04 mm 내지 0.35 mm, 0.05 mm 내지 0.3 mm, 0.06 mm 내지 0.25 mm, 또는 0.07 mm 내지 0.2 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.04 mm 내지 0.2 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일부 실시양태들에서, 2505로 표시된, 군 내의 제2 채널의 횡단면은 약 0.001 mm, 0.002 mm, 0.004 mm, 0.006 mm, 0.008 mm, 0.01 mm, 0.012 mm, 0.014 mm, 0.016 mm, 0.018 mm, 0.02 mm, 0.025 mm, 0.03 mm, 0.035 mm, 0.04 mm, 0.045 mm, 0.05 mm, 0.055 mm, 0.06 mm, 0.065 mm, 0.07 mm, 0.075 mm 또는 0.08 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 군 내의 제2 채널의 횡단면은 약 0.08 mm, 0.075 mm, 0.07 mm, 0.065 mm, 0.06 mm, 0.055 mm, 0.05 mm, 0.045 mm, 0.04 mm, 0.035 mm, 0.03 mm, 0.025 mm, 0.02 mm, 0.018 mm, 0.016 mm, 0.014 mm, 0.012 mm, 0.01 mm, 0.008 mm, 0.006 mm, 0.004 mm, 0.002 mm 또는 0.001 mm 이하이다. 군 내의 제2 채널의 횡단면은 0.001 mm 내지 0.08 mm, 0.004 mm 내지 0.07 mm, 0.008 mm 내지 0.06 mm, 0.01 mm 내지 0.05 mm, 0.015 mm 내지 0.04 mm, 0.018 mm 내지 0.03 mm, 또는 0.02 mm 내지 0.025 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.008 mm 내지 0.04 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 도 25b는 한 줄의 11개 군들을 포함하는 클러스터의 예시적 횡단면을 보여준다. 일부 실시양태들에서, 각각의 군 내의 제2 채널의 높이는 약 0.005 mm, 0.008 mm, 0.01 mm, 0.015 mm, 0.02 mm, 0.025 mm, 0.03 mm, 0.04 mm, 0.05 mm, 0.06 mm, 0.07 mm, 0.08 mm, 0.1 mm, 0.12 mm, 0.14 mm, 0.16 mm, 0.18 mm 또는 0.2 mm 이상의 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 2501로 표시된, 각각의 군 내의 제2 채널의 높이는 약 0.2 mm, 0.18 mm, 0.16 mm, 0.14 mm, 0.12 mm, 0.1 mm, 0.08 mm, 0.07 mm, 0.06 mm, 0.05 mm, 0.04 mm, 0.03 mm, 0.025 mm, 0.02 mm, 0.015 mm, 0.01 mm, 0.008 mm 또는 0.005 mm 이하의 길이를 가진다. 각각의 군 내의 제2 채널의 높이는 0.005 mm 내지 0.2 mm, 0.008 mm 내지 0.018 mm, 0.01 mm 내지 0.16 mm, 0.015 mm 내지 0.1 mm, 0.02 mm 내지 0.08 mm, 또는 0.025 mm 내지 0.04 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.01 mm 내지 0.04 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일부 실시양태들에서, 2502로 표시된, 각각의 군 내의 제1 채널의 높이는 약 5 mm, 4.5 mm, 4 mm, 3.5 mm, 3 mm, 2.5 mm, 2 mm, 1.5 mm, 1.0 mm, 0.8 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.375 mm, 0.35 mm, 0.3 mm, 0.275 mm, 0.25 mm, 0.225 mm, 0.2 mm, 0.175 mm, 0.15 mm, 0.125 mm, 0.1 mm, 0.075 mm 또는 0.05 mm 이하이다. 일부 실시양태들에서, 2502로 표시된, 각각의 군 내의 제1 채널의 높이는 약 0.05 mm, 0.075 mm, 0.1 mm, 0.125 mm, 0.15 mm, 0.175 mm, 0.2 mm, 0.225 mm, 0.25 mm, 0.275 mm, 0.3 mm, 0.325 mm, 0.35 mm, 0.375 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.8 mm, 1.0 mm, 1.5 mm, 2 mm, 2.5 mm, 3 mm, 3.5 mm, 4 mm, 4.5 mm 또는 5 mm 이상이다. 각각의 군 내의 제1 채널의 높이는 0.05 mm 내지 5 mm, 0.075 mm 내지 4 mm, 0.1 mm 내지 3 mm, 0.15 mm 내지 2 mm, 0.2 mm 내지 1 mm, 또는 0.3 mm 내지 0.8 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 mm 내지 1 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0195] 군들의 클러스터는 도 25d에 나타낸 바와 같이, 마이크로플루이딕 디바이스의 실질적으로 평평한 기판 부분의 단일 반응 웰에 놓이기에 적합한 배열로 정렬될 수 있다. 도 25d는 108개의 반응 웰들을 포함하는 마이크로플루이딕 디바이스의 실질적으로 평평한 기판 부분의 도면인데, 이때 각각의 반응 웰은 복수의 군들을 포함한다. 기판은 약 2와 약 250 사이의 임의의 수를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 수의 웰들을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 웰의 수는 약 2개 내지 약 225개 웰, 약 2개 내지 약 200개 웰, 약 2개 내지 약 175개 웰, 약 2개 내지 약 150개 웰, 약 2개 내지 약 125개 웰, 약 2개 내지 약 100개 웰, 약 2개 내지 약 75개 웰, 약 2개 내지 약 50개 웰, 약 2개 내지 약 25개 웰, 약 25개 내지 약 250개 웰, 약 50개 내지 250개 웰, 약 75개 내지 약 250개 웰, 약 100개 내지 약 250개 웰, 약 125개 내지 약 250개 웰, 약 150개 내지 약 250개 웰, 약 175개 내지 약 250개 웰, 약 200개 내지 약 250개 웰, 또는 약 225개 내지 약 250개 웰을 포함한다. 당업자는 웰 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 25 내지 125에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 또한, 각각의 웰은 약 2개 군들과 약 250개 군들 사이의 임의의 수를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 수의 군들의 클러스터를 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 클러스터는 약 2개 내지 약 225개의 군들, 약 2개 내지 약 200개의 군들, 약 2개 내지 약 175개의 군들, 약 2개 내지 약 150개의 군들, 약 2개 내지 약 125개의 군들, 약 2개 내지 약 100개의 군들, 약 2개 내지 약 75개의 군들, 약 2개 내지 약 50개의 군들, 약 2개 내지 약 25개의 군들, 약 25개 내지 약 250개의 군들, 약 50개 내지 250개의 군들, 약 75개 내지 약 250개의 군들, 약 100개 내지 약 250개의 군들, 약 125개 내지 약 250개의 군들, 약 150개 내지 약 250개의 군들, 약 175개 내지 약 250개의 군들, 약 200개 내지 약 250개의 군들, 또는 약 225개 내지 약 250개의 군들을

포함한다. 당업자는 군의 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 25 내지 125에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일례로서, 도 25d에 나타낸 기판의 108개의 웰들 각각은 도 25a에 나타낸 109개의 군들의 클러스터를 포함하여, 11,772개의 군들이 마이크로플루이딕 디바이스의 실질적으로 평평한 기판 부분에 존재하게 할 수 있다.

[0196] 도 25d는 0,0(X,Y) 축으로 표시된 기준 원점을 포함하는데, 이때 마이크로플루이딕 디바이스의 예시적 실질적으로 평평한 기판 부분의 하부 좌측 모서리가 도시되어 있다. 일부 실시양태들에서, 2508로서 표시된, 상기 실질적으로 평평한 기판의 폭은 상기 원점으로부터 측정될 때 한 차원을 따라 약 5 ㎜ 내지 약 150 ㎜이다. 일부 실시양태들에서, 2519로서 표시된, 실질적으로 평평한 기판의 폭은 상기 원점으로부터 측정될 때 또 다른 차원을 따라 약 5 ㎜ 내지 약 150 ㎜이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서의 기판의 폭은 약 5 ㎜ 내지 약 125 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 100 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 75 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 50 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 25 ㎜, 약 25 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 약 50 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 약 75 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 약 100 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 또는 약 125 ㎜ 내지 약 150 ㎜이다. 당업자는 상기 폭이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 25 ㎜ 내지 100 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 도 25d에 나타낸 실질적으로 평평한 기판 부분은 군들의 108개 클러스터들을 포함한다. 상기 클러스터들은 임의의 배열로 정렬될 수 있다. 도 25d에서, 상기 클러스터들은 정사각형 모양을 형성하는 줄로 정렬되어 있다. 정렬과 관계없이, 상기 클러스터들은 X-축 또는 Y-축 상에서 측정될 때 원점으로부터 약 0.1 ㎜ 내지 약 149 ㎜의 거리에서 시작할 수 있다. 길이 2518 및 2509는 각각 X-축 및 Y-축 상에서 클러스터의 중심의 최장 거리를 나타낸다. 길이 2517 및 2512는 각각 X-축 및 Y-축 상에서 클러스터의 중심의 최단 거리를 나타낸다. 일부 실시양태들에서, 상기 클러스터들은 2개의 클러스터들 사이에 반복된 거리가 존재하도록 정렬된다. 2507 및 2522로 표시된 바와 같이, 2개의 클러스터들 사이의 거리는 약 0.3 ㎜ 내지 약 9 ㎜일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 2개의 클러스터들 사이의 거리는 약 0.3 ㎜, 0.4 ㎜, 0.5 ㎜, 0.6 ㎜, 0.7 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.4 ㎜, 1.6 ㎜, 1.8 ㎜, 2 ㎜, 2.2 ㎜, 2.4 ㎜, 2.6 ㎜, 2.8 ㎜, 3 ㎜, 3.2 ㎜, 3.4 ㎜, 3.6 ㎜, 3.8 ㎜, 4 ㎜, 4.2 ㎜, 4.4 ㎜, 4.6 ㎜, 4.8 ㎜, 5 ㎜, 5.2 ㎜, 5.4 ㎜, 5.6 ㎜, 5.8 ㎜, 6 ㎜, 6.2 ㎜, 6.4 ㎜, 6.6 ㎜, 6.8 ㎜, 7 ㎜, 7.2 ㎜, 7.4 ㎜, 7.6 ㎜, 7.8 ㎜, 8 ㎜, 8.2 ㎜, 8.4 ㎜, 8.6 ㎜, 8.8 ㎜ 또는 9 ㎜ 이상이다. 일부 실시양태들에서, 2개의 클러스터들 사이의 거리는 약 9 ㎜, 8.8 ㎜, 8.6 ㎜, 8.4 ㎜, 8.2 ㎜, 8 ㎜, 7.8 ㎜, 7.6 ㎜, 7.4 ㎜, 7.2 ㎜, 7 ㎜, 6.8 ㎜, 6.6 ㎜, 6.4 ㎜, 6.2 ㎜, 6 ㎜, 5.8 ㎜, 5.6 ㎜, 5.4 ㎜, 5.2 ㎜, 5 ㎜, 4.8 ㎜, 4.6 ㎜, 4.4 ㎜, 4.2 ㎜, 4 ㎜, 3.8 ㎜, 3.6 ㎜, 3.4 ㎜, 3.2 ㎜, 3 ㎜, 2.8 ㎜, 2.6 ㎜, 2.4 ㎜, 2.2 ㎜, 2 ㎜, 1.8 ㎜, 1.6 ㎜, 1.4 ㎜, 1.2 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.7 ㎜, 0.6 ㎜, 0.5 ㎜, 0.4 ㎜ 또는 0.3 ㎜ 이하이다. 2개의 클러스터들 사이의 거리는 0.3 ㎜ 내지 9 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 8 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 7 ㎜, 0.6 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.7 ㎜ 내지 5 ㎜, 0.7 ㎜ 내지 4 ㎜, 0.8 ㎜ 내지 3 ㎜, 또는 0.9 ㎜ 내지 2 ㎜일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.8 ㎜ 내지 2 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0197] 기준 마크를 본원에 기재된 마이크로플루이딕 디바이스 상에 배치하여 이러한 디바이스와 시스템의 다른 구성요소의 정렬을 용이하게 할 수 있다. 본 발명의 마이크로플루이딕 디바이스는 하나 이상의 기준 마크, 예를 들면, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 기준 마크를 가질 수 있다. 도 25d에 나타낸 예시적 마이크로플루이딕 디바이스의 실질적으로 평평한 기판 부분은 상기 디바이스를 시스템의 다른 구성요소와 정렬하는 데에 유용한 3개의 기준 마크들을 포함한다. 기준 마크는 마이크로플루이딕 디바이스의 실질적으로 평평한 기판 부분 내의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 2513 및 2516으로 표시된 바와 같이, 기준 마크는 원점 근처에 위치할 수 있는데, 이때 기준 마크는 어느 한 클러스터보다 원점에 더 가깝다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크는 2511 및 2521로 표시된 바와 같이 상기 기판 부분의 가장자리 근처에 위치하는데, 이때 가장자리로부터의 거리는 각각 2510 및 2520으로 표시되어 있다. 기준 마크는 상기 기판 부분의 가장자리로부터 약 0.1 ㎜ 내지 약 10 ㎜의 거리를 두고 위치할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크는 상기 기판 부분의 가장자리로부터 약 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜, 0.4 ㎜, 0.5 ㎜, 0.6 ㎜, 0.7 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.4 ㎜, 1.6 ㎜, 1.8 ㎜, 2 ㎜, 2.2 ㎜, 2.4 ㎜, 2.6 ㎜, 2.8 ㎜, 3 ㎜, 3.2 ㎜, 3.4 ㎜, 3.6 ㎜, 3.8 ㎜, 4 ㎜, 4.2 ㎜, 4.4 ㎜, 4.6 ㎜, 4.8 ㎜, 5 ㎜, 5.2 ㎜, 5.4 ㎜, 5.6 ㎜, 5.8 ㎜, 6 ㎜, 6.2 ㎜, 6.4 ㎜, 6.6 ㎜, 6.8 ㎜, 7 ㎜, 7.2 ㎜, 7.4 ㎜, 7.6 ㎜, 7.8 ㎜, 8 ㎜, 8.2 ㎜, 8.4 ㎜, 8.6 ㎜, 8.8 ㎜, 9 ㎜ 또는 10 ㎜ 이상의 거리를 두고 위치한다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크는 상기 기판 부분으로부터 약 10 ㎜, 9 ㎜, 8.8 ㎜, 8.6 ㎜, 8.4 ㎜, 8.2 ㎜, 8 ㎜, 7.8 ㎜, 7.6 ㎜, 7.4 ㎜, 7.2 ㎜, 7 ㎜, 6.8 ㎜, 6.6 ㎜, 6.4 ㎜, 6.2 ㎜, 6 ㎜, 5.8 ㎜, 5.6 ㎜, 5.4 ㎜, 5.2 ㎜, 5 ㎜, 4.8 ㎜, 4.6 ㎜, 4.4 ㎜, 4.2 ㎜, 4 ㎜, 3.8 ㎜, 3.6 ㎜, 3.4 ㎜, 3.2 ㎜, 3 ㎜, 2.8 ㎜, 2.6 ㎜, 2.4 ㎜, 2.2 ㎜, 2 ㎜, 1.8 ㎜, 1.6 ㎜, 1.4 ㎜, 1.2 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.7 ㎜, 0.6 ㎜, 0.5 ㎜, 0.4 ㎜, 0.3 ㎜, 0.2 ㎜ 또는 0.1 ㎜ 이하의 거리를 두고 위치한다. 기준 마크는 기판의

가장자리로부터 0.1 mm 내지 10 mm, 0.2 mm 내지 9 mm, 0.3 mm 내지 8 mm, 0.4 mm 내지 7 mm, 0.5 mm 내지 6 mm, 0.1 mm 내지 6 mm, 0.2 mm 내지 5 mm, 0.3 mm 내지 4 mm, 0.4 mm 내지 3 mm, 또는 0.5 mm 내지 2 mm의 거리를 두고 위치할 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 mm 내지 5 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 기준 마크는 거리 면에서 클러스터에 가까이 위치할 수 있는데, 이때 예시적 X-축 및 Y-축 거리는 각각 2515 및 2514로 표시되어 있다. 일부 실시양태들에서, 클러스터와 기준 마크 사이의 거리는 약 0.001 mm, 0.005 mm, 0.01 mm, 0.02 mm, 0.03 mm, 0.04 mm, 0.05 mm, 0.06 mm, 0.07 mm, 0.08 mm, 0.09 mm, 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.2 mm, 1.5 mm, 1.7 mm, 2 mm, 2.2 mm, 2.5 mm, 2.7 mm, 3 mm, 3.5 mm, 4 mm, 4.5 mm, 5 mm, 5.5 mm, 6 mm, 6.5 mm 또는 8 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 클러스터와 기준 마크 사이의 거리는 약 8 mm, 6.5 mm, 6 mm, 5.5 mm, 5 mm, 4.5 mm, 4 mm, 3.5 mm, 3 mm, 2.7 mm, 2.5 mm, 2.2 mm, 2 mm, 1.7 mm, 1.5 mm, 1.2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.2 mm, 0.1 mm, 0.09 mm, 0.08 mm, 0.07 mm, 0.06 mm, 0.05 mm, 0.04 mm, 0.03 mm, 0.02 mm, 0.01 mm, 0.005 mm 또는 0.001 mm 이하이다. 클러스터와 기준 마크 사이의 거리는 0.001 mm 내지 8 mm, 0.01 mm 내지 7 mm, 0.05 mm 내지 6 mm, 0.1 mm 내지 5 mm, 0.5 mm 내지 4 mm, 0.6 mm 내지 3 mm, 0.7 mm 내지 2 mm, 또는 0.8 mm 내지 1.7 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.5 mm 내지 2 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0198] 도 25e는 도 25d에 나타낸 예시적 마이크로플루이딕 디바이스의 실질적으로 평평한 기판 부분의 횡단면을 보여준다. 상기 횡단면은 군들의 클러스터를 각각 포함하는 한 줄의 11개 군들을 보여주는데, 이때 각각의 군은 제1 채널로부터 확장되는 복수의 제2 채널들을 포함한다. 2523으로 예시된 바와 같이, 군의 총 길이는 약 0.05 mm 내지 약 5 mm만큼 길 수 있다. 일부 실시양태들에서, 군의 총 길이는 약 0.05 mm, 0.06 mm, 0.07 mm, 0.08 mm, 0.09 mm, 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.2 mm, 1.5 mm, 1.7 mm, 2 mm, 2.2 mm, 2.5 mm, 2.7 mm, 3 mm, 3.2 mm, 3.5 mm, 3.7 mm, 4 mm, 4.2 mm, 4.5 mm, 4.7 mm 또는 5 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 군의 총 길이는 약 5 mm, 4.7 mm, 4.5 mm, 4.2 mm, 4 mm, 3.7 mm, 3.5 mm, 3.2 mm, 3 mm, 2.7 mm, 2.5 mm, 2.2 mm, 2 mm, 1.7 mm, 1.5 mm, 1.2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.2 mm, 0.1 mm, 0.09 mm, 0.08 mm, 0.07 mm, 0.06 mm 또는 0.05 mm 이하이다. 군의 총 길이는 0.05 mm 내지 5 mm, 0.06 mm 내지 4 mm, 0.07 mm 내지 3 mm, 0.08 mm 내지 2 mm, 0.09 mm 내지 1 mm, 0.1 mm 내지 0.9 mm, 0.2 mm 내지 0.8 mm, 또는 0.3 mm 내지 0.7 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 mm 내지 0.7 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일부 실시양태들에서, 마이크로플루이딕 디바이스에서 클러스터의 예시적 배치를 보여주는 도 25f에 예시된 바와 같이, 마이크로플루이딕 디바이스는 표지 또는 일련의 표지를 위한 위치를 가질 수 있다. 거리 2603으로 예시된 바와 같이, 표지는 기판의 가장자리 근처에 위치할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표지는 기판의 가장자리로부터 약 0.1 mm 내지 약 10 mm의 거리를 두고 위치한다. 일부 실시양태들에서, 표지는 기판의 가장자리로부터 약 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.2 mm, 1.4 mm, 1.6 mm, 1.8 mm, 2 mm, 2.2 mm, 2.4 mm, 2.6 mm, 2.8 mm, 3 mm, 3.2 mm, 3.4 mm, 3.6 mm, 3.8 mm, 4 mm, 4.2 mm, 4.4 mm, 4.6 mm, 4.8 mm, 5 mm, 5.2 mm, 5.4 mm, 5.6 mm, 5.8 mm, 6 mm, 6.2 mm, 6.4 mm, 6.6 mm, 6.8 mm, 7 mm, 7.2 mm, 7.4 mm, 7.6 mm, 7.8 mm, 8 mm, 8.2 mm, 8.4 mm, 8.6 mm, 8.8 mm, 9 mm 또는 10 mm 이상의 거리를 두고 위치한다. 일부 실시양태들에서, 표지는 기판의 가장자리로부터 약 10 mm, 9 mm, 8.8 mm, 8.6 mm, 8.4 mm, 8.2 mm, 8 mm, 7.8 mm, 7.6 mm, 7.4 mm, 7.2 mm, 7 mm, 6.8 mm, 6.6 mm, 6.4 mm, 6.2 mm, 6 mm, 5.8 mm, 5.6 mm, 5.4 mm, 5.2 mm, 5 mm, 4.8 mm, 4.6 mm, 4.4 mm, 4.2 mm, 4 mm, 3.8 mm, 3.6 mm, 3.4 mm, 3.2 mm, 3 mm, 2.8 mm, 2.6 mm, 2.4 mm, 2.2 mm, 2 mm, 1.8 mm, 1.6 mm, 1.4 mm, 1.2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.2 mm 또는 0.1 mm 이하의 거리를 두고 위치한다. 상기 거리는 0.1 mm 내지 10 mm, 0.2 mm 내지 9 mm, 0.3 mm 내지 8 mm, 0.4 mm 내지 7 mm, 0.5 mm 내지 6 mm, 0.6 mm 내지 5 mm, 0.7 mm 내지 4 mm, 0.8 mm 내지 3 mm, 0.9 mm 내지 2 mm 또는 1.5 mm의 범위 내에 있을 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.5 mm 내지 2 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 표지는 2602로 예시된 바와 같이 원점으로부터 약 0.1 mm 내지 약 20 mm의 위치에서 시작할 수 있다. 표지는 2601로 예시된 바와 같이 약 1 mm 내지 약 32 mm의 길이를 가질 수 있다.

[0199] **고질량 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 큰 크기의 비아를 가진 웨이퍼**

[0200] 일부 실시양태들에서, 본 발명은 표면 상에서의 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 조절된 유동 및 질량 전달 경로를 위한 방법 및 시스템을 제공한다. 본원에서 제공된 시스템 및 방법의 이점은 질량 전달 경로의 조절된 균일한 분포, 화학적 노출 시간 및 올리고뉴클레오티드 합성 동안의 세척 효능을 위한 개선된 수준의 구조를 허용

한다. 추가로, 본원에 기재된 방법 및 시스템은 성장하는 올리고뉴클레오티드에 의한 배제된 부피가 올리고뉴클레오티드를 성장시키는 데에 이용가능하거나 적합한 초기 이용가능한 부피의 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 이하보다 더 많이 차지하지 않도록, 예컨대, 성장하는 올리고뉴클레오티드를 위한 충분한 부피를 제공함으로써 증가된 스윕(sweep) 효율을 허용한다. 또한, 본원에 기재된 방법 및 시스템은 올리고머가 80-머를 초과하여 100-머, 120-머, 150-머, 175-머, 200-머, 225-머, 250-머, 275-머, 300-머, 325-머, 350-머, 375-머, 400-머, 425-머, 450-머, 475-머 또는 500-머 이상까지 성장하기에 충분한 구조를 허용한다.

[0201] 따라서, 본원에 기재된 방법 및 시스템은 이 이점들을 달성하기 위한 해결책, 예컨대, 작은 평행한 통로들의 집합체를 제공한다. 구조물, 예컨대, 작은 비아를 사용하여 보다 더 작은 구조물, 예컨대, "리볼버 패턴"에서 발견된 구조물을 공급할 수 있다(도 56b). 내부 표면 상에서 낮은 표면 에너지 표면을 가진 구조물은 기체가 벽상에 매달리게 할 수 있다. 기포는 유전자 조립을 위해 이용된 올리고뉴클레오티드 합성 주기 또는 후속 수성 단계 동안 유속 및 유동 균일성을 방해할 수 있다. 따라서, 올리고뉴클레오티드 합성을 위해 채택된 구조물은 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이 증가된 표면 에너지를 가진 표면을 포함할 수 있다.

[0202] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 시스템은 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 기판을 제작하는 실리콘 웨이퍼 공정을 활용한다. 이러한 기판은 침착 디바이스, 예컨대, 잉크젯을 통한 물질 침착에 접근할 수 있는 일련의 부위들을 가질 수 있다. 본 발명의 다양한 실시양태들에 따라 제작된 기판은 그들의 평면을 통해 복수의 이러한 부위들 사이에 공유된 침수 화학반응 단계를 뒷받침할 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 디바이스는 수성 시약을 안심하고 주입할 수 있고 풀링할 수 있게 한다(도 61).

[0203] 다양한 실시양태들에서, 큰 비아를 가진 이러한 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스를 표준 실리콘 온 인슐레이터(SOI) 실리콘 웨이퍼 상에서 생성한다. 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스는 약 10 마이크로미터(㎛), 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 ㎛, 500 ㎛, 550 ㎛, 600 ㎛, 650 ㎛, 700 ㎛, 750 ㎛, 800 ㎛, 850 ㎛, 900 ㎛, 950 ㎛ 또는 1000 ㎛ 이상의 총 폭을 가질 수 있다. 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스는 약 1000 ㎛, 900 ㎛, 850 ㎛, 750 ㎛, 700 ㎛, 650 ㎛, 600 ㎛, 550 ㎛, 500 ㎛, 450 ㎛, 400 ㎛, 350 ㎛, 300 ㎛, 250 ㎛, 200 ㎛, 190 ㎛, 180 ㎛, 170 ㎛, 160 ㎛, 150 ㎛, 140 ㎛, 130 ㎛, 120 ㎛, 110 ㎛, 100 ㎛, 95 ㎛, 90 ㎛, 85 ㎛, 80 ㎛, 75 ㎛, 70 ㎛, 65 ㎛, 60 ㎛, 55 ㎛, 50 ㎛, 45 ㎛, 40 ㎛, 35 ㎛, 30 ㎛, 25 ㎛, 20 ㎛, 19 ㎛, 18 ㎛, 17 ㎛, 16 ㎛, 15 ㎛, 14 ㎛, 13 ㎛, 12 ㎛, 11 ㎛ 또는 10 ㎛ 이하의 총 폭을 가질 수 있다. 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스는 10 ㎛ 내지 1000 ㎛, 11 ㎛ 내지 950 ㎛, 12 ㎛ 내지 900 ㎛, 13 ㎛ 내지 850 ㎛, 14 ㎛ 내지 800 ㎛, 15 ㎛ 내지 750 ㎛, 16 ㎛ 내지 700 ㎛, 17 ㎛ 내지 650 ㎛, 18 ㎛ 내지 600 ㎛, 19 ㎛ 내지 550 ㎛, 20 ㎛ 내지 500 ㎛, 25 ㎛ 내지 450 ㎛, 30 ㎛ 내지 400 ㎛, 35 ㎛ 내지 350 ㎛, 40 ㎛ 내지 300 ㎛, 45 ㎛ 내지 250 ㎛, 50 ㎛ 내지 200 ㎛, 55 ㎛ 내지 150 ㎛, 60 ㎛ 내지 140 ㎛, 65 ㎛ 내지 130 ㎛, 70 ㎛ 내지 120 ㎛, 75 ㎛ 내지 110 ㎛, 70 ㎛ 내지 100 ㎛, 75 ㎛ 내지 80 ㎛, 85 ㎛ 내지 90 ㎛, 또는 90 ㎛ 내지 95 ㎛의 총 폭을 가질 수 있다. 당업자는 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 총 폭이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 20 ㎛ 내지 80 ㎛ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 올리고뉴클레오티드 디바이스의 총 폭은 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있다. 상기 디바이스는 핸들 층과 디바이스 층으로 세분될 수 있다. 상기 디바이스의 전부 또는 일부는 이산화규소 층으로 덮일 수 있다. 이산화규소 층은 약 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 15 nm, 20 nm, 25 nm, 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 125 nm, 150 nm, 175 nm, 200 nm, 300 nm, 400 nm, 500 nm, 1 ㎛, 1.1 ㎛, 1.2 ㎛, 1.3 ㎛, 1.4 ㎛, 1.5 ㎛, 1.6 ㎛, 1.7 ㎛, 1.8 ㎛, 1.9 ㎛ 또는 2.0 ㎛ 이상의 두께를 가질 수 있다. 이산화규소 층은 약 2.0 ㎛, 1.9 ㎛, 1.8 ㎛, 1.7 ㎛, 1.6 ㎛, 1.5 ㎛, 1.4 ㎛, 1.3 ㎛, 1.2 ㎛, 1.1 ㎛, 1.0 ㎛, 500 nm, 400 nm, 300 nm, 200 nm, 175 nm, 150 nm, 125 nm, 100 nm, 95 nm, 90 nm, 85 nm, 80 nm, 75 nm, 70 nm, 65 nm, 60 nm, 55 nm, 50 nm, 45 nm, 40 nm, 35 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 15 nm, 10 nm, 9 nm, 8 nm, 7 nm, 6 nm, 5 nm, 4 nm, 3 nm, 2 nm 또는 1 nm 이하의 두께를 가질 수 있다. 이산화규소 층은 1.0 nm 내지 2.0 ㎛, 1.1 ㎛ 내지 1.9 ㎛, 1.2 nm 내지 1.8 nm, 1.3 ㎛ 내지 1.7 ㎛, 또는 1.4 ㎛ 내지 1.6 ㎛의 두께를 가질 수 있다. 당업자는 이산화규소 층이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 1.5 ㎛ 내지 1.9 ㎛ 내에 속하는 두께를 가질 수 있다는 것을 인식한다. 이산화규소는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위

내에 속하는 두께를 가질 수 있다.

[0204] 디바이스 층은 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 성장에 적합한 복수의 구조물들, 예컨대, 복수의 작은 홀들을 포함할 수 있다(도 61). 디바이스 층은 약 1 마이크로미터(㎛), 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 ㎛, 200 ㎛, 300 ㎛, 400 ㎛ 또는 500 ㎛ 이상의 두께를 가질 수 있다. 디바이스 층은 약 500 ㎛, 400 ㎛, 300 ㎛, 200 ㎛, 100 ㎛, 95 ㎛, 90 ㎛, 85 ㎛, 80 ㎛, 75 ㎛, 70 ㎛, 65 ㎛, 60 ㎛, 55 ㎛, 50 ㎛, 45 ㎛, 40 ㎛, 35 ㎛, 30 ㎛, 25 ㎛, 20 ㎛, 19 ㎛, 18 ㎛, 17 ㎛, 16 ㎛, 15 ㎛, 14 ㎛, 13 ㎛, 12 ㎛, 11 ㎛, 10 ㎛, 9 ㎛, 8 ㎛, 7 ㎛, 6 ㎛, 5 ㎛, 4 ㎛, 3 ㎛, 2 ㎛ 또는 1 ㎛ 이하의 두께를 가질 수 있다. 디바이스 층은 1 ㎛ 내지 100 ㎛, 2 ㎛ 내지 95 ㎛, 3 ㎛ 내지 90 ㎛, 4 ㎛ 내지 85 ㎛, 5 ㎛ 내지 80 ㎛, 6 ㎛ 내지 75 ㎛, 7 ㎛ 내지 70 ㎛, 8 ㎛ 내지 65 ㎛, 9 ㎛ 내지 60 ㎛, 10 ㎛ 내지 55 ㎛, 11 ㎛ 내지 50 ㎛, 12 ㎛ 내지 45 ㎛, 13 ㎛ 내지 40 ㎛, 14 ㎛ 내지 35 ㎛, 15 ㎛ 내지 30 ㎛, 16 ㎛ 내지 25 ㎛, 17 ㎛ 내지 20 ㎛, 또는 18 ㎛ 내지 19 ㎛의 두께를 가질 수 있다. 당업자는 디바이스 층의 두께가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 20 ㎛ 내지 60 ㎛ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 디바이스 층의 두께는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있다. 핸들 층 및/또는 디바이스 층은 깊은 특징부를 포함할 수 있다. 이러한 깊은 특징부는 적합한 MEMS 기법, 예컨대, 깊은 반응성 이온 식각을 이용함으로써 제작될 수 있다. 일련의 식각들을 이용하여 원하는 디바이스 형상을 구축할 수 있다. 식각들 중 하나는 보다 더 오래 지속하고 절연체 층을 침투하기 위해 허용될 수 있다. 따라서, 디바이스의 전체 폭에 걸쳐 있는 통로를 구축할 수 있다. 이러한 통로를 이용하여 유체를 기판, 예컨대, 실질적으로 평평한 기판의 한 표면으로부터 또 다른 표면으로 통과시킬 수 있다.

[0205] 일부 실시양태들에서, 디바이스 층은 디바이스 층을 침투하는 2개 이상 내지 500개 이하의 부위, 2개 이상 내지 약 250개의 부위, 2개 이상 내지 약 200개의 부위, 2개 이상 내지 약 175개의 부위, 2개 이상 내지 약 150개의 부위, 2개 이상 내지 약 125개의 부위, 2개 이상 내지 약 100개의 부위, 2개 이상 내지 약 75개의 부위, 2개 이상 내지 약 50개의 부위, 2개 이상 내지 약 25개의 부위, 또는 2개 이상 내지 약 250개의 부위를 가진다. 일부 실시양태들에서, 디바이스 층은 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개, 30개, 50개, 75개, 100개, 125개, 150개, 175개, 200개, 225개, 250개, 275개, 300개, 350개, 400개, 450개 또는 500개 이상의 부위를 가진다. 당업자는 디바이스 층을 침투하는 부위의 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 75개 내지 150개 부위에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 디바이스 층은 약 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 ㎛ 또는 100 ㎛ 이상의 두께를 가질 수 있다. 디바이스 층은 약 100 ㎛, 95 ㎛, 90 ㎛, 85 ㎛, 80 ㎛, 75 ㎛, 70 ㎛, 65 ㎛, 60 ㎛, 55 ㎛, 50 ㎛, 45 ㎛, 40 ㎛, 35 ㎛, 30 ㎛, 25 ㎛, 20 ㎛, 19 ㎛, 18 ㎛, 17 ㎛, 16 ㎛, 15 ㎛, 14 ㎛, 13 ㎛, 12 ㎛, 11 ㎛, 10 ㎛, 9 ㎛, 8 ㎛, 7 ㎛, 6 ㎛, 5 ㎛, 4 ㎛, 3 ㎛, 2 ㎛ 또는 1 ㎛ 이하의 두께를 가질 수 있다. 디바이스 층은 1 ㎛ 내지 100 ㎛, 2 ㎛ 내지 95 ㎛, 3 ㎛ 내지 90 ㎛, 4 ㎛ 내지 85 ㎛, 5 ㎛ 내지 80 ㎛, 6 ㎛ 내지 75 ㎛, 7 ㎛ 내지 70 ㎛, 8 ㎛ 내지 65 ㎛, 9 ㎛ 내지 60 ㎛, 10 ㎛ 내지 55 ㎛, 11 ㎛ 내지 50 ㎛, 12 ㎛ 내지 45 ㎛, 13 ㎛ 내지 40 ㎛, 14 ㎛ 내지 35 ㎛, 15 ㎛ 내지 30 ㎛, 16 ㎛ 내지 25 ㎛, 17 ㎛ 내지 20 ㎛, 또는 18 ㎛ 내지 19 ㎛에 속하는 임의의 두께를 가질 수 있다. 당업자는 디바이스 층이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 4 ㎛ 내지 100 ㎛에 속할 수 있는 임의의 두께를 가질 수 있다는 것을 인식한다.

[0206] 디바이스 층의 두께는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있다. 핸들 층은 디바이스 층에서 특징부에 인접하는 웨이퍼 내로 식각된 보다 더 큰 영역을 가질 수 있다. 핸들 층은 약 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 ㎛, 500 ㎛, 550 ㎛, 600 ㎛, 650 ㎛, 700 ㎛, 750 ㎛, 800 ㎛, 850 ㎛, 900 ㎛, 950 ㎛ 또는 1000 ㎛ 이상의 두께를 가질 수 있다. 핸들 층은 약 1000 ㎛, 950 ㎛, 900 ㎛, 850 ㎛, 800 ㎛, 750 ㎛, 700 ㎛, 650 ㎛, 600 ㎛, 550 ㎛, 500 ㎛, 450 ㎛, 400 ㎛, 350 ㎛, 300 ㎛, 250 ㎛, 200 ㎛, 150 ㎛, 100 ㎛, 95 ㎛, 90 ㎛, 85 ㎛, 80 ㎛, 75 ㎛, 70 ㎛, 65 ㎛, 60 ㎛, 55 ㎛, 50 ㎛, 45 ㎛, 40 ㎛, 30 ㎛, 25 ㎛, 20 ㎛, 19 ㎛, 18 ㎛, 17 ㎛, 16 ㎛, 15 ㎛, 14 ㎛, 13 ㎛, 12 ㎛, 11 ㎛, 10 ㎛, 9 ㎛, 8 ㎛, 7 ㎛, 6 ㎛, 5 ㎛, 4 ㎛, 3 ㎛, 2 ㎛ 또는 1 ㎛ 이하의 두께를 가질 수 있다. 핸들 층은 10 ㎛ 내지 1000 ㎛, 11 ㎛ 내지 950 ㎛, 12 ㎛ 내

지 900 ㎛, 13 ㎛ 내지 850 ㎛, 14 ㎛ 내지 800 ㎛, 15 ㎛ 내지 750 ㎛, 16 ㎛ 내지 700 ㎛, 17 ㎛ 내지 650 ㎛, 18 ㎛ 내지 600 ㎛, 19 ㎛ 내지 550 ㎛, 20 ㎛ 내지 500 ㎛, 25 ㎛ 내지 450 ㎛, 30 ㎛ 내지 400 ㎛, 35 ㎛ 내지 350 ㎛, 40 ㎛ 내지 300 ㎛, 45 ㎛ 내지 250 ㎛, 50 ㎛ 내지 200 ㎛, 55 ㎛ 내지 150 ㎛, 60 ㎛ 내지 140 ㎛, 65 ㎛ 내지 130 ㎛, 70 ㎛ 내지 120 ㎛, 75 ㎛ 내지 110 ㎛, 70 ㎛ 내지 100 ㎛, 75 ㎛ 내지 80 ㎛, 85 ㎛ 내지 90 ㎛, 또는 90 ㎛ 내지 95 ㎛ 범위 내의 임의의 두께를 가질 수 있다. 당업자는 핸들 층이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 20 ㎛ 내지 350 ㎛에 속하는 두께를 가질 수 있다는 것을 인식한다. 핸들 층의 두께는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속한다.

[0207] 핸들 층 내의 식각된 영역은 기판에 매립된 웰 유사 구조물을 형성할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 핸들 층 내의 식각된 영역은 약 100 ㎛, 101 ㎛, 102 ㎛, 103 ㎛, 104 ㎛, 105 ㎛, 106 ㎛, 107 ㎛, 108 ㎛, 109 ㎛, 110 ㎛, 120 ㎛, 130 ㎛, 140 ㎛, 150 ㎛, 160 ㎛, 170 ㎛, 180 ㎛, 190 ㎛, 200 ㎛, 250 ㎛, 300 ㎛, 350 ㎛, 400 ㎛, 450 ㎛, 500 ㎛, 550 ㎛, 600 ㎛, 650 ㎛, 700 ㎛, 750 ㎛, 800 ㎛, 850 ㎛, 900 ㎛, 950 ㎛ 또는 1000 ㎛ 이상의 두께를 가질 수 있다. 핸들 층 내의 식각된 영역은 약 1000 ㎛, 950 ㎛, 900 ㎛, 850 ㎛, 800 ㎛, 750 ㎛, 700 ㎛, 650 ㎛, 600 ㎛, 550 ㎛, 500 ㎛, 450 ㎛, 400 ㎛, 350 ㎛, 300 ㎛, 250 ㎛, 200 ㎛, 190 ㎛, 180 ㎛, 170 ㎛, 160 ㎛, 150 ㎛, 140 ㎛, 130 ㎛, 120 ㎛, 110 ㎛, 109 ㎛, 108 ㎛, 107 ㎛, 106 ㎛, 105 ㎛, 104 ㎛, 103 ㎛, 102 ㎛, 101 ㎛ 또는 100 ㎛ 이하의 임의의 두께를 가질 수 있다. 핸들 층 내의 식각된 영역은 100 ㎛ 내지 1000 ㎛, 101 ㎛ 내지 950 ㎛, 102 ㎛ 내지 900 ㎛, 103 ㎛ 내지 850 ㎛, 104 ㎛ 내지 800 ㎛, 105 ㎛ 내지 750 ㎛, 106 ㎛ 내지 700 ㎛, 105 ㎛ 내지 650 ㎛, 106 ㎛ 내지 600 ㎛, 107 ㎛ 내지 550 ㎛, 108 ㎛ 내지 500 ㎛, 109 ㎛ 내지 450 ㎛, 110 ㎛ 내지 400 ㎛, 120 ㎛ 내지 350 ㎛, 130 ㎛ 내지 300 ㎛, 140 ㎛ 내지 250 ㎛, 150 ㎛ 내지 200 ㎛, 160 ㎛ 내지 190 ㎛, 또는 170 ㎛ 내지 180 ㎛ 범위 내의 임의의 두께를 가질 수 있다. 당업자는 핸들 층이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 200 ㎛ 내지 300 ㎛에 속하는 두께를 가질 수 있다는 것을 인식한다.

[0208] 핸들 층 내의 식각된 영역의 모양은 직사각형 또는 곡선일 수 있다.

[0209] 일부 실시양태들에서, 핸들 층 내의 큰 식각된 영역은 올리고뉴클레오티드 합성 주기 및/또는 올리고뉴클레오티드 방출, 예컨대, 기체상 내로의 올리고뉴클레오티드 방출 동안 기체상으로부터 액체상으로의 용이한 전이를 허용한다.

[0210] **높은 표면적 합성 부위를 가진 기판**

[0211] 다양한 실시양태들에서, 본원에 기재된 방법 및 시스템은 고질량의 올리고뉴클레오티드의 합성을 위한 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스에 관한 것이다. 상기 합성은 동시적일 수 있다. 예를 들면, 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 100개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 450개, 500개, 550개, 600개, 650개, 700개, 750개, 800개, 850개, 900개, 1000개, 10000개, 50000개 또는 100000개 이상의 올리고뉴클레오티드들이 동시에 합성될 수 있다. 동시에 합성될 수 있는 올리고뉴클레오티드의 총수는 2 내지 100000, 3 내지 50000, 4 내지 10000, 5 내지 1000, 6 내지 900, 7 내지 850, 8 내지 800, 9 내지 750, 10 내지 700, 11 내지 650, 12 내지 600, 13 내지 550, 14 내지 500, 15 내지 450, 16 내지 400, 17 내지 350, 18 내지 300, 19 내지 250, 20 내지 200, 21 내지 150, 22 내지 100, 23 내지 50, 24 내지 45, 25 내지 40, 또는 30 내지 35일 수 있다. 당업자는 동시에 합성되는 올리고뉴클레오티드의 총수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 25 내지 100에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 동시에 합성되는 올리고뉴클레오티드의 총수는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있다. 디바이스 내에서 합성되는 올리고뉴클레오티드의 총 몰질량 또는 올리고뉴클레오티드 각각의 몰질량은 약 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 25000, 50000, 75000 또는 100000 피코몰 이상일 수 있다. 디바이스 내의 올리고뉴클레오티드 각각의 길이 또는 올리고뉴클레오티드의 평균 길이는 약 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 100개, 150개, 200개, 300개, 400개 또는 500개 이상의 뉴클레오티드일 수 있다. 디바이스 내의 올리고뉴클레오티드 각각의 길이 또는 올리고뉴클레오티드의 평균 길이는 약 500개, 400개, 300개, 200개, 150개, 100개, 50개, 45개, 35개, 30개, 25개, 20개, 19개, 18개, 17개, 16개, 15개, 14개, 13개, 12개, 11개 또는 10개 이하의 뉴클레오티드일 수 있다. 디바이스 내의 올리고뉴클레오티드 각각의 길이 또는 올리고뉴클레오티드의 평균 길이는 10 내지 500, 9 내지 400, 11 내지 300, 12 내지 200, 13 내지 150, 14 내지 100, 15 내지 50, 16 내지 45, 17 내지 40, 18 내지 35, 또는 19 내지 25 내에 속할 수 있다. 당업자는 디바이스 내의 올리고뉴클레오티드 각각의 길이 또는

올리고뉴클레오티드의 평균 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 100 내지 300에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 디바이스 내의 올리고뉴클레오티드 각각의 길이 또는 올리고뉴클레오티드의 평균 길이는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있다.

[0212] 다양한 실시양태들에서, 높은 표면적은 도 62에 예시된 바와 같이 상승된 및/또는 하강된 특징부를 가진 기판의 표면을 구조화함으로써 달성된다. 상승된 또는 하강된 특징부는 날카롭거나 둥근 가장자리를 가질 수 있고 임의의 원하는 기하학적 모양, 예컨대, 직사각형, 원형 등의 횡단면(폭)을 가질 수 있다. 상기 특징부는 전체 기판 표면 또는 이의 부분을 따라 채널을 형성할 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 약 1:20, 2:20, 3:20, 4:20, 5:20, 6:20, 10:20, 15:20, 20:20, 20:10, 20:5 또는 20:1 이상의 종횡비를 가질 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 약 20:1, 20:5, 20:10, 20:20, 20:15, 20:10, 20:10, 6:20, 5:20, 4:20, 3:20, 2:20 또는 1:20 이하의 종횡비를 가질 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 1:20 내지 20:1, 2:20 내지 20:5, 3:20 내지 20:10, 4:20 내지 20:15, 5:20 내지 20:20, 또는 6:20 내지 20:20에 속하는 종횡비를 가질 수 있다. 당업자는 상승된 또는 하강된 특징부가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 3:20 내지 4:20에 속할 수 있는 종횡비를 가질 수 있다는 것을 인식한다. 상승된 또는 하강된 특징부는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속하는 종횡비를 가질 수 있다.

[0213] 상승된 또는 하강된 특징부는 약 10 나노미터(nm), 11 nm, 12 nm, 20 nm, 30 nm, 100 nm, 500 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm 또는 1000000 nm 이상의 횡단면을 가질 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 약 1000000 nm, 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 500 nm, 100 nm, 30 nm, 20 nm, 12 nm, 11 nm 또는 10 nm 이하의 횡단면을 가질 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 10 nm 내지 1000000 nm, 11 nm 내지 100000 nm, 12 nm 내지 10000 nm, 20 nm 내지 1000 nm, 또는 30 nm 내지 500 nm에 속하는 횡단면을 가질 수 있다. 당업자는 상승된 또는 하강된 특징부가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 10 nm 내지 100 nm에 속할 수 있는 횡단면을 가질 수 있다는 것을 인식한다. 상승된 또는 하강된 특징부는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속하는 횡단면을 가질 수 있다.

[0214] 상승된 또는 하강된 특징부는 약 10 나노미터(nm), 11 nm, 12 nm, 20 nm, 30 nm, 100 nm, 500 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm 또는 1000000 nm 이상의 높이를 가질 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 약 1000000 나노미터(nm), 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 500 nm, 100 nm, 30 nm, 20 nm, 12 nm, 11 nm 또는 10 nm 이하의 높이를 가질 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 10 nm 내지 1000000 nm, 11 nm 내지 100000 nm, 12 nm 내지 10000 nm, 20 nm 내지 1000 nm, 또는 30 nm 내지 500 nm에 속하는 높이를 가질 수 있다. 당업자는 상승된 또는 하강된 특징부가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 100 nm 내지 1000 nm에 속할 수 있는 높이를 가질 수 있다는 것을 인식한다. 상승된 또는 하강된 특징부는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속하는 높이를 가질 수 있다. 개별 상승된 또는 하강된 특징부는 약 5 나노미터(nm), 10 nm, 11 nm, 12 nm, 20 nm, 30 nm, 100 nm, 500 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm 또는 1000000 nm 이상의 거리에 의해 인접 상승된 또는 하강된 특징부로부터 분리될 수 있다. 개별 상승된 또는 하강된 특징부는 약 1000000 나노미터(nm), 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 500 nm, 100 nm, 30 nm, 20 nm, 12 nm, 11 nm, 10 nm 또는 5 nm 이하의 거리에 의해 인접 상승된 또는 하강된 특징부로부터 분리될 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부는 5 nm 내지 1000000 nm, 10 nm 내지 100000 nm, 11 nm 내지 10000 nm, 12 nm 내지 1000 nm, 20 nm 내지 500 nm, 또는 30 nm 내지 100 nm에 속하는 높이를 가질 수 있다. 당업자는 개별 상승된 또는 하강된 특징부가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 100 nm 내지 1000 nm에 속할 수 있는 거리에 의해 인접 상승된 또는 하강된 특징부로부터 분리될 수 있다는 것을 인식한다. 개별 상승된 또는 하강된 특징부는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속하는 거리에 의해 인접 상승된 또는 하강된 특징부로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 2개의 상승된 또는 하강된 특징부들 사이의 거리는 상승된 또는 하강된 특징부의 횡단면(폭) 또는 평균 횡단면의 약 0.1배, 0.2배, 0.5배, 1.0배, 2.0배, 3.0배, 5.0배 또는 10.0배 이상이다. 2개의 상승된 또는 하강된 특징부들 사이의 거리는 상승된 또는 하강된 특징부의 횡단면(폭) 또는 평균 횡단면의 약 10.0배, 5.0배, 3.0배, 2.0배, 1.0배, 0.5배, 0.2배 또는 0.1배 이하이다. 2개의 상승된 또는 하강된 특징부들 사이의 거리는 상승된 또는 하강된 특징부의 횡단면(폭) 또는 평균 횡단면의 0.1배 내지 10배, 0.2배 내지 5.0배, 또는 1.0배 내지 3.0배일 수 있다. 당업자는 2개의 상승된 또는 하강된 특징부들 사이의 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 상승된 또는 하강된 특징부의 횡단면(폭) 또는 평균 횡단면의 5배 내지 10배 내의 임의의 배수일 수 있다는 것을 인식한다. 2개의 상승된 또는 하강된 특징부들 사이의 거리는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있다.

[0215] 일부 실시양태들에서, 상승된 또는 하강된 특징부의 군은 서로 분리되어 있다. 상승된 또는 하강된 특징부의 군의 둘레는 상이한 유형의 구조적 특징부 또는 차별 작용화에 의해 표시될 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부의 군은 단일 올리고뉴클레오티드의 합성에 전용될 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부의 군은 횡단면에서 약 10 ㎛, 11 ㎛, 12 ㎛, 13 ㎛, 14 ㎛, 15 ㎛, 20 ㎛, 50 ㎛, 70 ㎛, 90 ㎛, 100 ㎛, 150 ㎛ 또는 200 ㎛ 이상의 폭을 가진 영역에 걸쳐 있을 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부의 군은 횡단면에서 약 200 ㎛, 150 ㎛, 100 ㎛, 90 ㎛, 70 ㎛, 50 ㎛, 20 ㎛, 15 ㎛, 14 ㎛, 13 ㎛, 12 ㎛, 11 ㎛ 또는 10 ㎛ 이하의 폭을 가진 영역에 걸쳐 있을 수 있다. 상승된 또는 하강된 특징부의 군은 횡단면에서 10 ㎛ 내지 200 ㎛, 11 ㎛ 내지 150 ㎛, 12 ㎛ 내지 100 ㎛, 13 ㎛ 내지 90 ㎛, 14 ㎛ 내지 70 ㎛, 15 ㎛ 내지 50 ㎛, 또는 13 ㎛ 내지 20 ㎛의 폭을 가진 영역에 걸쳐 있을 수 있다. 당업자는 상승된 또는 하강된 특징부의 군이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 12 ㎛ 내지 200 ㎛에 속하는 폭을 가진 영역에 걸쳐 있을 수 있다는 것을 인식한다. 상승된 또는 하강된 특징부의 군은 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속하는 폭을 가진 영역에 걸쳐 있을 수 있다.

[0216] 다양한 실시양태들에서, 기판 상의 상승된 또는 하강된 특징부는 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 총 이용가능한 영역을 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 2배, 5배, 10배, 50배, 100배, 200배, 500배 또는 1000배 이상 증가시킨다. 기판 상의 상승된 또는 하강된 특징부는 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 총 이용가능한 영역을 약 1.1배 내지 1000배, 1.2배 내지 500배, 1.3배 내지 200배, 1.4배 내지 100배, 2배 내지 50배, 또는 5배 내지 100배 증가시킨다. 당업자는 기판 상의 상승된 또는 하강된 특징부가 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 총 이용가능한 영역을 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 배수, 예를 들면, 20배 내지 80배 증가시킬 수 있다는 것을 인식한다. 기판 상의 상승된 또는 하강된 특징부는 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 총 이용가능한 영역을 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있는 계수만큼 증가시킨다.

[0217] 큰 올리고뉴클레오티드 합성 표면을 사용하는 본 발명의 방법 및 시스템은 약 20분, 15분, 14분, 13분, 12분, 11분, 10분, 1분, 40초 또는 30초 이하의 뉴클레오티드 추가 주기 시간으로 다수의 올리고뉴클레오티드들을 동시에 합성할 수 있게 한다. 큰 올리고뉴클레오티드 합성 표면을 사용하는 본 발명의 방법 및 시스템은 30초 내지 20분, 40초 내지 10분, 또는 1분 내지 10분의 뉴클레오티드 추가 주기 시간으로 다수의 올리고뉴클레오티드들을 동시에 합성할 수 있게 한다. 당업자는 큰 올리고뉴클레오티드 합성 표면을 사용하는 본 발명의 방법 및 시스템이 이 값들 중 임의의 값, 예를 들면, 30초 내지 10분의 뉴클레오티드 추가 주기 시간으로 다수의 올리고뉴클레오티드들을 동시에 합성할 수 있게 한다는 것을 인식한다. 큰 올리고뉴클레오티드 합성 표면을 사용하는 본 발명의 방법 및 시스템은 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있는 뉴클레오티드 추가 주기 시간으로 다수의 올리고뉴클레오티드들을 동시에 합성할 수 있게 한다.

[0218] 기판 상에서 합성된 각각의 올리고뉴클레오티드에 대한, 기판 상에서 합성된 올리고뉴클레오티드들의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상에 대한, 또는 기판 평균에 대한 전체 오류율 또는 개별 유형의 오류, 예컨대, 결실, 삽입 또는 치환에 대한 오류율은 약 1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:40000, 1:50000, 1:60000, 1:70000, 1:80000, 1:90000 또는 1:1000000 이하일 수 있다. 기판 상에서 합성된 각각의 올리고뉴클레오티드에 대한, 기판 상에서 합성된 올리고뉴클레오티드들의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상에 대한, 또는 기판 평균에 대한 전체 오류율 또는 개별 유형의 오류, 예컨대, 결실, 삽입 또는 치환에 대한 오류율은 1:100 내지 1:10000, 또는 1:500 내지 1:30000에 속할 수 있다. 당업자는 기판 상에서 합성된 각각의 올리고뉴클레오티드에 대한, 기판 상에서 합성된 올리고뉴클레오티드들의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상에 대한, 또는 기판 평균에 대한 전체 오류율 또는 개별 유형의 오류, 예컨대, 결실, 삽입 또는 치환에 대한 오류율이 이 값들 중 임의의 값, 예를 들면, 1:500 내지 1:10000에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 기판 상에서 합성된 각각의 올리고뉴클레오티드에 대한, 기판 상에서 합성된 올리고뉴클레오티드들의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상에 대한, 또는 기판 평균에 대한 전체 오류율 또는 개별 유형의 오류, 예컨대, 결실, 삽입 또는 치환에 대한 오류율은 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위에 속할 수 있다.

[0219] 표준 실리콘 웨이퍼 공정을 이용하여, 전술된 바와 같은 높은 표면적, 및 화학적 노출의 신속한 교환을 허용하는 조절된 유동을 가질 기판을 생성할 수 있다. 올리고뉴클레오티드가 성장할 때, 예를 들면, 배제된 부피 효과로 인한 전체 채널 또는 공극 치수에 대한 실질적인 영향 없이 약 20-머, 25-머, 30-머, 50-머, 100-머, 200-머, 250-머, 300-머, 400-머 또는 500-머 이상보다 더 큰 올리고머 쇄가 합성될 수 있도록 충분히 분리되어

있는 일련의 구조물들을 가진 올리고뉴클레오티드 합성 기판을 생성할 수 있다. 올리고뉴클레오티드가 성장할 때, 예를 들면, 배제된 부피 효과로 인한 전체 채널 또는 공극 치수에 대한 실질적인 영향 없이 약 500-머, 200-머, 100-머, 50-머, 30-머, 25-머 또는 20-머 이하보다 더 큰 올리고머 쇄가 합성될 수 있도록 충분히 분리되어 있는 일련의 구조물들을 가진 올리고뉴클레오티드 합성 기판을 생성할 수 있다. 올리고뉴클레오티드가 성장할 때, 예를 들면, 배제된 부피 효과로 인한 전체 채널 또는 공극 치수에 대한 실질적인 영향 없이 약 20-머, 50-머, 75-머, 100-머, 125-머, 150-머, 175-머, 200-머, 250-머, 300-머, 350-머, 400-머 또는 500-머 이상인 올리고머 쇄가 합성될 수 있도록 충분히 분리되어 있는 일련의 구조물들을 가진 올리고뉴클레오티드 합성 기판을 생성할 수 있다. 당업자는 올리고뉴클레오티드가 성장할 때, 예를 들면, 배제된 부피 효과로 인한 전체 채널 또는 공극 치수에 대한 실질적인 영향 없이 약 이 값들 중 임의의 값들 사이, 예를 들면, 20-머 내지 300-머 또는 200-머보다 더 큰 올리고머 쇄가 합성될 수 있도록 충분히 분리되어 있는 일련의 구조물들을 가진 올리고뉴클레오티드 합성 기판을 생성할 수 있다는 것을 인식한다.

[0220] 도 62는 구조물들의 어레이를 가진 본 발명의 실시양태에 따른 예시적 기판을 보여준다. 특징부들 사이의 거리는 약 5 nm, 10 nm, 20 nm, 100 nm, 1000 nm, 10000 nm, 100000 nm 또는 1000000 nm 이상보다 더 클 수 있다. 특징부들 사이의 거리는 약 1000000 nm, 100000 nm, 10000 nm, 1000 nm, 100 nm, 20 nm, 10 nm 또는 5 nm 이하보다 더 클 수 있다. 특징부들 사이의 거리는 5 nm 내지 1000000 nm, 10 nm 내지 100000 nm, 20 nm 내지 10000 nm, 또는 100 nm 내지 1000 nm에 속할 수 있다. 당업자는 특징부들 사이의 거리가 이 값들 중 임의의 값들 사이, 예를 들면, 20 nm 내지 1000 nm에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 특징부들 사이의 거리는 범위의 종점으로서 사용되는 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위에 속할 수 있다. 한 실시양태에서, 특징부들 사이의 거리는 200 nm보다 더 크다. 특징부는 본원의 다른 부분에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 MEMS 공정, 예컨대, 시한 반응성 이온 식각 공정을 이용하는 공정에 의해 생성될 수 있다. 이러한 반도체 제작 공정은 전형적으로 200 nm, 100 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 25 nm, 20 nm, 10 nm 또는 5 nm보다 더 작은 특징부 크기를 생성할 수 있다. 당업자는 200 nm보다 더 작은 특징부 크기가 이 값들 중 임의의 값 사이, 예를 들면, 20 nm 내지 100 nm에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 특징부 크기는 범위의 종점으로서 사용되는 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위 내에 속할 수 있다. 한 실시양태에서, 40 ㎛ 폭 포스트들(posts)의 어레이는 합성을 위해 이용가능한 표면적의 약 2배인 30 ㎛ 깊이로 식각된다.

[0221] 상승된 또는 하강된 특징부들의 어레이는 매우 복잡하고 조밀한 라이브러리 생성을 위한 포스포라미다이트 화학 반응의 물질 침착을 허용하도록 분리될 수 있다. 상기 분리는 보다 더 큰 구조물에 의해, 또는 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 능동 영역 및 수동 영역을 생성하는 표면의 차별 작용화에 의해 달성될 수 있다. 대안적으로, 특정 조건 하에서 표면에의 절단가능한 올리고뉴클레오티드 부착 및 절단불가능한 올리고뉴클레오티드 부착의 영역을 생성함으로써 개별 올리고뉴클레오티드의 합성을 위한 위치들을 서로 분리할 수 있다. 디바이스, 예컨대, 잉크젯 프린터를 이용하여 시약을 개별 올리고뉴클레오티드 합성 위치에 침착시킬 수 있다. 차별 작용화는 기판 표면에 걸쳐 소수성을 교대로 달성함으로써, 침착된 시약의 비딩(beading) 또는 습윤화를 야기할 수 있는 물 접촉각 효과를 생성할 수도 있다. 보다 더 큰 구조물의 사용은 인접 스폿들의 시약에 의한 개별 올리고뉴클레오티드 합성 위치의 더럽혀짐 또는 교차-오염을 감소시킬 수 있다.

[0222] **반응기**

[0223] 또 다른 양태에서, 인클로저들의 어레이가 본원에 기재되어 있다. 인클로저들의 어레이는 반응기 캡을 포함하는 제1 기판 및 제2 기판을 포함하는 복수의 분해된 반응기들을 포함할 수 있다. 일부 경우, 2개 이상의 분해된 좌위들이 각각의 반응기 내에 함유된다. 분해된 반응기들은 분리가능한 밀봉에 의해 분리될 수 있다. 반응기 캡은 제1 기판으로부터의 제2 기판의 이형 시 반응기의 내용물을 보유할 수 있다. 복수의 분해된 반응기들은 ㎟당 1 이상의 임의의 적합한 밀도를 가질 수 있다. 복수의 반응기 캡들은 모이어티로 코팅될 수 있다. 모이어티는 화학적 불활성 또는 화학적 활성 모이어티일 수 있다. 반응기 캡 상에 코팅된 모이어티는 올리고뉴클레오티드의 부착을 최소화할 수 있는 모이어티일 수 있다. 화학적 모이어티의 유형은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있다.

[0224] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 반응기 캡은 캡핑 요소 기판의 표면 상에서 개방된 상부를 가진 인클로저를 의미할 수 있다. 예를 들면, 반응기 캡은 기판 표면의 상부 상에서 튀어나와 있는 실린더와 유사할 수 있다. 반응기 캡의 내경은 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 또는 500 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있다. 반응기의 외경은 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 또는 600 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있다. 상기 실린더의 테두리는 약 0.1, 0.5,

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, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300 또는 400 ㎛ 이상 또는 이하의 폭을 가질 수 있다. 내부에서 측정된 반응기 캡의 높이는 약 0.1, 0.5, 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, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있다. 도 7은 캡핑 요소 상의 반응기 캡의 예시적 실시양태를 보여준다.

[0225] 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 적합한 표면 변경 방법을 이용하여 반응기 캡 표면의 전부 또는 일부, 예컨대, 테두리 표면을 변경시킬 수 있다. 일부 경우, 표면 불규칙성이 조작된다. 화학적 표면 변경 및 불규칙성은 테두리의 물 접촉각을 조절하는 데에 기여할 수 있다. 유사한 표면 처리가 반응기 캡에 가까이 인접하여 밀봉, 예를 들면, 가역적 밀봉을 형성하는 기판의 표면 상에 적용될 수도 있다. 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 2개의 표면들 사이에서 모세관 파열 밸브를 이용할 수 있다. 표면 처리는 모세관 파열 밸브를 포함하는 이러한 밀봉의 정밀한 조절에 유용할 수 있다.

[0226] 기판에 포함된 반응기 캡은 당분야에서 공지되어 있는 임의의 모양 또는 디자인으로 존재할 수 있다. 반응기 캡은 반응기의 내용물을 둘러쌀 수 있는 부피의 캐비티를 함유할 수 있다. 반응기의 내용물은 인접 기판 상의 복수의 분해된 좌위들로부터 나올 수 있다. 반응기 캡은 원형, 타원형, 직사각형 또는 불규칙한 모양으로 존재할 수 있다. 반응기 캡은 날카로운 모서리를 가질 수 있다. 일부 경우, 반응기 캡은 임의의 기포를 보유하는 것을 최소화하고 반응기의 내용물의 보다 더 우수한 혼합을 용이하게 하기 위해 둥근 모서리를 가질 수 있다. 반응기 캡은 반응기의 내용물의 조절된 전달 또는 혼합을 가능하게 하는 임의의 모양, 구조 또는 디자인으로 제작될 수 있다. 반응기 캡은 본원에 기재된 바와 같이 기판 상의 분해된 좌위들과 유사한 디자인으로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 반응기 캡은 기포를 생성하지 않으면서 액체가 용이하게 유동할 수 있게 하는 모양으로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 반응기 캡은 약 1 마이크로미터(㎛), 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 ㎛, 500 ㎛, 550 ㎛, 600 ㎛, 650 ㎛, 700 ㎛ 또는 750 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있는 직경을 가진 원형 모양을 가질 수 있다. 반응기 캡은 단분산 크기 분포를 가질 수 있다. 즉, 모든 마이크로구조물들이 거의 동일한 폭, 높이 및/또는 길이를 가질 수 있다. 대안적으로, 반응기 캡은 한정된 수의 모양 및/또는 크기를 가질 수 있다. 예를 들면, 반응기 캡은 단분산 크기를 각각 가진 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개, 15개 또는 20개 이상의 구별되는 모양들로 표시될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 동일한 모양은 다수의 단분산 크기 분포들, 예를 들면, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개, 15개 또는 20개 이상의 단분산 크기 분포들로 반복될 수 있다. 단분산 분포는 모드의 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2%, 1%, 0.1%, 0.05%, 0.01% 또는 0.001% 미만의 표준 편차를 가진 단일모듈 분포로 반영될 수 있다.

[0227] 반응기 캡들 각각은 본원에 기재된 본 발명의 다양한 실시양태들에 따라 반응을 수행하기 위한 임의의 적합한 면적을 가질 수 있다. 일부 경우, 복수의 반응기 캡들은 기판의 총 표면적의 임의의 적합한 백분율을 점유할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 반응기 캡들은 기판의 표면의 약 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%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상 또는 이하를 점유할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 반응기 캡은 총 면적의 약 0.1 ㎟, 0.15 ㎟, 0.2 ㎟, 0.25 ㎟, 0.3 ㎟, 0.35 ㎟, 0.4 ㎟, 0.45 ㎟, 0.5 ㎟, 0.55 ㎟, 0.6 ㎟, 0.65 ㎟, 0.7 ㎟, 0.75 ㎟, 0.8 ㎟, 0.85 ㎟, 0.9 ㎟, 0.95 ㎟, 1 ㎟, 2 ㎟, 3 ㎟, 4 ㎟, 5 ㎟, 6 ㎟, 7 ㎟, 8 ㎟, 9 ㎟, 10 ㎟, 11 ㎟, 12 ㎟, 13 ㎟, 14 ㎟, 15 ㎟, 16 ㎟, 17 ㎟, 18 ㎟, 19 ㎟, 20 ㎟, 25 ㎟, 30 ㎟, 35 ㎟, 40 ㎟, 50 ㎟, 75 ㎟, 100 ㎟, 200 ㎟, 300 ㎟, 400 ㎟, 500 ㎟, 600 ㎟, 700 ㎟, 800 ㎟, 900 ㎟, 1000 ㎟, 1500 ㎟, 2000 ㎟, 3000 ㎟, 4000 ㎟, 5000 ㎟, 7500 ㎟, 10000 ㎟, 15000 ㎟, 20000 ㎟, 25000 ㎟, 30000 ㎟, 35000 ㎟, 40000 ㎟, 50000 ㎟, 60000 ㎟, 70000 ㎟, 80000 ㎟, 90000 ㎟, 100000 ㎟, 200000 ㎟ 또는 300000 ㎟ 이상 또는 이하를 점유할 수 있다. 분해된 반응기들, 분해된 좌위들 및 반응기 캡들은 임의의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표면은 1 ㎟당 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 약 50개, 약 75개, 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 900개, 약 1000개, 약 1500개, 약 2000개, 약 3000개, 약 4000개, 약 5000개, 약 6000개, 약 7000개, 약 8000개, 약 9000개, 약 10000개, 약 20000개, 약 40000개, 약 60000개, 약 80000개, 약 100000개 또는 약 500000개 부위의 밀도로 분해된 반응기들, 분해된 좌위들 또는 반응기 캡들을 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표면은 1 ㎟당 약 50개 이상, 약 75개 이상, 약 100개 이상, 약 200개 이상, 약 300개 이상, 약 400개 이상, 약 500개 이상, 약 600개

이상, 약 700개 이상, 약 800개 이상, 약 900개 이상, 약 1000개 이상, 약 1500개 이상, 약 2000개 이상, 약 3000개 이상, 약 4000개 이상, 약 5000개 이상, 약 6000개 이상, 약 7000개 이상, 약 8000개 이상, 약 9000개 이상, 약 10000개 이상, 약 20000개 이상, 약 40000개 이상, 약 60000개 이상, 약 80000개 이상, 약 100000개 이상 또는 약 500000개 이상의 부위의 밀도로 분해된 반응기들, 분해된 좌위들 또는 반응기 캡들을 가질 수 있다.

[0228] 따라서, 인접 기판 표면 상의 분해된 좌위들의 밀도를 고려하여, 반응기 캡의 밀도, 분포 및 모양은 각각의 반응기에서 바람직한 수의 분해된 좌위들과 정렬하도록 구성될 수 있게끔 디자인될 수 있다. 복수의 분해된 반응기들 각각은 다수의 분해된 좌위들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 각각의 반응기는 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 225개, 250개, 275개, 300개, 350개, 400개, 450개, 500개, 550개, 600개, 650개, 700개, 750개, 800개, 850개, 900개, 950개 또는 1000개 이상 또는 이하의 분해된 좌위들을 포함할 수 있다. 일부 경우, 각각의 반응기는 100개 이상의 분해된 좌위들을 포함할 수 있다.

[0229] 복수의 인클로저들의 어레이 내에 포함된 분해된 좌위들 또는 반응기 캡들은 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재할 수 있다. 마이크로구조물은 본원의 다른 단락에 기재되어 있는 바와 같이 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 제작될 수 있다. 마이크로구조물은 2D 또는 3D에서 임의의 모양 및 디자인을 가진 마이크로채널 또는 마이크로웰일 수 있다. 마이크로구조물(예를 들면, 마이크로채널 또는 마이크로웰)은 서로 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 마이크로채널들은 상호연결되어, 유체가 주어진 조건, 예컨대, 진공 흡입을 통해 주입되게 할 수 있다. 개별 마이크로구조물은 2개의 분해된 좌위들의 내용물들이 혼합되지 않은 상태로 유지되도록 개별적으로 주소지정가능하고 분리되어 있을 수 있다. 마이크로채널은 유체 소통하는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 채널들을 임의의 조합으로 포함하여, 유체의 조절된 혼합, 소통 또는 분포를 가능하게 할 수 있다. 마이크로채널의 연결성은 마이크로플루이딕 디자인 분야에서 공지되어 있는 밸브 시스템에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 기판의 유체 조절 층은 기판의 유체 소통 층의 상부 상에서 직접적으로 제작될 수 있다. 상이한 마이크로플루이딕 밸브 시스템들이 문헌(Marc A. Unger et al, "Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography," Science, vol. 288, no. 7, pp. 113-116, April 2000) 및 문헌(David C. Duffy et al., "Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)," Analytical Chemistry, vol. 70, no. 23, pp. 4974-4984, December 1998)에 기재되어 있다.

[0230] 복수의 인클로저들의 어레이 내에 포함된 분해된 좌위들 또는 반응기 캡들은 마이크로구조물, 예컨대, 마이크로채널 또는 채널 상에 존재할 수 있다. 인접 기판 표면 상의 분해된 좌위들의 마이크로채널의 치수 및 디자인은 본원의 다른 부분에 기재되어 있다. 마이크로구조물은 유체 소통하는 2개 이상의 채널들을 포함할 수 있는데, 이때 상기 2개 이상의 채널들은 상이한 폭을 가진 2개 이상의 채널들을 포함할 수 있다. 일부 경우, 2개 이상의 채널들은 동일한 폭, 또는 동일한 또는 상이한 폭의 조합을 가질 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 채널 또는 마이크로채널의 폭은 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있다. 채널 또는 마이크로채널은 분해된 좌위들의 유체 소통을 가능하게 하는 임의의 길이를 가질 수 있다. 하나 이상의 채널은 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ㎛ 이상 또는 이하의 길이 또는 둘레에 대한 표면적의 비를 포함할 수 있다. 하나 이상의 채널은 원형 모양으로 존재하고 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ㎛ 이상 또는 이하의 횡단면 반경을 포함할 수 있는 횡단면을 가질 수 있다.

[0231] 본원에 기재되어 있는 바와 같이, 인클로저들의 어레이는 반응기 캡을 포함하는 제1 기판 및 제2 기판을 포함하는 복수의 분해된 반응기들을 포함할 수 있다. 분해된 반응기들은 제2 기판을 제1 기판 상에 조합하거나 캡핑함으로써 형성될 수 있고, 함께 밀봉될 수 있다. 밀봉은 가역적 또는 비가역적 밀봉일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 밀봉은 가역적 또는 분리가능한 밀봉이다. 분해된 반응기들의 밀봉 시, 반응기의 내용물, 예컨대, 증폭 또는 다른 하류 반응에 필요한 올리고뉴클레오티드 또는 시약은 분해된 반응기들 내에서 방출될 수 있고 혼합될 수 있다. 분해된 반응기들은 분리가능한 밀봉에 의해 분리되어 있을 수 있고, 이때 반응기 캡은 제1 기판으로부터의 제2 기판의 이형 시 반응기의 내용물의 전부 또는 일부를 보유할 수 있다. 제1 기판 및 제2 기판의 재료에

따라, 밀봉은 제1 기판과 제2 기판 사이에 가역적 밀봉을 허용하고 분해된 반응기들을 형성하도록 상이하게 디자인될 수 있다. 제1 기판과 제2 기판은 밀봉을 형성할 때 직접 물리적으로 접촉할 수 있다. 일부 경우, 제1 기판과 제2 기판은 나노반응기 바로 주위에서 또는 2개의 나노반응기들 사이에서 그들 각각의 표면 없이 가깝게 인접하여 직접 물리적으로 접촉할 수 있다. 밀봉은 모세관 파열 밸브를 포함할 수 있다. 밀봉을 형성할 때 제1 기판과 제2 기판 사이의 거리는 약 0.1 ㎛, 0.2 ㎛, 0.3 ㎛, 0.4 ㎛, 0.5 ㎛, 0.6 ㎛, 0.7 ㎛, 0.8 ㎛, 0.9 ㎛, 1 ㎛, 1.1 ㎛, 1.2 ㎛, 1.3 ㎛, 1.4 ㎛, 1.5 ㎛, 1.6 ㎛, 1.7 ㎛, 1.8 ㎛, 1.9 ㎛, 2 ㎛, 2.5 ㎛, 3 ㎛, 3.5 ㎛, 4 ㎛, 4.5 ㎛, 5 ㎛, 5.5 ㎛, 6 ㎛, 6.5 ㎛, 7 ㎛, 7.5 ㎛, 8 ㎛, 8.5 ㎛, 9 ㎛, 9.5 ㎛ 또는 10 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있다. 밀봉은 모세관 파열 밸브를 포함할 수 있다.

[0232] 일부 경우, 분리된 인클로저들은 압력 방출 홀을 포함할 수 있다. 압력 방출 홀은 제1 기판과 제2 기판의 분리를 가능하게 할 수 있다. 압력 방출 시스템을 가진 마이크로플루이딕 시스템의 디자인은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 유럽 특허 제1987275 A1호에 기재되어 있다.

[0233] 기판 상의 복수의 분해된 반응기 캡들은 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법(예를 들면, 마이크로제작 공정)에 의해 제작될 수 있다. 본원에 개시된 복수의 반응기 캡들 또는 반응기들을 가진 기판의 제조에 이용될 수 있는 마이크로제작 공정은 리쏘그래피; 식각 기법, 예컨대, 습식 화학적, 건식 및 포토레지스트 제거; 마이크로플루이딕스/랩-온-어-칩, 광학 MEMS(MOEMS로서도 지칭됨), RF MEMS, PowerMEMS 및 BioMEMS 기법을 포함하는 마이크로전기기계적(MEMS) 기법, 및 깊은 반응성 이온 식각(DRIE); 나노전기기계적(NEMS) 기법; 실리콘의 열 산화; 전기도금 및 무전해 도금; 확산 공정, 예컨대, 붕소, 인, 비소 및 안티몬 확산; 이온 주입; 필름 침착, 예컨대, 증발(필라멘트, 전자 빔, 플래쉬 및 쉐도윙 및 단계 커버리지), 스퍼터링, 화학적 증착(CVD); 에피택시(증기상, 액체상 및 분자 빔), 전기도금, 스크린 프린팅 및 적층을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일반적으로 문헌(Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988)); 문헌(Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990)); 문헌(Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998); 및 문헌(Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997))을 참조한다.

[0234] 한 양태에서, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법을 이용하여 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 기판을 제작할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 반응기 캡들을 가진 기판의 재료는 반도체 기판, 예컨대, 이산화규소일 수 있다. 기판의 재료는 다른 화합물 III-V 또는 II-VI 물질, 예컨대, 쵸크랄스키 공정(Grovenor, C. (1989). Microelectronic Materials. CRC Press. pp. 113-123)을 통해 생성된 반도체인 GaAs일 수도 있다. 상기 재료는 그의 표면과의 접촉 시 반응성 산화물(-OH) 기의 균일한 덮임을 나타내는 평평한 경질 표면을 용액에게 제공할 수 있다. 이 산화물 기는 후속 실란화 공정을 위한 부착점일 수 있다. 대안적으로, 산화규소의 식각 특성을 모방하는 친유성 표면 재료 및 소수성 표면 재료가 침착될 수 있다. 질화규소 및 탄화규소 표면도 본 발명의 다양한 실시양태들에 따라 적합한 기판의 제조를 위해 사용될 수 있다.

[0235] 일부 실시양태들에서, 부동화 층이 반응성 산화물 기를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있는 기판 상에 침착될 수 있다. 부동화 층은 질화규소(Si_3N_4) 또는 폴리마이드를 포함할 수 있다. 일부 경우, 포토리쏘그래피 단계를 이용하여 분해된 좌위들이 부동화 층을 형성하는 영역을 한정할 수 있다.

[0236] 복수의 반응기 캡들을 가진 기판을 제조하는 방법은 기판으로 시작될 수 있다. 기판(예를 들면, 실리콘)은 전도층, 예컨대, 금속을 포함하나 이것으로 한정되지 않는, 그 위에 배치된 임의의 수의 층을 가질 수 있다. 일부 경우, 전도층은 알루미늄일 수 있다. 일부 경우, 기판은 보호층(예를 들면, 질화티타늄)을 가질 수 있다. 일부 경우, 기판은 높은 표면 에너지를 가진 화학층을 가질 수 있다. 다양한 침착 기법들, 예를 들면, 화학적 증착(CVD), 원자 층 침착(ALD), 플라스마 향상된 CVD(PECVD), 플라스마 향상된 ALD(PEALD), 금속 유기 CVD(MOCVD), 고온 와이어 CVD(HWCVD), 개시된 CVD(iCVD), 변형된 CVD(MCVD), 증기 축 침착(VAD), 외부 증착(OVD) 및 물리적 증착(예를 들면, 스퍼터 침착, 증발 침착)을 이용하여 층을 침착시킬 수 있다.

[0237] 일부 경우, 산화물 층은 기판 상에 침착된다. 일부 경우, 산화물 층은 이산화규소를 포함할 수 있다. 이산화규소는 테트라에틸 오르쏘실리케이트(TEOS), 고밀도 플라스마(HDP) 또는 이들의 임의의 조합을 이용함으로써 침착될 수 있다.

[0238] 일부 경우, 이산화규소는 저온 기법을 이용함으로써 침착될 수 있다. 일부 경우, 공정은 이산화규소의 저온 화학적 증착이다. 온도는 일반적으로 칩 상의 기존 금속이 손상되지 않을 정도로 충분히 낮다. 침착 온도는 약 50

℃, 약 100℃, 약 150℃, 약 200℃, 약 250℃, 약 300℃, 약 350℃ 등일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 침착 온도는 약 50℃ 미만, 약 100℃ 미만, 약 150℃ 미만, 약 200℃ 미만, 약 250℃ 미만, 약 300℃ 미만, 약 350℃ 미만 등이다. 침착은 임의의 적합한 압력에서 수행될 수 있다. 일부 경우, 침착 공정은 RF 플라스마 에너지를 이용한다.

[0239] 일부 경우, 산화물은 건식 열적으로 성장된 산화물 절차(예를 들면, 1,000℃ 근처 또는 초과의 온도를 이용할 수 있는 절차)에 의해 침착된다. 일부 경우, 산화규소가 습식 증기 공정에 의해 생성된다.

[0240] 이산화규소는 본 발명의 다른 단락에 기재된 바와 같이 임의의 원하는 양의 올리고뉴클레오티드의 증폭 또는 다른 하류 반응에 적합할 수 있는 부피의 침착되고 혼합될 시약을 포함하는 복수의 분해된 반응기들을 형성할 수 있는 반응기 캡들의 형성에 적합한 두께까지 침착될 수 있다.

[0241] 이산화규소는 임의의 적합한 두께까지 침착될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 이산화규소는 약 1 나노미터(nm), 약 2 nm, 약 3 nm, 약 4 nm, 약 5 nm, 약 6 nm, 약 7 nm, 약 8 nm, 약 9 nm, 약 10 nm, 약 15 nm, 약 20 nm, 약 25 nm, 약 30 nm, 약 35 nm, 약 40 nm, 약 45 nm, 약 50 nm, 약 55 nm, 약 60 nm, 약 65 nm, 약 70 nm, 약 75 nm, 약 80 nm, 약 85 nm, 약 90 nm, 약 95 nm, 약 100 nm, 약 125 nm, 약 150 nm, 약 175 nm, 약 200 nm, 약 300 nm, 약 400 nm 또는 약 500 nm 이상 또는 이하의 두께를 가진다.

[0242] 당분야에서 공지되어 있는 다양한 제작 기법들을 이용하여 이산화규소 기판에서 반응기 캡을 생성할 수 있다. 이러한 기법들은 반도체 제작 기법을 포함할 수 있다. 일부 경우, 포토리쏘그래피 기법, 예컨대, 반도체 산업에서 이용되는 포토리쏘그래피 기법을 이용하여 반응기 캡을 생성한다. 예를 들면, 포토레지스트(예를 들면, 전자기적 방사선에 노출되었을 때 성질을 변화시키는 물질)가 (예를 들면, 웨이퍼의 회전 코팅에 의해) 임의의 적합한 두께까지 이산화규소 상에 코팅될 수 있다. 포토레지스트를 포함하는 기판은 전자기적 방사선 공급원에 노출될 수 있다. 분해된 좌위들의 영역을 한정하기 위해 마스크를 이용하여 포토레지스트의 부분으로부터의 방사선을 차폐할 수 있다. 포토레지스트는 음성 레지스트 또는 양성 레지스트일 수 있다(예를 들면, 반응기 캡의 영역을 전자기적 방사선에 노출시킬 수 있거나, 반응기 캡 이외의 영역을 마스크에 의해 한정된 전자기적 방사선에 노출시킬 수 있다). 반응기 캡이 생성될 위치 위에 놓인 영역을 전자기적 방사선에 노출시켜, 이산화규소 층에서 반응기 캡의 위치 및 분포에 상응하는 패턴을 한정한다. 반응기 캡에 상응하는 패턴을 한정하는 마스크를 통해 포토레지스트를 전자기적 방사선에 노출시킬 수 있다. 다음으로, 예를 들면, 세척 작업(예를 들면, 탈이온수)을 이용하여 포토레지스트의 노출된 부분을 제거할 수 있다. 그 다음, 마스크의 제거된 부분을 화학적 식각제에 노출시켜 기판을 식각할 수 있고 반응기 캡의 패턴을 이산화규소 층 내로 전달할 수 있다. 식각제는 산, 예를 들면, 황산(H_2SO_4)을 포함할 수 있다. 이산화규소 층을 이방성 방식으로 식각할 수 있다. 본원에 기재된 방법을 이용하여 높은 이방성 제작 방법, 예컨대, DRIE를 적용함으로써, 기판의 표면에 대하여 수직으로부터 약 $\pm 3^{\circ}$, 2°, 1°, 0.5° 또는 0.1° 미만 만큼 벗어나는 측벽을 가진 기판 상에서 또는 내에서 마이크로구조물, 예컨대, 반응기 캡을 제작할 수 있다. 약 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 또는 0.1 ㎛ 미만의 언더컷 값을 달성하여 매우 균일한 마이크로구조물을 생성할 수 있다.

[0243] 다양한 식각 절차들을 이용하여 반응기 캡이 형성될 영역에서 이산화규소를 식각할 수 있다. 식각은 등방성 식각(즉, 한 방향을 따른 식각 속도가 직교 방향을 따른 식각 속도와 동등함) 또는 이방성 식각(즉, 한 방향을 따른 식각 속도가 직교 방향을 따른 식각 속도보다 더 작음), 또는 이들의 변법일 수 있다. 식각 기법은 습식 실리콘 식각, 예컨대, KOH, TMAH, EDP 등, 및 건식 플라스마 식각(예를 들면, DRIE) 둘 다일 수 있다. 상기 둘 다를 이용하여 상호연결을 통해 마이크로구조물 웨이퍼를 식각할 수 있다.

[0244] 일부 경우, 이방성 식각은 반응기 캡의 부피의 대부분을 제거한다. 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90% 또는 약 95%를 포함하는 임의의 적합한 백분율의 반응기 캡 부피가 제거될 수 있다. 일부 경우, 이방성 식각에서 물질의 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상이 제거된다. 일부 경우, 이방성 식각에서 물질의 약 60% 이하, 약 70% 이하, 약 80% 이하, 약 90% 이하 또는 약 95% 이하가 제거된다. 일부 실시양태들에서, 이방성 식각은 항상 기판을 통해 이산화규소 물질을 제거하지는 않는다. 일부 경우, 등방성 식각은 항상 홀을 생성하는 기판을 통해 이산화규소 물질을 제거한다.

[0245] 일부 경우, 포토리쏘그래피 단계를 이용하여 반응기 캡을 식각하여 반응기 캡을 한정한 후, 하이브리드 건식-습식 식각을 수행한다. 포토리쏘그래피 단계는 포토레지스트를 사용하여 이산화규소를 코팅하는 것, 및 반응기 캡을 한정하는 패턴을 가진 마스크(또는 레티클)를 통해 포토레지스트를 전자기적 방사선에 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우, 하이브리드 건식-습식 식각은 (a) 포토리쏘그래피 단계에 의해 포토레지스트에서 한정

된 반응기 캡의 영역에서 이산화규소의 대부분을 제거하기 위한 건식 식각; (b) 기판의 세정; 및 (c) 반응기 캡의 영역에서 남은 이산화규소를 기판으로부터 제거하기 위한 습식 식각을 포함한다.

[0246] 플라스마 식각 화학반응, 또는 산화제, 예를 들면, H_2O_2, O_2, O_3, H_2SO_4 또는 이들의 조합, 예컨대, H_2O_2와 H_2SO_4의 조합에의 노출을 이용하여 기판을 세정할 수 있다. 세정은 잔류 중합체의 제거, 습식 식각을 차단할 수 있는 물질의 제거, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우, 세정은 플라스마 세정이다. 세정 단계는 임의의 적합한 시간(예를 들면, 15초 내지 20초) 동안 진행될 수 있다. 일례에서, 100 mT, 200 W, 20 G 및 20 O_2의 세팅을 가진 어플라이드 매트리얼스 eMAx-CT 기계로 20초 동안 세정을 수행할 수 있다.

[0247] 건식 식각은 실질적으로 수직으로(예를 들면, 기판을 향하여) 식각하되 측면으로 또는 실질적으로 측면으로(예를 들면, 기판에 평행하게) 식각하지 않는 이방성 식각일 수 있다. 일부 경우, 건식 식각은 불소-기제 식각제, 예컨대, CF_4, CHF_3, C_2F_6, C_3F_6 또는 이들의 임의의 조합을 사용한 식각을 포함한다. 한 경우에서, 100 mT, 1000 W, 20 G 및 50 CF_4의 세팅을 가진 어플라이드 매트리얼스 eMax-CT 기계로 400초 동안 식각을 수행한다. 본원에 기재된 기판은 깊은 반응성 이온 식각(DRIE)에 의해 식각될 수 있다. DRIE는 전형적으로 높은 종횡비를 가진 웨이퍼/기판에서 깊은 침투, 측면으로 경사진 홀 및 도랑을 생성하는 데에 이용되는 고도 이방성 식각 공정이다. 고속 DRIE를 위한 2종의 주요 기술인 극저온 및 보슈를 이용하여 기판을 식각할 수 있다. DRIE를 적용하는 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5501893호에 기재되어 있다.

[0248] 습식 식각은 모든 방향들에서 물질을 제거하는 등방성 식각일 수 있다. 일부 경우, 습식 식각은 포토레지스트를 언더컷팅한다. 포토레지스트의 언더컷팅은 포토레지스트가 후속 단계(예를 들면, 포토레지스트 "리프트 오프") 에서 보다 더 용이하게 제거되게 할 수 있다. 한 실시양태에서, 습식 식각은 완충된 산화물 식각(BOE)이다. 일부 경우, 식각 속도를 늦추도록 (예를 들면, 불화암모늄으로) 완충될 수 있는 불산 염기를 사용하여 실온에서 습식 산화물 식각을 수행한다. 식각 속도는 식각될 필름, 및 HF 및/또는 NH_4F의 구체적인 농도에 의존할 수 있다. 산화물 층을 완전히 제거하기 위해 필요한 식각 시간은 전형적으로 실험적으로 결정된다. 일례에서, 15:1 BOE(완충된 산화물 식각)로 22℃에서 식각을 수행한다.

[0249] 이산화규소 층은 기저 물질 층까지 식각될 수 있다. 예를 들면, 이산화규소 층은 질화티타늄 층까지 식각될 수 있다.

[0250] 한 양태에서, 복수의 반응기 캡들을 가진 기판을 제조하는 방법은 (a) 분해된 좌위들을 한정하기 위한 포토리쏘그래피 단계; (b) 포토리쏘그래피 단계에 의해 한정된 반응기 캡들의 영역에서 이산화규소의 대부분을 제거하기 위한 건식 식각; 및 (c) 반응기 캡들의 영역에서 남은 이산화규소를 기판으로부터 제거하기 위한 습식 식각을 이용하여 반응기 캡들의 캐비티를 기판, 예컨대, 상부에 코팅된 이산화규소 층을 포함하는 실리콘 기판 내에 식각하는 단계를 포함한다. 일부 경우, 상기 방법은 잔류 중합체를 제거하는 단계, 습식 식각을 차단할 수 있는 물질을 제거하는 단계, 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다. 상기 방법은 플라스마 세정 단계를 포함할 수 있다.

[0251] 일부 실시양태들에서, 포토레지스트는 일부 경우 포토리쏘그래피 단계 또는 하이브리드 습식-건식 식각 후 이산화규소로부터 제거되지 않는다. 남은 포토레지스트는 후속 단계에서 금속을 반응기 캡 내로 선택적으로 향하게 하고 이산화규소 층의 상부 표면 상으로 향하게 하지 않는 데에 사용될 수 있다. 일부 경우, 기판은 금속(예를 들면, 알루미늄)으로 코팅되고, 습식 식각은 금속 상의 특정 성분, 예를 들면, 금속을 부식으로부터 보호하는 성분(예를 들면, 질화타타늄(TiN))을 제거하지 않는다. 그러나, 일부 경우, 예컨대, 화학 기계적 평탄화(CMP)를 이용하여 포토레지스트 층을 제거할 수 있다.

[0252] 예시적 나노반응기가 도 26a 내지 26d에 다양한 조감도로 제시되어 있다. 이 나노반응기는 나노반응기의 기저로부터 개별적으로 상승되어 있는 108개의 웰들을 포함한다. 나노반응기의 횡단면은 도 26a에 제시되어 있다. 나노반응기의 디바이스 조감도는 도 26b 및 26c에 제시되어 있다. 나노반응기의 핸들 조감도는 도 26d에 제시되어 있다. 나노반응기는 복수의 특징부들에서 액체를 수용하고 보유하도록 구성될 수 있다. 도 26의 나노반응기는 108개의 웰들 중 임의의 수의 웰들 내에서 액체를 보유하도록 디자인된다. 나노반응기는 기판, 예컨대, 도 25에 예시된 기판과 접촉될 수 있고/있거나 정렬될 수 있다. 임의의 수의 웰들이 임의의 배열로 나노반응기 내에서 정렬될 수 있기 때문에, 나노반응기의 웰들은 도 26에 제시된 배열로 한정되지 않는다. 일부 실시양태들에서, 나노반응기 웰들은 기판 배열과 정렬되는 배열로 정렬된다. 2701로 표시된 바와 같이, 나노반응기의 높이는 약 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.5 mm, 2 mm, 2.5 mm, 3 mm, 3.5 mm, 4 mm, 4.5 mm, 5 mm, 5.5 mm, 6 mm, 6.5 mm, 7 mm, 7.5 mm, 8 mm, 8.5 mm, 9 mm, 9.5 mm 또는 10

mm 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 나노반응기의 높이는 약 10 mm, 9.5 mm, 9 mm, 8.5 mm, 8 mm, 7.5 mm, 7 mm, 6.5 mm, 6 mm, 5.5 mm, 5 mm, 4.5 mm, 4 mm, 3.5 mm, 3 mm, 2.5 mm, 2 mm, 1.5 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.2 mm 또는 0.1 mm 이하일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 나노반응기의 높이는 0.1 mm 내지 10 mm, 0.2 mm 내지 9 mm, 0.3 mm 내지 8 mm, 0.4 mm 내지 7 mm, 0.5 mm 내지 6 mm, 0.6 mm 내지 5 mm, 0.7 mm 내지 4 mm, 0.8 mm 내지 3 mm, 또는 0.9 mm 내지 2 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.2 mm 내지 0.8 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 2702로 표시된 바와 같이, 나노반응기의 웰의 높이는 약 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.5 mm, 2 mm, 2.5 mm, 3 mm, 3.5 mm, 4 mm, 4.5 mm, 5 mm, 5.5 mm, 6 mm, 6.5 mm, 7 mm, 7.5 mm, 8 mm, 8.5 mm, 9 mm, 9.5 mm 또는 10 mm 이상일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 나노반응기의 웰의 높이는 약 10 mm, 9.5 mm, 9 mm, 8.5 mm, 8 mm, 7.5 mm, 7 mm, 6.5 mm, 6 mm, 5.5 mm, 5 mm, 4.5 mm, 4 mm, 3.5 mm, 3 mm, 2.5 mm, 2 mm, 1.5 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.2 mm 또는 0.1 mm 이하일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 나노반응기의 웰의 높이는 0.1 mm 내지 10 mm, 0.2 mm 내지 9 mm, 0.3 mm 내지 8 mm, 0.4 mm 내지 7 mm, 0.5 mm 내지 6 mm, 0.6 mm 내지 5 mm, 0.7 mm 내지 4 mm, 0.8 mm 내지 3 mm, 또는 0.9 mm 내지 2 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 mm 내지 0.6 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0253] 도 26b는 0,0(X,Y) 축으로 표시된 기준 원점을 포함하는데, 이때 예시적 나노반응기의 상부 좌측 모서리가 도시되어 있다. 일부 실시양태들에서, 2703으로서 표시된, 나노반응기의 폭은 상기 원점으로부터 측정될 때 한 차원을 따라 약 5 mm 내지 약 150 mm이다. 일부 실시양태들에서, 2704로서 표시된, 나노반응기의 폭은 상기 원점으로부터 측정될 때 또 다른 차원을 따라 약 5 mm 내지 약 150 mm이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 나노반응기의 폭은 약 5 mm 내지 약 125 mm, 약 5 mm 내지 약 100 mm, 약 5 mm 내지 약 75 mm, 약 5 mm 내지 약 50 mm, 약 5 mm 내지 약 25 mm, 약 25 mm 내지 약 150 mm, 약 50 mm 내지 약 150 mm, 약 75 mm 내지 약 150 mm, 약 100 mm 내지 약 150 mm, 또는 약 125 mm 내지 약 150 mm이다. 당업자는 상기 폭이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 5 mm 내지 25 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 나노반응기의 폭은 약 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm 또는 150 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 나노반응기의 폭은 약 150 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm 또는 5 mm 이하이다.

[0254] 도 26b에 나타낸 나노반응기는 108개의 웰들을 포함한다. 상기 웰들은 임의의 배열로 정렬될 수 있다. 도 26b에서, 웰들은 정사각형 모양을 형성하는 줄로 정렬된다. 정렬과 관계없이, 웰들은 X-축 또는 Y-축 상에서 측정될 때 원점으로부터 약 0.1 mm 내지 약 149 mm의 거리에서 출발할 수 있고 원점으로부터 약 1 mm 내지 약 150 mm의 거리에서 종결할 수 있다. 길이 2706 및 2705는 각각 X-축 및 Y-축 상에서 원점으로부터 웰의 중심까지의 최장 거리를 표시한다. 길이 2710 및 2709는 각각 X-축 및 Y-축 상에서 원점으로부터 웰의 중심까지의 최단 거리를 표시한다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 원점으로부터 웰의 중심까지의 최장 거리는 약 1 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm 또는 150 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 웰의 중심까지의 최장 거리는 약 150 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm, 5 mm 또는 1 mm 이하이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 웰의 중심까지의 최장 거리는 약 5 mm 내지 약 125 mm, 약 5 mm 내지 약 100 mm, 약 5 mm 내지 약 75 mm, 약 5 mm 내지 약 50 mm, 약 5 mm 내지 약 25 mm, 약 25 mm 내지 약 150 mm, 약 50 mm 내지 약 150 mm, 약 75 mm 내지 약 150 mm, 약 100 mm 내지 약 150 mm, 또는 약 125 mm 내지 약 150 mm이다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 5 mm 내지 25 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 원점으로부터 웰의 중심까지의 최단 거리는 약 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm 또는 149 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 웰의 중심까지의 최단 거리는 약 149 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm, 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.2 mm 또는 0.1 mm 이하이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 웰의 중심까지의 최단 거리는 약 0.1 mm 내지 약 125 mm, 약 0.5 mm 내지 약 100 mm, 약 0.5 mm 내지 약 75 mm, 약 0.5 mm 내지 약 50 mm, 약 0.5 mm 내지 약 25 mm, 약 1 mm 내지

약 50 mm, 약 1 mm 내지 약 40 mm, 약 1 mm 내지 약 30 mm, 약 1 mm 내지 약 20 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 5 mm이다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 mm 내지 5 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0255] 나노반응기의 웰은 나노반응기의 가장자리로부터 임의의 거리에서 위치할 수 있다. 나노반응기의 웰과 가장자리 사이의 예시적 거리는 2707 및 2708로 표시되어 있다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 나노반응기의 웰의 중심과 가장자리 사이의 거리는 약 0.1 mm, 0.2 mm, 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25 mm, 30 mm, 40 mm, 50 mm, 60 mm, 70 mm, 80 mm, 90 mm, 100 mm, 110 mm, 120 mm, 130 mm, 140 mm 또는 149 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 나노반응기의 웰의 중심과 가장자리 사이의 거리는 약 149 mm, 140 mm, 130 mm, 120 mm, 110 mm, 100 mm, 90 mm, 80 mm, 70 mm, 60 mm, 50 mm, 40 mm, 30 mm, 25 mm, 20 mm, 15 mm, 10 mm, 5 mm, 4 mm, 3 mm, 2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm, 0.3 mm, 0.2 mm 또는 0.1 mm 이하이다. 일부 실시양태들에서, 임의의 차원에서 나노반응기의 웰의 중심과 가장자리 사이의 거리는 약 0.1 mm 내지 약 125 mm, 약 0.5 mm 내지 약 100 mm, 약 0.5 mm 내지 약 75 mm, 약 0.5 mm 내지 약 50 mm, 약 0.5 mm 내지 약 25 mm, 약 1 mm 내지 약 50 mm, 약 1 mm 내지 약 40 mm, 약 1 mm 내지 약 30 mm, 약 1 mm 내지 약 20 mm, 또는 약 1 mm 내지 약 5 mm이다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 mm 내지 5 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0256] 일부 실시양태들에서, 웰들은 2개의 웰들 사이에 반복된 거리가 존재하도록 정렬된다. 2711 및 2712로 표시된 바와 같이, 2개의 웰들 사이의 거리는 약 0.3 mm 내지 약 9 mm일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 2개의 웰들 사이의 거리는 약 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.2 mm, 1.4 mm, 1.6 mm, 1.8 mm, 2 mm, 2.2 mm, 2.4 mm, 2.6 mm, 2.8 mm, 3 mm, 3.2 mm, 3.4 mm, 3.6 mm, 3.8 mm, 4 mm, 4.2 mm, 4.4 mm, 4.6 mm, 4.8 mm, 5 mm, 5.2 mm, 5.4 mm, 5.6 mm, 5.8 mm, 6 mm, 6.2 mm, 6.4 mm, 6.6 mm, 6.8 mm, 7 mm, 7.2 mm, 7.4 mm, 7.6 mm, 7.8 mm, 8 mm, 8.2 mm, 8.4 mm, 8.6 mm, 8.8 mm 또는 9 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 2개의 웰들 사이의 거리는 약 9 mm, 8.8 mm, 8.6 mm, 8.4 mm, 8.2 mm, 8 mm, 7.8 mm, 7.6 mm, 7.4 mm, 7.2 mm, 7 mm, 6.8 mm, 6.6 mm, 6.4 mm, 6.2 mm, 6 mm, 5.8 mm, 5.6 mm, 5.4 mm, 5.2 mm, 5 mm, 4.8 mm, 4.6 mm, 4.4 mm, 4.2 mm, 4 mm, 3.8 mm, 3.6 mm, 3.4 mm, 3.2 mm, 3 mm, 2.8 mm, 2.6 mm, 2.4 mm, 2.2 mm, 2 mm, 1.8 mm, 1.6 mm, 1.4 mm, 1.2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm 또는 0.3 mm 이하이다. 2개의 웰들 사이의 거리는 0.3 mm 내지 9 mm, 0.4 mm 내지 8 mm, 0.5 mm 내지 7 mm, 0.6 mm 내지 6 mm, 0.7 mm 내지 5 mm, 0.7 mm 내지 4 mm, 0.8 mm 내지 3 mm, 또는 0.9 mm 내지 2 mm일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.8 mm 내지 2 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0257] 일부 실시양태들에서, 2721로 표시된, 웰의 내부의 횡단면은 약 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.2 mm, 1.4 mm, 1.6 mm, 1.8 mm, 2 mm, 2.2 mm, 2.4 mm, 2.6 mm, 2.8 mm, 3 mm, 3.2 mm, 3.4 mm, 3.6 mm, 3.8 mm, 4 mm, 4.2 mm, 4.4 mm, 4.6 mm, 4.8 mm, 5 mm, 5.2 mm, 5.4 mm, 5.6 mm, 5.8 mm, 6 mm, 6.2 mm, 6.4 mm, 6.6 mm, 6.8 mm, 7 mm, 7.2 mm, 7.4 mm, 7.6 mm, 7.8 mm, 8 mm, 8.2 mm, 8.4 mm, 8.6 mm, 8.8 mm 또는 9 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 웰의 내부의 횡단면은 약 9 mm, 8.8 mm, 8.6 mm, 8.4 mm, 8.2 mm, 8 mm, 7.8 mm, 7.6 mm, 7.4 mm, 7.2 mm, 7 mm, 6.8 mm, 6.6 mm, 6.4 mm, 6.2 mm, 6 mm, 5.8 mm, 5.6 mm, 5.4 mm, 5.2 mm, 5 mm, 4.8 mm, 4.6 mm, 4.4 mm, 4.2 mm, 4 mm, 3.8 mm, 3.6 mm, 3.4 mm, 3.2 mm, 3 mm, 2.8 mm, 2.6 mm, 2.4 mm, 2.2 mm, 2 mm, 1.8 mm, 1.6 mm, 1.4 mm, 1.2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6 mm, 0.5 mm, 0.4 mm 또는 0.3 mm 이하이다. 웰의 내부의 횡단면은 0.3 mm 내지 9 mm, 0.4 mm 내지 8 mm, 0.5 mm 내지 7 mm, 0.6 mm 내지 6 mm, 0.7 mm 내지 5 mm, 0.7 mm 내지 4 mm, 0.8 mm 내지 3 mm, 또는 0.9 mm 내지 2 mm일 수 있다. 당업자는 상기 횡단면이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.8 mm 내지 2 mm 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일부 실시양태들에서, 2720으로 표시된, 웰의 테두리를 포함하는 웰의 횡단면은 약 0.3 mm, 0.4 mm, 0.5 mm, 0.6 mm, 0.7 mm, 0.8 mm, 0.9 mm, 1 mm, 1.2 mm, 1.4 mm, 1.6 mm, 1.8 mm, 2 mm, 2.2 mm, 2.4 mm, 2.6 mm, 2.8 mm, 3 mm, 3.2 mm, 3.4 mm, 3.6 mm, 3.8 mm, 4 mm, 4.2 mm, 4.4 mm, 4.6 mm, 4.8 mm, 5 mm, 5.2 mm, 5.4 mm, 5.6 mm, 5.8 mm, 6 mm, 6.2 mm, 6.4 mm, 6.6 mm, 6.8 mm, 7 mm, 7.2 mm, 7.4 mm, 7.6 mm, 7.8 mm, 8 mm, 8.2 mm, 8.4 mm, 8.6 mm, 8.8 mm 또는 9 mm 이상이다. 일부 실시양태들에서, 웰의 테두리를 포함하는 웰의 횡단면은 약 9 mm, 8.8 mm, 8.6 mm, 8.4 mm, 8.2 mm, 8 mm, 7.8 mm, 7.6 mm, 7.4 mm, 7.2 mm, 7 mm, 6.8 mm, 6.6 mm, 6.4 mm, 6.2 mm, 6 mm, 5.8 mm, 5.6 mm, 5.4 mm, 5.2 mm, 5 mm, 4.8 mm, 4.6 mm, 4.4 mm, 4.2 mm, 4 mm, 3.8 mm, 3.6 mm, 3.4 mm, 3.2 mm, 3 mm, 2.8 mm, 2.6 mm, 2.4 mm, 2.2 mm, 2 mm, 1.8 mm, 1.6 mm, 1.4 mm, 1.2 mm, 1 mm, 0.9 mm, 0.8 mm, 0.7 mm, 0.6

㎜, 0.5 ㎜, 0.4 ㎜ 또는 0.3 ㎜ 이하이다. 웰의 테두리를 포함하는 웰의 횡단면은 0.3 ㎜ 내지 9 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 8 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 7 ㎜, 0.6 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.7 ㎜ 내지 5 ㎜, 0.7 ㎜ 내지 4 ㎜, 0.8 ㎜ 내지 3 ㎜, 또는 0.9 ㎜ 내지 2 ㎜일 수 있다. 당업자는 상기 횡단면이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.8 ㎜ 내지 2 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0258] 나노반응기는 약 2와 약 250 사이의 임의의 수를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 수의 웰을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 웰의 수는 약 2개 내지 약 225개의 웰, 약 2개 내지 약 200개의 웰, 약 2개 내지 약 175개의 웰, 약 2개 내지 약 150개의 웰, 약 2개 내지 약 125개의 웰, 약 2개 내지 약 100개의 웰, 약 2개 내지 약 75개의 웰, 약 2개 내지 약 50개의 웰, 약 2개 내지 약 25개의 웰, 약 25개 내지 약 250개의 웰, 약 50개 내지 약 250개의 웰, 약 75개 내지 약 250개의 웰, 약 100개 내지 약 250개의 웰, 약 125개 내지 약 250개의 웰, 약 150개 내지 약 250개의 웰, 약 175개 내지 약 250개의 웰, 약 200개 내지 약 250개의 웰, 또는 약 225개 내지 약 250개의 웰을 포함한다. 당업자는 웰 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 25 내지 125 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0259] 나노반응기와 시스템의 다른 구성요소, 예를 들면, 마이크로플루이딕 디바이스 또는 마이크로플루이딕 디바이스의 구성요소의 정렬을 용이하게 하기 위해 기준 마크를 본원에 기재된 나노반응기 상에 배치할 수 있다. 본 발명의 나노반응기는 1개 이상의 기준 마크, 예를 들면, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 기준 마크를 가질 수 있다. 도 25b에 나타낸 나노반응기의 디바이스 조감도는 디바이스를 시스템의 다른 구성요소와 정렬하는 데에 유용한 3개의 기준 마크들을 포함한다. 기준 마크는 나노반응기 내의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 2716 및 2717로 표시된 바와 같이, 기준 마크는 원점 근처에 위치할 수 있는데, 이때 기준 마크는 어느 한 웰보다 원점에 더 가깝다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크는 2713으로 표시된, 나노반응기의 가장자리 근처에 위치하는데, 이때 가장자리로부터의 거리는 2714 및 2715로 예시된다. 기준 마크는 나노반응기의 가장자리로부터 약 0.1 ㎜ 내지 약 10 ㎜의 거리를 두고 위치할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크는 나노반응기의 가장자리로부터 약 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜, 0.4 ㎜, 0.5 ㎜, 0.6 ㎜, 0.7 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.4 ㎜, 1.6 ㎜, 1.8 ㎜, 2 ㎜, 2.2 ㎜, 2.4 ㎜, 2.6 ㎜, 2.8 ㎜, 3 ㎜, 3.2 ㎜, 3.4 ㎜, 3.6 ㎜, 3.8 ㎜, 4 ㎜, 4.2 ㎜, 4.4 ㎜, 4.6 ㎜, 4.8 ㎜, 5 ㎜, 5.2 ㎜, 5.4 ㎜, 5.6 ㎜, 5.8 ㎜, 6 ㎜, 6.2 ㎜, 6.4 ㎜, 6.6 ㎜, 6.8 ㎜, 7 ㎜, 7.2 ㎜, 7.4 ㎜, 7.6 ㎜, 7.8 ㎜, 8 ㎜, 8.2 ㎜, 8.4 ㎜, 8.6 ㎜, 8.8 ㎜, 9 ㎜ 또는 10 ㎜ 이상의 거리를 두고 위치한다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크는 나노반응기의 가장자리로부터 약 10 ㎜, 9 ㎜, 8.8 ㎜, 8.6 ㎜, 8.4 ㎜, 8.2 ㎜, 8 ㎜, 7.8 ㎜, 7.6 ㎜, 7.4 ㎜, 7.2 ㎜, 7 ㎜, 6.8 ㎜, 6.6 ㎜, 6.4 ㎜, 6.2 ㎜, 6 ㎜, 5.8 ㎜, 5.6 ㎜, 5.4 ㎜, 5.2 ㎜, 5 ㎜, 4.8 ㎜, 4.6 ㎜, 4.4 ㎜, 4.2 ㎜, 4 ㎜, 3.8 ㎜, 3.6 ㎜, 3.4 ㎜, 3.2 ㎜, 3 ㎜, 2.8 ㎜, 2.6 ㎜, 2.4 ㎜, 2.2 ㎜, 2 ㎜, 1.8 ㎜, 1.6 ㎜, 1.4 ㎜, 1.2 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.7 ㎜, 0.6 ㎜, 0.5 ㎜, 0.4 ㎜, 0.3 ㎜, 0.2 ㎜ 또는 0.1 ㎜ 이하의 거리를 두고 위치한다. 기준 마크는 나노반응기의 가장자리로부터 0.1 ㎜ 내지 10 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 9 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 8 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 7 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.1 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 5 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 4 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 3 ㎜, 또는 0.5 ㎜ 내지 2 ㎜의 거리를 두고 위치할 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 ㎜ 내지 5 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 기준 마크는 거리 면에서 웰에 가깝게 위치할 수 있는데, 이때 예시적 X-축 및 Y-축 거리는 각각 2719 및 2718로 표시된다. 일부 실시양태들에서, 웰과 기준 마크 사이의 거리는 약 0.001 ㎜, 0.005 ㎜, 0.01 ㎜, 0.02 ㎜, 0.03 ㎜, 0.04 ㎜, 0.05 ㎜, 0.06 ㎜, 0.07 ㎜, 0.08 ㎜, 0.09 ㎜, 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜, 0.4 ㎜, 0.5 ㎜, 0.6 ㎜, 0.7 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.5 ㎜, 1.7 ㎜, 2 ㎜, 2.2 ㎜, 2.5 ㎜, 2.7 ㎜, 3 ㎜, 3.5 ㎜, 4 ㎜, 4.5 ㎜, 5 ㎜, 5.5 ㎜, 6 ㎜, 6.5 ㎜ 또는 8 ㎜ 이상이다. 일부 실시양태들에서, 웰과 기준 마크 사이의 거리는 약 8 ㎜, 6.5 ㎜, 6 ㎜, 5.5 ㎜, 5 ㎜, 4.5 ㎜, 4 ㎜, 3.5 ㎜, 3 ㎜, 2.7 ㎜, 2.5 ㎜, 2.2 ㎜, 2 ㎜, 1.7 ㎜, 1.5 ㎜, 1.2 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.7 ㎜, 0.6 ㎜, 0.5 ㎜, 0.4 ㎜, 0.3 ㎜, 0.2 ㎜, 0.1 ㎜, 0.09 ㎜, 0.08 ㎜, 0.07 ㎜, 0.06 ㎜, 0.05 ㎜, 0.04 ㎜, 0.03 ㎜, 0.02 ㎜, 0.01 ㎜, 0.005 ㎜ 또는 0.001 ㎜ 이하이다. 웰과 기준 마크 사이의 거리는 0.001 ㎜ 내지 8 ㎜, 0.01 ㎜ 내지 7 ㎜, 0.05 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.1 ㎜ 내지 5 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 4 ㎜, 0.6 ㎜ 내지 3 ㎜, 0.7 ㎜ 내지 2 ㎜, 또는 0.8 ㎜ 내지 1.7 ㎜일 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.5 ㎜ 내지 2 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0260] 도 26d에 나타낸 나노반응기의 핸들 조감도는 디바이스를 시스템의 다른 구성요소와 정렬하는 데에 유용한 4개의 기준 마크들을 포함한다. 기준 마크는 나노반응기 내의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 기준 마크 H의 세부도 상에서 2722 및 2723으로 표시된 바와 같이, 기준 마크는 핸들 면 상에서 나노반응기의 모서리 근처에 위치할 수 있다. 기준 마크는 나노반응기의 모서리로부터 약 0.1 ㎜ 내지 약 10 ㎜의 거리를 두고 위치할 수 있다.

일부 실시양태들에서, 기준 마크는 나노반응기의 모서리로부터 약 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜, 0.4 ㎜, 0.5 ㎜, 0.6 ㎜, 0.7 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.4 ㎜, 1.6 ㎜, 1.8 ㎜, 2 ㎜, 2.2 ㎜, 2.4 ㎜, 2.6 ㎜, 2.8 ㎜, 3 ㎜, 3.2 ㎜, 3.4 ㎜, 3.6 ㎜, 3.8 ㎜, 4 ㎜, 4.2 ㎜, 4.4 ㎜, 4.6 ㎜, 4.8 ㎜, 5 ㎜, 5.2 ㎜, 5.4 ㎜, 5.6 ㎜, 5.8 ㎜, 6 ㎜, 6.2 ㎜, 6.4 ㎜, 6.6 ㎜, 6.8 ㎜, 7 ㎜, 7.2 ㎜, 7.4 ㎜, 7.6 ㎜, 7.8 ㎜, 8 ㎜, 8.2 ㎜, 8.4 ㎜, 8.6 ㎜, 8.8 ㎜, 9 ㎜ 또는 10 ㎜ 이상의 거리를 두고 위치한다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크는 나노반응기의 모서리로부터 약 10 ㎜, 9 ㎜, 8.8 ㎜, 8.6 ㎜, 8.4 ㎜, 8.2 ㎜, 8 ㎜, 7.8 ㎜, 7.6 ㎜, 7.4 ㎜, 7.2 ㎜, 7 ㎜, 6.8 ㎜, 6.6 ㎜, 6.4 ㎜, 6.2 ㎜, 6 ㎜, 5.8 ㎜, 5.6 ㎜, 5.4 ㎜, 5.2 ㎜, 5 ㎜, 4.8 ㎜, 4.6 ㎜, 4.4 ㎜, 4.2 ㎜, 4 ㎜, 3.8 ㎜, 3.6 ㎜, 3.4 ㎜, 3.2 ㎜, 3 ㎜, 2.8 ㎜, 2.6 ㎜, 2.4 ㎜, 2.2 ㎜, 2 ㎜, 1.8 ㎜, 1.6 ㎜, 1.4 ㎜, 1.2 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.7 ㎜, 0.6 ㎜, 0.5 ㎜, 0.4 ㎜, 0.3 ㎜, 0.2 ㎜ 또는 0.1 ㎜ 이하의 거리를 두고 위치한다. 기준 마크는 나노반응기의 모서리로부터 0.1 ㎜ 내지 10 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 9 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 8 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 7 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.1 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 5 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 4 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 3 ㎜, 또는 0.5 ㎜ 내지 2 ㎜의 거리를 두고 위치한다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 ㎜ 내지 5 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 기준 마크는 기능에 적합한 임의의 폭을 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 2724 및 2725로 예시된 바와 같이, 기준 마크의 폭은 약 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜, 0.4 ㎜, 0.5 ㎜, 0.6 ㎜, 0.7 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.4 ㎜, 1.6 ㎜, 1.8 ㎜, 2 ㎜, 2.2 ㎜, 2.4 ㎜, 2.6 ㎜, 2.8 ㎜, 3 ㎜, 3.2 ㎜, 3.4 ㎜, 3.6 ㎜, 3.8 ㎜, 4 ㎜, 4.2 ㎜, 4.4 ㎜, 4.6 ㎜, 4.8 ㎜, 5 ㎜, 5.2 ㎜, 5.4 ㎜, 5.6 ㎜, 5.8 ㎜, 6 ㎜, 6.2 ㎜, 6.4 ㎜, 6.6 ㎜, 6.8 ㎜, 7 ㎜, 7.2 ㎜, 7.4 ㎜, 7.6 ㎜, 7.8 ㎜, 8 ㎜, 8.2 ㎜, 8.4 ㎜, 8.6 ㎜, 8.8 ㎜, 9 ㎜ 또는 10 ㎜ 이상이다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크의 폭은 약 10 ㎜, 9 ㎜, 8.8 ㎜, 8.6 ㎜, 8.4 ㎜, 8.2 ㎜, 8 ㎜, 7.8 ㎜, 7.6 ㎜, 7.4 ㎜, 7.2 ㎜, 7 ㎜, 6.8 ㎜, 6.6 ㎜, 6.4 ㎜, 6.2 ㎜, 6 ㎜, 5.8 ㎜, 5.6 ㎜, 5.4 ㎜, 5.2 ㎜, 5 ㎜, 4.8 ㎜, 4.6 ㎜, 4.4 ㎜, 4.2 ㎜, 4 ㎜, 3.8 ㎜, 3.6 ㎜, 3.4 ㎜, 3.2 ㎜, 3 ㎜, 2.8 ㎜, 2.6 ㎜, 2.4 ㎜, 2.2 ㎜, 2 ㎜, 1.8 ㎜, 1.6 ㎜, 1.4 ㎜, 1.2 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.7 ㎜, 0.6 ㎜, 0.5 ㎜, 0.4 ㎜, 0.3 ㎜, 0.2 ㎜ 또는 0.1 ㎜ 이하이다. 기준 마크 폭은 0.1 ㎜ 내지 10 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 9 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 8 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 7 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.1 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 5 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 4 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 3 ㎜, 또는 0.5 ㎜ 내지 2 ㎜ 길이일 수 있다. 당업자는 상기 폭이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.1 ㎜ 내지 5 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 기준 마크의 횡단면은 2726으로 표시된 바와 같이 임의의 적합한 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크의 횡단면은 약 0.001 ㎜, 0.002 ㎜, 0.004 ㎜, 0.006 ㎜, 0.008 ㎜, 0.01 ㎜, 0.012 ㎜, 0.014 ㎜, 0.016 ㎜, 0.018 ㎜, 0.02 ㎜, 0.025 ㎜, 0.03 ㎜, 0.035 ㎜, 0.04 ㎜, 0.045 ㎜, 0.05 ㎜, 0.055 ㎜, 0.06 ㎜, 0.065 ㎜, 0.07 ㎜, 0.075 ㎜, 0.08 ㎜, 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜, 0.4 ㎜ 또는 0.5 ㎜ 이상이다. 일부 실시양태들에서, 기준 마크의 횡단면은 약 0.5 ㎜, 0.4 ㎜, 0.3 ㎜, 0.2 ㎜, 0.1 ㎜, 0.08 ㎜, 0.075 ㎜, 0.07 ㎜, 0.065 ㎜, 0.06 ㎜, 0.055 ㎜, 0.05 ㎜, 0.045 ㎜, 0.04 ㎜, 0.035 ㎜, 0.03 ㎜, 0.025 ㎜, 0.02 ㎜, 0.018 ㎜, 0.016 ㎜, 0.014 ㎜, 0.012 ㎜, 0.01 ㎜, 0.008 ㎜, 0.006 ㎜, 0.004 ㎜, 0.002 ㎜ 또는 0.001 ㎜ 이하이다. 기준 마크의 횡단면은 0.001 ㎜ 내지 0.5 ㎜, 0.004 ㎜ 내지 0.4 ㎜, 0.008 ㎜ 내지 0.3 ㎜, 0.01 ㎜ 내지 0.2 ㎜, 0.015 ㎜ 내지 0.1 ㎜, 0.018 ㎜ 내지 0.1 ㎜, 또는 0.02 ㎜ 내지 0.05 ㎜일 수 있다. 당업자는 상기 횡단면이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.02 ㎜ 내지 0.1 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0261] 일부 실시양태들에서, 나노반응기 내의 웰의 예시적 배치를 보여주는 도 26e에 예시된 바와 같이, 나노반응기는 표지 또는 일련의 표지를 위한 위치를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표지는 일련 번호이다. 거리 2728 및 2727로 예시된 바와 같이, 표지는 나노반응기의 가장자리 근처에 위치할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표지의 임의의 부분은 나노반응기의 가장자리로부터 약 0.1 ㎜ 내지 약 10 ㎜의 거리를 두고 위치한다. 일부 실시양태들에서, 표지의 임의의 부분은 나노반응기의 가장자리로부터 약 0.1 ㎜, 0.2 ㎜, 0.3 ㎜, 0.4 ㎜, 0.5 ㎜, 0.6 ㎜, 0.7 ㎜, 0.8 ㎜, 0.9 ㎜, 1 ㎜, 1.2 ㎜, 1.4 ㎜, 1.6 ㎜, 1.8 ㎜, 2 ㎜, 2.2 ㎜, 2.4 ㎜, 2.6 ㎜, 2.8 ㎜, 3 ㎜, 3.2 ㎜, 3.4 ㎜, 3.6 ㎜, 3.8 ㎜, 4 ㎜, 4.2 ㎜, 4.4 ㎜, 4.6 ㎜, 4.8 ㎜, 5 ㎜, 5.2 ㎜, 5.4 ㎜, 5.6 ㎜, 5.8 ㎜, 6 ㎜, 6.2 ㎜, 6.4 ㎜, 6.6 ㎜, 6.8 ㎜, 7 ㎜, 7.2 ㎜, 7.4 ㎜, 7.6 ㎜, 7.8 ㎜, 8 ㎜, 8.2 ㎜, 8.4 ㎜, 8.6 ㎜, 8.8 ㎜, 9 ㎜ 또는 10 ㎜ 이상의 거리를 두고 위치한다. 일부 실시양태들에서, 표지의 임의의 부분은 나노반응기의 가장자리로부터 약 10 ㎜, 9 ㎜, 8.8 ㎜, 8.6 ㎜, 8.4 ㎜, 8.2 ㎜, 8 ㎜, 7.8 ㎜, 7.6 ㎜, 7.4 ㎜, 7.2 ㎜, 7 ㎜, 6.8 ㎜, 6.6 ㎜, 6.4 ㎜, 6.2 ㎜, 6 ㎜, 5.8 ㎜, 5.6 ㎜, 5.4 ㎜, 5.2 ㎜, 5 ㎜, 4.8 ㎜, 4.6 ㎜, 4.4 ㎜, 4.2 ㎜, 4 ㎜, 3.8 ㎜, 3.6 ㎜, 3.4 ㎜, 3.2 ㎜, 3 ㎜, 2.8 ㎜, 2.6 ㎜, 2.4 ㎜, 2.2 ㎜, 2 ㎜, 1.8 ㎜, 1.6 ㎜, 1.4 ㎜, 1.2 ㎜, 1 ㎜, 0.9 ㎜, 0.8 ㎜, 0.7 ㎜, 0.6 ㎜, 0.5 ㎜,

0.4 ㎜, 0.3 ㎜, 0.2 ㎜ 또는 0.1 ㎜ 이하의 거리를 두고 위치한다. 상기 거리는 0.1 ㎜ 내지 10 ㎜, 0.2 ㎜ 내지 9 ㎜, 0.3 ㎜ 내지 8 ㎜, 0.4 ㎜ 내지 7 ㎜, 0.5 ㎜ 내지 6 ㎜, 0.6 ㎜ 내지 5 ㎜, 0.7 ㎜ 내지 4 ㎜, 0.8 ㎜ 내지 3 ㎜, 0.9 ㎜ 내지 2 ㎜ 또는 1.5 ㎜의 범위 내에 있을 수 있다. 당업자는 상기 거리가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 0.5 ㎜ 내지 2 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 2726으로 예시된 바와 같이, 표지는 약 1 ㎜ 내지 약 25 ㎜를 포함하는 임의의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표지의 길이는 약 1 ㎜, 5 ㎜, 10 ㎜, 15 ㎜, 20 ㎜, 25 ㎜, 30 ㎜, 40 ㎜, 50 ㎜, 60 ㎜, 70 ㎜, 80 ㎜, 90 ㎜, 100 ㎜, 110 ㎜, 120 ㎜, 130 ㎜, 140 ㎜ 또는 150 ㎜ 이상이다. 일부 실시양태들에서, 표지의 길이는 약 150 ㎜, 140 ㎜, 130 ㎜, 120 ㎜, 110 ㎜, 100 ㎜, 90 ㎜, 80 ㎜, 70 ㎜, 60 ㎜, 50 ㎜, 40 ㎜, 30 ㎜, 25 ㎜, 20 ㎜, 15 ㎜, 10 ㎜, 5 ㎜ 또는 1 ㎜ 이하이다. 일부 실시양태들에서, 표지의 길이는 약 5 ㎜ 내지 약 125 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 100 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 75 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 50 ㎜, 약 5 ㎜ 내지 약 25 ㎜, 약 25 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 약 50 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 약 75 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 약 100 ㎜ 내지 약 150 ㎜, 또는 약 125 ㎜ 내지 약 150 ㎜이다. 당업자는 상기 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 5 ㎜ 내지 25 ㎜ 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0262] **재료**

[0263] 기판, 고체 지지체 또는 마이크로구조물, 또는 그 내부의 반응기는 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물에 적합한 다양한 재료들로부터 제작될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 본 발명을 구성하는 기판/고체 지지체의 제작에 사용되는 재료는 저수준의 올리고뉴클레오티드 결합을 나타낸다. 일부 상황들에서, 가시 광 및/또는 UV 광에 대한 투과성을 나타내는 재료가 사용될 수 있다. 충분한 전도성을 가진 재료, 예를 들면, 본원에 기재된 기판/고체 지지체의 전부 또는 일부에 걸쳐 균일한 전기장을 형성할 수 있는 재료가 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 이러한 재료는 전기 접지에 연결될 수 있다. 일부 경우, 기판 또는 고체 지지체는 열 전도성을 가질 수 있거나 절연될 수 있다. 상기 재료는 화학적 또는 생화학적 반응, 예컨대, 일련의 올리고뉴클레오티드 합성 반응을 지탱할 정도의 내화학성 및 내열성을 가질 수 있다. 유연성 재료의 경우, 관심있는 재료는 변형된 나일론 및 비변형된 나일론, 니트로셀룰로스, 폴리프로필렌 등을 포함할 수 있다. 강성 재료의 경우, 관심있는 구체적인 재료는 유리; 훈연 실리카; 실리콘, 플라스틱(예를 들면, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리카보네이트 및 이들의 블렌드 등); 및 금속(예를 들면, 금, 백금 등)을 포함한다. 기판, 고체 지지체 또는 반응기는 실리콘, 폴리스티렌, 아가로스, 덱스트란, 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, 폴리디메틸실록산(PDMS) 및 유리로 구성된 군으로부터 선택된 재료로부터 제작될 수 있다. 기판/고체 지지체 또는 마이크로구조물, 또는 그 내부의 반응기는 본원에 나열된 재료들의 조합 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 재료로 제작될 수 있다.

[0264] **표면 변경(개질)**

[0265] 다양한 실시양태들에서, 추가 또는 공제 공정으로 표면을 화학적으로 및/또는 물리적으로 변경시켜 기판 표면, 또는 기판 표면의 선택된 부위 또는 영역의 하나 이상의 화학적 및/또는 물리적 성질을 변화시키기 위해 표면 변경을 이용한다. 예를 들면, 표면 변경은 (1) 표면의 습윤화 성질의 변화, (2) 표면의 작용화, 즉 표면 작용기의 제공, 변경 또는 치환, (3) 표면의 탈작용화, 즉 표면 작용기의 제거, (4) 예를 들면, 식각을 통한 표면의 화학적 조성의 다른 변경, (5) 표면 조도(roughness)의 증가 또는 감소, (6) 표면 상의 코팅, 예를 들면, 표면의 습윤화 성질과 상이한 습윤화 성질을 나타내는 코팅의 제공, 및/또는 (7) 표면 상에의 미립자의 침착을 포함할 수 있다.

[0266] 올리고뉴클레오티드 또는 다른 모이어티가 침착되는 기판 표면 또는 분해된 좌위들은 매끄러울 수 있거나 실질적으로 평평할 수 있거나, 불규칙성, 예컨대, 함몰 또는 융기를 가질 수 있다. 표면은 바람직한 방식으로 표면의 성질을 변경시키도록 작용하는 하나 이상의 상이한 화합물 층들로 변경될 수 있다. 관심있는 이러한 변경 층은 무기 층 및 유기 층, 예컨대, 금속, 금속 산화물, 중합체, 유기 소분자 등을 포함한다. 관심있는 중합체 층은 펩티드, 단백질, 핵산 또는 이들의 유사체(예를 들면, 펩티드 핵산 등); 폴리사카라이드, 인지질, 폴리우레탄, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 폴리우레아, 폴리아미드, 폴리에틸렌아민, 폴리아릴렌 설파이드, 폴리실록산, 폴리이미드, 폴리아세테이트 등; 또는 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 화합물의 층을 포함하는데, 이때 상기 중합체들은 이종중합체 또는 동종중합체일 수 있고, 그에 부착된(예를 들면, 접합된) 별개의 작용 모이어티를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있다. 기판의 표면 변경 또는 고체 지지체의 코팅을 위한 다른 재료 및 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,773,888호 및 미국 특허 출원 공보 제2007/0054127호에 기재되어 있다.

[0267] 분해된 좌위들은 고체 지지체의 표면 에너지를 증가시킬 수 있거나 감소시킬 수 있는 모이어티로 작용화될 수 있다. 상기 모이어티는 화학적 불활성을 나타낼 수 있거나, 대안적으로 원하는 화학반응을 뒷받침하기에 적합한 모이어티일 수 있다. 표면의 표면 에너지 또는 소수성은 표면 상에 부착되는 올리고뉴클레오티드의 친화성을 결정할 수 있다. 기판의 제조 방법은 (a) 이산화규소를 포함하는 표면을 가진 기판을 제공하는 단계; 및 (b) 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 적합한 실란화제, 예를 들면, 유기작용성 알콕시실란 분자를 사용하여 상기 표면을 실란화시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우, 유기작용성 알콕시실란 분자는 디메틸클로로-옥토데실-실란, 메틸디클로로-옥토데실-실란, 트리클로로-옥토데실-실란, 트리메틸-옥토데실-실란, 트리에틸-옥토데실-실란 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0268] 기판의 표면은 당분에서 공지되어 있는 임의의 방법을 이용함으로써 낮은 표면 에너지를 갖도록 제조될 수도 있다. 표면 에너지의 낮춤은 올리고뉴클레오티드가 표면에 부착하는 것을 용이하게 할 수 있다. 표면은 습윤성이 감소될 수 있도록 표면 에너지를 낮출 수 있는 분자 모이어티의 공유결합을 가능하게 하도록 작용화될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표면의 작용화는 표면 에너지 및 습윤성에서의 증가를 가능하게 한다.

[0269] 일부 실시양태들에서, 기판의 표면은 전형적으로 기판 표면 상에 존재하는 반응성 친수성 모이어티를 통해 실란을 기판 표면에 커플링시키기에 효과적인 반응 조건 하에서 실란들의 혼합물을 함유하는 유도체화 조성물과 접촉된다. 실란화는 일반적으로 유기작용성 알콕시실란 분자와의 자가-조립을 통해 표면을 덮는 데에 이용될 수 있다. 다양한 실록산 작용화 시약들이 예를 들면, 표면 에너지를 낮추거나 증가시키기 위해 당분야에서 현재 공지되어 있는 바와 같이 사용될 수도 있다. 유기작용성 알콕시실란은 그의 유기 작용기에 따라 분류된다. 실록산 작용화 시약의 비-한정적 예에는 하이드록시알킬 실록산(표면을 실릴화하고 디보란으로 작용화하고 과산화수소로 알코올을 산화시킴), 디올(디하이드록시알킬) 실록산(표면을 실릴화하고 디올로 가수분해함), 아미노알킬 실록산(중간 작용화 단계를 요구하지 않는 아민), 글리시독시실란(3-글리시독시프로필-디메틸-에톡시실란, 글리시독시-트리메톡시실란), 머캡토실란(3-머캡토프로필-트리메톡시실란, 3-4 에폭시사이클로헥실-에틸트리메톡시실란 또는 3-머캡토프로필-메틸-디메톡시실란), 비사이클로헵테닐-트리클로로실란, 부틸-알데하이드르-트리메톡시실란 또는 이량체성 이차 아미노알킬 실록산을 포함한다. 하이드록시알킬 실록산은 3-하이드록시프로필로 전환되는 알릴트리클로로클로로실란, 또는 8-하이드록시옥틸로 전환되는 7-옥트-1-에닐 트리클로로클로로실란을 포함할 수 있다. 디올(디하이드록시알킬) 실록산은 글리시딜 트리메톡시실란으로부터 유도된 (2,3-디하이드록시프로필옥시)프로필을 포함한다. 아미노알킬 실록산은 3-아미노프로필로 전환되는 3-아미노프로필 트리메톡시실란(3-아미노프로필-트리에톡시실란, 3-아미노프로필-디에톡시-메틸실란, 3-아미노프로필-디메틸-에톡시실란 또는 3-아미노프로필-트리메톡시실란)을 포함한다. 이량체성 이차 아미노알킬 실록산은 비스(실릴옥시프로필)아민으로 전환되는 비스(3-트리메톡시실릴프로필)아민일 수 있다. 추가로, 다수의 대안적 작용화된 표면들이 본 발명에서 사용될 수 있다. 비-한정적 예는 1. 폴리에틸렌/폴리프로필렌(감마 방사선조사 또는 크롬산 산화, 및 하이드록시알킬 표면으로의 환원에 의해 작용화됨); 2. 고도로 가교연결된 폴리스티렌-디비닐벤젠(클로로메틸화에 의해 유도체화되고 벤질아민 작용 표면으로 아민화됨); 3. 나일론(말단 아미노헥실 기는 직접적으로 반응성을 나타냄); 또는 4. 식각되고 환원된 폴리테트라플루오로에틸렌을 포함한다. 다른 방법 및 작용화제는 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5474796호에 기재되어 있다. 작용화 기들, 예를 들면, 실란들의 혼합물은 임의의 상이한 비로 존재할 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 상기 혼합물은 2종 이상의 상이한 작용화제들, 예를 들면, 실란들을 포함할 수 있다. 혼합물에서 2종 이상의 표면 작용화제들, 예를 들면, 실란들의 비는 약 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 2:3, 2:5, 2:7, 2:9, 2:11, 2:13, 2:15, 2:17, 2:19, 3:5, 3:7, 3:8, 3:10, 3:11, 3:13, 3:14, 3:16, 3:17, 3:19, 4:5, 4:7, 4:9, 4:11, 4:13, 4:15, 4:17, 4:19, 5:6, 5:8, 5:9, 5:11, 5:12, 5:13, 5:14, 5:16, 5:17, 5:18, 5:19, 6:7, 6:11, 6:13, 6:17, 6:19, 7:8, 7:9, 7:10, 7:11, 7:12, 7:13, 7:15, 7:16, 7:18, 7:19, 8:9, 8:11, 8:13, 8:15, 8:17, 8:19, 9:10, 9:11, 9:13, 9:14, 9:16, 9:17, 9:19, 10:11, 10:13, 10:17, 10:19, 11:12, 11:13, 11:14, 11:15, 11:16, 11:17, 11:18, 11:19, 11:20, 12:13, 12:17, 12:19, 13:14, 13:15, 13:16, 13:17, 13:18, 13:19, 13:20, 14:15, 14:17, 14:19, 15:16, 15:17, 15:19, 16:17, 16:19, 17:18, 17:19, 17:20, 18:19, 19:20, 또는 2개의 기들의 원하는 표면 표시를 달성할 임의의 다른 비일 수 있다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 표면 표시는 혼합물에서 2개의 기들의 비에 고도로 비례할 것이다. 본 발명의 방법 및 조성물에 따른 원하는 표면 장력, 습윤화성, 물 접촉각 또는 다른 적합한 용매에 대한 접촉각은 작용화제들의 비를 제공함으로써 달성될 수 있다. 추가로, 혼합물 중의 물질은 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 원하는 수준까지 반응성 기의 표면 밀도를 희석하는 하류 반응을 위한 적합한 반응성 모이어티 및 불활성 모이어티로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드 합성 반응에서 반응하여 성장하는 올리고뉴클레오티드를 형성하는 표면 작용기의 분획의 밀도는 약 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6,

1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 7.0, 10.0, 15.0, 20.0, 50.0, 75.0 또는 100.0 μMol/m^2 이하 또는 이상이다.

[0270] 다양한 실시양태들에서, 표면은 반응성 친수성 모이어티의 코팅에 의해 보다 더 높은 표면 에너지를 갖거나 더 높은 친수성을 갖게 되도록 변경된다. 기판 표면의 상이한 부분들의 표면 에너지를 변경시킴으로써 침착된 시약 액체의 퍼짐을 조절할, 일부 경우, 용이하게 할 수 있다. 예를 들면, 도 5는 시약의 점적이 잉크젯 프린터에 의해 마이크로웰 내에 침착되는 경우를 보여준다. 이 경우, 마이크로웰의 표면이 근처의 다른 표면에 비해 더 높은 표면 에너지를 갖기 때문에, 액체 점적은 보다 더 작은 마이크로웰 상으로 퍼져 이러한 마이크로웰을 채울 수 있다. 기판 표면 상의 반응성 친수성 모이어티는 하이드록실 기, 카복실 기, 티올 기, 및/또는 치환된 또는 비치환된 아민 기일 수 있다. 적합한 재료는 고체상 화학적 합성을 위해 사용될 수 있는 지지체, 예를 들면, 가교연결된 중합체성 재료(예를 들면, 디비닐벤젠 스티렌-기제의 중합체), 아가로스(예를 들면, 세파로스®), 덱스트란(예를 들면, 세파덱스®), 셀룰로스성 중합체, 폴리아크릴아미드, 실리카, 유리(특히 조절된 공극 유리, 또는 "CPG"), 세라믹 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 지지체는 상업적으로 입수될 수 있고, 그 자체로서 사용될 수 있거나, 작용화 전에 처리될 수 있거나 코팅될 수 있다.

[0271] **친수성 표면 및 소수성 표면**

[0272] 표면의 표면 에너지 또는 소수성은 물 접촉각을 측정함으로써 평가될 수 있거나 측정될 수 있다. 물 접촉각은 점적 표면과 고체 표면 사이의 각도이고, 이때 수적은 고체 표면과 만난다. 고체 표면은 매끄러운, 평탄한 또는 평평한 표면일 수 있다. 영(Young) 방정식을 통해 액체(예를 들면, 물)에 의한 고체 표면의 습윤화를 정량할 수 있다. 일부 경우, 소위 전진(최대) 물 접촉각부터 후퇴(최소) 물 접촉각까지 물 접촉각 이력현상(hysteresis)을 관찰할 수 있다. 평형 물 접촉은 이 값들 내에서 발견될 수 있고, 이들로부터 계산될 수 있다. 물 접촉각을 사용하여 상대적 정량적 용어로 소수성 및 친수성을 표현할 수 있다. 90°보다 더 작은 물 접촉각을 가진 표면인 고체 표면은 친수성 또는 극성 표면으로서 간주될 수 있다. 90°보다 더 큰 물 접촉각을 가진 표면인 고체 표면은 소수성 또는 비극성 표면으로서 간주될 수 있다. 낮은 표면 에너지를 가진 고도 소수성 표면은 120°보다 더 큰 물 접촉각을 가질 수 있다.

[0273] 코팅된 표면의 표면 특성은 올리고뉴클레오티드 합성에 적합한 다양한 방식들로 조절될 수 있다. 표면은 통상의 올리고뉴클레오티드 합성의 조건에 대한 불활성을 갖도록 선택될 수 있고; 예를 들면, 고체 표면은 선택된 화학 반응에 따라 단량체 추가 동안 큰 용매 계면에 대한 자유 하이드록시, 아미노 또는 카복실 기를 결여할 수 있다. 대안적으로, 표면은 올리고뉴클레오티드 합성의 제1 주기 또는 처음 몇몇 주기의 시작 전에 반응성 모이어티를 포함할 수 있고, 이 반응성 모이어티는 올리고뉴클레오티드 합성 반응의 1, 2, 3, 4 또는 5 이상의 주기 후 측정불가능한 밀도까지 신속히 고갈될 수 있다. 표면은 예를 들면, 통상의 유기 용매, 예컨대, 아세토니트릴 및 글리콜 에테르 또는 수성 용매에 의해 주변 표면에 비해 충분히 또는 부족하게 습윤화되도록 최적화될 수도 있다.

[0274] 이론에 의해 구속받지 않지만, 습윤화 현상은 고체-액체 계면에서 분자들 사이의 표면 장력 또는 인력의 척도인 것으로서 이해되고, dynes/cm^2로 표현된다. 예를 들면, 탄화불소는 전형적으로 탄소-불소 결합의 독특한 극성(전기음성)에 기인하는 매우 낮은 표면 장력을 가진다. 조밀하게 구조화된 랭뮤어-블로드젯(Langmuir-Blodgett) 유형 필름에서, 층의 표면 장력은 일차적으로 알킬 쇄의 말단에서의 불소의 퍼센트에 의해 결정될 수 있다. 조밀하게 정돈된 필름에서, 단일 말단 트리플루오로메틸 기는 표면이 거의 퍼플루오로알킬 층만큼 친유성을 갖게 만들 수 있다. 탄화불소가 기저 유도체화된 고체(예를 들면, 고도로 가교연결된 중합체성) 지지체에 공유부착될 때, 반응성 부위의 밀도는 랭뮤어-블로드젯 및 기 밀도보다 더 낮을 수 있다. 예를 들면, 메틸트리메톡시실란 표면의 표면 장력은 약 22.5 mN/m일 수 있고, 아미노프로필트리에톡시실란 표면은 약 35 mN/m일 수 있다. 실란 표면의 다른 예는 전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(Arkles B et al., "The role of polarity in the structure of silanes employed in surface modification", Silanes and Other Coupling Agents, Vol. 5)에 기재되어 있다. 요약하건대, 표면의 친수성 거동은 일반적으로 임계 표면 장력이 45 mN/m보다 더 클 때 일어나는 것으로서 간주된다. 임계 표면 장력이 증가할 때, 접촉각의 예상된 감소가 보다 더 강한 흡착 거동과 함께 동반된다. 표면의 소수성 거동은 일반적으로 임계 표면 장력이 35 mN/m보다 더 작을 때 일어나는 것으로서 간주된다. 먼저, 임계 표면 장력의 감소는 친유성 거동, 즉 탄화수소 오일에 의한 표면의 습윤화와 관련되어 있다. 임계 표면 장력이 20 mN/m 미만으로 감소될 때, 표면은 탄화수소 오일에 의한 습윤화에 저항하고 소수성뿐만 아

니라 소유성도 갖는 것으로서 간주된다. 예를 들면, 실란 표면 변경을 이용하여 임계 표면 장력의 넓은 범위를 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법 및 조성물은 표면 코팅, 예를 들면, 실란을 사용한 표면 코팅을 이용하여 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 115 또는 120 mN/m, 또는 이보다 더 높은 값 미만의 표면 장력을 달성할 수 있다. 추가로, 본 발명의 방법 및 조성물은 표면 코팅, 예를 들면, 실란을 사용한 표면 코팅을 이용하여 115, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7 또는 6 mN/m, 또는 이보다 더 낮은 값 초과의 표면 장력을 달성할 수 있다. 표면 코팅, 예를 들면, 실란을 사용한 표면 코팅의 비-한정적 예의 물 접촉각 및 표면 장력은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(Arkles et al., Silanes and Other Coupling Agents, Vol. 5v: The Role of Polarity in the Structure of Silanes Employed in Surface Modification. 2009)의 표 1 및 표 2에 기재되어 있다. 상기 표들은 아래에 복사되어 있다.

[0275] [표 1]

매끄러운 표면 상에서의 물 접촉각(도)

헵타데카플루오로데실트리메톡시실란	113-115
폴리(테트라플루오로에틸렌)	108-112
폴리프로필렌	108
옥타데실디메틸클로로실란	110
옥타데실트리클로로실란	102-109
트리스(트리메틸실옥시)실릴에틸디메틸클로로실란	103-104
옥틸디메틸클로로실란	104
부틸디메틸클로로실란	100
트리메틸클로로실란	90-100
폴리에틸렌	88-103
폴리스티렌	94
폴리(클로로트리플루오로에틸렌)	90
인간 피부	75-90
다이아몬드	87
흑연	86
규소(식각된)	86-88
활석	82-90
키토산	80-81
강철	70-75
메톡시에톡시운데실트리클로로실란	73-74
메타크릴옥시프로필트리메톡시실란	70
전형적인 금(순금 참조)	66
장점막	50-60
고령토	42-46
백금	40
질화규소	28-30
요오드화은	17
[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]트리메톡시실란	15-16
소다석회 유리	<15

[0276]

순금	<10
트리메톡시실릴프로필 치환된 폴리(에틸렌이민), 하이드로클로라이드	<10

각주: 표 1 에서, 실란에 대한 접촉각은 매끄러운 표면 상에의 실란의 가수분해성 침착을 지칭한다. 여기 데이터는 다양한 문헌 출처들 및 저자의 연구로부터 도출된다. 기판들 사이의 정확한 비교는 시험 방법에서의 차이점; 또는 전진 접촉각이 기록되었는지, 후진 접촉각이 기록되었는지 아니면 평형 접촉각이 기록되었는지를 고려하지 않는다.

[0277]

[0278] [표 2]

임계 표면 장력(mN/m)

헵타데카플루오로데실트리클로로실란	12
폴리(테트라플루오로에틸렌)	18.5
옥타데실트리클로로실란	20-24
메틸트리메톡시실란	22.5
노나플루오로헥실트리메톡시실란	23
비닐트리에톡시실란	25
파라핀 왁스	25.5
에틸트리메톡시실란	27.0
프로필트리메톡시실란	28.5
소다석회 유리(습윤)	30.0
폴리(클로로트리플루오로에틸렌)	31.0
폴리프로필렌	31.0
폴리(프로필렌 옥사이드)	32
폴리에틸렌	33.0
트리플루오로프로필트리메톡시실란	33.5
3-(2-아미노에틸)아미노프로필트리메톡시실란	33.5
폴리스티렌	34
p-톨릴트리메톡시실란	34
시아노에틸트리메톡시실란	34
아미노프로필트리에톡시실란	35
아세톡시프로필트리메톡시실란	37.5
폴리(메틸 메타크릴레이트)	39
폴리(비닐 클로라이드)	39
페닐트리메톡시실란	40.0
클로로프로필트리메톡시실란	40.5
머캡토프로필트리메톡시실란	41
글리시독시프로필트리메톡시실란	42.5
폴리(에틸렌 테레프탈레이트)	43

[0279]

구리(무수)	44
폴리(에틸렌 옥사이드)	43-45
알루미늄(무수)	45
나일론 6/6	45-46
철(무수)	46
소다석회 유리(무수)	47
산화티타늄(예추석)	91
산화철	107
산화주석	111

[0280]

[0281] 물 접촉각을 측정하는 방법은 정적법, 동적법, 동적 윌헬미(Wilhelmy) 방법, 단일-섬유 윌헬미 방법, 분말 접촉각 방법 등을 비롯한, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법을 이용할 수 있다. 일부 경우, 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명에서 본원에 기재된 기판의 표면, 또는 기판의 표면의 일부는 소수성을 갖거나, 낮은 표면 에너지를 갖거나, 기판의 적절한 작용화된 표면의 굽어지지 않은, 매끄러운 또는 평평한 등가물 상에서 약 90°, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120°, 125°, 130°, 135°, 140°, 145° 또는 150° 초과의 각도로서 측정될 물 접촉각을 갖도록 작용화될 수 있거나 변경될 수 있다. 본원에 기재된 작용화된 표면의 물 접촉각은 굽어지지 않고 매끄럽고 평탄하고 평평한 형상의 작용화된 표면 상에서 수적의 접촉각을 지칭할 수 있다. 일부 경우, 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명에서 본원에 기재된 기판의 표면, 또는 기판의 표면의 일부는 친수성을 갖도록, 높은 표면 에너지를 갖도록, 또는 기판의 적절한 작용화된 표면의 굽어지지 않은, 매끄러운 또는 평평한 등가물 상에서 약 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° 또는 10° 미만의 각도로서 측정될 물 접촉각을 갖도록 작용화될 수 있거나 변경될 수 있다. 기판의 표면, 또는 기판의 표면의 일부는 작용화 또는 변경 전의 표면 또는 표면의 일부에 비해 더 높은 친수성 또는 소수성을 갖도록 작용화될 수 있거나 변경될 수 있다.

[0282] 일부 경우, 하나 이상의 표면은 하나 이상의 굽어지지 않은, 매끄러운 또는 평평한 등가 표면 상에서 측정될 때 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° 또는 10° 초과의 물 접촉각 차이를 갖도록 변경될 수 있다. 일부 경우, 기판의 마이크로구조물, 채널, 분해된 좌위들, 분해된 반응기 캡들 또는 다른 부분의 표면은 이러한 구조물의 굽어지지 않은, 매끄러운 또는 평평한 등가 표면 상에서 측정될 때 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° 또는 10° 초과의 물 접촉각 차이에 상응하는 소수성 차이를 갖도록 변경될 수 있다. 달리 언급되어 있지 않은 한, 본원에서 언급된 물 접촉각은 해당 표면의 굽어지지 않은, 매끄러운 또는 평평한 등가물 상에서 수득될 측정치에 상응한다.

[0283] 표면을 작용화하는 다른 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,028,189호에 기재되어 있다. 예를 들면, 먼저 보호제 또는 레지스트를 기판 내의 각각의 좌위 상에 적용함으로써 친수성을 가진 분해된 좌위들을 생성할 수 있다. 그 다음, 비보호된 영역을 소수성 물질로 코팅하여 비반응성 표면을 생성할 수 있다. 예를 들면, (트리데카플루오로테트라하이드로옥틸)-트리에톡시실란을, 보호된 원을 둘러싸는 노출된 산화물 상에 화학적으로 증착시킴으로써 소수성 코팅을 생성할 수 있다. 마지막으로, 보호제 또는 레지스트를 제거하여 추가 변경 및 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 기판의 좌위 영역을 노출시킬 수 있다. 일부 실시양태들에서, 이러한 비보호된 영역들의 초기 변경은 추가 변경에 저항할 수 있고 그들의 표면 작용화를 유지할 수 있는 반면, 새로 비보호된 영역은 후속 변경 단계로 처리될 수 있다.

[0284] **다수의 병렬식 마이크로플루이딕 반응들**

[0285] 또 다른 양태에서, 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 시스템 및 방법이 본원에 기재되어 있다. 상기 시스템은 서로 밀봉되어, 예를 들면, 분리가능하게 밀봉되어, 밀봉 시 복수의 개별적으로 주소지정가능한 반응 부피 또는 반응기를 형성할 수 있는 2개 이상의 기판들을 포함할 수 있다. 제1 기판을 제2 기판으로부터 이형시키고 이를 제3 기판과 정렬함으로써 새로운 반응기 세트를 형성할 수 있다. 각각의 기판은 원하는 반응을 위한 시약, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드, 효소, 완충제 또는 용매를 보유할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 시스템은 제1 적합한 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 기판, 및 제2 적합한 밀도로 복수의 분해된 반응기 캡들을

가진 캡핑 요소를 포함한다. 시스템은 복수의 분해된 반응기 캡들을 제1 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하여 제1 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적 밀봉을 형성할 수 있다. 정렬된 기판들 사이의 일시적 밀봉은 제1 표면 상의 좌위들을 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 125개, 150개 또는 200개 이상 또는 이하의 좌위들의 군들로 물리적으로 나눌 수 있다. 본원에 기재된 한 세트의 병렬식 반응들은 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 수행될 수 있다. 제1 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 표면과 제2 밀도로 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소는 복수의 분해된 반응기 캡들이 제1 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 함께 제1 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적 밀봉을 형성함으로써 제1 표면 상의 좌위들을 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 125개, 150개 또는 200개 이상 또는 이하의 좌위들의 군들로 물리적으로 나누도록 정렬될 수 있다. 제1 반응을 수행하여 제1 시약 세트를 형성할 수 있다. 캡핑 요소는 제1 표면으로부터 이형될 수 있다. 이형 시, 반응기 캡들은 이전에 밀봉된 반응 부피로 제1 시약 세트의 적어도 일부를 각각 보유할 수 있다. 복수의 분해된 좌위들은 1 ㎟당 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 50, 약 75, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 약 500, 약 600, 약 700, 약 800, 약 900, 약 1000, 약 1500, 약 2000, 약 3000, 약 4000, 약 5000, 약 6000, 약 7000, 약 8000, 약 9000, 약 10000, 약 20000, 약 40000, 약 60000, 약 80000, 약 100000 또는 약 500000 이상 또는 이하의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들은 ㎟당 약 100 이상 또는 이하의 밀도로 존재할 수 있다. 복수의 분해된 반응기 캡들은 ㎟당 약 1 이상 또는 이하의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기 캡들은 1 ㎟당 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 50, 약 75, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 약 500, 약 600, 약 700, 약 800, 약 900, 약 1000, 약 1500, 약 2000, 약 3000, 약 4000, 약 5000, 약 6000, 약 7000, 약 8000, 약 9000, 약 10000, 약 20000, 약 40000, 약 60000, 약 80000, 약 100000 또는 약 500000 이상 또는 이하의 밀도로 존재할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 제3 밀도로 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면을 제공하는 단계, 및 복수의 분해된 반응기 캡들을 제2 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬함으로써 제2 표면과 캡핑 요소 사이에 밀봉, 전형적으로 일시적 또는 분리가능한 밀봉을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 새로 형성된 밀봉은 제2 표면 상의 좌위들을 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 125개, 150개 또는 200개 이상 또는 이하의 좌위들의 군으로 물리적으로 나눌 수 있다. 임의적으로 제1 시약 세트의 일부를 사용하여 제2 반응을 수행함으로써 제2 시약 세트를 형성할 수 있다. 캡핑 요소는 제2 표면으로부터 이형될 수 있다. 이형 시, 반응기 캡은 이전에 밀봉된 제2 반응 부피로 제2 시약 세트의 적어도 일부를 각각 보유할 수 있다. 일부 경우, 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면은 1 ㎟당 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 50, 약 75, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 약 500, 약 600, 약 700, 약 800, 약 900, 약 1000, 약 1500, 약 2000, 약 3000, 약 4000, 약 5000, 약 6000, 약 7000, 약 8000, 약 9000, 약 10000, 약 20000, 약 40000, 약 60000, 약 80000, 약 100000 또는 약 500000 이상의 좌위 밀도를 가질 수 있다. 시스템, 방법 및 장치의 실시양태들의 다양한 양태들이 본원에 기재되어 있다.

[0286] 시스템은 임의의 수의 정적 웨이퍼 및 임의의 수의 동적 웨이퍼를 포함할 수 있다. 예를 들면, 시스템은 세로줄에서 3개의 기판들 및 가로줄에서 4개의 기판들을 포함할 수 있다. 수송 시스템은 3개의 정적 웨이퍼들(또는 기판들) 및 1개의 동적 웨이퍼(또는 기판)을 포함할 수 있다. 동적 웨이퍼는 복수의 정적 웨이퍼들 사이에서 움직일 수 있거나 수송될 수 있다. 동적 웨이퍼는 3개의 정적으로 장착된 웨이퍼들 사이에서 수송될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 동적 웨이퍼는 약 50, 100, 150, 200 또는 250 ㎜ 이상, 또는 2, 4, 6 또는 8 in 이상의 직경을 가질 수 있다. 동적 웨이퍼는 온도 조절된 진공 척 내에 장착될 수 있다. 본 발명의 시스템은 동적 웨이퍼가 z-위치의 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 또는 3 ㎛ 이하의 조절에 의해 제2 웨이퍼의 표면에 대향할 웨이퍼의 표면에 수직인 방향일 수 있는 Z 방향으로 이동할 수 있는 배열을 허용하고, 예를 들면, 동적 웨이퍼 상의 한 패턴을 허용범위 내에서 정적 웨이퍼 상의 또 다른 패턴과 일치시킴으로써 서로 대향할 2개의 웨이퍼들의 표면들의 범선들 사이의 각도인 웨이퍼의 세타_z를 정렬할 수 있다. 웨이퍼 위치선정 허용오차는 x-y 평면에서 회전각의 차이에서 약 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 또는 500 마이크로라디안(microradians) 이하일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 웨이퍼 위치선정 허용오차는 x-y 평면에서 회전각의 차이에서 약 50 마이크로라디안 이하일 수 있다. 웨이퍼 위치선정 허용오차는 x-

방향에서 거리의 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 ㎛ 이하일 수 있다. 웨이퍼 위치선정 허용오차는 y-방향에서 거리의 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 ㎛ 이하일 수 있다. 웨이퍼 위치선정 허용오차는 z-방향에서 x-y 평면의 회전에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 마이크로라디안 이하일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 웨이퍼 위치선정 허용오차는 z-방향에서 x-y 평면의 회전에서 약 5 마이크로라디안 이하일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 웨이퍼 위치선정 허용오차는 z-방향에서 거리의 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 또는 5 ㎛ 이하일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 웨이퍼 위치선정 허용오차는 z-방향에서 거리의 약 0.5 ㎛ 이하일 수 있다.

[0287] 일부 경우, 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 시스템 및 방법은 복수의 분해된 좌위들을 가진 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 표면, 및/또는 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소를 추가로 포함할 수 있다. 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 표면은 정렬될 수 있고 2개의 표면들과 상응하는 캡핑 요소 사이에 일시적 밀봉을 형성함으로써 표면 상의 좌위들 및/또는 반응기 캡들을 물리적으로 나눌 수 있다. 이전 반응으로부터 보유된 시약들, 즉 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8 또는 제9 시약 세트의 일부를 사용하여 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 반응을 수행함으로써 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 시약 세트를 형성할 수 있다. 본원에 기재된 각각의 캡핑 요소는 그의 상응하는 표면으로부터 이형될 수 있는데, 이때 반응기 캡은 또 다른 반응 부피의 이전 시약 세트의 적어도 일부를 보유할 수 있다. 일부 경우, 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면은 2/㎟ 이상의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 분해된 좌위들을 가진 제2 표면은 1 ㎟당 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 50, 약 75, 약 100, 약 200, 약 300, 약 400, 약 500, 약 600, 약 700, 약 800, 약 900, 약 1000, 약 1500, 약 2000, 약 3000, 약 4000, 약 5000, 약 6000, 약 7000, 약 8000, 약 9000, 약 10000, 약 20000, 약 40000, 약 60000, 약 80000, 약 100000 또는 약 500000 이상의 좌위 밀도를 가질 수 있다. 매회 보유된 시약의 일부는 상이할 수 있고 수행될 반응에 따라 바람직한 일부로 존재하도록 조절될 수 있다.

[0288] 다양한 실시양태들에서, 본 발명은 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 표면 및 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소를 포함하는 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하기 위한 시스템을 예상한다. 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 바와 같이, 복수의 분해된 좌위들과 복수의 분해된 반응기 캡들을 가진 캡핑 요소는 조합되어 복수의 분해된 반응기들을 형성할 수 있다. 일부 경우, 제1 기판의 제1 표면의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함할 수 있다. 제2 기판의 제2 표면의 분해된 좌위들은 시약의 코팅을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 시약의 코팅은 제1 또는 제2 표면에 공유연결될 수 있다. 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 표면이 존재하는 경우, 각각의 표면은 시약의 코팅을 포함할 수 있다.

[0289] 제1 표면 또는 제2 표면 상의 시약의 코팅은 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 본원의 다른 부분에 더 기재된 바와 같이 임의의 길이, 예를 들면, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 또는 300 bp 이상의 길이를 가질 수 있다. 분해된 좌위들과 분해된 반응기 캡들의 밀봉 시, 시약의 코팅 내에 포함되는 올리고뉴클레오티드는 방출될 수 있다. 복수의 분해된 반응기들 내부에서 다양한 반응들, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 증폭 반응, PCA, 시퀀싱 라이브러리의 생성 또는 오류 보정을 수행할 수 있다.

[0290] 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있고 당분야에서 공지되어 있는 다양한 적합한 방법들, 예를 들면, 그 자체로 당분야에서 잘 공지되어 있는 효소적 절단으로 올리고뉴클레오티드를 코팅된 표면으로부터 방출시킬 수 있다. 이러한 효소적 절단의 예는 제한 효소, 예컨대, MIyI, 또는 단일 또는 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있는 다른 효소들 또는 효소들의 조합, 예컨대, 우라실 DNA 글리코실라제(UDG) 및 DNA 엔도뉴클레아제 IV(그러나, 이들로 한정되지 않음)의 사용을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. DNA 분자의 화학적(염기 불안정성) 절단 또는 표면으로부터의 광학적(광불안정성) 절단을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 당분야에서 공지되어 있는 다른 절단 방법도 본 발명에서 유리하게 이용될 수 있다. PCR 또는 다른 증폭 반응도 올리고뉴클레오티드가 기판에 여전히 고착되어 있는 동안 올리고뉴클레오티드를 복사함으로써 유전자 합성을 위한 구축 물질을 생성하는 데에 이용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드를 방출시키는 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 PCT 특허 공보 제WO2007137242호 및 미국 특허 제5,750,672호에 기재되어 있다.

[0291] 일부 경우, 캡핑 요소를 제1 표면으로부터 이형시키고 캡핑 요소를 제2 표면으로부터 이형시킴에 있어서 이형은 상이한 속도로 수행될 수 있다. 캡핑 요소를 상응하는 표면으로부터 이형시킬 때 보유되는 시약의 일부의 양은 캡핑 요소 및 상응하는 표면의 속도 또는 표면 에너지에 의해 조절될 수 있다. 일부 경우, 제1 또는 제2 표면은 주어진 액체, 예컨대, 물과의 상이한 표면 장력, 표면 에너지 또는 소수성을 포함한다. 일부 경우, 제1 표면의

분해된 좌위들은 높은 표면 에너지, 표면 장력 또는 소수성을 포함할 수 있다. 캡핑 요소 및 상응하는 표면의 표면 에너지 또는 소수성에서의 차이는 이형 시 보유되는 시약의 일부를 조절하기 위한 파라미터일 수 있다. 제1 반응의 부피와 제2 반응의 부피는 상이할 수 있다.

[0292] 일부 경우, 분해된 반응기들 외부의 기압은 분해된 반응기들 내부의 압력보다 더 클 수 있다. 다른 경우에서, 분해된 반응기들 외부의 기압은 분해된 반응기들 내부의 압력보다 더 작을 수 있다. 분해된 반응기들 외부의 기압과 분해된 반응기들 내부의 기압 사이의 차이(또는 기압 차이)는 분해된 반응기들의 밀봉에 영향을 미칠 수 있다. 기압 차이는 제1 표면 및 제2 표면의 표면 에너지 또는 소수성을 변경시킴으로써 제1 표면과 제2 표면의 반응기 캡 사이의 갭 내에서 곡선형 또는 직선형 기체/액체 계면을 생성할 수 있다. 더욱이, 캡핑 요소를 표면으로부터 이형시키기 위해 필요한 힘은 기압 차이 및 표면 에너지 차이에 의해 조절될 수 있다. 일부 경우, 표면은 캡핑 요소가 표면으로부터 용이하게 이형될 수 있을 정도의 표면 에너지 차이 및 압력 차이를 갖도록 변경될 수 있다.

[0293] 제1 또는 제2 반응, 또는 제2 반응 후 임의의 반응은 본원에 기재된 다양한 분자적 또는 생화학적 분석들, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 반응을 포함할 수 있다. 일부 경우, 제1 또는 제2 반응은 중합효소 순환 조립을 포함할 수 있다. 일부 경우, 제1 또는 제2 반응은 효소적 유전자 합성, 어닐링 및 라이게이션 반응, 하이브리드 유전자를 통한 2개의 유전자들의 동시적 합성, 숏건 라이게이션 및 공-라이게이션, 삽입 유전자 합성, DNA의 한 가닥을 통한 유전자 합성, 주형-유도된 라이게이션, 리가제 연쇄 반응, 마이크로어레이-매개된 유전자 합성, 고체상 조립, 슬로닝 빌딩 블록 기술, 또는 RNA 라이게이션-매개된 유전자 합성을 포함할 수 있다. 한 세트의 병렬식 반응들을 수행하는 반응 또는 방법은 캡핑 요소를 냉각시키거나 제1 표면(제2 표면)을 냉각시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0294] 본원에 기재된 시스템을 이용하는 본 발명의 방법 및 조성물의 일반적인 공정 작업흐름은 도 8에 예시되어 있다.

[0295] **보조 장치**

[0296] 한 양태에서, 본 발명은 올리고뉴클레오티드 합성 시스템 및 방법에 관한 것이다. 올리고뉴클레오티드 합성 시스템은 스캐닝 침착 시스템을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 합성 시스템은 작용화된 표면 및 복수의 분해된 좌위들을 가진 제1 기판(예를 들면, 올리고뉴클레오티드 합성 웨이퍼), 및 전형적으로 복수의 프린트헤드들을 포함하는 잉크젯 프린터를 포함할 수 있다. 각각의 프린트헤드는 전형적으로 제1 기판의 분해된 좌위들에서 수행되는 반응을 위한 다양한 빌딩 블록들, 예를 들면, 포스포라미다이트 합성을 위한 뉴클레오티드 빌딩 블록들 중 하나를 침착시키도록 구성된다. 올리고뉴클레오티드 합성 웨이퍼의 분해된 좌위들은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 마이크로채널에 존재할 수 있다. 기판은 예를 들면, 액체, 예컨대, 분해된 좌위들 내에서의 반응에 필요한 시약을 함유하는 액체(예를 들면, 톨루엔 중의 산화제), 또는 합성 부위, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 합성 웨이퍼의 분해된 좌위들에서 시약의 용량 및 농도의 정확한 조절을 가능하게 하는 용매(예를 들면, 아세토니트릴)의 연속 유동을 제공함으로써 유동셀 내에서 밀봉될 수 있다. 불활성 기체, 예컨대, 질소의 유동은 전형적으로 휘발성 기판의 향상된 증발을 통해 기판을 건조하는 데에 이용될 수 있다. 다양한 수단들, 예를 들면, 진공 공급원/감압 펌프 또는 진공 탱크가 감소된 상대적 압력(음압) 또는 진공을 생성함으로써 건조를 개선하고 표면 상의 잔류 수분 양 및 임의의 액체 점적을 감소시키는 데에 이용될 수 있다. 따라서, 기판 또는 그의 분해된 좌위들 바로 주변의 압력은 약 100, 75, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05 또는 0.01 mTorr 이하인 것으로 측정될 수 있다.

[0297] 도 3은 올리고뉴클레오티드 합성 시스템의 일례를 보여준다. 따라서, 올리고뉴클레오티드 합성 웨이퍼는 입구 매니폴드(manifold) 및 임의적으로 출구 매니폴드를 통해 필요한 대부분의 시약들을 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 분해된 좌위들에게 제공하도록 구성된다. 상기 대부분의 시약은 다양한 실시양태들에서 복수의 분해된 좌위들 사이에 공통적으로 요구되는, 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 임의의 적합한 시약, 담체, 용매, 완충제 또는 기체, 예컨대, 산화제, 탈차단제, 아세토니트릴 또는 질소 기체를 포함할 수 있다. 잉크젯 프린터 프린트헤드는 제1 기판의 주소지정가능한 위치까지 X-Y 방향으로 이동할 수 있다. 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 바와 같이, 제2 기판, 예컨대, 캡핑 요소는 Z 방향, 및 필요한 경우 X 및 Y 방향으로 이동하여 제1 기판과 밀봉되어 복수의 분해된 반응기들을 형성할 수 있다. 대안적으로, 제2 기판은 정지 상태일 수 있다. 이러한 경우, 합성 기판은 Z 방향, 및 필요한 경우 X 및 Y 방향으로 이동하여 제2 기판과 정렬하고 밀봉될 수 있다. 합성된 올리고뉴클레오티드는 제1 기판으로부터 제2 기판까지 전달될 수 있다. 적합한 양의 유체는 입구 매니폴드 및 제1 기판의 분해된 좌위들을 통과하여 제2 기판 내로 들어감으로써, 시약이 제1 기판/이의 분해된 좌위들로

부터 제2 기판 내로 전달되는 것을 용이하게 할 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 웨이퍼 취급을 포함하는 올리고뉴클레오티드 조립을 위한 시스템에 관한 것이다.

[0298] 다양한 실시양태들에서, 본 발명은 스캐닝 침착 시스템을 이용한다. 스캐닝 침착 시스템은 시약을 기판 내에 식각된 분해된 좌위들 또는 마이크로웰들에 침착시키는 데에 이용될 수 있는 잉크젯을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 스캐닝 침착 시스템은 유기 용매 또는 잉크를 사용할 수 있다. 일부 경우, 스캐닝 침착 시스템은 전형적으로 직경이 약 200 ㎜인 복수의 웨이퍼들, 예컨대, 실리콘 웨이퍼들을 포함할 수 있다. 일부 경우, 전체 시스템은 대기적으로 조절된 인클로저 내에 배치되어 작용할 수 있다. 스캐닝 침착 시스템은 작업 구역(work envelope), 프린트헤드 조립체, 유동셀 조립체 및/또는 서비스 구역(service envelope)을 포함할 수 있다. 일부 경우, 프린트헤드 조립체는 이동할 수 있는 반면, 유동셀 조립체는 정지 상태로 남아있다. 스캐닝 침착 시스템은 1개 이상의 기판/웨이퍼, 예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개, 30개, 40개 또는 50개 이상의 기판들/웨이퍼들을 공급하는 1개 이상의 유동셀, 예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개, 30개, 40개 또는 50개 이상의 유동셀들을 포함할 수 있다. 웨이퍼는 유동셀 내에 고정된 상태로 머무를 수 있다. 일부 경우, 시스템은 세타_z 자동화를 통해 기판의 정렬을 용이하게 할 수 있다. 한 구체적인 실시양태에서, 작업 구역은 스캐닝 방향 이동을 포함하는 영역, 예를 들면, 약 (n-1) 프린트헤드 피치(Pitch) + 웨이퍼 직경 = 9*20 ㎜ + 200 ㎜ = 380 ㎜를 포함할 수 있다. 동등한 셋업을 가진 적합한 작업 구역이 예상될 수 있다. 서비스 구역은 공급을 위해 배치된 프린트헤드를 포함할 수 있다. 일부 경우, 서비스 구역은 보다 더 큰 상자로부터 환경적으로 격리될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물을 위한 시스템은 올리고뉴클레오티드 합성, 올리고뉴클레오티드 조립, 또는 보다 더 일반적으로 시약의 제조를 위한 스캐닝 침착 시스템을 포함한다.

[0299] 복수의 분해된 좌위들 및 복수의 분해된 반응기 캡들은 상호연결성 또는 유체 소통을 가진 마이크로구조물 상에 위치할 수 있다. 이러한 유체 소통은 상이한 단계의 반응들을 위해 세척, 및 점적으로서의 새로운 시약의 주입 또는 연속적 유동을 이용한 새로운 시약의 주입을 가능하게 한다. 유체 소통 마이크로채널은 복수의 분해된 좌위들 및 복수의 분해된 반응기들을 향한 및/또는 이들로부터의 입구 및 출구를 함유할 수 있다. 입구 및/또는 출구는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 입구 및/또는 출구는 기판의 전면 및 후면 상에 제공될 수 있다. 입구 및/또는 출구를 생성하는 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공보 제20080308884 A1호에 기재되어 있고, 전면 상에서 리쏘그래피 및 식각 공정으로 적합한 마이크로구조의 구성요소를 제조하는 단계; 및 전면 상의 마이크로구조물과 정확히 정렬되는 홀을 상기 기판의 후면으로부터 천공하여 상기 마이크로기계적 구조물을 향한 및/또는 이러한 구조물로부터의 입구 및/또는 출구를 제공하는 단계를 포함할 수 있다. 입구 및/또는 출구는 매니폴드에 의해 공급된 얇은 갭에서 유동하는 유체를 가진 헬레-쇼(Hele-Shaw) 유형의 유동셀일 수 있다. 도 9a에 예시된 바와 같이, 본원에 기재된 기판은 유동셀의 일부를 형성할 수 있다. 유동셀은 기판(즉, 웨이퍼)의 상부 상에서 덮개를 슬라이딩시킴으로써 폐쇄될 수 있고 현장 고정되어 기판의 가장자리 주변에서 압력 밀폐 밀봉을 형성할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 밀봉은 진공, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 대기압으로부터 밀봉하기에 적절할 수 있다. 시약은 기판(즉, 웨이퍼) 아래의 얇은 갭 내로 도입될 수 있고 기판을 통해 위로 유동할 수 있다. 그 다음, 시약은 도 9b에 예시된 바와 같이 점점 가늘어지는 폐기물 수집기 내에서 수집될 수 있다. 최종 용매 세척 단계 후, 일부 실시양태들에서, 웨이퍼는 예를 들면, 조립체의 하부를 통해 배수된 후 질소로 퍼징될 수 있다. 그 다음, 챔버를 진공 상태로 만들어 임의의 마이크로구조물에서 남은 용매를 건조함으로써, 잔류 액체 또는 수분을 50 부피%, 40 부피%, 30 부피%, 20 부피%, 10 부피%, 9 부피%, 8 부피%, 7 부피%, 6 부피%, 5 부피%, 4 부피%, 3 부피%, 2 부피%, 1 부피%, 0.1 부피%, 0.01 부피%, 0.001 부피%, 0.0001 부피% 또는 0.00001 부피% 미만까지 감소시킬 수 있다. 챔버를 진공 상태로 만들어 기판 주변의 압력을 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 또는 1000 mTorr 미만까지 감소시킬 수 있다. 일부 경우, 진공 단계 후 챔버를 질소로 채울 수 있고, 덮개를 슬라이딩시켜 다시 개방함으로써 시스템의 보조 부품, 예를 들면, 프린터에 의한 접근을 허용할 수 있다. 일부 경우, 유동셀을 개방할 수 있다. 도 9b에 예시된 바와 같이, 폐기물 매니폴드 치환된 측면로(sideway)를 기판/웨이퍼에 장착시킬 수 있다. 이 셋업은 웨이퍼에의 보다 더 용이한 잉크젯 접근을 가능하게 할 수 있다. 이 시점에서 시약을 마이크로웰 내에 침착시킬 수 있다. 일부 실시양태들에서, 분리된 인클로저들(즉, 유동셀들)의 덮개는 폐기물 수집기로서 작용할 수 있고, 시약의 액체는 이곳으로 유동할 수 있다. 도 9b 및 9c에서 화살표는 시약에 대한 예시적 유동 방향을 나타낸다. 일부 경우, 도 9c에 예시된 바와 같이, 시약은 하부 상의 얇은 갭을 통해 들어가 기판(예를 들면, 실리콘 웨이퍼) 내의 홀을 통과할 수 있고 폐기물 수집기에서 수집될 수 있다. 일부 경우, 기체는 상부 또는 하부 매니폴드를 통해 퍼징되어, 예를 들면, 유동셀의 하부 또는 상부를 통해 액체를 배출할 수 있다. 출구 또는 입구 포트는 완전히 건조될 때까지 진공에 연결

될 수 있다. 도 10에 예시된 바와 같이, 진공 포트는 폐기물 면 또는 입구 면에 연결될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 기판(즉, 웨이퍼)를 통과하는 복수의 압력 방출 홀들이 존재할 수 있다. 복수의 홀들은 약 1000개, 5000개, 10,000개, 50,000개, 100,000개, 500,000개, 1,000,000개 또는 2,000,000개 초과의 홀들일 수 있다. 일부 경우, 복수의 홀들은 5백만 개 초과의 홀들일 수 있다. 일부 경우, 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 바와 같이 합성을 위한 마이크로구조물은 압력 방출 홀로서 작용한다. 이 홀은 분리된 인클로저들이 기판을 건조하도록 배기될 때 기체가 웨이퍼의 한 면부터 통과하게 할 수 있다. 일부 경우, 예를 들면, 공기가 폐기물 수집기 면으로부터 배출되는 경우, 폐기물 수집기 면의 기압인 $P_{폐기물}$은 입구 면의 기압인 $P_{입구}$와 실질적으로 동일한 수준으로 유지될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 입구 매니폴드를 폐기물 수집기에 연결하는 포트를 사용할 수 있다. 따라서, 웨이퍼 기판을 수송하지 않으면서 본원에 기재된 복수의 단계들, 예컨대, 스캐닝, 침착, 침수, 세척, 퍼징 및/또는 건조를 수행할 수 있다.

[0300] 제1 기판과 제2 기판을 밀봉함으로써 형성된 분해된 반응기들은 조절된 습도, 공기 함량, 증기압 및/또는 압력을 가진 챔버 내에 봉입되어 조절된 환경을 가진 조립체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 챔버의 습도는 반응 동안 분해된 반응기들로부터의 액체 증발을 방지하기 위해 포화될 수 있거나 약 100%일 수 있다. 예를 들면, 습도는 약 100%, 99.5%, 99%, 98.5%, 98%, 97.5%, 97%, 96.5%, 96%, 95.5%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30% 또는 25% 이하 또는 이상까지 조절될 수 있다.

[0301] 본원에 기재된 시스템, 예컨대, 전술된 조절된 환경 조립체를 가진 시스템은 복수의 분해된 반응기들과 작동가능하게 연결된 진공 디바이스/척 및/또는 온도 조절 시스템을 포함할 수 있다. 기판은 진공 척 상에 위치할 수 있다. 진공 척은 기판 바로 아래에 위치한 표면 불규칙한 것들을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 표면 불규칙한 것들은 채널 또는 오목부를 포함할 수 있다. 진공 척은 채널에 의해 한정된 공간으로부터 기체를 끌어내기 위해 기판과의 유체 소통 상태에 있을 수 있다. 진공 디바이스 상에서 기판을 유지하는 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제8247221호에 더 상세히 기재되어 있다.

[0302] 다양한 실시양태들에서, 기판(예를 들면, 실리콘 웨이퍼)은 척, 예컨대, 전술된 진공 척 상에 위치할 수 있다. 도 10은 기판과 온도 조절 디바이스 사이에 있는 단일 홈 진공 척 및 소결된 금속 조각의 시스템 조립체를 예시한다. 진공 척은 기판을 지탱하기에 적합한 치수를 가진 단일 홈을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 진공 척은 기판이 본원에 기재된 방법들 중 하나 이상의 방법 동안 제자리에 유지될 수 있도록 디자인된다. 일례로서 도 10a에 예시된 진공 척은 직경이 대략 198 ㎜인 단일 1 내지 5 ㎜ 홈을 포함한다. 일부 경우, 단일 홈 진공 척 디자인은 기판에게의 개선된 열 전달을 제공하는 데에 이용될 수 있다. 도 10b는 기판(예를 들면, 실리콘 웨이퍼)와 진공 척 사이에 위치하고 접착제에 의해 제자리에 고정되어 있는 소결된 금속 삽입체를 예시한다. 일부 실시양태들에서, 척은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,530,516호에 더 기재되어 있는 바와 같이 정전기 척일 수 있다.

[0303] 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제8,367,016호 및 유럽 특허 제0126621 B1호에 기재되어 있는 바와 같이, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법을 이용하여 복수의 분해된 반응기 캡들을 제1 표면 상의 복수의 분해된 좌위들과 정렬하여 제1 표면과 캡핑 요소 사이에 일시적 밀봉을 형성할 수 있다. 예를 들면, x, y 및 z 차원, 및 z 차원을 따라 위치한 좌위 깊이 중심점을 가진 복수의 분해된 좌위들을 가진 기판의 경우, 좌위 깊이 중심점은 기판 내에 매립된 기준 마킹으로부터 공지된 z 차원 거리를 두고 위치할 수 있다. 기판은 기준 마킹을 검출할 수 있는 광학 디바이스를 포함할 수 있는 영상화 시스템 내에 배치될 수 있다. 광학 디바이스는 z 차원과 축 방향으로 정렬된 광학 경로를 한정할 수 있고 광학 경로에 수직인 초점면을 가질 수 있다. 초점면이 광학 경로를 따라 이동하는 경우, 기준 마킹은 초점면이 z 깊이와 실질적으로 동일면에 있지 않을 때에 비해 초점면이 z 깊이에서 존재할 때 최대로 검출될 수 있다. 기준 마킹은 제1 기판, 예를 들면, 복수의 분해된 좌위들을 포함하는 합성 웨이퍼, 및/또는 제2 기판, 예를 들면, 복수의 캡핑 요소들을 포함하는 반응기 요소 상에서 적합한 공간적 정렬로 선택적으로 배치될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 전체적 정렬 기준 마킹은 분해된 좌위에 가까운 위치에서 형성될 수 있다. 적용에 따라, 변경, 대안 및 변형이 존재할 수 있다. 예를 들면, 기준 마킹들 중 2개는 분해된 좌위들의 근처에 존재할 수 있고, 제3 기준 마킹은 기판의 가장자리에 존재할 수 있다. 또 다른 예로서, 본원에 기재된 기판에서의 마이크로구조물의 패턴은 그 자체가 정렬에 적합한 인식가능한 방식, 예를 들면, 비대칭 패턴으로 선택될 수 있고 정렬을 위해 사용될 수 있다. 일부 경우, 기준 마킹은 장의 깊이 또는 다른 광학적 특성을 보정하기 위한 정렬점으로서 작용한다. 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제4,123,661호는 기판 상의 전자 빔 정렬 마크들을 개시하는데, 이때 상기 마크들은 서로 인접하되, 이 마크들의 상승 기울기 및 하강 기울기가 비디오 신호에 의해 검출되어 정렬을 허용할 수 있을 정도의 거리에 의해 분리되

어 있다.

[0304] 시스템은 가열 구성요소, 냉각 구성요소, 또는 온도 조절된 요소(예를 들면, 열 순환 디바이스)를 포함할 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 복수의 분해된 반응기들과 함께 사용될 열 순환 디바이스는 핵산 증폭 또는 조립, 예컨대, PCR 또는 PCA, 또는 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 핵산 반응을 수행하도록 구성될 수 있다. 온도는 반응기 내의 온도가 균일할 수 있고 가열이 신속히 수행될 수 있도록 조절될 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 본원에 기재된 시스템은 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 합성, 유전자 조립 또는 핵산 증폭 동안 기판 내의 반응기 또는 개별 마이크로구조물로부터의 종점 또는 실시간 검출을 위한 검출 구성요소를 가질 수 있다.

[0305] 본원에 기재된 시스템들 중 임의의 시스템은 컴퓨터에 작동가능하게 연결될 수 있고 지역적으로 또는 원격적으로 컴퓨터를 통해 자동화될 수 있다. 본원에 기재된 시스템 구성요소의 조절을 위한 컴퓨터 및 컴퓨터 시스템은 본원의 다른 부분에 더 기재되어 있다.

[0306] **일차 조성물 - 올리고뉴클레오티드**

[0307] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "미리 선택된 서열", "미리 정해진 서열" 또는 "예정된 서열"은 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어들은 중합체의 서열이 중합체의 합성 또는 조립 전에 공지되어 있고 선택된다는 것을 의미한다. 구체적으로, 본 발명의 다양한 양태들은 주로 핵산 분자의 제조에 대해 본원에 기재되어 있는데, 이때 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 서열은 핵산 분자의 합성 또는 조립 전에 공지되어 있고 선택된다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 짧은 핵산 분자이다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 약 10개 내지 약 300개 뉴클레오티드, 약 20개 내지 약 400개 뉴클레오티드, 약 30개 내지 약 500개 뉴클레오티드, 약 40개 내지 약 600개 뉴클레오티드, 또는 약 600개 초과의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 당업자는 올리고뉴클레오티드 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 약 10개 내지 약 400개 뉴클레오티드, 또는 약 300개 내지 약 400개 뉴클레오티드 등) 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 적절하게 짧거나 긴 올리고뉴클레오티드는 구체적 적용에 의해 필요해질 때 사용될 수 있다. 개별 올리고뉴클레오티드는 라이브러리 내의 또 다른 올리고뉴클레오티드와 상이한 길이를 갖도록 디자인될 수 있다. 보다 더 구체적으로, 올리고뉴클레오티드는 상대적으로 짧을, 예를 들면, 200개, 100개, 80개, 60개, 50개, 40개, 30개, 25개, 20개, 15개, 12개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개 또는 4개 뉴클레오티드보다 더 짧을 수 있다. 상대적으로 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드도 고려되고; 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 125개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 500개 또는 600개 이상의 뉴클레오티드 길이를 가진다. 전형적으로, 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 DNA 또는 RNA 분자이다.

[0308] 본 발명의 한 양태에서, 예정된 서열을 가진 복수의 핵산들을 합성하는 디바이스가 제공된다. 상기 디바이스는 복수의 올리고뉴클레오티드들을 각각 가진 복수의 특징부들을 가진 지지체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 미리 정해진 서열을 가진 복수의 올리고뉴클레오티드들은 고체 지지체의 상이한 별개의 특징부들에서 고정된다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태들에서, 복수의 올리고뉴클레오티드 서열들은 축퇴 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 지지체에 결합되어 있다. 일부 실시양태들에서, 디바이스는 복수의 스폿들 또는 특징부들을 가진 고체 지지체를 포함하고, 복수의 스폿들 각각은 지지체에 결합된 복수의 올리고뉴클레오티드들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 그의 3' 말단을 통해 고체 지지체에 공유연결된다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 5' 말단을 통해 고체 지지체에 공유연결된다.

[0309] 일부 실시양태들에서, 표면 또는 지지체에 결합된 올리고뉴클레오티드는 그의 3' 말단을 통해 고정된다. 3' 말단은 5' 말단으로부터 하류에 위치하는, 예를 들면, 5' 말단으로부터 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 10개, 15개 또는 20개 이상의 뉴클레오티드들만큼 하류에 위치하는, 또 다른 예를 들면, 서열의 3' 절반, 3분의 1 또는 4분의 1 상에 위치하는, 또 다른 예를 들면, 절대적 3' 말단으로부터 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 10개, 15개 또는 20개 미만의 뉴클레오티드만큼 떨어져 있는 서열을 의미하고, 5' 말단은 3' 말단으로부터 상류에 위치하는, 예를 들면, 3' 말단으로부터 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 10개, 15개 또는 20개 이상의 뉴클레오티드만큼 상류에 위치하는, 또 다른 예를 들면, 서열의 5' 절반, 3분의 1 또는 4분의 1 상에 위치하는, 또 다른 예를 들면, 절대적 5' 말단으로부터 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 10개, 15개 또는 20개 미만의 뉴클레오티드만큼 떨어져 있는 서열을 의미한다는 것을 인식해야 한다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열(예를 들면, 축퇴 결합 서열), 링커 또는 스페이서(예를 들면, 혼성화에 수반되지 않는 모이어티)를 통해 지지

체 상에 고정될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 지지체로부터 올리고뉴클레오티드 서열을 분리하기 위해 스페이서 또는 링커를 포함한다. 유용한 스페이서 또는 링커는 광절단가능한 링커 또는 다른 전통적인 화학적 링커를 포함한다. 한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 절단가능한 연결 모이어티를 통해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 예를 들면, 고체 지지체는 올리고뉴클레오티드에의 공유부착을 위해 절단가능한 링커를 제공하도록 작용화될 수 있다. 링커 모이어티는 길이에서 6개 이상의 원자들을 가질 수 있다. 대안적으로, 절단가능한 모이어티는 올리고뉴클레오티드 내에 존재할 수 있고 제자리 합성 동안 도입될 수 있다. 매우 다양한 절단가능한 모이어티들이 고체상 및 마이크로어레이 올리고뉴클레오티드 합성 분야에서 이용될 수 있다(예를 들면, 문헌(Pon, R., Methods Mol. Biol. 20:465-496 (1993)); 문헌(Verma et al, Annu. Rev. Biochem. 67:99-134 (1998)); 미국 특허 제5,739,386호, 제5,700,642호 및 제5,830,655호; 및 미국 특허출원 공보 제2003/0186226호 및 제2004/0106728호 참조). 적절한 절단가능한 모이어티는 특히 뉴클레오시드 염기의 보호기의 성질, 고체 지지체의 선택 및/또는 시약 전달 방식과 잘 맞도록 선택될 수 있다. 예시적 실시양태에서, 고체 지지체로부터 절단된 올리고뉴클레오티드는 자유 3'-OH 말단을 함유한다. 대안적으로, 자유 3'-OH 말단은 올리고뉴클레오티드의 절단 후 화학적 또는 효소적 처리에 의해 수득될 수도 있다. 다양한 실시양태들에서, 본 발명은 지지체 또는 표면에 결합된 올리고뉴클레오티드를 용액 내로 방출하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 절단가능한 모이어티는 올리고뉴클레오티드를 분해하지 않는 조건 하에서 제거될 수 있다. 바람직하게는, 2종의 방식을 이용하여, 즉 탈보호 단계와 동일한 조건 하에서 동시에, 또는 탈보호 단계의 완료 후 링커 절단을 위한 상이한 조건 또는 시약을 후속적으로 사용하여 링커를 절단할 수 있다.

[0310] 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 용액에 존재한다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드는 상이한 별개의 특징부들에서 별개의 부피, 예컨대, 점적 또는 마이크로점적 내에서 제공될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 약 0.5 pl 내지 약 100 nl의 별개의 마이크로부피가 사용될 수 있다. 그러나, 보다 더 작거나 보다 더 큰 부피가 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 적합한 분배기 또는 연속 유동, 예컨대, 펌프에 의해 작동되는 마이크로구조물을 통한 유동이 100 nl 미만, 10 nl 미만, 5 nl 미만, 100 pl 미만, 10 pl 미만 또는 0.5 pl 미만의 부피를 본원에 기재된 기판의 마이크로구조물들에게 및 이러한 마이크로구조물들 사이에 전달하는 데에 이용될 수 있다. 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 합성 웨이퍼의 하나 이상의 마이크로구조물로부터의 작은 부피는 유체를 올리고뉴클레오티드 합성 웨이퍼에 통과시킴으로써 캡핑 요소의 반응기 캡 내로 분배될 수 있다.

[0311] 일부 실시양태들에서, 복수의 핵산 구축물들은 지지체의 상이한 특징부들에서 제공된다. 일부 실시양태들에서, 짧은 올리고뉴클레오티드 및 보다 더 긴/조립된 폴리뉴클레오티드를 비롯한 핵산 구축물은 부분적으로 이중 가닥 또는 이중체 올리고뉴클레오티드이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중체"는 적어도 부분적으로 이중 가닥인 핵산 분자를 지칭한다. 용어 "뉴클레오시드" 또는 "뉴클레오티드"는 공지된 푸린 및 피리미딘 염기뿐만 아니라 변경된 다른 헤테로환형 염기도 함유하는 모이어티를 포함하기 위한 것이다. 이러한 변경물은 메틸화된 푸린 또는 피리미딘, 아실화된 푸린 또는 피리미딘, 알킬화된 리보스 또는 다른 헤테로환, 또는 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 변경물을 포함한다. 추가로, 용어 "뉴클레오시드" 및 "뉴클레오티드"는 통상적인 리보스 및 데옥시리보스 당뿐만 아니라 다른 당도 함유하는 모이어티를 포함한다. 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드는 당 모이어티 상의 변형물도 포함하는데, 예를 들면, 이때 하이드록실기들 중 하나 이상은 할로겐 원자 또는 지방족 기로 치환되어 있거나 에테르, 아민 등으로서 작용화되어 있다.

[0312] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오시드" 및 "뉴클레오티드"는 통상적인 푸린 및 피리미딘 염기, 즉 아데닌(A), 타이민(T), 사이토신(C), 구아닌(G) 및 우라실(U)뿐만 아니라 이의 보호된 형태, 예를 들면, 염기가 보호기, 예컨대, 아세틸, 디플루오로아세틸, 트리플루오로아세틸, 이소부티릴 또는 벤조일로 보호된 형태, 및 푸린 및 피리미딘 유사체도 함유하는 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드를 지칭한다. 적합한 유사체는 당업자에게 공지되어 있을 것이고 관련 교재 및 문헌에 기재되어 있다. 통상의 유사체는 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, N6-메틸아데닌, N6-이소펜틸아데닌, 2-메틸티오-N6-이소펜틸아데닌, N,N-디메틸아데닌, 8-브로모아데닌, 2-티오사이토신, 3-메틸사이토신, 5-메틸사이토신, 5-에틸사이토신, 4-아세틸사이토신, 1-메틸구아닌, 2-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, 2,2-디메틸구아닌, 8-브로모구아닌, 8-클로로구아닌, 8-아미노구아닌, 8-메틸구아닌, 8-티오구아닌, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 5-에틸우라실, 5-프로필우라실, 5-메톡시우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 5-(카복시하이드록시메틸)우라실, 5-(메틸아미노메틸)우라실, 5-(카복시메틸아미노메틸)-우라실, 2-티오우라실, 5-메틸-2-티오우라실, 5-(2-브로모비닐)우라실, 우라실-5-옥시아세트산, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 슈도우라실, 1-메틸슈도우라실, 쿠에오신, 이노신, 1-메틸이노신, 하이포잔틴, 잔틴, 2-아미노푸린, 6-하이드록시아미노푸린, 6-티오푸린 및 2,6-디아미노푸린을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 또한, 용어 "뉴클레오시드" 및 "뉴클레오티드"는 통상적인 리보스 및 데옥시리보스 당뿐만 아니라 다른 당도 함유하는 모이어티를 포함한다. 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드는 당 모이어

티 상의 변경물도 포함하는데, 예를 들면, 이때 하이드록실 기들 중 하나 이상은 할로겐 원자 또는 지방족 기로 치환되어 있거나 에테르, 아민 등으로서 작용화되어 있다.

[0313] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오티드"는 (2-데옥시-D-리보스를 함유하는) 폴리데옥시뉴클레오티드, (D-리보스를 함유하는) 폴리리보뉴클레오티드, 푸린 또는 피리미딘 염기의 N-글리코사이드인 임의의 다른 유형의 폴리뉴클레오티드, 및 비-뉴클레오티드성 골격을 함유하되(예를 들면, PNA), 예컨대, DNA 및 RNA에서 발견되는 염기 쌍형성 및 염기 적층을 허용하는 배열로 뉴클레오염기를 함유하는 다른 중합체에 대한 일반 용어일 것이다. 따라서, 이 용어들은 공지된 유형의 올리고뉴클레오티드 변경물, 예를 들면, 유사체에 의한 천연 생성 뉴클레오티드들 중 하나 이상의 치환, 뉴클레오티드간 변경물, 예를 들면, 비하전된 연결(예를 들면, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 카바메이트 등)을 가진 뉴클레오티드간 변경물, 음으로 하전된 연결(예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 가진 뉴클레오티드간 변경물, 양으로 하전된 연결(예를 들면, 아미노알킬포스포라미데이트, 아미노알킬포스포트리에스터)을 가진 뉴클레오티드간 변경물, 펜던트(pendant) 모이어티, 예를 들면, (뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-라이신 등을 비롯한) 단백질을 함유하는 뉴클레오티드간 변경물, 인터킬레이터(예를 들면, 아크리딘, 소랄렌 등)를 가진 뉴클레오티드간 변경물, 및 킬레이터(예를 들면, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등)를 함유하는 뉴클레오티드간 변경물을 포함한다. 용어 "폴리뉴클레오티드"와 "올리고뉴클레오티드" 사이에 길이에서의 의도된 구별은 없고, 이 용어들은 상호교환적으로 사용될 것이다.

[0314] 예를 들면, 그에 "부착된" 모이어티를 가진 기판 표면에서 사용된 용어 "부착된"은 공유결합, 흡착 및 물리적 고정을 포함한다. 용어 "결합하는" 및 "결합된"은 용어 "부착된"과 의미 면에서 동일하다.

[0315] 다양한 실시양태들에서, 본 발명은 핵산 이외의 분자의 합성, 예컨대, 화학적 합성에 관한 것이다. 본 명세서 및 청구범위 전체에서 사용된 용어 "펩티드", "펩티딜" 및 "펩티드성"은 2개 이상의 아미노산들로 구성된 임의의 구조물을 포함하기 위한 것이다. 대체로, 본 어레이 내의 펩티드는 약 5개 내지 10,000개의 아미노산들, 바람직하게는 약 5개 내지 1000개의 아미노산들을 포함한다. 펩티드의 전부 또는 일부를 형성하는 아미노산은 20종의 통상적인 천연 생성 아미노산들, 즉 알라닌(A), 시스테인(C), 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 페닐알라닌(F), 글리신(G), 히스티딘(H), 이소류신(I), 라이신(K), 류신(L), 메티오닌(M), 아스파라긴(N), 프롤린(P), 글루타민(Q), 아르기닌(R), 세린(S), 쓰레오닌(T), 발린(V), 트립토판(W) 및 티로신(Y) 중 임의의 아미노산일 수 있다. 본 어레이를 형성하는 펩티드성 분자 내의 아미노산들 중 임의의 아미노산이 비-통상적인 아미노산으로 치환될 수 있다. 일반적으로, 보존적 치환이 바람직하다. 보존적 치환은 원래의 아미노산을, 그의 특징적 성질들(예를 들면, 전하, 소수성, 입체적 용적) 중 하나 이상의 성질 면에서 원래의 아미노산과 유사한 비-통상적인 아미노산으로 치환한다(예를 들면, Val을 Nval으로 치환할 수 있다). 용어 "비-통상적인 아미노산"은 통상적인 아미노산 이외의 아미노산을 지칭하고, 예를 들면, 통상적인 아미노산의 이성질체 및 변경물(예를 들면, D-아미노산), 비-단백질 아미노산, 번역 후 변형된 아미노산, 효소에 의해 변형된 아미노산, 아미노산과 유사하도록 디자인된 구축물 또는 구조물(예를 들면, α,α-이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 젖산, β-알라닌, 나프틸알라닌, 3-피리딜알라닌, 4-하이드록시프롤린, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신 및 노르류신), 및 펩티드 골격 내의 하나 이상의 부위에서 비-통상적인 연결, 예컨대, N-치환된 아미드, 에스테르, 티오아미드, 레트로펩티드(-NHCO-), 레트로티오아미드(-NHCS-), 설폰아미도(-SO_2NH-) 및/또는 펩토이드(peptoid)(N-치환된 글리신) 연결로 치환된 천연 생성 아미드 -CONH- 연결을 가진 펩티드를 포함한다. 따라서, 어레이의 펩티드성 분자는 슈도펩티드(pseudopeptides) 및 펩티도미메틱(peptidomimetics)을 포함한다. 본 발명의 펩티드는 (a) 천연 생성될 수 있거나, (b) 화학적 합성에 의해 생성될 수 있거나, (c) 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있거나, (d) 보다 더 큰 분자의 생화학적 또는 효소적 단편화에 의해 생성될 수 있거나, (e) 상기 나열된 (a) 내지 (d) 방법들의 조합으로부터 생성된 방법에 의해 생성될 수 있거나, (f) 펩티드를 생성하는 임의의 다른 수단에 의해 생성될 수 있다.

[0316] 용어 "올리고머"는 임의의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드, 또는 반복 모이어티, 예컨대, 뉴클레오티드, 아미노산, 탄수화물 등을 가진 다른 화합물을 포괄하기 위한 것이다.

[0317] 일부 예에서, 디바이스는 특정 위치(즉, "주소")에서 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 12개, 15개, 18개, 20개, 25개, 30개, 40개, 50개, 100개, 1,000개, 4,000개, 10,000개, 100,000개 또는 1,000,000개 이상의 상이한 특징부들(또는 "영역들" 또는 "스폿들")을 가진다. 디바이스가 하나 이상의 고체 지지체를 포함할 수 있다는 것을 인식해야 한다. 디바이스의 각각의 주소지정가능한 위치는 상이한 조성물, 예컨대, 상이한 올리고뉴클레오티드를 보유할 수 있다. 대안적으로, 디바이스의 주소지정가능한 위치의 군들은 디바이스의 마이

크로구조물의 다른 군들에서 보유된 조성물과 상이한, 전체적으로 또는 실질적으로 유사한 조성물, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드를 보유할 수 있다.

[0318] 개별적으로 주소지정가능한 위치 및/또는 혼합된 집단에서 본 발명의 방법에 의해 제조될 수 있는 각각의 올리고뉴클레오티드의 수는 5개 내지 500,000개, 500개 내지 500,000개, 1,000개 내지 500,000개, 5,000개 내지 500,000개, 10,000개 내지 500,000개, 20,000개 내지 500,000개, 30,000개 내지 500,000개, 5,000개 내지 250,000개, 5,000개 내지 100,000개, 5개 내지 5,000개, 5개 내지 50,000개, 5,000개 내지 800,000개, 5,000개 내지 1,000,000개, 5,000개 내지 2,000,000개, 10,000개 내지 2,000,000개, 20,000개 내지 1,000,000개, 30,000개 내지 2,000,000개 등일 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 각각의 올리고뉴클레오티드의 약 5개, 10개, 20개, 50개, 100개, 500개, 1000개, 10000개, 100000개, 1000000개, 10000000개 또는 100000000개 이상의 카피들이 합성될 수 있다. 일부 경우, 올리고뉴클레오티드의 100000000개, 10000000개, 1000000개, 100000개, 10000개, 1000개 또는 100개 미만의 카피들이 합성될 수 있다.

[0319] 올리고뉴클레오티드 포스포로티오에이트(OPS)는 포스페이트 모이어티 내의 산소 원자들 중 하나가 황으로 치환되어 있는 변형된 올리고뉴클레오티드이다. 비-가교 위치에서 황을 가진 포스포로티오에이트는 널리 사용된다. OPS는 뉴클레아제에 의한 가수분해에 대해 실질적으로 보다 더 안정하다. 이 성질은 OPS가 뉴클레아제에의 광범위한 노출을 포함하는 시험관내 적용 및 생체내 적용에서 안티센스 올리고뉴클레오티드로서 사용될 유리한 후보가 되게 한다. 유사하게, siRNA의 안정성을 개선하기 위해, 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결은 종종 센스 및/또는 안티센스 가닥의 3'-말단에서 도입된다. 일부 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 OPS의 드노보/화학적 합성에 관한 것이다. 본원에 기재된 방법 및 조성물을 사용하여 많은 수의 OPS들의 합성을 동시에 수행할 수 있다.

[0320] **단일 가닥 핵산의 증폭**

[0321] 다양한 실시양태들에서, 상기 방법 및 시스템은 단일 가닥 핵산의 증폭에 관한 것이다. 따라서, 단리된 한 샘플에서; 복수의 샘플들에서 병렬식으로; 또는 동일한 샘플 내에 복수의 상이한 단일 가닥 핵산들을 가진 다중체화된 형식으로 단일 가닥 핵산, 예를 들면, 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 증폭할 수 있다. 병렬 형식으로 증폭될 수 있는 복수의 샘플들은 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 20개, 25개, 50개, 55개, 100개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 500개, 550개, 600개, 650개, 700개, 750개, 800개, 850개, 900개, 950개 또는 1000개 이상일 수 있다. 병렬 형식으로 증폭될 수 있는 복수의 샘플들은 1개 내지 1000개, 2개 내지 950개, 3개 내지 900개, 4개 내지 850개, 5개 내지 800개, 10개 내지 800개, 20개 내지 750개, 25개 내지 700개, 30개 내지 650개, 35개 내지 600개, 40개 내지 550개, 45개 내지 500개, 50개 내지 450개, 55개 내지 400개, 60개 내지 350개, 65개 내지 250개, 70개 내지 200개, 75개 내지 150개, 또는 80개 내지 100개일 수 있다. 당업자는 병렬 형식으로 증폭될 수 있는 복수의 샘플들의 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 3개 내지 800개에 속할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 다중체화된 증폭 반응의 수는 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 20개, 25개, 50개 또는 100개 이상일 수 있다. 다중체화된 증폭 반응의 수는 1개 내지 100개, 2개 내지 50개, 3개 내지 25개, 4개 내지 20개, 또는 5개 내지 10개일 수 있다. 당업자는 다중체화된 증폭 반응의 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 3개 내지 100개에 속할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0322] 동일한 샘플 내의 상이한 단일 가닥 핵산들의 수는 약 1개, 2개, 3개, 10개, 50개, 100개, 150개, 200개, 1000개, 10000개 또는 100000개 이상일 수 있다. 동일한 샘플 내의 상이한 단일 가닥 핵산들의 수는 약 10000개, 10000개, 1000개, 200개, 150개, 100개, 50개, 10개, 3개, 2개 또는 1개 이하일 수 있다. 동일한 샘플 내의 상이한 단일 가닥 핵산들의 수는 1개 내지 100000개, 2개 내지 10000개, 3개 내지 1000개, 10개 내지 200개, 또는 50개 내지 100개일 수 있다. 당업자는 동일한 샘플 내의 상이한 단일 가닥 핵산들의 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 이 범위들 중 임의의 범위, 예를 들면, 3개 내지 100개에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0323] 단일 가닥 표적 핵산은 약 10개, 20개, 50개, 100개, 200개, 500개, 1000개 또는 3000개 이상의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 단일 가닥 표적 핵산은 약 3000개, 1000개, 500개, 200개, 100개, 50개, 20개 또는 10개 이하의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 단일 가닥 표적 핵산은 50개 내지 500개, 75개 내지 450개, 또는 100개 내지 400개의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 당업자는 단일 가닥 표적 핵산의 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 50 내지 1000에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0324] 지금부터 도 64를 참조하건대, 단일 가닥 표적 핵산은 하나 이상의 어댑터 혼성화 서열로 플랭킹될 수 있다. 이 어댑터 혼성화 서열은 약 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 이상의 뉴클레오티드 길

이를 가질 수 있다. 이 어댑터 혼성화 서열은 약 20개, 19개, 18개, 17개, 16개, 15개, 14개, 13개 또는 12개 이하의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 어댑터 혼성화 서열은 15개 내지 20개, 16개 내지 19개, 또는 17개 또는 18개의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 당업자는 어댑터 혼성화 서열의 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 범위, 예를 들면, 15 내지 17, 12 내지 20, 또는 13 내지 25에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 어댑터 혼성화 서열은 한 샘플 내의 복수의 핵산들에 의해 공유될 수 있는데, 이때 이러한 복수의 단일 가닥 핵산들은 상이한 단일 가닥 표적 핵산 영역을 가진다. 상이한 어댑터 혼성화 서열들을 각각 가진, 단일 가닥 핵산들의 다수의 군들은 한 샘플 내에 공존할 수 있고 본원에 기재된 증폭 방법으로 처리될 수 있다. 상이한 어댑터 혼성화 서열들은 약 1개, 2개, 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개 또는 50개 이상의 뉴클레오티드에 의해 서로 상이할 수 있다. 상이한 어댑터 혼성화 서열들은 약 50개, 45개, 40개, 35개, 30개, 25개, 20개, 15개, 10개, 5개, 2개 또는 1개 이하의 뉴클레오티드에 의해 서로 상이할 수 있다. 상이한 어댑터 혼성화 서열들은 1개 내지 50개, 2개 내지 45개, 5개 내지 40개, 10개 내지 35개, 15개 내지 25개, 또는 20개 내지 30개의 다수의 뉴클레오티드들에 의해 서로 상이할 수 있다. 당업자는 상이한 어댑터 혼성화 서열들이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 2개 내지 50개에 속하는 다수의 뉴클레오티드들에 의해 서로 상이할 수 있다는 것을 인식한다. 따라서, 보편적인 어댑터가 다수의 단일 가닥 핵산들 전부에 혼성화될 수 있도록 말단 서열을 공유하는 다수의 단일 가닥 핵산들을 위해 사용될 수 있다. 복수의 어댑터들은 단일 가닥 핵산들의 복수의 군들을 가진 샘플에서 사용될 수 있는데, 이때 각각의 어댑터는 상기 군들 중 하나 이상의 군에서 말단 서열에 혼성화될 수 있다. 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 20개, 25개, 30개, 50개 또는 100개 이상의 어댑터들이 다중체화된 방식에서 사용될 수 있다. 약 100개, 50개, 30개, 25개, 20개, 10개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 이하의 어댑터들이 다중체화된 방식에서 사용될 수 있다. 1개 내지 100개, 2개 내지 50개, 3개 내지 30개, 4개 내지 25개, 또는 5개 내지 20개의 어댑터들이 다중체화된 방식에서 사용될 수 있다. 당업자는 다중체화된 방식에서 사용될 수 있는 어댑터의 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위, 예를 들면, 2개 내지 30개에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 어댑터 상의 제1 서열은 단일 가닥 핵산의 5' 말단에 혼성화될 수 있고 어댑터 상의 제2 서열은 동일한 단일 가닥 핵산의 3' 말단에 혼성화될 수 있는데, 이것은 단일 가닥 핵산의 환형화를 용이하게 할 수 있다.

[0325] 단일 가닥 핵산은 어댑터와의 혼성화 시 환형화될 수 있다. 환형화된 단일 가닥 핵산은 그의 5' 말단 및 3' 말단에서 연결되어 연속적인 원을 형성할 수 있다. 다양한 라이게이션 방법들 및 효소들이 본원의 다른 부분에 기재되어 있고 당분야에서 공지되어 있는 반응에 적합하다.

[0326] 환형화된 단일 가닥 핵산을 주형으로서 사용하여 어댑터를 연장시킬 수 있다. 대안적으로, 어댑터 이외에 또는 대신에 하나 이상의 상이한 프라이머를 사용하여 원 상의 다른 부분에서 어닐링할 수 있고, 상기 프라이머를 중합효소로 연장시킬 수 있다. 연장 반응, 예컨대, 롤링 서클 증폭, 다중-프라이머 롤링 서클 증폭 또는 임의의 다른 적합한 연장 반응은 단일 가닥 주형 핵산 및 어댑터 혼성화 서열의 복제물들을 교대로 포함하는 1개의 긴 선형 단일 가닥 앰플리콘 핵산의 생성을 용이하게 할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 어댑터 혼성화 서열들의 조합된 복제물들은 어댑터 서열의 카피이거나, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개 또는 2개 미만의 뉴클레오티드에 의해 상이하다. 이 서열들은 편의상 함께 "어댑터 카피들"로서 지칭될 것이지만, 이들이 원을 주형으로서 사용하는 연장 반응으로부터 생성된 다수의 상이한 유형의 서열들을 지칭할 수 있다는 것이 이해된다.

[0327] 하나 이상의 보조 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 앰플리콘 핵산에 어닐링하기 위해 제공될 수 있다. 보조 올리고뉴클레오티드는 어댑터 카피에 부분적으로 또는 완전히 상보적일 수 있다. 보조 올리고뉴클레오티드와 단일 가닥 앰플리콘 핵산의 혼성화는 교대로 존재하는 단일 가닥 영역 및 이중 가닥 영역을 형성할 수 있다. 단일 가닥 영역은 단일 가닥 주형 핵산 서열의 복제물에 상응할 수 있다. 예를 들면, 어댑터 카피에서 보조 올리고뉴클레오티드와 단일 가닥 앰플리콘 핵산의 혼성화는 절단제, 예컨대, 제한 엔도뉴클레아제, 예를 들면, IIS형 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위를 생성할 수 있다. 상기 서열은 절단제에 대한 절단 부위가 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 연접부에 또는 이러한 연접부 근처에 존재하는 방식으로 디자인될 수 있다. 일부 경우, 하나 이상의 절단제를 사용한 절단 시, 단일 가닥 표적 핵산의 복수의 단일 가닥 복제물들이 형성될 것인데, 이때 단일 가닥 표적 핵산은 어댑터 카피로부터의 임의의 부분을 함유하지 않거나, 어댑터 카피로부터의 15개, 14개, 13개, 12개, 11개, 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개, 4개, 3개, 2개 또는 1개 미만의 뉴클레오티드를 함유한다.

[0328] 보조 올리고뉴클레오티드는 친화성 태그, 예컨대, 바이오틴 또는 바이오틴 유도체를 가질 수 있다. 친화성 태그는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단, 3' 말단 또는 중간에 존재할 수 있다. 정제 매질, 예컨대, 스트렙타비딘으로 코팅된 비드 표면 상의 친화성 결합 파트너를 이용하거나 임의의 다른 적합한 친화성 정제 방법을 이용하여 샘플로부터의 보조 올리고뉴클레오티드의 정제를 용이하게 할 수 있다. 절단된 어댑터 카피 또는 이의 일부도 보

조 올리고뉴클레오티드와 함께 정제될 수 있고, 이것은 이들과 보조 올리고뉴클레오티드의 혼성화에 의해 용이해질 수 있다. 복수의 어댑터들을 사용하는 다중체화된 반응에서, 예를 들면, 어댑터 카피의 위치에서 단일 가닥 앰플리콘 핵산들의 상이한 군에 각각 혼성화하는 복수의 보조 올리고뉴클레오티드들이 사용될 수 있다. 대안적 정제 방법, 예컨대, HPLC 또는 PAGE 정제가 친화성 태그에 부착된 올리고뉴클레오티드와 함께 또는 이러한 올리고뉴클레오티드 없이 이용될 수 있다.

[0329] 지금부터 도 65를 참조하건대, 절단 부위가 어댑터 카피 내에 속하도록 서열 및 절단제를 선택하여, 플랭킹 영역을 가진 단일 가닥 표적 핵산 서열의 단일 가닥 복제물을 형성한다는 점을 제외하고, 도 64에 대해 기재된 방법과 유사한 방식으로 단일 가닥 핵산을 증폭할 수도 있다. 이러한 플랭킹 영역은 원래의 단일 가닥 표적 핵산 서열의 플랭킹 영역의 역 상보체일 수 있다. 대안적으로, 절단 부위의 정확한 위치에 따라, 상기 영역들은 뉴클레오티드를 한 플랭킹 영역으로부터 다른 플랭킹 영역으로 "이동"시킬 수 있다. 이러한 경우, 어댑터 뉴클레오티드에 대한 역 상보적 올리고뉴클레오티드는 양 말단들에 여전히 효과적으로 혼성화되어, 또 다른 라운드의 환형화를 용이하게 할 수 있다. 따라서, 도 65에 예시된 방법을 단독으로 또는 도 64에 예시된 방법에 대한 전구체 반응으로서 다회, 예컨대, 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 11회, 12회, 13회, 14회, 15회, 16회, 17회, 18회, 19회, 20회, 21회, 22회, 23회, 24회, 25회, 26회, 27회, 28회, 29회 또는 30회 이상 반복하여, 단일 가닥 표적 핵산을 증폭할 수 있다. 도 64에 예시된 방법을 마지막 라운드로서 이용하여 플랭킹 영역을 제거함으로써, 단일 가닥 표적 핵산의 증폭된 단일 가닥 카피 또는 복제물을 남길 수 있다.

[0330] 증폭된 원하는 올리고뉴클레오티드 및 어댑터 올리고뉴클레오티드의 단일 가닥 반복 유닛을 포함하는 연장 반응 생성물, 예컨대, 롤링 서클 증폭 생성물을 어댑터 올리고뉴클레오티드 내에서 또는 근처에서 절단하여 방출된 원하는 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있는데, 이때 방출된 원하는 올리고뉴클레오티드는 원하는 올리고뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단에서 어댑터 뉴클레오티드를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태들에서, 증폭된 원하는 올리고뉴클레오티드 및 어댑터 서열의 단일 가닥 반복 유닛의 바로 연접부에서 절단을 달성한다. 일부 실시양태들에서, 어댑터 서열의 하나 이상의 영역은 분자적 바코드, 단백질 결합 부위, 제한 엔도뉴클레아제 부위, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 증폭 생성물을 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위에서 또는 이 부위 근처에서 하나 이상의 제한 엔도뉴클레아제로 절단하는데, 이때 인식 부위는 어댑터 올리고뉴클레오티드 서열 내에 위치한다. 엔도뉴클레아제를 사용한 절단 전에, 증폭 생성물은 제한 엔도뉴클레아제 인식 부위를 포함하는 어댑터 올리고뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 보조 올리고뉴클레오티드와 혼성화될 수 있다.

[0331] 증폭 생성물은 II형 엔도뉴클레아제에 의해 인식 부위의 5' 말단에서 절단될 수 있다. 절단 부위는 인식 부위의 첫 번째 뉴클레오티드로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 이상의 뉴클레오티드만큼 상류에 존재할 수 있다. 인식 부위의 5' 또는 3' 말단은 0개, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 뉴클레오티드 오버행(overhang)을 형성할 수 있다. 0개 뉴클레오티드 오버행으로 절단하는 블런트(blunt) II형 엔도뉴클레아제는 MlyI 및 SchI를 포함한다. 5' 오버행(예를 들면, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 뉴클레오티드 오버행)을 생성하는 예시적 IIS형 엔도뉴클레아제는 AlwI, BccI, BceAI, BsmAI, BsmFI, FokI, HgaI, PleI, SfaNI, BfuAI, BsaI, BspMI, BtgZI, EarI, BspQI, SapI, SgeI, BceFI, BslFI, BsoMAI, Bst71I, FaqI, AceIII, BbvII, BveI 및 LguI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 인식 부위를 제거하고 인식 부위의 5' 부위 상에서 절단하는 닉킹 엔도뉴클레아제는 Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I 및 UbaPI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0332] 증폭 생성물은 양 가닥들 상의 인식 부위의 5' 말단에서 절단하여 블런트 말단을 생성하는 비-IIS형 엔도뉴클레아제에 의해 절단될 수 있다. 증폭 생성물은 한 가닥 상의 인식 부위의 5' 말단 및 다른 가닥 상의 인식 부위의 중간에서 절단하여 5' 오버행을 생성하는 비-IIS형 엔도뉴클레아제에 의해 절단될 수 있다. 5' 오버행을 생성하는 엔도뉴클레아제의 예는 BfuCI, DpnII, FatI, MboI, MluCI, Sau3AI, Tsp509I, BssKI, PspGI, StyD4I, Tsp45I, AoxI, BscFI, Bsp143I, BssMI, BseENII, BstMBI, Kzo9I, NedII, Sse9I, TasI, TspEI, AjnI, BstSCI, EcoRII, MaeIII, NmuCI 및 Psp6I를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0333] 증폭 생성물은 인식 부위의 5' 말단에서 절단하여 닉을 생성하는 닉킹 엔도뉴클레아제에 의해 절단될 수 있다. 닉킹 부위는 인식 부의의 첫 번째 뉴클레오티드로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 이상의 뉴클레오티드만큼 상류에 존재할 수 있다. 예시적 닉킹 엔도뉴클레아제는 Nb.BsrDI, Nb.BtsI, AspCNI, BscGI, BspNCI, EcoHI, FinI, TsuI, UbaF11I, UnbI, Vpak11AI, BspGI, DrdII, Pfl1108I 및 UbaPI를 포함하나 이들로

한정되지 않는다.

[0334] 증폭 생성물은 IIS형 엔도뉴클레아제에 의해 인식 부위의 3' 말단에서 절단될 수 있다. 인식 부위의 5' 또는 3' 말단은 0개, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 뉴클레오티드 오버행을 형성할 수 있다. 절단 부위는 인식 부위의 마지막 뉴클레오티드로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개 또는 25개 이상의 뉴클레오티드만큼 하류에 존재할 수 있다. 인식 부위의 마지막 뉴클레오티드의 0개 뉴클레오티드 하류에서 절단하는 IIS형 엔도뉴클레아제는 MlyI 및 SchI를 포함한다. 3' 오버행(예를 들면, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 뉴클레오티드 오버행)을 생성하는 예시적 IIS형 엔도뉴클레아제는 MnlI, BspCNI, BsrI, BtsCI, HphI, HpyAV, MboII, AcuI, BciVI, BmrI, BpmI, BpuEI, BseRI, BsgI, BsmI, BsrDI, BtsI, EciI, MmeI, NmeAIII, Hin4II, TscAI, Bce83I, BmuI, BsbI 및 BscCI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 한 가닥 상에서 인식 부위를 제거하고 다른 가닥 상에서 3' 오버행 또는 블런트 말단을 생성하는 비-II형 엔도뉴클레아제는 NlaIII, Hpy99I, TspRI, FaeI, HinlII, Hsp92II, SetI, TaiI, TscI, TscAI 및 TseFI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 인식 부위를 제거하고 인식 부위의 3' 말단 상에서 절단하는 닉킹 엔도뉴클레아제는 Nt.AlwI, Nt.BsmAI, Nt.BstNBI 및 Nt.BspQI를 포함한다.

[0335] 인식 부위와 절단 부위 사이의 거리는 절단을 위해 사용된 제한 엔도뉴클레아제에 의존할 수 있다. 예를 들면, 최적 반응 조건 하에서 효율적으로 절단할 수 있는, 인식 부위로부터 1개 염기쌍만큼 하류 또는 상류에 위치하는 절단 부위를 가진 제한 엔도뉴클레아제는 AgeI, ApaI, AscI, BmtI, BsaI, BsmBI, BsrGI, DdeI, DraIII, HpaI, MseI, PacI, PciI, PmeI, PvuI, SacII, SapI, Sau3AI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, StuI 및 XmaI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 최적 반응 조건 하에서 효율적으로 절단할 수 있는, 인식 부위로부터 2개 염기쌍만큼 하류 또는 상류에 위치하는 절단 부위를 가진 제한 엔도뉴클레아제는 AgeI, AluI, ApaI, AscI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, DdeI, DraIII, EagI, HpaI, KpnI, MseI, NlaIII, PacI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, RsaI, SacII, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI 및 XmaI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 최적 반응 조건 하에서 효율적으로 절단할 수 있는, 인식 부위로부터 3개 염기쌍만큼 하류 또는 상류에 위치하는 절단 부위를 가진 제한 엔도뉴클레아제는 AgeI, AluI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, DdeI, DraIII, EagI, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, PacI, PciI, PmeI, PstI, RsaI, SacI, SacII, SaII, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI 및 XmaI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 최적 반응 조건 하에서 효율적으로 절단할 수 있는, 인식 부위로부터 4개 염기쌍만큼 하류 또는 상류에 위치하는 절단 부위를 가진 제한 엔도뉴클레아제는 AgeI, AluI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, ClaI, DdeI, DraIII, EagI, EcoRI, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, PacI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, SacI, SacII, SaII, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI, XhoI 및 XmaI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 최적 반응 조건 하에서 효율적으로 절단할 수 있는, 인식 부위로부터 5개 염기쌍만큼 하류 또는 상류에 위치하는 절단 부위를 가진 제한 엔도뉴클레아제는 AgeI, AluI, ApaI, AscI, AvrII, BamHI, BglII, BmtI, BsaI, BsiWI, BsmBI, BsrGI, BssHII, ClaI, DdeI, DraIII, EagI, EcoRI, EcoRV, FseI, HindIII, HpaI, KpnI, MfeI, MluI, MseI, NcoI, NdeI, NheI, NlaIII, NsiI, NspI, PacI, PciI, PmeI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, SacI, SacII, SaII, SapI, Sau3AI, SbfI, ScaI, SfiI, SmaI, SphI, SspI, StuI, StyI, XhoI 및 XmaI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0336] 어댑터 서열은 하나 이상의 제한 인식 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 인식 부위는 적어도 4개, 5개 또는 6개 염기쌍 길이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 인식 부위는 비-회문식 인식 부위이다. 일부 실시양태들에서, 어댑터 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 인식 부위들을 포함한다. 2개 이상의 인식 부위들은 하나 이상의 제한 효소로 절단될 수 있다. 2개 이상의 제한 효소들을 사용한 2개 이상의 인식 부위들의 절단이 완충제 및 반응 온도 최적화에 의해 달성될 수 있고/있거나 완전해질 수 있다는 것은 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 어댑터 서열 내의 인식 부위들의 예시적 쌍은 MlyI-MlyI, MlyI-Nt.AlwI, BsaI-MlyI, MlyI-BciVI 및 BfuCI-MlyI를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0337] **유전자**

[0338] 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 관심있는 개별적으로 접근가능한 폴리뉴클레오티드들의 집합체를 포함하는 유전자 라이브러리의 구축을 가능하게 한다. 폴리뉴클레오티드는 선형일 수 있거나, 벡터(예를 들면, 플라스미드 또는 파지) 또는 세포(예를 들면, 세균 세포) 내에서 유지될 수 있거나, 정제된 DNA로서 유지될 수 있거나, 당분야에서 공지되어 있는 다른 적합한 형태로 유지될 수 있다. 라이브러리 구성원(다양하게 클

론, 구축물, 폴리뉴클레오티드 등으로서 지칭됨)은 예를 들면, 다중웰 배양물 또는 마이크로타이터 플레이트, 바이알, 적합한 세포 환경(예를 들면, 이. 콜라이 세포), 적합한 저장 매체(예를 들면, 저장 IsoCodeD IDTM DNA 라이브러리 카드; Schleicher & Schuell BioScience) 상의 정제된 DNA 조성물, 또는 당분야에서 공지되어 있는 다양한 다른 적합한 라이브러리 형태들을 비롯한 다양한 회수 및 사용 방식들로 저장될 수 있다. 유전자 라이브러리는 약 10개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 750개, 1000개, 1500개, 2000개, 3000개, 4000개, 5000개, 6000개, 7500개, 10000개, 15000개, 20000개, 30000개, 40000개, 50000개, 60000개, 75000개 또는 100000개 이상의 구성원들을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 핵산 분자는 마이크로규모 양(예를 들면, 펨토몰 내지 나노몰 양, 예컨대, 약 0.001 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 0.01 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 0.1 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 0.001 펨토몰 내지 약 0.1 나노몰, 약 0.001 펨토몰 내지 약 0.01 나노몰, 약 0.001 펨토몰 내지 약 0.001 나노몰, 약 1.0 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 1.0 펨토몰 내지 약 0.1 나노몰, 약 1.0 펨토몰 내지 약 0.01 나노몰, 약 1.0 펨토몰 내지 약 0.001 나노몰, 약 10 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 10 펨토몰 내지 약 0.001 나노몰, 약 20 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 100 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 500 펨토몰 내지 약 1.0 나노몰, 약 1 나노몰 내지 약 800 나노몰, 약 40 나노몰 내지 약 800 나노몰, 약 100 나노몰 내지 약 800 나노몰, 약 200 나노몰 내지 약 800 나노몰, 약 500 나노몰 내지 약 800 나노몰, 약 100 나노몰 내지 약 1,000 나노몰 등)으로 생성될 수 있다. 당업자는 핵산 양이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 약 0.001 펨토몰 내지 약 1000 나노몰, 또는 약 0.001 펨토몰 내지 약 0.01 펨토몰) 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 일반적으로, 핵산 분자는 약 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 또는 100 펨토몰, 1, 10 또는 100 피코몰, 1, 10 또는 100 나노몰, 또는 1 마이크로몰 이상의 양으로 생성될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 핵산 분자는 약 1 마이크로몰, 100, 10 또는 1 나노몰, 100, 10 또는 1 피코몰, 또는 100, 10, 1, 0.1, 0.01 또는 0.001 펨토몰 미만의 양으로 생성될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 핵산 분자는 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 750 또는 1000 nM 이상의 농도로 생성될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 유전자 라이브러리는 1000, 100, 10 또는 1 m^3, 100, 10 또는 1 dm^3, 또는 100, 10 또는 1 cm^3 미만의 공간에서 합성/조립되고/되거나 보유된다.

[0339] 개별적으로 접근가능한 구성원의 위치는 입수될 수 있거나 용이하게 확인될 수 있다. 개별적으로 접근가능한 구성원은 라이브러리로부터 용이하게 회수될 수 있다.

[0340] 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 합성(즉, 드 노보 합성된) 유전자의 생성을 가능하게 한다. 합성 유전자를 포함하는 라이브러리는 2개 이상의 이중 가닥 폴리뉴클레오티드들(본원에서 "신톤(synthons)"으로서 지칭됨)을 조합("스티칭(stitching)")하여 보다 더 큰 DNA 유닛(즉, 멀티신톤(multisynthons) 또는 섀시(chassis))를 생성하는, 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 다양한 방법들, 예컨대, PCA, 비-PCA 유전자 조립 방법 또는 계층적 유전자 조립에 의해 구축될 수 있다. 큰 구축물들의 라이브러리는 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400 또는 500 kb 이상 긴 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 큰 구축물은 약 5000개, 10000개, 20000개 또는 50000개 염기쌍들의 독립적으로 선택된 상한에 의해 한정될 수 있다. 비-리보좀 펩티드들(NRP들)을 코딩하는 서열, 및 비-리보좀 펩티드-합성효소(NRPS) 모듈 및 합성 변이체, 다른 모듈성 단백질, 예컨대, 항체의 폴리펩티드 분절 또는 다른 단백질 패밀리로부터의 폴리펩티드 분절을 코딩하는 서열을 비롯한 임의의 수의 폴리펩티드 분절 코딩 뉴클레오티드 서열; 비-코딩 DNA 또는 RNA, 예컨대, 조절 서열, 예를 들면, 프로모터, 전사 인자, 인핸서, siRNA, shRNA, RNAi, miRNA, 또는 microRNA로부터 유도된 작은 핵인 RNA; 또는 관심있는 임의의 기능적 또는 구조적 DNA 또는 RNA 유닛의 합성이 달성될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "유전자"는 광범위하게 임의의 유형의 코딩 또는 비-코딩 긴 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 유사체를 지칭한다.

[0341] 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 유전자의 라이브러리에 관한 것이다. 유전자 라이브러리는 복수의 하위분절들을 포함할 수 있다. 하나 이상의 하위분절에서, 라이브러리의 유전자들은 함께 공유연결될 수 있다. 하나 이상의 하위분절에서, 라이브러리의 유전자들은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제1 대사 경로의 구성요소를 코딩할 수 있다. 하나 이상의 하위분절에서, 라이브러리의 유전자들은 하나 이상의 표적화된 대사 최종 생성물의 제조 공정을 기초로 선택될 수 있다. 하나 이상의 대사 최종 생성물은 바이오료를 포함한다. 하나 이상의 하위분절에서, 라이브러리의 유전자들은 하나 이상의 대사 최종 생성물을 가진 제2 대사 경로의 구성요소를 코딩할 수 있다. 제1 대사 경로 및 제2 대사 경로의 하나 이상의 최종 생성물은 하나 이상의 공유된 최종 생성물을 포함할 수 있다. 일부 경우, 제1 대사 경로는 제2 대사 경로에서 조작되는 최종 생성물을 포함한다.

[0342] 일부 실시양태들에서, 라이브러리의 하위분절은 합성 유기체, 예를 들면, 바이러스 또는 세균의 게놈의 일부 또는 전부를 코딩하는 유전자들을 포함할 수 있거나, 이러한 유전자들로 구성될 수 있거나 본질적으로 이러한 유전자들로 구성될 수 있다. 따라서, 용어 "유전자", "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산" 및 "올리고뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되고 뉴클레오티드 중합체를 지칭한다. 달리 한정되어 있지 않은 한, 상기 용어들은 천연 생성 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 작용할 수 있는(예를 들면, 혼성화할 수 있는) 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포함한다. 이들은 임의의 길이의 뉴클레오티드들(데옥시리보뉴클레오티드들 또는 리보뉴클레오티드들)의 중합체 형태, 또는 이의 유사체일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 공지되어 있거나 공지되어 있지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 하기 나열된 것들은 폴리뉴클레오티드의 비-한정적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비-코딩 영역; 유전자간 DNA; 연관 분석으로부터 한정된 좌위들(좌위); 엑손; 인트론; 메신저 RNA(mRNA); 전달 RNA; 리보좀 RNA; 짧은 간섭 RNA(siRNA); 짧은 헤어핀 RNA(shRNA); microRNA(miRNA); 작은 핵인 RNA; 리보자임; 통상적으로 메신저 RNA(mRNA)의 역전사 또는 증폭에 의해 수득되는, mRNA의 DNA 표시물인 상보적 DNA(cDNA); 합성 또는 증폭에 의해 생성된 DNA 분자; 게놈 DNA; 재조합 폴리뉴클레오티드; 분지된 폴리뉴클레오티드; 플라스미드; 벡터; 임의의 서열의 단리된 DNA; 임의의 서열의 단리된 RNA; 핵산 프로브; 및 프라이머. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대, 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변경은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 구성요소에 의해 단절될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예컨대, 표지 구성요소와의 접합에 의해 중합 후 변경될 수도 있다. 달리 언급되어 있지 않은 한, 제공될 때 폴리뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 방향으로 나열된다.

[0343] 용어 핵산은 단일 가닥 분자뿐만 아니라 이중 또는 삼중 가닥 핵산도 포괄한다. 이중 또는 삼중 가닥 핵산들에서, 핵산 가닥들은 동일선상에 있을 필요가 없다(즉, 이중 가닥 핵산은 양 가닥들의 전체 길이를 따라 이중 가닥일 필요가 없다).

[0344] 용어 핵산은 예컨대, 메틸화 및/또는 캡핑에 의한 그의 임의의 화학적 변경물도 포괄한다. 핵산 변경은 추가 전하, 분극성, 수소 결합, 정전기 상호작용 및 기능성을 개별 핵산 염기 또는 전체로서의 핵산에 도입하는 화학적 기의 추가를 포함할 수 있다. 이러한 변경은 염기 변경, 예컨대, 2'-위치 당 변경, 5-위치 피리미딘 변경, 8-위치 푸린 변경, 사이토신 환외(exocyclic) 아민에서의 변경, 5-브로모-우라실의 치환, 골격 변경, 희귀 염기 쌍형성 조합, 예컨대, 이소염기(isobases) 이소사이티딘 및 이소구아니딘 등을 포함할 수 있다.

[0345] 보다 더 구체적으로, 일부 실시양태들에서, 핵산은 (2-데옥시-D-리보스를 함유하는) 폴리데옥시리보뉴클레오티드, (D-리보스를 함유하는) 폴리리보뉴클레오티드, 및 푸린 또는 피리미딘 염기의 N-글리코사이드 또는 C-글리코사이드인 임의의 다른 유형의 핵산뿐만 아니라, 비-뉴클레오티드성 골격을 함유하는 다른 중합체, 예를 들면, 폴리아미드(예를 들면, 펩티드 핵산(PNA)) 및 폴리모르폴리노(안티-바이랄스 인코포레이티드(Anti-Virals, Inc.)(미국 오레곤주 코발리스 소재)로부터 뉴진(Neugene)으로서 상업적으로 입수가능함) 중합체, 및 다른 합성 서열 특이적 핵산 중합체(단, 중합체는 예컨대, DNA 및 RNA에서 발견되는 염기 쌍형성 및 염기 적층을 가능하게 하는 배열로 뉴클레오염기들을 함유함)도 포함할 수 있다. 용어 핵산은 연결된 핵산(LNA)의 개시내용에 대해 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,794,499호, 제6,670,461호, 제6,262,490호 및 제6,770,748호에 기재되어 있는 LNA도 포괄한다.

[0346] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "상보적"은 2개의 뉴클레오티드들 사이의 정확한 쌍형성 능력을 지칭한다. 핵산의 주어진 위치에서 뉴클레오티드가 또 다른 핵산의 뉴클레오티드와 수소결합할 수 있는 경우, 2개의 핵산들은 그 위치에서 서로 상보적인 것으로 간주된다. 2개의 단일 가닥 핵산 분자들 사이의 상보성은 뉴클레오티드들 중 일부만이 결합할 때 "부분적"일 수 있거나, 상기 상보성은 전체 상보성이 단일 가닥 분자들 사이에 존재할 때 완전할 수 있다. 핵산 가닥들 사이의 상보성의 정도는 핵산 가닥들 사이의 혼성화의 효율 및 강도에 유의한 영향을 미친다.

[0347] "혼성화" 및 "어닐링"은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 뉴클레오티드 잔기들의 염기들 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체를 형성하도록 반응하는 반응을 지칭한다. 수소 결합은 와슨 크릭(Watson Crick) 염기 쌍형성, 호그스테인(Hoogstein) 결합, 또는 임의의 다른 서열 특이적 방식으로 일어날 수 있다. 상기 복합체는 이중체 구조를 형성하는 2개의 가닥들, 다중 가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥들, 단일 자가 혼성화 가닥, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 보다 더 연장적인 공정에서의 한 단계, 예컨대, PCR 또는 다른 증폭 반응의 시작, 또는 리보자임에 의한 폴리뉴클레오티드의 효소적 절단을 구성할 수 있다. 제2 서열의 뉴클레오티드 잔기들의 염기들과의 수소 결합을 통해 안정화될 수 있는 제1 서열은 상기 제2 서열에 "혼성화될 수 있는" 것으로서 주장된다. 이러한 경우, 제2 서열은 제1 서열에 혼성화될 수 있는 것으로서 주장될 수

도 있다.

[0348] 폴리뉴클레오티드에 적용된 용어 "혼성화된"은 뉴클레오티드 잔기들의 염기들 사이의 수소 결합을 통해 안정화되는 복합체 형태의 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 수소 결합은 와슨 크릭 염기 쌍형성, 호그스테인 결합, 또는 임의의 다른 서열 특이적 방식으로 일어날 수 있다. 복합체는 이중체 구조를 형성하는 2개의 가닥들, 다중 가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥들, 단일 자가 혼성화 가닥, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 혼성화 반응은 보다 더 연장적인 공정에서의 한 단계, 예컨대, PCR 반응의 시작, 또는 리보자임에 의한 폴리뉴클레오티드의 효소적 절단을 구성할 수 있다. 주어진 서열과 혼성화된 서열은 상기 주어진 서열의 "상보체"로서 지칭된다.

[0349] "특이적 혼성화"는 정해진 엄격성 조건 하에서 혼성화 혼합물에 존재하는 다른 뉴클레오티드 서열과의 실질적 결합의 부재 하에서 핵산과 표적 뉴클레오티드 서열의 결합을 지칭한다. 당업자는 혼성화 조건의 엄격성의 완화가 서열 불일치의 용인을 가능하게 한다는 것을 인식한다.

[0350] 일반적으로, 주어진 서열의 "상보체"는 주어진 서열에 완전히 또는 실질적으로 상보적이고 혼성화될 수 있는 서열이다. 일반적으로, 제2 서열 또는 제2 서열 세트에 혼성화될 수 있는 제1 서열은 혼성화 반응 동안 제2 서열 또는 제2 서열 세트와의 혼성화가 비-표적 서열과의 혼성화보다 선호되도록(예를 들면, 주어진 조건 세트, 예컨대, 당분야에서 통상적으로 이용되는 엄격한 조건 하에서 열역학적으로 보다 더 안정하도록) 제2 서열 또는 제2 서열 세트에 특이적으로 또는 선택적으로 혼성화될 수 있다. 전형적으로, 혼성화될 수 있는 서열들은 그들 각각의 길이의 전부 또는 일부에 걸쳐 일정한 정도의 서열 상보성, 예컨대, 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100%의 서열 상보성을 포함하는 25% 내지 100%의 상보성을 공유한다.

[0351] 용어 "프라이머"는 핵산과 혼성화("어닐링"으로서도 지칭됨)할 수 있고 적절한 완충제 및 적합한 온도에서 적절한 조건 하에서(즉, 4종의 상이한 뉴클레오시드 트리포스페이트들 및 중합을 위한 물질, 예컨대, DNA 또는 RNA 중합효소 또는 역전사효소의 존재 하에서) 뉴클레오티드(RNA 또는 DNA) 중합을 위한 시작 부위로서 작용할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 프라이머의 적절한 길이는 프라이머의 의도된 용도에 의존하지만, 프라이머는 전형적으로 7개 이상의 뉴클레오티드 길이, 보다 더 전형적으로 10개 내지 30개의 뉴클레오티드 길이, 훨씬 더 전형적으로 15개 내지 30개의 뉴클레오티드 길이를 가진다. 다른 프라이머는 다소 더 긴, 예를 들면, 30개 내지 50개, 또는 40개 내지 70개의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 당업자는 프라이머 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 7 내지 70, 또는 50 내지 70)에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 본원에 더 기재된 바와 같이 다양한 길이의 올리고뉴클레오티드들이 증폭 및/또는 유전자 조립 반응을 위한 프라이머 또는 빌딩 블록으로서 사용될 수 있다. 이와 관련하여, "프라이머 길이"는 상보적 "표적" 서열에 혼성화되고 뉴클레오티드 합성을 프라이밍하는 올리고뉴클레오티드 또는 핵산의 일부를 지칭한다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과의 충분히 안정한 하이브리드 복합체를 형성하기 위해 보다 더 낮은 온도를 요구한다. 프라이머는 주형의 정확한 서열을 반영할 필요가 없지만, 주형과 혼성화될 정도로 충분히 상보적이어야 한다. 용어 "프라이머 부위" 또는 "프라이머 결합 부위"는 프라이머가 혼성화되는 표적 핵산의 분절을 지칭한다. 프라이머 결합 부위를 제공하는 구축물은 종종 "프라이밍 준비 구축물" 또는 "증폭 준비 구축물"로서 지칭된다.

[0352] 프라이머 또는 이의 일부가 핵산 내의 뉴클레오티드 서열에 혼성화되는 경우, 프라이머는 또 다른 핵산에 어닐링한다고 주장된다. 프라이머가 특정 뉴클레오티드 서열에 혼성화된다는 주장은 상기 프라이머가 그 뉴클레오티드 서열에 완전히 또는 배타적으로 혼성화된다는 것을 내포하기 위한 것이 아니다.

[0353] **올리고뉴클레오티드 합성**

[0354] 본원에 기재된 기판 상에서 합성된 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 20, 10, 5, 1 또는 0.1 cm^2 미만의 표면적에서 약 100개 초과, 바람직하게는 약 1000개 초과, 보다 더 바람직하게는 약 16,000개 초과, 가장 바람직하게는 50,000개 또는 250,000개 초과, 또는 심지어 약 1,000,000개 초과의 상이한 올리고뉴클레오티드 프로브들을 포함할 수 있다.

[0355] 다양한 실시양태들에서, 기판 상에서 n-머, 예컨대, 약 100개, 150개, 200개, 250개, 300개 또는 350개 이상의 뉴클레오티드를 가진 올리고뉴클레오티드를 신속히 합성하는 방법이 본원에 더 기재되어 있다. 상기 방법은 뉴클레오티드 커플링에 적합한 화학적 모이어티로 작용화되는 분해된 좌위들을 가진 기판을 사용할 수 있다. 일부 경우, 표준 포스포라미다이트 화학반응이 이용될 수 있다. 따라서, 2개 이상의 빌딩 블록들이 빠른 속도, 예컨대, 시간당 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19

개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 125개, 150개, 175개 또는 200개 이상의 뉴클레오티드의 속도로 분해된 좌위들 중 하나 상에 각각 존재하는 복수의 성장하는 올리고뉴클레오티드 쇄들에 커플링된다. 일부 실시양태들에서, 아데닌, 구아닌, 타이민, 사이토신 또는 우리딘 빌딩 블록, 또는 이들의 유사체/변형된 버전이 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 바와 같이 사용된다. 일부 경우, 추가된 빌딩 블록은 디뉴클레오티드, 트리뉴클레오티드 또는 보다 더 긴 뉴클레오티드-기제 빌딩 블록, 예컨대, 약 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개 또는 50개 이상의 뉴클레오티드들을 함유하는 빌딩 블록을 포함한다. 일부 실시양태들에서, n-머 올리고뉴클레오티드들의 큰 라이브러리들이 기판, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 합성이 일어나는 약 100개, 1000개, 10000개, 100000개, 1000000개, 2000000개, 3000000개, 4000000개 또는 5000000개 이상의 분해된 좌위들을 가진 기판 상에서 동시적으로 합성된다. 서로 상이한 올리고뉴클레오티드들의 합성이 개별 좌위에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태들에서, 포스포라미다이트 화학반응, 예를 들면, 커플링, 캡핑, 산화 및 탈차단 단계를 가진 공정의 흐름 동안 시약 용량은 액체의 연속적인/치환 유동 및 진공 건조 단계, 예컨대, 새로운 빌딩 블록의 커플링 전 진공 건조 단계로 이루어진 주기를 통해 정확히 조절될 수 있다. 기판은 기판의 제1 표면과 기판의 제2 표면 사이에 유체 소통을 제공하는 비아들, 예컨대, 약 100개, 1000개, 10000개, 100000개 또는 1000000개 이상의 비아들을 포함할 수 있다. 기판은 포스포라미다이트 화학반응 주기 내의 단계들 중 하나 또는 전부 동안 제자리에 유지될 수 있고, 유동 시약은 기판을 통과할 수 있다.

[0356] 합성 핵산을 제조하는 통상적인 방법은 카루터스(Caruthers)의 기초 연구에 기초하고 포스포라미다이트 방법으로서 공지되어 있다(M. H. Caruthers, Methods in Enzymology 154, 287-313, 1987; 전체로서 본원에 참고로 도입됨). 생성된 분자의 서열은 합성 순서에 의해 조절될 수 있다. 다른 방법, 예컨대, H-포스포네이트 방법은 중합체를 그의 서브유닛으로부터 연속적으로 합성한다는 동일한 목적에 기여한다.

[0357] 전형적으로, 본 발명의 방법에 의한 DNA 올리고머의 합성은 전통적인 포스포라미다이트 화학반응을 통해 달성될 수 있다. 포스포라미다이트에 기초한 화학적 핵산 합성은 당업자에게 잘 공지되어 있고 본원에 참고로 도입되는 문헌(Streyer, Biochemistry (1988) pp 123-124) 및 미국 특허 제4,415,732호에서 검토되어 있다. 본 발명과 함께 사용될 수 있는 B-시아노에틸(CE) 포스포라미다이트 단량체 및 CPG(조절된 다공성 유리) 시약을 비롯한 포스포라미다이트 시약은 어메리칸 인터내셔날 케미칼(American International Chemical)(미국 매사추세츠주 나틱 소재), 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)(미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재) 등을 비롯한 다수의 상업적 공급처들로부터 구입될 수 있다.

[0358] 다양한 실시양태들에서, 화학적 핵산 합성은 주로 고체 표면 상에서 포스포라미다이트 화학반응의 변법을 이용함으로써 수행된다(문헌(Beaucage SL, Caruthers MH. Deoxynucleoside phosphoramidites - a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. Tetrahedron Lett. 1981;22:1859-1862); 및 문헌(Caruthers MH. Gene synthesis machines - DNA chemistry and its uses. Science. 1985;230:281-285)(이들 둘 다가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)).

[0359] 예를 들면, 포스포라미다이트에 기초한 방법을 이용하여 핵산 유사체뿐만 아니라 데옥시리보핵산 및 리보핵산의 풍부한 염기, 골격 및 당 변경물도 합성할 수 있다(문헌(Beaucage SL, Iyer RP. Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. Tetrahedron. 1992;48:2223-2311); 문헌(Beigelman L, Matulic-Adamic J, Karpeisky A, Haeberli P, Sweedler D. Base-modified phosphoramidite analogs of pyrimidine ribonucleosides for RNA structure-activity studies. Methods Enzymol. 2000;317:39-65); 문헌(Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH. Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development. Drug Discov. Today. 2005;10:587-593); 문헌(Pankiewicz KW. Fluorinated nucleosides. Carbohydrate Res. 2000;327:87-105); 문헌(Lesnikowski ZJ, Shi J, Schinazi RF. Nucleic acids and nucleosides containing carboranes. J. Organometallic Chem. 1999;581:156-169); 문헌(Foldesi A, Trifonova A, Kundu MK, Chattopadhyaya J. The synthesis of deuterionucleosides. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2000;19:1615-1656); 문헌(Leumann CJ. DNA Analogues: from supramolecular principles to biological properties. Bioorg. Med. Chem. 2002;10:841-854); 문헌(Petersen M, Wengel J. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. Trends Biotechnol. 2003;21:74-81); 및 문헌(De Mesmaeker A, Altmann K-H, Waldner A, Wendeborn S. Backbone modifications in oligonucleotides and peptide nucleic acid systems. Curr. Opin. Struct. Biol. 1995;5:343-355)(이들 모두가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)).

[0360] 포스포라미다이트 화학반응은 고체 기판, 예를 들면, 마이크로어레이 상에서의 DNA의 제자리 합성을 위해 개조되었다. 이러한 합성은 전형적으로 작은 면적, 예를 들면, 수 제곱 센티미터의 면적에 분포된 수천 개 내지 수십 만개의 유일한 올리고뉴클레오티드들을 생성하는, 합성 주기의 한 단계의 공간적 조절에 의해 달성된다. 올리고뉴클레오티드의 합성을 위한 영역 및 기판 구조는 본원의 다른 부분에 더 상세히 추가로 기재되어 있다. 공간적 조절을 달성하는 데에 이용되는 적합한 방법은 (i) 잉크젯 프린팅(Agilent, Protogene; Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. Nat. Biotechnol. 2001;19:342-347; Butler JH, Cronin M, Anderson KM, Biddison GM, Chatelain F, Cummer M, Davi DJ, Fisher L, Frauendorf AW, Frueh FW, et al. In situ synthesis of oligonucleotide arrays by using surface tension. J. Am. Chem. Soc. 2001;123:8887-8894) 또는 물리적 마스크(Southern EM, Maskos U, Elder JK. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. Genomics. 1992;13:1008-1017)에 의한 커플링 단계의 조절; (ii) 광불안정성 단량체의 고전적인 포토리쏘그래피 탈보호(Affymetrix; Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid dna-sequence analysis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994;91:5022-5026) 및 마스크 부재(maskless) 포토리쏘그래피 탈보호(Nimblegen; Singh-Gasson S, Green RD, Yue YJ, Nelson C, Blattner F, Sussman MR, Cerrina F. Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. Nat. Biotechnol. 1999;17:974-978)에 의한 5'-하이드록실 탈차단 단계의 조절; 또는 (iii) 표준 탈트리틸화(detritylation)를 수행하기 위한 광생성된 산의 디지털 활성화(Xeotron/Atactic; Gao XL, LeProust E, Zhang H, Srivannavit O, Gulari E, Yu PL, Nishiguchi C, Xiang Q, Zhou XC. A flexible light-directed DNA chip synthesis gated by deprotection using solution photogenerated acids. Nucleic Acids Res. 2001;29:4744-4750)(이들 모두가 전체로서 본원에 참고로 도입됨))를 포함할 수 있다.

[0361] 기판 상에서 제조된 올리고뉴클레오티드들을 그들의 고체 표면으로부터 절단하고 임의적으로 풀링하여 신규 적용, 예컨대, 유전자 조립, 핵산 증폭, 시퀀싱 라이브러리, shRNA 라이브러리 등(Cleary MA, Kilian K, Wang YQ, Bradshaw J, Cavet G, Ge W, Kulkarni A, Paddison PJ, Chang K, Sheth N, et al. Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nature Methods. 2004;1:241-248), 유전자 합성(Richmond KE, Li MH, Rodesch MJ, Patel M, Lowe AM, Kim C, Chu LL, Venkataramaian N, Flickinger SF, Kaysen J, et al. Amplification and assembly of chip-eluted DNA (AACED): a method for high-throughput gene synthesis. Nucleic Acids Res. 2004;32:5011-5018; Tian JD, Gong H, Sheng NJ, Zhou XC, Gulari E, Gao XL, Church G. Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips. Nature. 2004;432:1050-1054) 및 부위-지정된 돌연변이유발(Saboulard D, Dugas V, Jaber M, Broutin J, Souteyrand E, Sylvestre J, Delcourt M. High-throughput site-directed mutagenesis using oligonucleotides synthesized on DNA chips. BioTechniques. 2005;39:363-368)(이들 모두가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)을 가능하게 할 수 있다.

[0362] 긴 고품질 올리고뉴클레오티드의 성공적인 합성은 높은 단계적 커플링 수율, 예를 들면, 약 99.5% 이상인 단계적 커플링 수율에 의해 강하게 뒷받침된다. 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 98%, 98.5%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 99.95%, 99.96%, 99.97%, 99.98% 또는 99.99% 초과의 커플링 수율을 예상한다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 커플링 효율이 보다 더 낮은, 예를 들면, 98% 미만인 경우, 서열 완전성에 대한 영향은 전형적으로 2개의 시나리오들 중 하나를 따른다. 캡핑이 이용되는 경우, 낮은 커플링 효율은 짧은 절두된 서열에 의해 입증될 것이다. 캡핑이 이용되지 않는 경우, 또는 캡핑이 성공적이지 않은 경우, 단일 염기 결실이 올리고뉴클레오티드에서 일어날 것이고, 그 결과 1개 또는 2개의 뉴클레오티드를 결여하는 많은 수의 실패 서열들이 형성될 것이다. 5'-하이드록실 보호기의 효율적인 제거도 바람직하게 높은 수율, 예컨대, 각각의 주기 내에서 100%에 가까운 매우 높은 효율, 예를 들면, 98%, 98.5%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 99.95%, 99.96%, 99.97%, 99.98% 또는 99.99% 이상의 효율에서 긴 고품질 올리고뉴클레오티드의 합성을 뒷받침한다. 원하는 생성물 이외에 단일 염기 결실을 가진 올리고머들의 패밀리를 포함하는 최종 생성물 혼합물을 피하면서 본원에 기재된 방법 및 조성물을 이용하여 시약의 용량 및 다른 환경적 파라미터를 정밀하게 조절함으로써 이 단계를 최적화할 수 있다.

[0363] 추가로, 긴 올리고뉴클레오티드의 합성을 위해, 가장 우세한 부반응인 탈푸린화(depurination)를 최소화하는 것이 중요하다(Carr PA, Park JS, Lee YJ, Yu T, Zhang SG, Jacobson JM. Protein-mediated error correction

for de novo dna synthesis. Nucleic Acids Res. 2004; 32:e162). 탈푸린화는 전형적으로 쇄 연장을 방해하지 않는 탈염기 부위의 형성을 초래한다. 염기성 조건 하에서 최종 뉴클레오염기 탈보호 동안 중대한 DNA 손상이 일어나고, 이것도 탈염기 부위에서 올리고뉴클레오티드 쇄를 전달한다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 탈푸린화는 전형적으로 푸린 뉴클레오염기에 맵핑될 수 있는 짧은 절두된 서열을 생성함으로써 서열 완전성에 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 올리고뉴클레오티드의 고수율 및 고품질 합성은 매우 효율적인 커플링 및 5'-하이드록실 탈보호 반응과 조합된 탈푸린화의 조절에 의해 뒷받침된다. 높은 커플링 수율 및 낮은 탈푸린화를 이용하여, 낮은 수율을 보충하기 위한 광범위한 정제 및/또는 PCR 증폭에 대한 필요성 없이 긴 고품질 올리고뉴클레오티드를 합성할 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 이러한 높은 커플링 수율, 낮은 탈푸린화 및 보호기의 효과적인 제거를 달성할 조건을 제공한다.

[0364] 다양한 실시양태들에서, 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물은 임의적으로 당분야에서 공지되어 있는 적합한 변경을 이용하는, 작용화된 기판, 예를 들면, 실릴화된 웨이퍼 상에서의 표준 포스포라미다이트 화학반응에 의존한다. 전형적으로, 포스포라미다이트 화학반응에 적합한 변경을 가진 단량체, 예를 들면, 모노뉴클레오티드, 디뉴클레오티드 또는 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드의 침착 후, 하기 단계들 중 하나 이상의 단계를 1회 이상 수행하여 제자리에서 고품질 중합체의 단계적 합성을 달성할 수 있다: 1) 커플링, 2) 캡핑, 3) 산화, 4) 황화, 5) 탈차단(탈트리틸화) 및 6) 세척. 전형적으로, 산화 또는 황화가 상기 단계들 중 하나로서 이용될 것이지만, 둘 다가 이용되지는 않을 것이다. 도 11은 커플링, 캡핑, 산화 및 탈차단 단계를 포함하는 4-단계 포스포라미다이트 합성 방법을 예시한다.

[0365] 성장하는 올리고데옥시뉴클레오티드의 연장은 전형적으로 포스페이트 트리에스테르 뉴클레오티드간 결합의 형성을 통한 포스포라미다이트 빌딩 블록의 후속 추를 통해 달성될 수 있다. 커플링 단계 동안, 아세토니트릴 중의 포스포라미다이트 빌딩 블록, 예를 들면, 뉴클레오시드 포스포라미다이트(또는 여러 포스포라미다이트들의 혼합물)의 용액(전형적으로 0.02 내지 0.2 M 농도)을 예를 들면, 전형적으로 산성 아졸 촉매, 1H-테트라졸, 2-에틸티오테트라졸(Sproat et al., 1995, "An efficient method for the isolation and purification of oligoribonucleotides". Nucleosides & Nucleotides 14 (1&2): 255-273), 2-벤질티오테트라졸(Stutz et al., 2000, "Novel fluoride-labile nucleobase-protecting groups for the synthesis of 3'(2')-O-amino-acylated RNA sequences", Helv. Chim. Acta 83 (9): 2477-2503; Welz et al., 2002, "5-(Benzylmercapto)-1H-tetrazole as activator for 2'-O-TBDMS phosphoramidite building blocks in RNA synthesis", Tetrahedron Lett., 43 (5): 795-797), 4,5-디시아노이미다졸(Vargeese et al., 1998, "Efficient activation of nucleoside phosphoramidites with 4,5-dicyanoimidazole during oligonucleotide synthesis", Nucl. Acids Res., 26 (4): 1046-1050) 또는 다수의 유사한 화합물들의 용액(0.2 내지 0.7 M 농도)으로 활성화시킬 수 있다. 혼합은 성분들이 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 적합한 기판의 선택된 스폿에게 전달되는 동안 잉크젯의 유체 라인에서 달성될 수 있다. 포스포라미다이트 빌딩 블록, 예컨대, 전술된 바와 같이 활성화된 포스포라미다이트 빌딩 블록은 전형적으로 기판에 결합된 물질에 비해 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배 이상의 과량으로 제공된 후, 출발 고체 지지체(제1 커플링) 또는 지지체에 결합된 올리고뉴클레오티드 전구체(커플링 후)와 접촉된다. 3'에서 5' 방향으로의 합성에서, 전구체의 5'-하이드록시 기는 들어오는 뉴클레오시드 포스포라미다이트의 활성화된 포스포라미다이트 모이어티와 반응하여 포스파이트 트리에스테르 연결을 형성하도록 설정될 수 있다. 상기 반응은 특히 포스포라미다이트의 묽은 용액이 사용될 때 물의 존재에 대한 높은 민감성도 갖고, 전형적으로 무수 아세토니트릴에서 수행된다. 커플링의 완료 시, 임의의 결합되지 않은 시약 및 부산물은 세척 단계에 의해 제거될 수 있다.

[0366] 커플링 반응의 생성물은 예를 들면, 실패 서열을 에스테르화할 수 있고/있거나 헤테로환 염기 상에서 포스페이트 반응 생성물을 절단할 수 있는 캡핑제로 처리될 수 있다. 캡핑 단계는 고체 지지체에 결합된 물질을 아세트산 무수물과 촉매로서의 1-메틸이미다졸 또는 DMAP의 혼합물로 처리함으로써 수행될 수 있고, 2종의 목적에 기여할 수 있다: 커플링 반응의 완료 후, 고체 지지체에 결합된 5'-OH 기의 분획(예를 들면, 0.1% 내지 1%)이 비반응된 상태로 남아있을 수 있다. 이 비반응된 기는 통상적으로 (n-1) 쇼트머(shortmers)로서 지칭되는, 내부 염기 결실을 가진 올리고뉴클레오티드의 형성을 방지하기 위해 추가 쇄 연장으로부터 영구적으로 차단될 수 있다. 비반응된 5'-하이드록시 기는 캡핑 혼합물에 의해 아세틸화될 수 있다. 추가로, 1H-테트라졸로 활성화된 포스포라미다이트가 구아노신의 O6 위치와 어느 정도 반응한다는 것은 이해된다. 이론에 의해 구속받지 않지만, I_2/물에 의한 산화 시, 이 부산물은 가능하게는 O6-N7 이동을 통해 탈푸린화를 겪을 수 있다. 탈푸린(apurinic) 부위는 올리고뉴클레오티드의 최종 탈보호의 과정에서 절단된 상태로 종결되어, 전장 생성물의 수율을 감소시킬

수 있다. O6 변경은 I_2/물을 사용한 산화 전에 캡핑 시약을 사용한 처리에 의해 제거될 수 있다.

[0367] 올리고뉴클레오티드 포스포로티오에이트(OPS; 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재됨)의 합성은 전형적으로 I_2/물을 사용한 산화를 포함하지 않고, 그만큼 전술된 부반응으로부터 발생되는 문제점을 갖지 않는다. 다른 한편으로, 캡핑 혼합물은 황 전달 반응을 방해하지 않을 수 있다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 캡핑 혼합물은 원하는 PS 트리에스테르 대신에 포스페이트 트리에스테르 뉴클레오시드간 연결의 광범위한 형성을 야기할 수 있다. 따라서, OPS의 합성을 위해, 황화 단계는 임의의 캡핑 단계 전에 수행될 수 있다.

[0368] 지지체에 결합된 물질은 천연 생성 포스페이트 디에스테르 뉴클레오시드간 연결의 보호된 전구체인 사중통합된(tetracoordinated) 포스페이트 트리에스테르로의 포스파이트 트리에스테르의 산화를 수행하기 위해 전형적으로 약염기(예를 들면, 피리딘, 루티딘 또는 콜리딘)의 존재 하에서 요오드 및 물로 처리될 수 있다. 예를 들면, tert-부틸 과산화수소 또는 (1S)-(+)-(10-캄포설포닐)-옥사지리딘(CSO)을 사용하여 무수 조건 하에서 산화를 수행할 수 있다. 산화 단계를 황화 단계로 치환하여 올리고뉴클레오티드 포스포로티오에이트를 수득할 수 있다.

[0369] 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물을 이용하여 천연 올리고뉴클레오티드의 합성과 유사하게 올리고뉴클레오티드 포스포로티오에이트(OPS)의 합성을 달성할 수 있다. 요약하건대, 산화 단계는 황 전달 반응(황화)로 대체될 수 있고, 임의의 캡핑 단계는 황화 후에 수행될 수 있다. 3-(디메틸아미노메틸리덴)아미노)-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온, DDTT, 뷰케이지(Beaucage) 시약으로서도 공지되어 있는 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드 및 N,N,N',N'-테트라에틸티우람 디설파이드(TETD)를 포함하나 이들로 한정되지 않는 많은 시약들이 효율적인 황 전달을 수행할 수 있다.

[0370] 탈차단(또는 탈트리틸화) 단계는 차단기, 예컨대, DMT 기를 예를 들면, 불활성 용매(디클로로메탄 또는 톨루엔) 중의 산, 예컨대, 2% 트리클로로아세트산(TCA) 또는 3% 디클로로아세트산(DCA)의 용액으로 제거하는 데에 기여할 수 있다. 세척 단계가 수행될 수 있다. 고체 지지체에 결합된 올리고뉴클레오티드 전구체는 자유 5'-말단 하이드록실 기를 보유하도록 영향을 받는다. 연장된 시간 동안 탈트리틸화의 수행 또는 권장된 산 용액보다 더 강한 산 용액을 사용한 탈트리틸화의 수행은 고체 지지체에 결합된 올리고뉴클레오티드의 증가된 탈푸린화를 유발하여 원하는 전장 생성물의 수율을 감소시킬 수 있다. 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물은 원하지 않는 탈푸린화 반응을 한정하는 조절된 탈차단 조건을 제공한다.

[0371] 일부 실시양태들에서, THF/피리딘/H_2O 중에 약 0.02 M의 I_2를 포함하는 산화 용액 또는 당업자에게 자명한 임의의 적합한 변경물이 사용될 수 있다. 탈트리틸화 용액은 톨루엔, 디클로로메탄, 또는 임의의 다른 적합한 불활성 용매 중의 3% 디클로로아세트산(DCA) 또는 2% 트리클로로아세트산(TCA)일 수 있다. 탈트리틸화 용액의 적합한 변경물이 당업자에게 자명하다는 것은 이해된다. 본 발명의 방법 및 조성물은 용매의 유의한 증발을 허용하지 않으면서 탈트리틸화 용액의 치환을 허용하여, 탈푸린화 성분, 예를 들면, DCA 또는 TCA의 농축된 스폿을 방지한다. 예를 들면, 탈트리틸화 용액 후에 추적 용액이 사용될 수 있다. 추적 용액의 밀도를 조절하여 선입선출(first in first out) 공정을 달성할 수 있다. 약간 더 진한 추적 용액을 사용하여 이 결과를 달성할 수 있다. 예를 들면, 탈트리틸화 용액을 산화 용액으로 추적할 수 있다. 추적 용액은 켄칭제(quenching agent), 예컨대, 피리딘을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 탈차단 용액이 기판 상의 올리고뉴클레오티드 합성 좌위로부터 실질적으로 제거될 때까지 연속 액체 조건이 이용된다. 탈푸린화 성분들의 농도는 예를 들면, 기판의 올리고뉴클레오티드 합성 좌위 상에서의 그들의 값을 원래의 농도의 3배, 2.5배, 2배, 1.5배, 1.4배, 1.3배, 1.25배, 1.2배, 1.15배, 1.1배, 1.05배, 1.04배, 1.03배, 1.02배, 1.01배 또는 1.005배 미만까지 한정함으로써 철저히 조절될 수 있다.

[0372] 치환 공정은 올리고뉴클레오티드 합성 좌위 상에서의 화학적 용량을 유용한 범위 내에서 적절하게 조절하도록 최적화될 수 있다. 용량은 의도된 반응(탈트리틸화)의 완료 및 부반응(탈푸린화)의 정도 둘다에 대한 시간, 농도 및 온도의 합산된 동역학적 효과를 총칭할 수 있다.

[0373] 추가로, 탈트리틸화는 가역적이므로 정확한 뉴클레오티드들 중 하나 이상을 결여하는 일련의 올리고머들의 합성을 야기할 수 있다. 문헌(Sierzchala et al., Solid-phase oligodeoxynucleotide synthesis: A two-step cycle using peroxy anion deprotection. J. Am. Chem. Soc. 2003;125:13427-13441)에 의해 제안된 2-단계 화학반응은 성장하는 쇄의 5' 또는 3' 말단의 산 탈보호의 사용을 제거함으로써 탈푸린화라는 문제점을 해결할 수 있다. 2-단계 합성 주기는 약한 염기성 조건, 예를 들면, 약 pH 9.6 하에서 완충된 수성 퍼록시 음이온을 사용하여, 4-단계 포스포라미다이트 합성에서 통상적으로 사용되는 DMT 기를 치환시키는 아릴옥시카보닐 기를 제거한다. 따라서, 퍼록시 음이온 용액, 또는 강한 친핵성 및 약한 산화 성질을 가진 임의의 적합한 변경물은 탈차

단 단계와 산화 단계를 하나로 통합할 수 있게 한다. 추가로, 높은 주기 수율은 캡핑 단계의 제거를 허용한다.

[0374] 기판으로부터의 DNA의 탈보호 및 절단은 문헌(Cleary et al., Production of complex nucleic acid libraries using highly parallel in situ oligonucleotide synthesis. Nature Methods. 2004;1:241-248)에 기재된 바와 같이, 예를 들면, NH_4OH로 처리함으로써, 자외선 광을 광절단가능한 링커에 적용함으로써, 탈푸린 부위, 예컨대, 도입된 dU-잔기의 우라실-DNA 글리코실라제 처리에 의해 생성된 탈푸린 부위를 표적화, 예를 들면, 열처리함으로써, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 절단 방법을 이용함으로써 수행될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 동결건조에 의해 절단 후 회수될 수 있다.

[0375] 포스포라미다이트 화학반응이 일어나기 위해, 기판의 올리고뉴클레오티드 합성 좌위의 표면은 성장하는 뉴클레오티드 쇄와 표면의 연결을 위한 적절한 부위를 제공하도록 화학적으로 변경될 수 있다. 뉴클레오티드가 기판 표면에 부착될 수 있게 하는 다양한 유형의 표면 변경 화학반응들이 존재한다. 표면 변경은 올리고뉴클레오티드 쇄가 핵산 염기의 탈보호와 동시에 표면으로부터 절단되는지 아니면 탈보호 후 표면에 부착된 상태로 남아있는지에 따라 그의 실행에서 상이할 수 있다. 다양한 유형의 적합한 표면 변경 화학반응들이 당분야에서 공지되어 있고 전체로서 본원에 참고로 도입되는 웹사이트(www.glenresearch.com)에 기재되어 있다. 한 표면 변경 기법은 올리고뉴클레오티드 쇄가 기판에 부착된 상태로 남아있게 하면서 A, G 및 C 염기들의 환외 N 원자가 탈보호될 수 있게 한다.

[0376] 또 다른 방법은 트리알콕시실릴 아민(예를 들면, $(CH_3CH_2O)_3Si-(CH_2)_2-NH_2$)을 유리 또는 실리카 표면 SiOH 기와 반응시킨 후, 상기 아민을 석신산 무수물과 반응시켜, 뉴클레오티드 쇄 성장이 시작될 수 있는 아미드 연결 및 자유 OH를 생성하는 단계를 포함한다.

[0377] 세 번째 유형의 링커 기는 광절단가능한 프라이머에 기초할 수 있다. 이 유형의 링커는 각각의 염기 상의 질소성 작용기 상에서 보호기를 절단하지 않으면서 올리고뉴클레오티드가 (광, 예를 들면, 약 350 nm 광을 사용한 방사선조사에 의해) 기판으로부터 제거될 수 있게 한다. 전형적인 암모니아 또는 NH_3 처리는 기판으로부터 올리고머를 절단하기 위한 시약으로서 사용될 때 모든 것을 탈보호한다. 이러한 종류의 광절단가능한 링커의 사용은 웹사이트(www.glenresearch.com)에 기재되어 있다. 다양한 다른 적합한 절단가능한 링커 기들은 당분야에서 공지되어 있고 대안적으로 사용될 수 있다.

[0378] 산화 및 탈트리틸화를 위한 시간은 전형적으로 각각 약 30초 및 60초일 수 있다. 시약을 배출한 후 아세토니트릴(ACN)로 세척할 수 있다. 탈푸린화 조절된 탈트리틸화 공정에서, 중간에 배출 단계를 이용하지 않으면서 산화 용액의 연속적인 유입을 이용하여 탈트리틸화 용액을 배출할 수 있다.

[0379] 제자리 합성 단계 동안 시약의 유동의 정밀한 조절은 생성물의 개선된 수율, 균일성 및 품질을 가능하게 한다. 예를 들면, 산 농도 및 탈트리틸화 시간을 정밀하게 조절할 수 있다. 기판, 구체적으로 제자리 합성 영역 및/또는 주변 영역에 대한 물 접촉각은 탈푸린화 및/또는 합성 속도를 감소시키도록 선택될 수 있다. 물 접촉각의 적절한 원하는 값은 본원의 다른 부분에 기재되어 있다. 일부 실시양태들에서, 보다 더 낮은 양의 탈푸린화는 보다 더 높은 표면 에너지, 즉 보다 더 낮은 접촉각의 표면 상에서 달성될 수 있다.

[0380] 본 발명의 방법 및 조성물은 올리고뉴클레오티드 합성 동안 탈푸린화의 감소된 속도, 예를 들면, 주기당 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% 또는 0.0001% 미만의 속도를 허용한다. 추가로, 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물은 기판의 표면에 걸쳐 탈푸린화 구배의 감소 또는 제거를 허용하여, 올리고뉴클레오티드의 제자리 합성을 뒷받침한다. 따라서, 매우 균일한 고품질 및 고수율의 올리고뉴클레오티드 합성이 고밀도의 분리된 올리고뉴클레오티드 좌위들을 가질 수 있는 기판 상에서 달성될 수 있다.

[0381] 올리고뉴클레오티드의 제자리 합성은 전형적으로 상대적으로 소수성을 갖고 나중에 그의 표면 에너지에 영향을 미치는 올리고뉴클레오티드 특징부의 합성에 따라 점진적으로 점점 더 친수성을 갖게 되는 고체 지지체를 사용함으로써 시작된다. 올리고뉴클레오티드 특징부는 올리고뉴클레오티드 길이의 증가에 따라 상당한 표면 에너지를 획득할 수 있다. 일반적으로, 보호된 올리고뉴클레오티드로 구성된 이 부위 또는 특징부는 약 10 내지 20 합성 주기 후 포스포라미다이트 합성에서 통상적으로 사용되는 높은 표면 장력 유기 용매, 예컨대, 아세토니트릴 또는 프로필렌 카보네이트에 자발적으로 적셔지기에 충분한 표면 에너지를 획득한다. 본 발명의 방법 및 조성물은 올리고뉴클레오티드 합성의 좌위 상에서의 변하는 표면 성질을 해결하기 위해 성장하는 올리고뉴클레오티드의 합성 동안 길이의 함수로서 파라미터, 예컨대, 시간, 유속, 온도, 부피, 점도 또는 시약 농도를 변경시킬 수

있게 한다. 이러한 변경은 합성의 주기를 반복할 때 파라미터를 일정하게 또는 증가시키면서 연속적으로 변화시킴으로써 적용될 수 있다. 대안적으로, 파라미터는 합성의 선택된 주기에서만 변화될 수 있고 임의적으로 패턴을 따를 수 있다(예컨대, 2 주기마다, 3 주기마다, 4 주기마다, 5 주기마다, 6 주기마다, 7 주기마다, 8 주기마다, 9 주기마다 또는 10 주기마다 변화될 수 있다).

[0382] 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 기판 상에서 합성된 올리고뉴클레오티드들의 라이브러리를 예상하는데, 이때 상기 라이브러리는 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 다양한 크기의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 추가로, 본 발명의 방법 및 조성물은 다양한 크기, 서열 또는 뉴클레오티드 조성의 실질적으로 유사한 양의 올리고뉴클레오티드들 또는 일부 경우 상이한 미리 선택된 양의 올리고뉴클레오티드들이 기판 상에서 합성될 수 있게 한다. 양에서의 편차는 임의의 2개의 합성된 올리고뉴클레오티드들 사이에 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.1% 미만까지 한정될 수 있거나, 대안적으로 라이브러리에 걸쳐 상대적 오류 또는 퍼센트 편차로서 한정될 수 있다. 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 원하는 양으로 기판 상에서 합성된 올리고뉴클레오티드를 예상한다.

[0383] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 기판 상에서 올리고뉴클레오티드들의 라이브러리가 합성될 수 있게 하는데, 이때 각각의 올리고뉴클레오티드의 화학양론은 합성된 특징부의 상대적인 수를 변경시킴으로써 엄격히 조절되고 조정될 수 있다. 기판의 분해된 좌위들 상에서 성장하는 올리고뉴클레오티드의 밀도를 미세하게 조정하기에 적합한 표면 작용화 및 코팅은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있고 기판의 모든 마이크로구조물들에 균일하게 적용될 수 있거나, 대안적으로 선택된 양 및 비로 개별 마이크로구조물에 적용될 수 있다.

[0384] 제자리 합성 방법은 펩티드 어레이를 합성하는, 미국 특허 제5,449,754호에 기재된 방법; 및 포스포라미다이트 또는 다른 화학반응을 이용하여 폴리뉴클레오티드(구체적으로, DNA)를 합성하는, PCT 공보 제WO 98/41531호 및 이 공보에서 인용된 참고문헌에 기재된 방법을 포함한다. 제자리 핵산 어레이 합성 프로토콜 및 디바이스를 기술하는 추가 특허는 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공보 제2013/0130321호 및 제2013/0017977호, 및 이 공보에서 인용된 참고문헌을 포함한다.

[0385] 이러한 제자리 합성 방법은 기본적으로 보호된 단량체의 점적을 기판 상의 예정된 위치 상에 침착시켜 적절하게 활성화된 기판 표면(또는 미리 침착된 탈보호된 단량체)과 연결하고; 침착된 단량체가 나중에 침착된 보호된 단량체와 반응할 수 있도록 침착된 단량체를 탈보호하고; 연결을 위해 또 다른 보호된 단량체를 침착시키는 순서를 반복하는 것으로서 간주될 수 있다. 상이한 단량체들은 완성된 어레이의 상이한 영역들이 완성된 어레이에서 요구될 때 상이한 생물중합체 서열을 보유하도록 어느 한 주기 동안 기판 상의 상이한 영역들에서 침착될 수 있다. 하나 이상의 중간 추가 단계, 예컨대, 산화, 황화 및/또는 세척 단계가 각각의 반복에서 요구될 수 있다.

[0386] 단일 기판 상에서 올리고뉴클레오티드들의 어레이를 생성하는 데에 이용될 수 있는 다양한 방법들이 미국 특허 제5,677,195호, 미국 특허 제5,384,261호 및 PCT 공보 제WO 93/09668호에 기재되어 있다. 이 출원들에 개시된 방법에서, 시약은 (1) 미리 정해진 영역 상에서 정해진 채널 내에서의 유동, (2) 미리 정해진 영역 상에서의 "스폿팅(spotting)", 또는 (3) 포토레지스트의 사용을 통해 기판에게 전달될 수 있다. 그러나, 스폿팅과 유동의 조합뿐만 아니라 다른 방법도 이용될 수 있다. 각각의 경우, 기판의 일부 활성화된 영역들은 단량체 용액이 다양한 반응 부위들에게 전달될 때 다른 영역으로부터 기계적으로 분리된다. 따라서, 올리고뉴클레오티드의 제자리 합성은 당분야에서 공지되어 있는 다양한 적합한 합성 방법들을 본원에 기재된 방법 및 조성물에 적용함으로써 달성될 수 있다. 이러한 한 방법은 광불안정성 보호기를 사용하여 고체 또는 중합체성 표면 상의 분리된 예정된 부위들에서 올리고뉴클레오티드를 직접적으로 제자리 합성하는 단계를 포함하는 포토리쏘그래피 기법에 기초한다(Kumar et al., 2003). 하이드록실 기는 표면 상에서 생성될 수 있고 광불안정성 보호기에 의해 차단될 수 있다. 표면이 예를 들면, 포토리쏘그래피 마스크를 통해 UV 광에 노출될 때, 표면 상의 자유 하이드록실 기들의 패턴이 생성될 수 있다. 이 하이드록실 기들은 포스포라미다이트 화학반응에 따라 광보호된 뉴클레오시드 포스포라미다이트와 반응할 수 있다. 제2 포토리쏘그래피 마스크가 적용될 수 있고, 표면이 UV 광에 노출되어 하이드록실 기들의 제2 패턴을 생성한 후 5'-광보호된 뉴클레오시드포스포라미다이트와 커플링될 수 있다. 마찬가지로, 패턴이 생성될 수 있고 올리고머 쇄가 연장될 수 있다. 5'-하이드록실 작용기로부터 깨끗하고 신속하게 제거될 수 있는 여러 광불안정성 보호기들이 당분야에서 공지되어 있다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 광절단 가능한 기의 불안정성은 사용된 용매의 파장 및 극성에 의존하고, 광절단의 속도는 광의 노출 지속시간 및 강도에 의해 영향을 받을 수 있다. 이 방법은 다수의 인자들, 예를 들면, 마스크의 정렬에서의 정확성, 광 보호기의 제거 효율 및 포스포라미다이트 커플링 단계의 수율에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 인접 부위들 내로의 광의 의

도되지 않은 누출이 최소화될 수 있다. 스폿당 합성된 올리고머의 밀도는 합성 표면 상에서의 리더 뉴클레오시드의 적재를 조절함으로써 모니터링될 수 있다.

[0387] 본 발명의 방법 및 조성물은 당분야에서 잘 공지되어 있는 다수의 적합한 구축 기법들, 예를 들면, 마스크 부재 어레이 합성기, 마스크를 사용하는 광-유도된 방법, 유동 채널 방법, 스폿팅 방법 등을 이용할 수 있다는 것이 이해된다. 일부 실시양태들에서, 마스크 부재 어레이 합성기(MAS)를 이용하여 고체 지지체 상에서 구축 및/또는 선택 올리고뉴클레오티드를 합성할 수 있다. 마스크 부재 어레이 합성기는 예를 들면, PCT 공보 제WO 99/42813호 및 상응하는 미국 특허 제6,375,903호에 기재되어 있다. 어레이 내의 각각의 특징부가 원하는 서열의 단일 가닥 DNA 분자를 가진 주문제작 DNA 마이크로어레이를 제작할 수 있는 마스크 부재 기계의 다른 예가 공지되어 있다. 구축 및/또는 선택 올리고뉴클레오티드를 합성하는 다른 방법은 예를 들면, 마스크를 사용하는 광-유도된 방법, 유동 채널 방법, 스폿팅 방법, 핀(pin)-기초 방법, 및 다수의 지지체들을 사용하는 방법을 포함한다. 올리고뉴클레오티드의 합성을 위해 마스크를 사용하는 광-유도된 방법(예를 들면, VLSIPS™ 방법)은 예를 들면, 미국 특허 제5,143,854호, 제5,510,270호 및 제5,527,681호에 기재되어 있다. 이 방법들은 고체 지지체의 미리 정해진 영역을 활성화시킨 후, 상기 지지체를 미리 선택된 단량체 용액과 접촉시키는 단계를 포함한다. 선택된 영역은 통합된 회로 제작에서 이용되는 포토리쏘그래피 기법의 방식으로 마스크를 통해 광원으로 방사선조사함으로써 활성화될 수 있다. 조명이 마스크에 의해 차단되기 때문에 지지체의 다른 영역들은 불활성 상태로 남아있고 화학적으로 보호된 상태로 남아있다. 따라서, 광 패턴은 지지체의 어떤 영역이 주어진 단량체와 반응하는지를 정한다. 상이한 미리 정해진 영역 세트들을 반복적으로 활성화시키고 상이한 단량체 용액을 지지체와 접촉시킴으로써 지지체 상에서 중합체들의 다양한 어레이를 생성한다. 다른 단계, 예컨대, 지지체로부터 비반응된 단량체 용액을 세척하는 단계가 임의적으로 이용될 수 있다. 다른 적용가능한 방법은 기계적 기법, 예컨대, 미국 특허 제5,384,261호에 기재된 기법을 포함한다. 단일 지지체 상에서의 구축 및/또는 선택 올리고뉴클레오티드의 합성에 적용될 수 있는 추가 방법들은 예를 들면, 미국 특허 제5,384,261호에 기재되어 있다. 예를 들면, 시약은 미리 정해진 영역 상의 정해진 채널 내에서의 유동 또는 미리 정해진 영역 상에서의 "스폿팅"에 의해 지지체에게 전달될 수 있다. 스폿팅과 유동의 조합뿐만 아니라 다른 방법들도 이용될 수 있다. 각각의 경우, 지지체의 일부 활성화된 영역들은 단량체 용액이 다양한 반응 부위들에게 전달될 때 다른 영역으로부터 기계적으로 분리된다. 유동 채널 방법은 고체 지지체 상에서의 올리고뉴클레오티드의 합성을 조절하기 위해 예를 들면, 마이크로플루이딕 시스템을 이용한다. 예를 들면, 적절한 시약이 유동하거나 적절한 시약이 배치되는 유동 채널을 지지체의 표면 상에서 또는 내에서 형성함으로써 고체 지지체의 선택된 영역에서 다양한 중합체 서열들을 합성할 수 있다. 고체 지지체 상에서 올리고뉴클레오티드를 제조하는 스폿팅 방법은 반응물들을 선택된 영역 또는 이것에 유체 연결된 구조물 내에 직접적으로 침착시킴으로써 상대적으로 작은 양의 반응물을 전달하는 단계를 포함한다. 일부 단계들에서, 전체 지지체 표면은 용액으로 분무될 수 있거나 다른 방식으로 코팅될 수 있다. 단량체 용액의 정확히 측정된 분취액은 영역들 사이를 이동하는 분배기에 의해 적가 방식으로 침착될 수 있다. 고체 지지체 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 핀-기초 방법은 예를 들면, 미국 특허 제5,288,514호에 기재되어 있다. 핀-기초 방법은 복수의 핀들 또는 다른 연장부들을 가진 지지체를 사용한다. 핀은 트레이 내의 개별 시약 용기 내로 동시에 각각 삽입된다.

[0388] 대안적 방법에서, 고밀도 마이크로어레이의 광-유도된 합성은 5'-3' 방향으로 달성될 수 있다(Albert et al., 2003). 3'-말단이 효소적 반응, 예컨대, 서열 특이적 프라이머 연장 및 라이게이션 반응을 위해 이용될 수 있기 때문에, 이 방법은 하류 반응, 예컨대, 병렬식 유전형분석(genotyping) 또는 서열결정이 합성 표면 상에서 수행될 수 있게 한다. 광보호된 5'-OH 기의 완전한 또는 실질적으로 완전한 탈보호, 또는 NPPOC(2-(2-니트로페닐)프로폭시 카보닐)의 염기-보조된 광-탈보호가 이용될 수 있다(Beier et al., 2002).

[0389] 본원에 기재된 방법 및 조성물은 평평한 또는 불규칙한 표면을 비롯한, 다양한 형상들의 기판들 상에서의 제자리 합성을 이용한 합성 핵산의 제조를 용이하게 할 수 있다. 이 기판들에 적합한 다양한 재료들, 예를 들면, 실리콘이 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있다. 기판은 합성 동안 다수의 상이한 서열들로 적재될 수 있다. 기판 상에서의 제자리 합성 방법은 통상적인 지지체 상의 주소지정가능한 위치에서 상이한 정해진 서열들의 다수의 올리고머들이 제조될 수 있게 한다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은 본원의 다른 부분에 더 기재되어 있는 바와 같이 보다 더 길고 보다 더 높은 품질을 가진 올리고뉴클레오티드의 제자리 합성을 가능하게 한다. 합성 단계는 다양한 공급재료 세트들, 올리고뉴클레오티드 합성의 경우 대체로 4종의 염기 A, G, T 및 C를 도입할 수 있고, 당분야에서 공지되어 있는 적합한 변형된 염기들(이들 중 일부는 본원에 기재되어 있음)도 지지체 또는 기판 상에서 분리된 방식으로 핵산 중합체의 원하는 서열을 구축하는 데에 사용될 수 있다.

[0390] 고체 지지체, 예를 들면, 어레이 상에서의 고밀도 올리고뉴클레오티드의 제작 및 적용은 예를 들면, PCT 공보

제WO 97/10365호, PCT 공보 제WO 92/10588호, 1996년 12월 23일자로 출원된 미국 특허 제6,309,822호, 1995년 9월 15일자로 출원된 미국 특허 제6,040,138호, 1993년 12월 15일자로 출원된 미국 특허출원 제08/168,904호, 1990년 12월 6일자로 출원된 미국 특허출원 제07/624,114호, 1990년 6월 7일자로 출원된 미국 특허출원 제07/362,901호, 및 미국 특허 제5,677,195호(이들 모두가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 도입됨)에도 이미 개시되어 있다. 고밀도 어레이를 사용하는 일부 실시양태들에서, 방법, 예컨대, 미국 특허 제5,445,934호 및 제6,566,495호(이들 둘 다가 모든 목적을 위해 본원에 참고로 도입됨)에 개시된 대규모 고정된 중합체 합성(VLSIPS)을 이용하여 고밀도 올리고뉴클레오티드 어레이를 합성한다. 각각의 올리고뉴클레오티드는 기판 상의 공지된 위치를 점유한다.

[0391] 최소한 수의 합성 단계들을 이용하여 올리고뉴클레오티드, 펩티드 및 다른 중합체 서열의 고밀도 어레이를 형성하는 다양한 다른 적합한 방법들이 당분야에서 공지되어 있다. 광-유도된 화학적 커플링 및 기계적으로 유도된 커플링을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 방법들로 올리고뉴클레오티드 유사체 어레이를 고체 기판 상에서 합성할 수 있다. 예를 들면, 광-유도된 합성 기법을 이용하여 펩티드, 올리고뉴클레오티드 및 다른 분자의 거대한 어레이를 형성하는 방법을 개시하는, 미국 특허 제5,143,854호(Pirrung et al.)(PCT 공보 제WO 90/15070호도 참조), 및 PCT 공보 제WO 92/10092호 및 제WO 93/09668호 및 미국 특허출원 제07/980,523호(Fodor et al.)를 참조한다. 문헌(Fodor et al., Science, 251, 767-77 (1991))도 참조한다. 중합체 어레이의 합성을 위한 이 절차들은 현재 VLSIPS 절차로서 지칭된다. VLSIPS 방법을 이용하여 다수의 반응 부위들에서의 동시적 커플링을 통해 중합체들의 한 불균일 어레이를 상이한 불균일 어레이로 전환시킨다. 미국 특허출원 제07/796,243호 및 제07/980,523호를 참조한다.

[0392] 폴리아미드 골격을 가진 올리고뉴클레오티드 유사체가 VLSIPS 절차에서 사용되는 경우, 단량체들이 포스페이트 연결을 통해 서로 부착되지 않기 때문에, 포스포라미다이트 화학반응을 이용하여 합성 단계를 수행하는 것이 종종 적합하지 않다. 대신에, 펩티드 합성 방법이 예를 들면, 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,143,854호(Pirrung et al.)에 기재된 바와 같이 대체될 수 있다.

[0393] 개별 분자 종들은 예를 들면, 잉크젯 프린팅 기술에 기초한 소위 제자리 스폿팅 방법 또는 압전 기법의 경우와 마찬가지로 합성 공급재료의 첨가를 위한 별도의 유체 구획에 의해 분리될 수 있다(A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996). 올리고뉴클레오티드의 분리된 제자리 합성은 선택적 조명, 활성화 시약(탈보호 시약)의 선택적 또는 공간적으로 분리된 생성, 또는 활성화 시약(탈보호 시약)의 선택적 첨가를 통해 가능한, 합성 부위의 공간적으로 분리된 활성화에 의해 달성될 수도 있다.

[0394] 현재까지 공지되어 있는 어레이의 제자리 합성 방법의 예는 포토리쏘그래피 광-기초 합성(McGall, G. et al.; J. Amer. Chem. Soc. 119; 5081-5090; 1997), 프로젝터-기초 광-기초 합성(PCT/EP99/06317), 반응 공간의 물리적 분리에 의한 유체 합성(이. 사우던(E. Southern) 교수(영국 옥스포드)와 옥스포드 진 테크놀로지스(Oxford Gene Technologies)(영국 옥스포드 소재)의 연구로부터 당업자에게 공지되어 있음), 반응 지지체 내의 광-활성화된 광-산 및 적합한 반응 챔버 또는 물리적으로 분리된 반응 공간에 의한 간접 프로젝터-기초 광-조절된 합성, 전극에 의해 유도된 양성자 생성을 이용하는, 지지체 상의 개별 전극 상에서의 공간적으로 분리된 탈보호에 의한 전자적으로 유도된 합성, 및 활성화된 합성 단량체의 공간적으로 분리된 침착에 의한 유체 합성(문헌(A. Blanchard, in Genetic Engineering, Principles and Methods, Vol. 20, Ed. J. Sedlow, 111-124, Plenum Press; A. P. Blanchard, R. J. Kaiser, L. E. Hood, High-Density Oligonucleotide Arrays, Biosens. & Bioelectronics 11, 687, 1996)으로부터 공지되어 있음)이다.

[0395] 통상적인 고체 지지체 상에서 합성 핵산, 특히 핵산 이중 가닥을 제조하는 방법도 PCT 공보 제WO 00/49142호 및 제WO 2005/051970호(이들 둘 다가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)로부터 공지되어 있다.

[0396] 핵산 어레이의 제자리 합성은 보다 더 전통적인 5'에서 3' 방향뿐만 아니라 3'에서 5' 방향으로도 달성될 수 있다. 시약의 첨가는 예를 들면, 적절한 뉴클레오티드 포스포라미다이트 및 활성화제를 기판 표면, 예를 들면, 코팅된 실리콘 웨이퍼 표면 상의 또는 내의 각각의 분해된 좌위에 펄스-젯(pulse-jet) 침착시킴으로써 달성될 수 있다. 기판의 분해된 좌위들은 동시에 수행될 수 있는 다른 포스포라미다이트 주기 단계들(5'-하이드록실 기의 탈보호, 산화, 황화 및/또는 황화)의 추가 시약들로 더 처리될 수 있다. 침착 및 통상적인 포스포라미다이트 주기 단계들은 올리고뉴클레오티드 합성 웨이퍼의 이동 없이 수행될 수 있다. 예를 들면, 기판의 한 표면부터 반대 표면까지 기판을 통해 시약을 유동시킴으로써 시약을 기판 내의 분해된 좌위들 상에 통과시킬 수 있다. 대안

적으로, 포스포라미다이트 주기 단계들의 일부를 위해 기판을 예를 들면, 유동셀 쪽으로 이동시킬 수 있다. 그 다음, 단량체의 다음 층을 프린팅하기 전에, 기판을 재위치시킬 수 있고/있거나, 재등록할 수 있고/있거나 재정렬할 수 있다.

[0397] 제자리 제작의 경우 폴리뉴클레오티드 전구체 유닛(예컨대, 단량체), 또는 미리 합성된 폴리뉴클레오티드의 펄스-젯으로부터의 점적 침착을 이용하여 올리고뉴클레오티드를 가진 기판을 제작할 수 있다. 이러한 방법은 예를 들면, 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공보 제2013/0130321호 및 제2013/0017977호, 및 이들 내에서 인용된 참고문헌에 상세히 기재되어 있다. 이 참고문헌들은 본원에 참고로 도입된다. 본원의 다른 부분에 기재되어 있는 바와 같이 제작을 위해 다른 점적 침착 방법을 이용할 수 있다. 또한, 당분야에서 공지되어 있는 바와 같이, 점적 침착 방법 대신에 광-유도된 제작 방법을 이용할 수 있다. 계면특징부 영역은 특히 어레이가 광-유도된 합성 프로토콜에 의해 제조될 때 존재할 필요가 없다.

[0398] 다양한 공지된 제자리 제작 디바이스들이 개조될 수 있는데, 이때 대표적인 펄스-젯 디바이스는 미국 특허출원 공보 제2010/0256017호, 미국 특허출원 공보 제20120050411호 및 미국 특허 제6,446,682호(이 특허들의 개시내용은 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 펄스-젯 디바이스들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0399] 다양한 실시양태들에서, 이미 수득된 생물중합체의 침착 또는 제자리 합성 방법을 이용하여 기판 상에서 또는 내부에서 생물중합체 어레이를 제작할 수 있다. 침착 방법은 전형적으로 생물중합체가 그에 연결될 수 있도록 적절하게 활성화되는 기판 상의 또는 내의 예정된 위치에서 생물중합체를 침착시키는 단계를 포함한다. 상이한 서열의 생물중합체들은 기판 상의 또는 내의 상이한 영역들에서 침착될 수 있다. 이미 수득된 폴리뉴클레오티드, 특히 DNA, 예컨대, 전체 올리고머 또는 cDNA의 침착을 위한 당분야에서 공지되어 있는 전형적인 절차는 폴리뉴클레오티드를 펄스-젯 헤드 형태의 점적 분배기 내로 적재하고 기판 상에 발포하는 절차를 포함하나 이것으로 한정되지 않는다. 이러한 기법은 PCT 공보 제WO 95/25116호 및 제WO 98/41531호(이들 둘 다가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다. 점적을 기판의 분리된 부위들에 침착시키기 위한 잉크젯의 다양한 적합한 형태들은 당분야에서 공지되어 있다.

[0400] 일부 실시양태들에서, 본 발명은 전체 올리고뉴클레오티드 라이브러리 또는 이의 일부, 예를 들면, 표면 상에 고정된 올리고뉴클레오티드 라이브러리 내에서의 미리 합성된 올리고뉴클레오티드의 사용에 의존할 수 있다. 고밀도의 핵산 어레이를 지지하는 기판은 기판 상에, 기판 내에 또는 기판을 통해 예정된 위치에서 미리 합성된 또는 천연 핵산을 침착시킴으로써 제작될 수 있다. 합성된 또는 천연 핵산은 광-유도된 표적화, 올리고뉴클레오티드-유도된 표적화, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 방법에 의해 기판의 특정 위치 상에서 침착될 수 있다. 핵산은 특정 위치로 향할 수도 있다. 특정 스폿에서 핵산을 침착시키기 위해 영역들 사이를 이동하는 분배기를 이용할 수 있다. 분배기는 선택된 영역으로 이어지는 마이크로채널을 통해 핵산을 침착시킬 수 있다. 전형적인 분배기는 핵산을 기판에 전달하기 위한 마이크로피펫 또는 모세관 핀, 및 기판에 대한 마이크로피펫의 위치를 조절하기 위한 로봇 시스템을 포함한다. 다른 실시양태에서, 분배기는 다양한 시약들이 반응 영역에게 동시에 전달될 수 있도록 일련의 튜브들, 매니폴드, 피펫 또는 모세관 핀의 어레이 등을 포함한다.

[0401] 미리 합성된 올리고뉴클레오티드 및/또는 폴리뉴클레오티드 서열을 지지체에 부착시키는 것, 및 광-유도된 방법, 유동 채널 및 스폿팅 방법, 잉크젯 방법, 핀-기초 방법 및 비드-기초 방법을 이용하여 이를 제자리에서 합성하는 것은 하기 참고문헌들에 더 기재되어 있다: 문헌(McGall et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 13555); 문헌(Synthetic DNA Arrays In Genetic Engineering, Vol. 20: 111, Plenum Press (1998)); 문헌(Duggan et al. (1999) Nat. Genet. S21: 10); 문헌(Microarrays: Making Them and Using Them In Microarray Bioinformatics, Cambridge University Press, 2003); 미국 특허출원 공보 제2003/0068633호 및 제2002/0081582호; 미국 특허 제6,833,450호, 제6,830,890호, 제6,824,866호, 제6,800,439호, 제6,375,903호 및 제5,700,637호; 및 PCT 공보 제WO 04/031399호, 제WO 04/031351호, 제WO 04/029586호, 제WO 03/100012호, 제WO 03/066212호, 제WO 03/065038호, 제WO 03/064699호, 제WO 03/064027호, 제WO 03/064026호, 제WO 03/046223호, 제WO 03/040410호 및 제WO 02/24597호(이들의 개시내용은 모든 목적을 위해 전체로서 본원에 참고로 도입됨). 일부 실시양태들에서, 미리 합성된 올리고뉴클레오티드는 지지체에 부착되거나 스폿팅 방법의 이용을 통해 합성되는데, 이때 단량체 용액은 영역들 사이를 이동하는 분배기(예를 들면, 잉크젯)에 의해 적가 방식으로 침착된다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 기계적 파동에 의해 작동되는 분배기의 이용을 통해 지지체 상에 스폿팅된다.

[0402] 본원에 기재된 시스템은 복수의 지지체-결합된 올리고뉴클레오티드들을 가진 제1 스폿(또는 특징부)에게 점적을 제공하기 위한 구성원도 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 점적은 추가될 특정 또는 예정된 뉴클레오티드

를 가진 뉴클레오티드들 또는 올리고뉴클레오티드들(본원에서 뉴클레오티드 추가 구축물로서도 지칭됨), 및/또는 혼성화, 변성, 쇄 연장 반응, 라이게이션 및 분해 중 하나 이상을 가능하게 하는 시약을 포함하는 하나 이상의 조성물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 예정된 올리고뉴클레오티드 서열들의 어레이(상이한 예정된 올리고뉴클레오티드 서열들을 가진 지지체의 상이한 특징부들)를 발생시키기 위해 어느 한 반복 실시 동안 지지체 상의 상이한 주소들(adresses)에서 상이한 조성물들 또는 상이한 뉴클레오티드 추가 구축물들을 침착시킬 수 있다. 조성물을 침착시키는 특히 유용한 한 방식은 지지체 표면으로부터 공간적으로 분리된 펄스-젯 디바이스로부터 원하는 시약(예를 들면, 뉴클레오티드 추가 구축물)을 각각 함유하는 하나 이상의 점적을 지지체 표면, 또는 지지체 표면 내에 구축된 특징부 상에 침착시키는 것이다.

[0403] 서브유닛으로부터 중합체를 합성하는 화학적 방법을 자동화하는 것을 가능하게 하기 위해, 성장하는 분자 쇄가 고착되는 고체상을 종종 사용한다. 합성의 완료 시, 상기 중합체를 잘라낼 수 있는데, 이것은 실제 중합체와 고체상 사이의 적합한 링커를 분해함으로써 달성될 수 있다. 자동화를 위해, 상기 방법은 기판 표면을 직접적으로 사용할 수 있거나, 상기 방법은 기판, 예를 들면, 조절된 다공성 유리(CPG) 내의 컬럼 또는 마이크로채널 내에 팩킹되는 활성화된 입자의 형태로 고체상의 기판 표면을 사용할 수 있다. 기판 표면은 종종 예정된 서열을 가진, 특이적으로 제거가능한 한 유형의 올리고머를 보유할 수 있다. 그 다음, 개별 합성 시약이 조절가능한 방식으로 첨가될 수 있다. 합성된 분자의 양은 전용된 기판 표면의 크기, 지지체 물질의 양, 반응 회분(batch)의 크기, 합성을 위해 이용가능한 작용화된 기판 면적, 작용화의 정도, 또는 합성 반응의 지속시간을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다양한 인자들에 의해 조절될 수 있다.

[0404] 따라서, 본 발명의 다양한 실시양태들은 조성물, 전형적으로 올리고뉴클레오티드의 라이브러리를 보유하는 기판의 제조 및 용도에 관한 것이다. 분리된 특징부들을 가진 기판은 기판 상의 특정 예정된 위치(즉, "주소")의 영역(즉, 기판의 "특징부" 또는 "스폿")이 특정 표적 또는 특정 부류의 표적들을 검출하도록(비록 특징부가 그 위치의 비-표적을 우발적으로 검출할 수 있을지라도) 상이한 모이어티들(예를 들면, 상이한 폴리뉴클레오티드 서열들)의 다수의 영역들을 가질 때 "주소지정가능"하다. 기판 특징부는 전형적으로 개재 공간에 의해 분리되어 있으나 반드시 그러할 필요는 없다. 일부 경우, 특징부는 기판 내에 구축될 수 있고 1차원적, 2차원적 또는 3차원적 마이크로플루이딕 형상을 생성할 수 있다. "기판 배치"는 특징부, 예컨대, 기판 상에 위치하는 특징부, 하나 이상의 특징부 치수 및 주어진 위치에서의 모이어티의 표시 중 하나 이상의 특성을 지칭한다.

[0405] **다른 분자의 합성**

[0406] 본 방법 및 조성물은 다른 유형의 관심있는 분자를 합성하는 데에 이용될 수 있다. 선택된 격자 영역에서의 펩티드의 합성이 이러한 한 경우이다. 어레이 표면 상에서의 펩티드의 단계적 성장에 이용되는 다양한 적합한 화학반응들이 당분야에서 공지되어 있다. 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,449,754호에 기재된 펩티드 합성 기법이 본 발명과 함께 이용될 수 있다. 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물은 약물 또는 단백질 억제제의 화학적 합성, 또는 복수의 화합물들의 신속한 합성이 요구되는 임의의 화학적 합성에서 사용될 수도 있다.

[0407] **유전자 조립**

[0408] 다양한 실시양태들에서, 본 발명은 기판 표면, 또는 대안적으로 올리고뉴클레오티드, 예를 들면, 비드의 합성 또는 스폿팅에 적합한 표면을 보유하는 기판 상에서 합성되었거나 스폿팅된 중첩되는 보다 더 짧은 올리고뉴클레오티드들의 조립을 이용하여 폴리뉴클레오티드 서열("유전자"로서도 지칭됨)을 제조하는 것에 관한 것이다. 예를 들면, 가닥 치환 활성을 결여하는 중합효소, 리가제, 클릭 화학반응, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 조립 방법을 이용하여 연속적인 조립된 올리고뉴클레오티드들에 상보적인 영역을 가진 어닐링 올리고뉴클레오티드들을 사용하여 동일한 가닥 상에서 상기 보다 더 짧은 올리고뉴클레오티드들을 함께 패치워킹(patchworking)할 수 있다. 이 방식으로 반대 가닥의 연속적인 올리고뉴클레오티드들 사이에서 어닐링 뉴클레오티드의 서열이 복제될 수 있다. 일부 경우, 예를 들면, 리가제, 클릭 화학반응, 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 조립 화학반응을 이용하여 어닐링 올리고뉴클레오티드로부터의 서열 요소를 도입하지 않으면서 동일한 가닥의 연속적인 올리고뉴클레오티드들을 스티칭(stitching)할 수 있다. 일부 경우, 보다 더 짧은 폴리뉴클레오티드/올리고뉴클레오티드를 이용하는 조립의 라운드를 통해 보다 더 긴 폴리뉴클레오티드를 계층적으로 합성할 수 있다.

[0409] 바이러스 게놈(7.5 kb; Cello et al, Science, 2002, 297, 1016), 박테리오파지 게놈(5.4 kb; Smith et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100, 15440), 및 32 kb만큼 큰 유전자 클러스터(Kodumal et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, 101, 15573)의 합성에 기재되어 있는 바와 같이 큰 폴리뉴클레오티드를 조립함으

로써 올리고뉴클레오티드로부터 유전자 또는 게놈을 드 노보로 합성할 수 있다(상기 문헌들 모두가 전체로서 본원에 참고로 도입됨). 벤터(Venter)와 그의 동료들에 의해 문헌(582 kb the genome assembly of a bacterium (Mycoplasma genitalium); Gibson et al, Science, 2008, 319, 1215)(전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있는 방법에 따라 긴 합성 DNA 서열의 라이브러리를 제작할 수 있다. 나아가, 15 kb 핵산의 경우에 대해 기재되어 있는 바와 같이, 큰 DNA 생물분자를 올리고뉴클레오티드로 구축할 수 있다(Tian et al, Nature, 2004, 432, 1050; 전체로서 본원에 참고로 도입됨). 본 발명의 방법 및 조성물은 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 유전자 조립 방법을 이용함으로써 드 노보 합성된 폴리뉴클레오티드 서열의 큰 라이브러리를 예상한다. 이러한 서열의 합성은 전형적으로 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 기판의 적합한 영역 상에서 고밀도로 동시에 수행된다. 또한, 이 큰 라이브러리는 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 매우 낮은 오류율로 합성될 수 있다.

[0410] 유전자는 풀링되는 다수의 합성된 올리고뉴클레오티드들로부터 조립될 수 있다. 예를 들면, 600개의 상이한 올리고뉴클레오티드들의 풀을 사용한 유전자 합성은 문헌(Tian et al. Nature, 432:1050, 2004)에 기재되어 있는 바와 같이 적용될 수 있다. 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드를 사용하여 조립된 유전자의 길이를 더 연장시킬 수 있다. 훨씬 더 큰, 예를 들면, 약 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 또는 5 kb보다 더 큰 유전자 및 DNA 단편의 경우, 전형적으로 계층적 유전자 조립 공정 내에서 1 초과의 라운드의 합성이 적용될 수 있다. 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드로부터의 PCR 조립 및 합성은 이하에 기재되어 있는 바와 같이 일련의 용도를 위해 개조될 수 있다.

[0411] 리가제 연쇄 반응(LCR)(Chalmers and Curnow, Biotechniques, 30(2), 249-52, 2001; Wosnick et al, Gene, 60(1), 115-27, 1987)과 같은 방법부터 일련의 PCR 방법들(Stemmer et al, 164, Gene, 49-53, 1995; Prodromou and L. H. Pearl, 5(8), Protein Engineering, 827-9, 1992; Sandhu et al, 12(1), BioTechniques, 14-6, 1992; Young and Dong, Nucleic Acids Research, 32(7), e59, 2004; Gao et al, Nucleic Acids Res., 31, e143, 2003; Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32(12), e98, 2004)에 이르는 다양한 유전자 조립 방법들이 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 사용될 수 있다(도 11). 대다수의 조립 프로토콜들은 중첩되는 합성된 올리고머들의 풀로 시작되고 조립된 유전자의 PCR 증폭으로 종결되지만, 이 두 시점들 사이의 경로는 꽤 상이할 수 있다. LCR의 경우, 초기 올리고머 집단은 리가제, 예를 들면, Pfu DNA 리가제가 이 "빌딩 블록들"을 함께 공유연결하여 초기 주형을 형성할 수 있게 하는 인산화된 5' 말단을 가진다. 그러나, PCR 조립은 전형적으로 반복적 PCR 순환을 거쳐 연장시키고 전장 주형을 생성하는, 인산화되지 않은 올리고머를 사용한다. 추가로, LCR 공정은 μM 범위 내의 올리고머 농도를 요구할 수 있는 반면, 단일 가닥 PCR 방식 및 이중 가닥 PCR 방식은 훨씬 더 낮은(예를 들면, nM 범위) 농도를 요구한다.

[0412] 공개된 합성 시도는 중첩부(6 내지 40 bp)의 혼성화를 통해 조립하는, 20 내지 70 bp 크기의 올리고머를 사용하였다. 많은 인자들이 올리고머의 길이 및 조성(Tm, 이차 구조 등)에 의해 결정되기 때문에, 이 집단의 크기 및 불균일성은 조립 효율 및 조립된 유전자의 품질에 큰 영향을 미칠 수 있었다. 정확한 최종 DNA 생성물의 백분율은 "빌딩 블록" 올리고머의 품질 및 수에 의존한다. 보다 더 짧은 올리고머는 보다 더 긴 올리고머의 돌연변이율에 비해 더 낮은 돌연변이율을 갖지만, 보다 더 많은 올리고머들이 DNA 생성물의 구축을 위해 요구된다. 또한, 보다 더 짧은 올리고머들의 감소된 중첩부는 어닐링 반응의 T_m을 낮추고, 이것은 비-특이적 어닐링을 촉진하고 조립 공정의 효율을 감소시킨다. 본 발명의 방법 및 조성물은 낮은 오류율을 가진 긴 올리고뉴클레오티드를 전달함으로써 이 문제점을 해결한다.

[0413] 시변 열장(time varying thermal field)은 PCR 증폭 또는 PCA 반응이 일어날 수 있게 하는 마이크로플루이딕 디바이스의 시간 조절된 가열을 지칭한다. 시변 열장은 예를 들면, 반응기, 예를 들면, 나노반응기를 가진 디바이스 기판을 열적 가열 블록의 상부에 배치함으로써 외부적으로 적용될 수 있거나, 예를 들면, PCA 및 PCR 챔버 바로 아래에 위치한 박막 가열기로서 마이크로플루이딕 디바이스 내에 내장될 수 있다. 온도 조절기는 가열기 요소에 연결된, 또는 반응 챔버 내에 내장된 온도 센서와 함께 가열 요소의 온도를 변경시킬 수 있다. 타이머는 반응 챔버에 적용된 가열의 지속시간을 변경시킬 수 있다.

[0414] 열장의 온도는 PCR 또는 PCA 반응의 변성, 어닐링 및 연장 단계에 따라 달라질 수 있다. 전형적으로, 핵산을 약 95℃에서 2분 동안 변성시킨 후, 95℃에서 30초 동안의 변성, 40℃ 내지 60℃에서 30초 동안의 어닐링 및 약 72℃에서 30초 동안의 연장으로 구성된 주기를 30회 이상 수행하고 72℃에서 10분 동안 마지막으로 연장시킨다. 사용된 지속시간 및 온도는 올리고뉴클레오티드의 조성, PCR 프라이머, 증폭된 생성물 크기, 주형 및 사용된 시약, 예를 들면, 중합효소에 따라 달라질 수 있다.

[0415] 중합효소는 뉴클레오시드 트리포스페이트 또는 데옥시뉴클레오시드 트리포스페이트를 도입하여 PCR 프라이머,

올리고뉴클레오티드 또는 DNA 단편의 3' 하이드록실 말단을 연장시키는 효소이다. 중합효소에 관한 일반적인 논의에 대해서는 문헌(Watson, J. D. et al, (1987) Molecular Biology of the Gene, 4th Ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif)을 참조한다. 적합한 중합효소는 KOD 중합효소; Pfu 중합효소; Taq-중합효소; 이. 콜라이 DNA 중합효소 I; "클레나우(Klenow)" 단편; T7 중합효소; T4 중합효소; T5 중합효소; 및 역전사효소(이들 모두가 당분야에서 공지되어 있음)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 교정(proof-reading) 능력을 가진 중합효소, 예컨대, Pfu 및 파이로베스트(Pyrobest)를 사용하여 높은 신뢰도로 DNA를 복제할 수 있다. Pfu DNA 중합효소는 3'에서 5' 방향의 엑소뉴클레아제 교정 활성을 보유하므로, 뉴클레오티드 잘못 도입 오류를 보정할 수 있다. 본 발명의 다양한 실시양태들에서, 바람직하게는 핵산 단편들의 상호 상보적 분절들의 중첩되는 영역들 사이의 특이적 혼성화 반응으로 핵산 단편들을 함께 연결함으로써 보다 더 긴 합성 이중 가닥 핵산을 수득한다. 보다 더 긴 핵산의 구축에 사용된 개별 서열 분절은 예를 들면, 20개 내지 200개, 50개 내지 300개, 75개 내지 350개, 또는 100개 내지 400개 뉴클레오티드 빌딩 블록의 길이를 가질 수 있다. 당업자는 서열 분절 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 20 내지 350, 또는 200 내지 350)내에 속할 수 있다는 것을 인식한다.

[0416] 서열 분절은 바람직하게는 합성될 핵산 가닥이 개별 서열 분절들의 혼성화에 의해 구축될 수 있도록 합성될 상보적 핵산의 안티센스 가닥의 서열 분절과 적어도 부분적으로 중첩되는 방식으로 선택된다. 대안적 실시양태에서, 서열 분절은 바람직하게는 합성될 핵산의 양 가닥들 상의 서열 분절들이 완전히 중첩됨으로써 거의 완전한 이중 가닥의 제조만이 포스포디에스테르 골격의 공유연결을 요구하도록 선택된다. 개별 단편들 사이의 상보적 영역 또는 중첩부의 길이는 예를 들면, 10개 내지 50개, 10개 내지 100개, 12개 내지 25개, 20개 내지 80개, 15개 내지 20개, 또는 15개 내지 25개 뉴클레오티드 빌딩 블록일 수 있다. 당업자는 서열 분절 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 25 내지 100, 또는 10 내지 25)내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 2개의 핵산 단편들 사이의 중첩 또는 상보성 영역이 높은 AT 함량, 예를 들면, 50%, 60% 또는 65% 초과의 AT 함량을 가진 경우, 결합 상수는 GC가 더 풍부한 서열에 비해 더 낮다. 따라서, 열역학적 이유로, 이 단편들 사이의 혼성화는 비교적 낮은 효율의 혼성화일 수 있다. 이것은 2개 이상의 단편들의 조립에 영향을 미칠 수 있다. 가능한 서열 의존적 결과는 정확한 표적 서열을 가진 핵산 이중 가닥의 감소된 수율이다. 따라서, 유전자를 조립하기 위한 서열 분절은 중첩되는 영역에서 원하는 수준의 GC 함량, 예를 들면, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% 또는 65% 초과의 GC 함량을 갖도록 디자인될 수 있다. 예시적 유전자 조립 방법의 보다 더 상세한 논의는 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제8367335호에서 발견될 수 있다.

[0417] 다양한 실시양태들에서, 중합효소 연쇄 반응(PCR)-기초 방법 및 비-중합효소 순환 조립(PCA)-기초 방법이 화학적 유전자 합성을 위해 이용될 수 있다. 추가로, 효소적 유전자 합성, 어닐링 및 라이게이션 반응, 하이브리드 유전자를 통한 2개의 유전자들의 동시적 합성, 숏건 라이게이션 및 공-라이게이션, 삽입 유전자 합성, DNA의 한 가닥을 통한 유전자 합성, 주형-유도된 라이게이션, 리가제 연쇄 반응, 마이크로어레이-매개된 유전자 합성, 블루 헤론(Blue Heron) 고체 지지체 기술, 슬로닝 빌딩 블록 기술, RNA-매개된 유전자 조립, PCR에 기초한 열역학적으로 균형잡힌 인사이드-아웃(inside-out)(TBIO)(Gao et al., 2003), 이중 비대칭 PCR(DA-PCR)을 조합하는 2-단계 전체 유전자 합성 방법(Sandhu et al., 1992), 중첩 연장 PCR(Young and Dong, 2004), PCR-기초 2-단계 DNA 합성(PTDS)(Xiong et al., 2004b), 연속적인 PCR 방법(Xiong et al., 2005, 2006a), 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 다른 적합한 방법을 비롯한, 상이한 전략들 및 방법들을 이용한 비-PCA-기초 화학적 유전자 합성이 보다 더 짧은 올리고뉴클레오티드로부터 보다 더 긴 폴리뉴클레오티드를 조립하기 위해 본원에 기재된 방법 및 조성물과 함께 이용될 수 있다.

[0418] 본 발명의 방법 및 조성물을 이용함으로써 화학적으로 합성된 DNA 서열은 긴 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들면, 500개, 750개, 1000개, 1250개, 1500개, 1750개, 2000개, 2500개, 3000개, 4000개, 5000개, 6000개, 7500개, 10000개, 20000개, 30000개, 40000개, 50000개, 75000개 또는 100000개 염기쌍 초과의 폴리뉴클레오티드 서열까지 연장될 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물은 본원의 다른 부분에 더 기재되어 있는 바와 같이 매우 낮은 오류율을 가진 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드 서열도 허용한다.

[0419] 다양한 실시양태들에서, 중합효소 구축 및 증폭으로서 총칭되는 중합효소-매개된 조립 기법의 변법이 폴리뉴클레오티드의 화학적 합성을 위해 이용된다. 주문제작 유전자 합성 분야에서 공지되어 있는 통상적으로 이용되는 기술들 중 일부는 중합효소 순환 조립에 기초하고 올리고뉴클레오티드들의 풀의 조립을 통해 보다 더 긴 폴리뉴클레오티드의 드 노보 합성을 달성할 수 있다. 올리고뉴클레오티드들의 풀은 다양한 유전자 합성 기법들에서 사용될 빌딩 블록으로서 합성될 수 있다. 상기 풀 내의 임의의 서열 중첩부뿐만 아니라 올리고뉴클레오티드의 서열, 길이 및 정확한 분포도 원하는 폴리뉴클레오티드 서열 및 이용된 조립 방법에 따라 디자인될 수 있다. 예를

들면, 중첩되는 올리고뉴클레오티드들을 변성시키고 어닐링하고 연장시키기 위해 필요한 온도 조건을 이용한 PCR의 몇몇 단계들로 원하는 전장 DNA를 수득할 수 있다.

[0420] **PCR 조립(PCA)**

[0421] PCR 조립은 폴리뉴클레오티드들 중 하나 이상이 중합효소(예를 들면, 열안정성 중합효소, 예컨대, Taq 중합효소, VENT™ 중합효소(뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)), KOD(노바겐(Novagen)) 등)에 의한 폴리뉴클레오티드 쇄 연장을 겪을 수 있는 자유 3'-하이드록실을 갖도록 어닐링할 수 있는 상보적 말단을 가진 2개 이상의 올리고뉴클레오티드들과 함께 중합효소-매개된 쇄 연장을 이용한다. 중첩되는 올리고뉴클레오티드들은 dNTP들, 중합효소 및 완충제를 함유하는 표준 PCR 반응에서 혼합될 수 있다. 어닐링 시, 올리고뉴클레오티드들의 중첩되는 말단들은 PCR 반응에서 중합효소에 의한 연장을 위한 프라이머로서 작용하는 이중 가닥 핵산 서열의 영역을 생성한다. 연장 반응의 생성물은 보다 더 긴 이중 가닥 핵산 서열의 형성을 위한 기판으로서 작용하여, 결과적으로 전장 표적 서열의 합성을 야기한다. PCR 조건은 긴 표적 DNA 서열의 수율을 증가시키도록 최적화될 수 있다.

[0422] 다양한 PCR-기초 방법들을 이용하여 올리고뉴클레오티드로부터 유전자를 합성할 수 있다. 이 방법들은 열역학적으로 균형잡힌 인사이드-아웃(TBIO) 방법(Gao et al., Nucleic Acids Research, 31:e143, 2003), 연속적인 PCR(Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004), 이중 비대칭 PCR(DA-PCR)(Sandhu et al, Biotechniques, 12:14, 1992), 중첩 연장 PCR(OE-PCR)(Young and Dong, Nucleic Acids Research, 32:e59, 2004; Prodromou and Pearl, Protein Eng., 5:827, 1992) 및 PCR-기초 2-단계 DNA 합성(PTDS)(Xiong et al, Nucleic Acids Research, 32:e98, 2004)(이들 모두가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)을 포함하나 이들로 한정되지 않고, 마이크로플루이딕 디바이스에서 PCR 주형을 조립하도록 개조될 수 있다.

[0423] DA-PCR은 합성 유전자를 구축하는 1-단계 공정이다. 일례에서, 예를 들면, 15개 내지 17개 염기의 중첩부를 가진, 예를 들면, 17개 내지 100개 염기 길이의 4개 인접 올리고뉴클레오티드들이 PCR 반응에서 프라이머로서 사용된다. 다른 적합한 올리고뉴클레오티드 및 중첩부 크기는 본원에 더 기재된 본 발명의 범위 내에 있다. 2개의 내부 프라이머들의 양은 매우 한정되고, 그 결과 반응은 과량의 2개 플랭킹 프라이머들로 인해 전체 서열의 2개 절반의 비대칭 단일 가닥 증폭을 야기한다. 후속 PCR 주기에서, 서로 중첩되는 이 이중 비대칭적으로 증폭된 단편들은 이중 가닥 전장 생성물을 제공한다.

[0424] TBIO 합성은 유전자 서열의 아미노 말단 절반을 위해 센스 가닥 프라이머만을 요구하고 유전자 서열의 카복시 말단 절반을 위해 안티센스 가닥 프라이머만을 요구한다. 추가로, TBIO 프라이머는 온도-최적화된 프라이머 중첩부의 동일한 영역을 함유할 수 있다. TBIO 방법은 다음 쌍의 외부 프라이머들과 전체적으로 합성된 내부 단편의 말단들 사이의 상보성을 이용한다. TBIO 양방향 연장은 다음 라운드의 양방향 연장이 일어나기 전에 주어진 외부 프라이머 쌍에 대해 완료된다.

[0425] 연속적인 PCR은 센스 프라이머의 절반이 조립될 주형의 절반에 상응하고 안티센스 프라이머가 조립될 주형의 나머지 절반에 상응하는 단일 단계 PCR 방식이다. 이 방식을 이용할 때, 내부 프라이머 쌍을 사용한 증폭이 완료될 때까지 외부 프라이머 쌍을 사용한 양방향 증폭이 일어나지 않을 것이다.

[0426] PDTS는 전형적으로 2개의 단계들을 포함한다. 먼저, 관심있는 DNA의 개별 단편들을 합성한다: 본 발명의 일부 실시양태들에서, 약 20 bp 중첩부를 가진 10개 내지 12개의 올리고뉴클레오티드들, 예컨대, 약 60개, 80개, 100개, 125개, 150개, 175개, 200개, 250개, 300개 또는 350개 이상의 뉴클레오티드 길이를 가진 올리고뉴클레오티드들을 혼합하고, 중합효소, 예컨대, pfu DNA를 사용하여 PCR 반응을 수행하여 보다 더 긴 DNA 단편을 생성한다. 둘째, 관심있는 DNA의 전체 서열을 합성한다: 제1 단계로부터의 5개 내지 10개의 PCR 생성물들을 조합하고 프라이머로서의 2개의 최외각 올리고뉴클레오티드들과 함께 중합효소, 예컨대, 파이로베스트 DNA 중합효소를 사용하는 제2 PCR 반응을 위한 주형으로서 사용한다.

[0427] 짧은 올리고뉴클레오티드를 사용하는 PCR 조립이 상대적으로 보다 더 짧은 핵산의 경우 잘 작동하지만, 단일 반응 내에서 조립될 수 있는 올리고뉴클레오티드들의 최대 수에 대한 제한이 있을 수 있다. 이것은 이중 가닥 DNA 생성물에 대한 크기 제한을 부여할 수 있다. 이 문제점에 대한 해결책은 DNA를 연속적으로 제조하는 것이다. 이 방식에서, 다수의 보다 더 작은 DNA 분절들이 별도의 챔버 내에서, 다수의 칩 내에서 또는 연속적으로 동시에 합성된 후, 후속 PCR 증폭을 위해 "보다 더 큰" DNA 단편으로 조립될 PCA 반응용 전구체로서 함께 도입된다. 즉, 올리고뉴클레오티드를 사용하는 PCR 조립은 PCR 증폭을 위한 주형(제1-실행(run) 주형)을 생성할 것이다. 이렇게 생성된 다수의 제1-실행 주형들은 제1-실행 주형보다 더 큰 DNA 단편들의 PCA 조립용 전구체로서 작용하

여 제2-실행 주형을 생성할 수 있다. 이어서, 제2-실행 주형은 제3-실행 주형의 조립용 전구체 등으로서 작용할 수 있다. 상기 방식은 원하는 DNA가 수득될 때까지 반복될 수 있다.

[0428] 합성 반응에서 사용되는 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 올리고뉴클레오티드 자체보다 더 긴 핵산을 조립하기 위한 단일 가닥 분자이다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 20개 내지 200개, 50개 내지 300개, 75개 내지 350개, 또는 100개 내지 400개 뉴클레오티드 빌딩 블록일 수 있다. 당업자는 서열 분절 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 20 내지 350, 또는 200 내지 350) 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 복수의 올리고뉴클레오티드들을 함유하는 PCA 챔버는 유전자 또는 DNA 단편에 상응하는 주형을 생성하는 데에 필요한 올리고뉴클레오티드들의 풀을 지칭한다. 합성 반응 및 디바이스가 연속적으로 이용될 때, 후속 일련의 반응들에서 PCA 챔버는 PCR용 주형으로의 조립을 위해 출발 올리고뉴클레오티드 대신에 DNA 단편들의 풀을 함유할 것이다. 도 12는 중첩되는 올리고뉴클레오티드들의 풀로부터의 긴 구축물이 다수의 주기의 반응을 통해 점차적으로 더 긴 구축물로 조립되는 중합효소 순환 조립을 보여준다.

[0429] 본원에 기재된 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드는 다양한 유전자 조립 방법들에서 유리하게 사용되어 조립 오류를 피하고 합성된 유전자의 품질을 증가시킬 수 있다는 것이 이해된다(도 13). 조립될 서열에서 상동성 반복부 또는 높은 GC 영역은 보다 더 작은 올리고뉴클레오티드들의 정확한 순서 및 혼성화와 관련된 오류를 도입할 수 있다. 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드는 순서대로 정돈되고 정렬될 올리고뉴클레오티드들의 수를 감소시킴으로써, 문제가 되는 서열, 예컨대, 상동성 반복부 또는 높은 GC 영역을 정렬 부위로부터 제거함으로써, 및/또는 원하는 유전자를 조립하는 데에 요구되는 조립 주기의 수를 감소시킴으로써 이 문제점들을 피할 수 있다.

[0430] 유전자 조립 방법들을 도 14에 예시된 바와 같이 계층적으로 조합하여 보다 더 큰 유전자를 합성할 수 있다. 따라서, 제1 유전자 조립 방법, 예컨대, PCA를 이용하여 중간 길이, 예를 들면, 약 2 kb의 다수의 유전자들을 조립할 수 있다. 제2 유전자 조립 방법, 예를 들면, 깁슨(Gibson) 조립(Gibson et al, Science, 2008, 319, 1215)을 이용하여 중간 길이의 유전자를 보다 더 큰, 예를 들면, 약 5 또는 10 kb의 유전자로 조합할 수 있다. 계층적 조립을 단계적으로 적용할 수 있다. 시험관내 재조합 기법을 이용하여 중간 길이의 유전자의 카세트를 점진적으로 더 긴, 예를 들면, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 kb 초과의 서열로 조립할 수 있다.

[0431] 유전자 드 노보 조립에 유용한 올리고뉴클레오티드를 하나 이상의 고체 지지체 상에서 합성할 수 있다. 예시적 고체 지지체는 예를 들면, 슬라이드, 비드, 칩, 입자, 가닥, 겔, 시트, 튜빙, 구, 용기, 모세관, 패드, 슬라이스, 필름, 플레이트, 중합체 또는 마이크로플루이딕 디바이스를 포함한다. 추가로, 고체 지지체는 생물학적, 비-생물학적, 유기 또는 무기 고체 지지체, 또는 이들의 조합일 수 있다. 실질적으로 평평한 지지체 상에서, 지지체는 예를 들면, 고랑(trenches), 홈, 웰 또는 화학적 차단막(예를 들면, 소수성 코팅 등)을 가진 영역들로 물리적으로 분리될 수 있다. 지지체는 임의적으로 표면의 전체 폭에 걸쳐 있는, 표면 내에 구축된 물리적으로 분리된 영역들을 포함할 수도 있다. 개선된 올리고뉴클레오티드 합성에 적합한 지지체는 본원에 더 기재되어 있다.

[0432] 한 양태에서, 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, PCA 반응 챔버의 일부로서 마이크로플루이딕 디바이스에서 사용될 고체 지지체 상에서 제공될 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오티드는 합성된 후 마이크로플루이딕 디바이스 내로 도입될 수 있다.

[0433] 일반적으로, 완전한 유전자 서열은 적절한 경우 변화가능한 또는 고정된 길이(N)의 올리고뉴클레오티드들로 분해된다. 적합한 올리고뉴클레오티드 길이, 예를 들면, 20개 내지 200개, 50개 내지 300개, 75개 내지 350개, 또는 100개 내지 400개 뉴클레오티드 빌딩 블록이 선택될 수 있다. 당업자는 서열 분절 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 20 내지 350, 또는 200 내지 350)에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 하위서열들 사이의 중첩부의 길이는 약 N/2 이하이지만, 조립 반응이 요구할 때 선택될 수 있다(예를 들면, 6 내지 40 bp, 10 내지 20 bp, 또는 20 내지 30 bp의 중첩부일 수 있다). 당업자는 서열 분절 길이가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 20 내지 40, 또는 6 내지 30)에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 부분적 염기 상보성의 양은 이용된 조립 방법에 따라 달라질 수 있다. 다양한 중첩 유전자 조립 방법들의 경우, 생성된 PCR 주형의 말단을 형성하는 PCA 올리고뉴클레오티드들을 제외한 PCA 올리고뉴클레오티드들은 5' 및 3' 말단들 둘 다에서 중첩될 수 있다. 올리고뉴클레오티드들 사이의 염기쌍 불일치는 불일치의 성질에 따라 혼성화에 영향을 미칠 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 3' 말단에서 또는 이 말단 근처에서의 불일치는 연장을 억제할 수 있다. 그러나, 중첩부의 G/C 풍부 영역은 불일치를 극복함으로써 오류를 함유하는 주형을 초래할 수 있다. 따라서, 올리고뉴클레오티드 디자인에서 중첩 서열, 용융 온도, 교차혼성화에 대한 잠재력 및 이차 구조

가 고려될 수 있다.

[0434] PCR 조립 반응으로부터 생성된 핵산 서열은 주형으로서 지칭될 수 있고 PCR에 의한 상보적 가닥의 재생성을 위한 표적 핵산으로서 작용할 수 있다. 전형적으로, 조립 반응 후, PCR 조립 생성물은 아마도 불완전한 조립 및/또는 콘카타머(concatamers)로 인해 변화가능한 크기의 이중 가닥 DNA일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드들로부터 제1-실행 주형이 조립된다. 다른 실시양태에서, 2개 이상의 제1-실행 주형들을 포함하는 DNA 단편으로부터 제2-실행 주형이 조립되는데, 이때 상기 2종의 주형들은 PCR 반응의 생성물이고 임의적으로 정제되고/되거나 오류 여과되고 처음 2회 실행으로부터 수득된다. 유사하게 오류 여과될 수 있는 2개 이상의 제2-실행 주형들을 포함하는 DNA 단편으로부터 제3-실행 주형이 조립된다.

[0435] 비-중합효소 순환 조립-기초 방법, 예컨대, 어닐링 및 라이게이션 반응(Climie and Santi, 1990; Smith et al., 1990; Kalman et al., 1990), 삽입 유전자 합성(IGS)(Ciccarelli et al., 1990), 한 가닥을 통한 유전자 합성(Chen et al., 1990), 주형-유도된 라이게이션(TDL)(Strizhov et al., 1996), 리가제 연쇄 반응(Au et al., 1998), 또는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 조립 방법도 폴리뉴클레오티드의 화학적 합성을 위해 이용될 수 있다. 다른 비-중합효소 순환 조립-기초 유전자 합성 방법은 마이크로어레이-기초 유전자 합성 기술(Zhou et al., 2004), 블루 헤론 고체 지지체 기술, 슬로닝 빌딩 블록 기술(Ball, 2004; Schmidt, 2006; Bugl et al., 2007), 및 DNA 어레이로부터의 RNA-매개된 유전자 조립(Wu et al., 2012)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0436] **효소적 유전자 합성**

[0437] 1960년대 이. 콜라이, 및 T4 박테리오파지에 감염된 이. 콜라이 세포에서 처음 발견된, 이중 가닥 DNA에서 단일 가닥 절단을 복구하는 효소(Meselson, 1964; Weiss and Richardson, 1967; Zimmerman et al., 1967)를 사용하여 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드들, 예컨대, 데옥시리보뉴클레오티드들을 연결함으로써 연속적인 이중 나선형 구조물을 형성할 수 있다(Gupta et al., 1968a). 또 다른 예에서, DNA 중합효소 I(클레나우)을 사용하여 올리고뉴클레오티드들을 연결함으로써 보다 더 긴 폴리뉴클레오티드를 형성할 수 있다. 라이게이션, 예를 들면, 리가제를 사용하는, 예컨대, 파지 T4 폴리뉴클레오티드 리가제를 사용하는 라이게이션을 통해 올리고뉴클레오티드들을 함께 연결할 수도 있다. 일부 경우, 올리고뉴클레오티드들을 계층적으로 연결하여 각각의 단계에서 점점 더 긴 올리고뉴클레오티드를 형성할 수 있다.

[0438] **어닐링 및 라이게이션 반응**

[0439] 유전자의 용이한 합성을 위한 또 다른 방법은 어닐링 및 라이게이션 반응을 통해 많은 올리고뉴클레오티드들로부터 폴리뉴클레오티드를 조립하는 단계를 포함한다(Climie and Santi, 1990; Smith et al., 1990; Kalman et al., 1990). 먼저, 원하는 서열의 양 가닥들은 인접 쌍의 상보적 올리고뉴클레오티드들이 어닐링할 수 있도록 짧은 코헤시브(cohesive) 말단으로 나누어질 수 있다. 예를 들면, 키나제(kinase)를 사용하여 합성된 올리고뉴클레오티드를 인산화시킬 수 있고 이중체로의 라이게이션 전에 어닐링시킬 수 있다.

[0440] **숏건 라이게이션 및 공-라이게이션**

[0441] 숏건 라이게이션 방법은 여러 합성된 블록들로부터 전체 유전자를 조립하는 단계를 포함한다(Eren and Swenson, 1989). 따라서, 유전자는 여러 상보적 쌍들의 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드와 인접 쌍의 올리고뉴클레오티드들에 상보적인 짧은 단일 가닥들의 효소적 라이게이션에 의해 각각 구축된 여러 구획들로 하위조립될 수 있다. 구획들의 공-라이게이션은 최종 폴리뉴클레오티드의 합성을 달성할 수 있다.

[0442] **삽입 유전자 합성**

[0443] 삽입 유전자 합성(IGS)(Ciccarelli et al., 1990)은 단일 가닥 DNA 파지 복제기점을 함유하는 플라스미드 내에서 단계적 방식으로 DNA 서열을 조립하는 데에 이용될 수 있다. IGS 방법은 올리고뉴클레오티드-지정된 돌연변이유발에 의한 플라스미드 내의 긴 DNA 올리고뉴클레오티드의 연속적인 표적화된 삽입에 기초한다.

[0444] **한 가닥을 통한 유전자 합성**

[0445] 한 가닥을 통한 유전자 합성은 한 가닥을 통해 유전자를 합성하는 방법을 지칭한다(Chen et al.; 1990). 다수의, 예를 들면, 2개의 말단 상보적 올리고뉴클레오티드들 및 다수의, 예를 들면, 3개의 짧은 단편간 상보적 올리고뉴클레오티드들의 존재 하에서 여러, 예를 들면, 6개의 올리고뉴클레오티드들을 사용하여 단계적 또는 단일 단계 T4 DNA 리가제 반응을 수행함으로써 표적 유전자의 플러스-가닥 DNA를 조립할 수 있다. 이중 가닥 또는

중첩 방법에 비해 더 적은 합성된 염기의 사용이 비용을 감소시킬 수 있다.

[0446] **주형-유도된 라이게이션**

[0447] 주형-유도된 라이게이션은 야생형 유전자로부터 유래된 단일 가닥 DNA 주형과의 부분적 어닐링에 의한 올리고뉴클레오티드 모듈들의 라이게이션으로 큰 합성 유전자를 구축하는 방법을 지칭한다(Strizhov et al.; 1996). 2개의 가닥들의 합성을 요구하는 다른 기술과 대조적으로 한 가닥만을 포함하는 올리고뉴클레오티드가 합성될 수 있다. 리가제, 예컨대, *Pfu* DNA 리가제를 사용하여 전장 올리고뉴클레오티드의 조립, 선택 및 라이게이션, 및 주형-유도된 라이게이션(TDL) 생성물의 선형 증폭을 위한 열 순환을 수행할 수 있다. 이 방법은 상동성 주형에 의존하기 때문에 기존 폴리뉴클레오티드 분자와 유사한 제한된 수의 서열만의 합성에 적합하다.

[0448] **리가제 연쇄 반응**

[0449] 리가제 연쇄 반응(LCR)은 폴리뉴클레오티드 합성 방법에서 이용될 수 있다(Au et al.; 1998). 리가제, 예를 들면, *Pfu* DNA 리가제를 사용한 라이게이션을 통해 여러 올리고뉴클레오티드들로부터 단편들을 조립할 수 있다. LCR 후, 변성 및 외부 2개의 올리고뉴클레오티드들을 사용한 연장을 이용하여 중첩부를 공유하는 단편들의 혼합물로 전장 유전자를 증폭할 수 있다.

[0450] **마이크로어레이-매개된 유전자 합성**

[0451] 일반적인 개념으로서 마이크로어레이-매개된 유전자 합성은 수만 개의 특이적 프로브들을 작은 고체 표면 상에 고정시키는 능력에 기초한다(Lockhart and Barlow, 2001). 어레이의 생성을 위해, DNA를 고체 지지체 상에서 직접적으로 합성할 수 있거나(Lipshutz et al., 1999; Hughes et al., 2001), 예를 들면, 핀 또는 잉크젯 프린터를 이용하여 미리 합성된 형태로 표면 상에 침착시킬 수 있다(Goldmann and Gonzalez, 2000). 수득된 올리고뉴클레오티드를 열 순환 조건 하에서 라이게이션에 사용하여 수백 개의 염기쌍들을 가진 DNA 구축물을 생성할 수 있다. 정확한 다중체 유전자 합성을 위한 또 다른 마이크로칩-기초 기술인 변형된 어레이-매개된 유전자 합성 기술(Tian et al., 2004)은 고 처리율(high-throughput) 유전자 합성을 위해 개발된 방법인 칩-용출된 DNA의 증폭 및 조립(AACED)(Richmond et al., 2004)과 유사하다. 수천 개의 '구축' 올리고뉴클레오티드들 및 태깅된 상보적 '선택' 올리고뉴클레오티드들의 풀을 포토-프로그래밍가능한 마이크로플루이딕 칩 상에서 합성하고 방출하고 라이게이션 증폭하고 혼성화로 선택하여 합성 오류를 감소시킬 수 있다(Tian et al., 2004).

[0452] **블루 헤론 기술**

[0453] 블루 헤론 바이오테크놀로지(Blue Heron Biotechnology)에 의해 개발된 블루 헤론 기술은 진메이커(GeneMaker) 플랫폼에 기초한 고체상 지지체 방법에 기초하고 자동화를 가능하게 한다(Parker and Mulligan, 2003; Mulligan and Tabone, 2003; Mulligan et al., 2007). 진메이커 프로토콜은 일반적으로 사용자 서열 데이터 입력; 입력된 서열의 조립, 올리고뉴클레오티드 합성 및 이중체로의 혼성화에 적합한 올리고뉴클레오티드를 디자인하는 알고리즘; 고체 지지체 매트릭스 상의 컬럼 내부에서의 자동화된 순차적 추가를 통한 자동화된 라이게이션-기초 고체상 조립; 및/또는 클로닝 및 서열 검증을 포함할 수 있다. 블루 헤론 기술은 빌딩 블록들의 비-연속 풀들에 기초한 다른 유전자 조립 방법, 예컨대, PCR 방법을 이용할 때 일어나는 오류를 낮추는 빌딩 블록의 순차적 추가에 의존한다.

[0454] 본 발명의 다양한 실시양태들은 블루 헤론 기술의 실시에서 예시된 바와 같이 일련의 계층적 조립 방법들을 이용한다.

[0455] **슬로닝 빌딩 블록 기술**

[0456] 슬로닝 빌딩 블록 기술(슬로노믹스(Slonomics)™; 슬로닝 바이오테크놀로지 게엠베하(Sloning Biotechnology GmbH), 독일 푸흐하임 소재)은 화학적 유전자 합성을 위한 라이게이션-기초 방식을 이용하는 또 다른 방법이다(Adis International, 2006). 슬로닝 합성 방법은 일련의 병렬식 반복적 및 표준화된 반응 단계들(피펫팅(pipetting), 혼합, 항온처리 및 세척)로 구성된다(Schatz and O'Connell, 2003; Schatz et al., 2004; Schatz, 2006). 주어진 유전자 구축물을 위해 특이적으로 디자인되고 합성된 올리고뉴클레오티드들의 라이게이션과 대조적으로, 슬로닝 기술은 일련의 표준화되고 전체적으로 자동화된 비용 효과적 반응 단계들에 의해 조합되어 임의의 원하는 서열을 형성할 수 있는 표준화된 빌딩 블록들의 라이브러리를 사용한다(Schatz and O'Connell, 2003; Schatz, 2006).

[0457] **골든 게이트(Golden Gate) 조립**

[0458] 골든 게이트 방법(예를 들면, 문헌(Engler et al. (2008) PLoS ONE, 3(11): e3647); 및 문헌(Engler et al. (2009) PLoS ONE 4(5): e5553) 참조)은 표준화된 다중-부분 DNA 조립을 제공한다. 골든 게이트 방법은 그의 인식 부위가 그의 절단 부위로부터 멀리 위치하는 IIS형 엔도뉴클레아제를 사용할 수 있다. 선택될 수 있는 여러 상이한 IIS형 엔도뉴클레아제들, 예를 들면, BsaI이 존재한다. 골든 게이트 방법은 단일 IIS형 엔도뉴클레아제의 사용에 의해 유리할 수 있다. 골든 게이트 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공보 제 2012/0258487호에 더 기재되어 있다.

[0459] 일부 경우, 유전자 조립을 위한 방법 및 조성물은 특이적으로 합성된 빌딩 블록과 미리 합성된 빌딩 블록의 조합을 사용할 수 있다. 미리 합성된 올리고뉴클레오티드들의 라이브러리는 저장될 수 있고, 원하는 표적 핵산을 위한 조립 공정은 미리 합성된 올리고뉴클레오티드를 최대한으로 사용하여 새로운 합성에 대한 필요성을 최소화하도록 최적화될 수 있다. 특이적으로 합성된 올리고뉴클레오티드는 미리 합성된 올리고뉴클레오티드들의 라이브러리에서 커버되지 않는 표적 핵산의 일부를 채울 수 있다.

[0460] **RNA-매개된 유전자 조립**

[0461] 다양한 실시양태들에서, RNA-매개된 유전자 조립을 이용하여 임의적으로 표면에 고정된 DNA 요소로부터 RNA 전사체를 조립함으로써 고정된 DNA 어레이를 형성한다. DNA 요소는 5' 말단 쪽으로 RNA 중합효소(RNAP) 프로모터 서열, 예컨대, T7 RNA 중합효소 프로모터 서열을 포함하도록 디자인된다. 프로모터 서열, 예컨대, T7 RNAP 프로모터 서열을 코딩하는 올리고뉴클레오티드와 DNA 요소의 혼성화는 이중 가닥 프로모터를 생성할 수 있다. RNAP의 첨가는 많은 RNA 카피들을 생성하는, 임의적으로 이 표면-결합된 프로모터들로부터의 전사에 영향을 미칠 수 있다. 이 증폭된 RNA 분자는 자가-조립을 허용하여, 보다 더 긴 RNA를 생성하도록 디자인될 수 있다. 요약하건대, DNA 요소는 원하는 전장 RNA 전사체의 구획인 "분절 서열", 및 RNA 분절의 정확한 조립을 유도하는 주형으로서 작용하는 상보적 RNA인 "스플린트(splint) 서열"을 코딩하도록 디자인될 수 있다. RNA 분절 또는 스플린트를 코딩하는 DNA 요소는 조립된 폴리뉴클레오티드의 합성 동안 하나 이상의 반응을 최적화하도록 선택될 수 있다. 예를 들면, DNA 요소는 각각의 RNA 전사체의 5' 말단이 GC 디뉴클레오티드에 상응하도록 구축될 수 있고, 이것은 T7 RNA 중합효소(T7 RNAP)에 의해 나타나는 보다 더 높은 전사 효율에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 이어서, G 잔기의 수가 GTP의 커플링 동안 효소의 "저하(slippage)"로 인해 1 내지 3일 수 있는 폴리 G 전사체의 래더(ladder)의 생성을 피하기 위해 5' 말단에서 GGG 트리뉴클레오티드 서열을 피할 수 있다. 분절과 스플린트의 RNA:RNA 혼성화를 통해 조립을 수행할 수 있다. 당분야에서 공지되어 있는 적합한 효소를 사용하여 닉을 화학적으로 또는 효소적으로 밀봉할 수 있다. 일례에서, 전장 RNA 전사체로의 RNA 분절 서열의 조립은 T4 RNA 리가제 2를 사용한 라이게이션을 포함한다. 삼중인산화된 전사체, 예컨대, T7 RNA 중합효소에 의해 생성된 전사체는 라이게이션 전에 그의 단일인산화된 유사체로 "트리밍"될 수 있다. 트리밍은 각각의 RNA의 5' 말단으로부터 피로포스페이트 기를 제거하는 RNA 5' 피로포스포하이드롤라제(pyrophosphohydrolase)로 전사체 풀을 처리함으로써 달성될 수 있다. 전사체는 일단 합성되면 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 카피되어 상응하는 유전자를 생성할 수 있다. 본원의 다른 부분에 기재된 방법들을 비롯한 적합한 핵산 증폭 방법을 이용하여 조립된 RNA 서열 또는 이의 DNA 등가물을 증폭할 수 있다. 상기 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(Cheng-Hsien Wu, Matthew R. Lockett, and Lloyd M. Smith, RNA-Mediated Gene Assembly from DNA Arrays, 2012, Angew. Chem. Int. Ed. 51, 4628-4632)에 더 기재되어 있다.

[0462] **DNA의 비-효소적 화학적 라이게이션**

[0463] 다른 방법은 183 bp의 생물학적 활성 미니-유전자의 합성에 대해 기재된 바와 같이, 예를 들면, 시아노겐 브로마이드를 축합제로서 사용하는 DNA의 비-효소적 화학적 라이게이션을 포함한다(Shabarova et al., 1991).

[0464] 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드들의 조립은 클릭 화학반응의 이용을 포함한다. 클릭 화학반응을 이용하여 다양한 분자들을 연결하기에 적합한 방법은 당분야에서 공지되어 있다(올리고뉴클레오티드의 클릭 화학반응 연결에 대해서는 예를 들면, 문헌(El-Sagheer et al., PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011) 참조). 클릭 화학반응은 CuI의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0465] **오류율 및 오류 보정**

[0466] 현재의 유전자 합성 기술의 중요한 한계는 공정의 낮은 서열 신뢰도이다: 화학적으로 합성된 DNA로부터 생성된 유전자 클론은 종종 서열 오류를 함유한다. 이 오류는 공정의 많은 단계들에서, 즉 성분 올리고뉴클레오티드의 화학적 합성 동안, 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 조립 동안, 및 DNA의 조작 및 단리 또는 클로닝 공정 동안 발생하는 화학적 손상에 의해 도입될 수 있다.

[0467] 화학적으로 합성된 DNA 단편을 생성하는 공지된 방법은 매우 높은 서열 오류율, 예를 들면, 평균 200 내지 500 bp마다 오류를 가진다. 본원에 기재된 방법은 매우 낮은 오류율로 올리고뉴클레오티드 및 보다 더 긴 폴리뉴클레오티드의 초기 드 노보 합성을 가능하게 한다. 올리고뉴클레오티드 내의 흔한 돌연변이는 캡핑, 산화 및/또는 탈차단 실패로부터 발생될 수 있는 결실을 포함한다. 다른 현저한 부반응은 아데노신(A)으로서 코딩되는 2,6-디아미노푸린을 제공하기 위한 암모니아에 의한 구아노신(G)의 변경을 포함한다. 우리딘(U)을 형성하는 사이티딘(C) 및 이노신(I)을 형성하는 아데노신의 경우 탈아민화도 가능하다.

[0468] 이론에 의해 구속받지 않지만, 포스포라미다이트 방법을 이용한 올리고뉴클레오티드의 합성 동안 전형적으로 생성된 염기 변경의 비-한정적 예는 2,6-디아미노푸린 잔기를 형성하기 위한 데옥시구아노신의 O6-산소의 트랜스아민화, 우리딘 잔기를 형성하기 위한 데옥시사이티딘의 N4-아민의 탈아민화(Eadie, J. S. and Davidson, D. S., Nucleic Acids Res. 15:8333, 1987), 탈푸린 부위를 생성하는 N6-벤조일데옥시아데노신의 탈푸린화(Shaller, H. and Khorana, H. G., J. Am. Chem. Soc. 85:3828, 1963; Matteucci, M. D. and Caruthers, M. H., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981), 및 데옥시구아노신 상의 N2-이소부티릴아미드 보호기의 불완전한 제거를 포함한다. 이 부생성물(부산물)들 각각은 클로닝된 합성 폴리뉴클레오티드 내의 서열 오류에 기여할 수 있다.

[0469] 추가로, 통상적인 올리고뉴클레오티드 합성 방법은 원하는 올리고뉴클레오티드의 전체 길이보다 더 짧은 절두된 생성물을 형성하기 쉽다. 올리고뉴클레오티드 합성을 위한 고체상 방법은 전형적으로 그의 3'-하이드록실 기를 통해 고체 지지체에 고착되고 그의 5' 말단에의 빌딩 블록의 커플링에 의해 연장되는 올리고머 쇄를 구축하는 단계를 포함한다. 주어진 쇄 연장 주기에서 각각의 커플링 단계의 수율은 일반적으로 100% 미만일 것이다. 길이 n의 올리고뉴클레오티드의 경우, n-1개의 연결이 존재하고, 최대 수율 추정은 전형적으로 $[\text{커플링 효율}]^{n-1}$에 의해 좌우될 것이다. 98%의 커플링 효율을 가정할 때 25-머의 경우, 전장 생성물의 계산된 최대 수율은 약 61%일 것이다. 따라서, 최종 생성물은 감소하는 양의 n-1개, n-2개, n-3개 등의 실패 서열을 함유할 것이다.

[0470] 또 다른 부류의 합성 실패는 원하는 올리고뉴클레오티드의 전체 길이보다 더 긴 "n+" 생성물들의 형성이다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 이 생성물들은 성장하는 올리고뉴클레오티드의 분지화로부터 유래할 수 있고, 이때 포스포라미다이트 단량체는 염기, 특히 아데노신의 N-6 및 구아노신의 O-6을 통해 반응한다. n+ 생성물의 또 다른 공급원은 고체 지지체 상의 원하지 않는 반응성 부위로부터의 시작 및 증식이다. n+ 생성물은 5'-트리틸 보호기가 커플링 단계 동안 우발적으로 탈보호되는 경우 형성될 수도 있다. 5'-하이드록실의 이 조기 노출은 포스포라미다이트의 이중 추가를 가능하게 한다. 올리고뉴클레오티드 합성 공정의 이러한 유형의 합성 실패도 합성 유전자 내의 서열 오류에 기여할 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 반응 파라미터의 정밀한 조절을 통해 올리고뉴클레오티드의 드 노보 합성 동안 오류를 감소시킬 수 있게 한다.

[0471] 다른 유형의 오류는 올리고뉴클레오티드들이 PCR-기초 조립 방법뿐만 아니라 비-PCR-기초 조립 방법 동안에도 보다 더 긴 구축물로 조립되는 동안 도입될 수 있다. 예를 들면, 보다 더 큰 합성 이중 가닥 올리고뉴클레오티드를 형성하기 위한 합성 이중 가닥 올리고뉴클레오티드와 다른 합성 이중 가닥 올리고뉴클레오티드의 라이게이션은 오류를 유발하기 쉬울 수 있다. 예를 들면, T4 DNA 리가제는 3' 및 5' A/A 또는 T/T 불일치(Wu, D. Y., and Wallace, R. B., Gene 76:245-54, 1989), 5' G/T 불일치(Harada, K. and Orgel, L. Nucleic Acids Res. 21:2287-91, 1993), 또는 3' C/A, C/T, T/G, T/T, T/C, A/C, G/G 또는 G/T 불일치(Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J., and Hood, L., Science 241:1077-80, 1988)를 가진 닉을 밀봉하는 데에 있어서 낮은 신뢰도를 나타낸다.

[0472] 오류율은 유전자 변이체들의 라이브러리의 생성을 위한 유전자 합성의 값도 한정한다. 오류율이 1/300인 경우, 1500개의 염기쌍을 가진 유전자에서 클론들의 약 0.7%만이 정확할 것이다. 올리고뉴클레오티드 합성으로부터의 오류들의 대부분이 프레임 변동 돌연변이를 초래하기 때문에, 이러한 라이브러리에서 클론들의 99% 이상이 전장 단백질을 생성하지 않을 것이다. 오류율을 75%까지 감소시키는 것은 정확한 클론의 분획을 40의 계수까지 증가시킬 것이다. 개선된 합성 품질, 및 대량 병렬식 및 시간 효율적 방식으로 가능해지는 오류 보정 방법의 적용가능성 때문에, 본 발명의 방법 및 조성물은 유전자 합성 방법에서 통상적으로 관찰된 오류율보다 더 낮은 오류율로 큰 올리고뉴클레오티드 및 유전자 라이브러리의 신속한 드 노보 합성을 가능하게 한다. 따라서, 라이브러리 전체에 걸쳐, 또는 라이브러리의 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, 99.95%, 99.98% 또는 99.99% 초과의 비율에 걸쳐 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/8000, 1/9000, 1/10000,

1/12000, 1/15000, 1/20000, 1/25000, 1/30000, 1/40000, 1/50000, 1/60000, 1/70000, 1/80000, 1/90000, 1/100000, 1/125000, 1/150000, 1/200000, 1/300000, 1/400000, 1/500000, 1/600000, 1/700000, 1/800000, 1/900000 또는 1/1000000 미만인 염기 삽입, 결실, 치환 또는 총 오류율로 라이브러리를 합성할 수 있다. 추가로, 본 발명의 방법 및 조성물은 라이브러리의 적어도 서브세트 내의 올리고뉴클레오티드 또는 유전자의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, 99.95%, 99.98% 또는 99.99% 이상이 예정된/미리 선택된 서열에 비해 오류 부재 서열에 부합할 정도로 낮은 오류율을 가진 큰 합성 올리고뉴클레오티드 및 유전자 라이브러리에 관한 것이다. 일부 실시양태들에서, 라이브러리 내에서 단리된 부피 내의 올리고뉴클레오티드 또는 유전자의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, 99.95%, 99.98% 또는 99.99% 이상이 동일한 서열을 가진다. 일부 실시양태들에서, 95%, 96%, 97%. 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99,7%, 99.8% 또는 99.9% 초과의 유사성 또는 동일성과 관련된 임의의 올리고뉴클레오티드 또는 유전자의 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, 99.95%, 99.98% 또는 99.99% 이상이 동일한 서열을 가진다. 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드 또는 유전자 상의 특정된 좌위와 관련된 오류율이 최적화된다. 따라서, 큰 라이브러리의 일부로서 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 유전자의 주어진 좌위 또는 복수의 선택된 좌위들은 1/300, 1/400, 1/500, 1/600, 1/700, 1/800, 1/900, 1/1000, 1/1250, 1/1500, 1/2000, 1/2500, 1/3000, 1/4000, 1/5000, 1/6000, 1/7000, 1/8000, 1/9000, 1/10000, 1/12000, 1/15000, 1/20000, 1/25000, 1/30000, 1/40000, 1/50000, 1/60000, 1/70000, 1/80000, 1/90000, 1/100000, 1/125000, 1/150000, 1/200000, 1/300000, 1/400000, 1/500000, 1/600000, 1/700000, 1/800000, 1/900000 또는 1/1000000 미만인 오류율을 각각 가질 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 이러한 오류 최적화된 좌위들은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1500개, 2000개, 2500개, 3000개, 4000개, 5000개, 6000개, 7000개, 8000개, 9000개, 10000개, 100000개, 500000개, 1000000개, 2000000개 또는 3000000개 이상의 좌위들을 포함할 수 있다. 오류 최적화된 좌위들은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1500개, 2000개, 2500개, 3000개, 4000개, 5000개, 6000개, 7000개, 8000개, 9000개, 10000개, 100000개, 500000개, 1000000개, 2000000개 또는 3000000개 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 유전자에 분포될 수 있다.

[0473] 오류율은 오류 보정의 존재 또는 부재 하에서 달성될 수 있다. 오류율은 라이브러리 전체에 걸쳐, 또는 라이브러리의 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, 99.95%, 99.98% 또는 99.99% 초과의 비율에 걸쳐 달성될 수 있다.

[0474] 라이브러리는 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 750개, 1000개, 15000개, 20000개, 30000개, 40000개, 50000개, 60000개, 75000개, 100000개, 200000개, 300000개, 400000개, 500000개, 600000개, 750000개, 1000000개, 2000000개, 3000000개, 4000000개 또는 5000000개 초과의 상이한 올리고뉴클레오티드들 또는 유전자들을 포함할 수 있다. 라이브러리는 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1250 bp, 1500 bp, 1750 bp, 2000 bp, 2500 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 7000 bp, 8000 bp, 9000 bp, 10 kb, 20 kb, 30 kb, 40 kb, 50 kb, 60 kb, 80 kb, 90 kb 또는 100 kb 이상 긴 올리고뉴클레오티드들 또는 유전자들을 포함할 수 있다. 라이브러리는 상이한 오류율 및/또는 구축물 크기에 의해 좌우되는 복수의 상이한 하위구획들, 예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 하위구획들을 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 짧은 기간, 예컨대, 3개월, 2개월, 1개월, 3주, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일 또는 2일 이내에 전술된 낮은 오류율을 가진 올리고뉴클레오티드 또는 유전자의 상기 언급된 큰 합성 라이브러리도 구축할 수 있게 한다. 상기 언급된 라이브러리의 유전자는 본원의 다른 부분에 상세히 더 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 적합한 유전자 조립 방법에 의한 드 노보 합성된 올리고뉴클레오티드들의 조립에 의해 합성될 수 있다.

[0475] 합성된 유전자에서 오류 함유 서열을 제거하는 여러 방법들이 당분야에서 공지되어 있다. DNA 불일치 결합 단백질인 MutS(써머스 아쿠아티커스(*Thermus aquaticus*)로부터 유래됨)는 상이한 방법들을 이용하여 합성 유전자로부터 실패 생성물을 제거하는 데에 사용될 수 있다(Schofield and Hsieh, 2003; Carr et al., 2004; Binkowski et al., 2005). 일부 다른 방법들(Pogulis et al., 1996; Ling and Robinson, 1997; An et al., 2005; Peng et al., 2006b)은 중첩 연장 PCR에 의한 부위-지정된 돌연변이유발을 이용하여 불일치를 보정하고, 올리고뉴클레오티드의 추가 합성뿐만 아니라 클로닝 및 서열결정의 2 이상의 라운드와도 커플링될 수 있다. 유전자 합성

후 기능적 선택 및 확인은 또 다른 방법이다(Xiong et al., 2004b; Smith et al., 2003). 오류를 보정하는 또 다른 방법은 불일치 특이적 DNA 엔도뉴클레아제인 SURVEYOR 엔도뉴클레아제(트랜스게노믹(Transgenomic))를 사용하여 이종이중체 DNA에서 공지된 돌연변이 및 다형성, 및 비공지된 돌연변이 및 다형성을 스캐닝한다. SURVEYOR 기술은 식물 DNA 엔도뉴클레아제의 CEL 뉴클레아제 패밀리의 구성원인, 셀러리로부터 유래된 불일치 특이적 DNA 엔도뉴클레아제, 즉 SURVEYOR 뉴클레아제에 기초한다(Qiu et al., 2004). SURVEYOR 뉴클레아제는 12개 이상의 뉴클레오티드들까지의 모든 염기 치환 및 삽입/결실을 비롯한, 양 DNA 가닥들 내의 임의의 염기 치환 불일치의 3' 쪽 및 다른 왜곡 부위에서 높은 특이성으로 절단한다. 불일치 서열에 기초한 상이한 절단 효율로 삽입/결실 불일치 및 모든 염기 치환 불일치들이 인식될 수 있다. 한 예에서, SURVEYOR 뉴클레아제 기술은 하기 4개의 단계들을 포함하는 방법에서 불일치 검출을 위해 이용될 수 있다: (i) 돌연변이체/변이체 및 야생형/원하는 서열을 가진 원하는 폴리뉴클레오티드 표적의 임의적 폴리뉴클레오티드 증폭, 예를 들면, PCR; (ii) 불일치를 포함하는 이종이중체를 생성하는 혼성화; (iii) 불일치 부위를 절단하기 위한 SURVEYOR 뉴클레아제를 사용한 이종이중체의 처리; 및 (iv) 선택된 검출/분리 플랫폼을 사용한 분해된 폴리뉴클레오티드 생성물의 임의적 분석(도 15 및 16). 이종이중체의 처리로부터 생성된 절단 생성물은 절단 부위에서의 오류가 예를 들면, 엑소뉴클레아제에 의해 제거되어 오류 고갈된 생성물을 생성한 후 PCA로 처리될 수 있다(도 15). 불일치 염기는 실질적으로 또는 일부 경우 완전히 제거되어 오류 부재 가닥을 생성할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 절단된 가닥은 폴리뉴클레오티드들의 풀 내의 표적에 재어닐링될 수 있고 연장될 수 있다. 오류 함유 폴리뉴클레오티드의 빈도가 불일치를 제거하는 이종이중체의 초기 어닐링 및 절단 후 매우 낮기 때문에, 대다수의 절단된 가닥들은 초기 불일치의 부위에서 오류를 갖지 않은 서열을 가진 표적에 어닐링될 것이다. 표적을 따른 연장을 통해 초기 불일치를 갖지 않은 폴리뉴클레오티드를 재합성할 수 있다. 유전자 조립의 다양한 예들은 오류 보정을 도입한다. 예를 들면, PCR-기초 정확한 합성(PAS) 프로토콜은 유전자 및 올리고뉴클레오티드의 디자인, 올리고뉴클레오티드의 정제, 분절을 합성하기 위한 제1 PCR, 전장 유전자를 조립하기 위한 제2 PCR, 및 서열결정 및 오류 보정을 도입할 수 있다(Xiong et al., 2006). 대안적으로, 절단된 생성물이 참여할 수 없는 PCR로 샘플을 처리하여 샘플에서 오류의 존재도를 희석할 수 있다(도 16).

[0476] 일부 실시양태들에서, 본 발명은 DNA의 화학적 합성 과정 동안 생성되는 불일치, 돌출부(bulges) 및 작은 루프, 화학적으로 변형된 염기 및 다른 이종이중체를 가진 이중 가닥 올리고뉴클레오티드, 예컨대, DNA 분자를, 완벽히 일치된 합성 DNA 단편을 함유하는 용액으로부터 선택적으로 제거하는 방법을 제공한다. 이 방법은 도입된 뉴클레오티드 유사체를 포함하는 형성된 특정 단백질-DNA 복합체, 예를 들면, DNA를 함유하는 이종이중체 내로의 바이오틴 분자 또는 바이오틴 유사체의 도입 및 스트렙타비딘을 비롯한 아비딘 단백질 패밀리의 임의의 구성원에 의한 후속 결합 후 형성된 아비딘-바이오틴-DNA 복합체에 기초한 특정 단백질-DNA 복합체를 이종이중체 DNA 상에서 직접적으로 또는 친화성 시스템을 통해 분리한다. 아비딘은 고체 지지체에 고정될 수 있다.

[0477] 상기 방법의 핵심은 이중 가닥 올리고뉴클레오티드(예를 들면, DNA) 분자 내의 불일치된 염기 또는 쌍을 형성하지 않은 염기를 인식하고 이 염기에 특이적으로 결합하고 이종이중체의 부위에서 또는 이 부위 근처에서 결합된 상태로 남아 단일 또는 이중 가닥 절단을 생성하거나 이종이중체 부위에서 또는 이 부위 근처에서 가닥 전달 전위 사건을 시작할 수 있는 효소이다. DNA 분자의 합성 용액으로부터 불일치된 이종이중체 DNA 분자, 잘못 쌍형성된 이종이중체 DNA 분자 및 화학적으로 변형된 이종이중체 DNA 분자를 제거하는 것은 예상된 합성된 DNA 서열과 상이한 DNA 분자의 농도를 감소시킨다.

[0478] 불일치 인식 단백질은 전형적으로 불일치 상에서 또는 불일치 근처에서 결합한다. 불일치 인식 단백질-기초 오류 보정을 위한 시약은 엔도뉴클레아제, 제한 효소, 리보뉴클레아제, 불일치 복구 효소, 리졸바제(resolvases), 헬리카제(helicases), 리가제, 불일치에 대해 특이적인 항체, 및 이들의 변이체인 단백질들을 포함할 수 있다. 효소는 예를 들면, T4 엔도뉴클레아제 7, T7 엔도뉴클레아제 1, S1, 녹두(mung bean) 엔도뉴클레아제, MutY, MutS, MutH, MutL, 클레아바제(cleavase) 및 HINF1로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태들에서, 불일치 인식 단백질은 불일치 부위 근처에서 불일치된 DNA의 적어도 한 가닥을 절단한다.

[0479] 이종이중체 DNA를 인식하고 절단하여 단일 가닥 닉을 형성하는 단백질, 예를 들면, CELI 엔도뉴클레아제 효소의 경우, 생성된 닉은 친화성 파트너관계에 적합한 변형된 뉴클레오티드, 예를 들면, 바이오틴 모이어티 또는 이의 유사체를 함유하는 뉴클레오티드를 도입하기 위한 DNA 중합효소에 대한 기질로서 사용될 수 있다. 리졸바제(resolvase), 엔도뉴클레아제, 글리코실라제, 및 엔도뉴클레아제 활성을 보유하는 특수 MutS 유사 단백질을 비롯한, 불일치된 DNA를 인식하고 단일 가닥 닉을 생성하는 단백질들의 많은 예들이 존재한다. 일부 경우, 닉이 추가 프로세싱 후 이종이중체 DNA 분자에서 생성되는데, 예를 들면, 타이민 DNA 글리코실라제를 사용하여 불일치된 DNA를 인식하고 DNA에서 데옥시리보스와 염기들 중 하나 사이의 결합을 가수분해하여, DNA의 당 포스페이

트 골격을 반드시 절단하지 않으면서 탈염기 부위를 생성할 수 있다. 탈염기 부위는 AP 엔도뉴클레아제에 의해 DNA 중합효소 연장에 적합한 닉킹된 기질로 전환될 수 있다. 따라서, 이종이중체 함유 가닥 내로의 뉴클레오티드 유사체, 예를 들면, 바이오틴 또는 이의 유사체의 도입 및 바이오틴 또는 바이오틴 유사체와 스트렙타비딘 또는 아비딘 단백질의 후속 결합 후, 단백질-이종이중체 DNA 복합체가 직접적으로(예를 들면, MutS 단백질) 또는 간접적으로 형성될 수 있다.

[0480] 다른 오류 보정 방법은 가닥 전달 반응을 통해 시험관내에서 트랜스포자제(transposase) DNA 결합 부위의 미리 절단된 버전을 함유하는 표지된 DNA, 예를 들면, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체로 표지된 DNA를 불일치된 DNA 부위 내로 또는 이 부위 근처에서 우선적으로 삽입하는 트랜스포자제 효소, 예컨대, MuA 트랜스포자제에 의존할 수 있다. 시험관내 MuA 트랜스포자제-유도된 가닥 전달은 당분야에서 숙련되어 있고 불일치된 DNA에 대해 특이적인 트랜스포자제 활성에 익숙한 자에게 공지되어 있다. 이 방법에서, 미리 절단된 MuA 결합 부위 DNA를 분자의 5' 말단에서 바이오티닐화하여, 이종이중체 함유 DNA 내로의 가닥 전달 후 스트렙타비딘 또는 아비딘 단백질과의 단백질-바이오틴-DNA 복합체를 형성할 수 있다.

[0481] 시험관내에서의 단백질-DNA 복합체의 분리는 단백질-DNA 복합체를 함유하는 용액을, 단백질의 결합에 대한 높은 친화성 및 능력, 및 DNA의 결합에 대한 낮은 친화성을 보유하는 고체 매트릭스와 함께 항온처리함으로써 달성될 수 있다. 일부 경우, 이러한 매트릭스는 본원에 기재된 본 발명의 다양한 실시양태들과 관련된 마이크로플루이딕 디바이스 내에 매립될 수 있다.

[0482] 여러 큰 부류의 효소들이 불일치, 결실 또는 손상된 염기를 함유하는 이종이중체 폴리뉴클레오티드, 예컨대, DNA 기질을 우선적으로 분해한다. 전형적으로, 이 효소들은 (일부 경우 탈염기 부위를 닉으로 전환시키는 AP 엔도뉴클레아제의 도움을 받아) 그들의 손상된 또는 불일치된 기질을 닉 또는 단일 염기쌍 갭으로 전환시키는 작용을 한다. DNA 글리코실라제, 불일치 엔도뉴클레아제 및 MutSLH 불일치 복구 단백질은 오류를 함유하는 합성 단편을 변경시키는 데에 특히 유용하다. 본 발명의 방법 및 조성물은 오류 함유 DNA 분자를 확인하고 이 분자를 클로닝 과정으로부터 제거하기 위해 이 닉 또는 작은 갭에 의존할 수 있다.

[0483] 오류를 함유하는 처리된 폴리뉴클레오티드를 제거하기 위해 기법들을 병용할 수 있다. DNA 글리코실라제는 불일치된 염기를 제거하고 일부 경우 생성된 탈푸린/탈피리미딘(AP) 부위에서 절단하는 한 부류의 효소들이다. 타이민 DNA 글리코실라제(TDG)를 사용하여 복합체 혼합물로부터 불일치 함유 또는 완벽히 일치된 DNA 집단을 풍부하게 할 수 있다(X. Pan and S. Weissman, "An approach for global scanning of single nucleotide variations" 2002 PNAS 99:9346-9351). DNA 글리코실라제를 사용하여 DNA에서 데옥시리보스와 염기들 중 하나 사이의 결합을 가수분해함으로써, DNA의 당 포스페이트 골격을 반드시 절단하지 않으면서 탈염기 부위를 생성할 수 있다. 단일 염기 불일치의 모든 4개 군들 및 일부 다른 불일치가 2종의 TDG들의 혼합물에 의해 가수분해될 수 있었다. 추가로, 마그네슘의 부재 하에서 탈염기 부위에 대한 효소의 높은 친화성을 이용하여 DNA 분자들을 이종이중체 풍부 또는 고갈 집단으로 분리할 수 있다. 매우 많은 수의 DNA 글리코실라제들이 확인되었고, 비-한정적 예가 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 공보 제2006/0134638호에서 발견될 수 있다. DNA 글리코실라제는 전형적으로 비천연, 손상된 또는 불일치된 염기의 서브세트에 작용하여 상기 염기를 제거하고 후속 복구를 위한 기질을 남긴다. 한 부류로서 DNA 글리코실라제는 그가 DNA로부터 제거할 화학적 기질에 대한 넓은, 상이한 및 중첩되는 특이성을 가진다. 글리코실라제 처리는 염기 치환의 오류율을 낮은 수준까지 감소시키는 데에 특히 유용할 수 있다. AP 부위를 남기는 글리코실라제는 AP 엔도뉴클레아제, 예컨대, 이. 콜라이 엔도뉴클레아제 IV 또는 엑소 III과 병용되어 DNA에서 닉을 생성한다.

[0484] 불일치 또는 손상된 DNA의 영역에서 DNA를 닉킹하는 불일치 엔도뉴클레아제 효소의 비-한정적 예는 T7 엔도뉴클레아제 I, 이. 콜라이 엔도뉴클레아제 V, T4 엔도뉴클레아제 VII, 녹두 뉴클레아제, Cell, 이. 콜라이 엔도뉴클레아제 IV, 및 UVDE를 포함한다.

[0485] PCR 단편으로부터 대부분의 오류들을 제거하기 위한 MutSLH 복합체의 용도는 전체로서 본원에 참고로 도입되는 문헌(J. Smith and P. Modrich, "Removal of polymerase-produced mutant sequences from PCR products." 1997, PNAS 94:6847-6850)에 기재되어 있다. DAM 메틸화의 부재 하에서, MutSLH 복합체를 사용하여 (GATC) 부위에서 이중 가닥 절단을 촉진할 수 있다. PCR 생성물을 ATP의 존재 하에서 MutSLH로 처리할 수 있다.

[0486] 합성 폴리뉴클레오티드에서의 오류 보정에 관한 보다 더 상세한 개시내용은 미국 특허출원 공보 제2006/0134638호 및 미국 특허 제6664112호(이들 둘 다가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에서 발견될 수 있다.

[0487] 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 합성된 폴리뉴클레오티드의 오류 보정에 사용되는 효소, 결합 파트너 및 다른

시약은 본원에 기재된 지지체 및 기판 상의 표면, 예컨대, 코팅된 또는 작용화된 표면 상에 고정될 수 있다. 반응은 고정된 하나 이상의 성분에 의해 제자리에서 수행될 수 있다. 적절한 표면 상의 이러한 성분을 사용하여, 오류가 보다 더 적거나 없는 폴리뉴클레오티드를 풍부하게 하는 정제 방법은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 이해된다.

[0488] 궁극적으로, 유전자 조립 방법은 낮은 오류율을 가진 폴리뉴클레오티드의 드 노보 합성을 달성하기 위해 고품질 올리고뉴클레오티드에 의존한다. 다양한 실시양태들에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 이러한 고품질 올리고뉴클레오티드의 합성을 가능하게 한다.

[0489] **핵산의 증폭**

[0490] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 핵산은 증폭된다. 증폭은 당분야에서 공지되어 있는 임의의 수단에 의해 수행될 수 있다. 일부 경우, 핵산은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭된다. 다양한 PCR 방법들이 예를 들면, 미국 특허 제5,928,907호 및 제6,015,674호(이들의 전체 개시내용은 임의의 목적을 위해 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 당분야에서 공지되어 있다. 다른 핵산 증폭 방법은 예를 들면, 리가제 연쇄 반응, 올리고뉴클레오티드 라이게이션 분석 및 혼성화 분석을 포함한다. 이 방법들 및 다른 방법들은 미국 특허 제5,928,907호 및 제6,015,674호에 더 상세히 기재되어 있다. 실시간 광학 검출 시스템은 예를 들면, 전술된 바와 같이 본원에 도입된 미국 특허 제5,928,907호 및 제6,015,674호에도 더 상세히 기재된 바와 같이 당분야에서 공지되어 있다. 본원에서 이용될 수 있는 다른 증폭 방법은 미국 특허 제5,242,794호, 제5,494,810호, 제4,988,617호 및 6,582,938호(이들 모두가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 방법들을 포함한다.

[0491] 본 발명의 일부 양태들에서, 핵산 또는 폴리뉴클레오티드의 기하급수적 증폭이 이용된다. 이 방법은 종종 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 이의 상보체의 다수의 카피들의 생성물-촉진된 형성에 의존한다. 증폭 생성물은 종종 "앰플리콘"으로서 지칭된다. DNA의 특정 이중 가닥 서열의 효소적 증폭을 위한 이러한 한 방법은 중합효소 연쇄 반응(PCR)이다. 이 시험관내 증폭 절차는 변성, 올리고뉴클레오티드 프라이머 어닐링, 및 호열성 주형 의존적 폴리뉴클레오티드 중합효소에 의한 프라이머 연장의 반복된 주기에 기초함으로써, 프라이머에 의해 플랭킹된 폴리뉴클레오티드 분석물의 원하는 서열의 카피를 기하급수적으로 증가시킨다. DNA의 대향하는 가닥들에 어닐링하는 2개의 상이한 PCR 프라이머들은 한 프라이머의 중합효소-촉진된 연장 생성물이 다른 프라이머를 위한 주형 가닥으로서 작용하여, 올리고뉴클레오티드 프라이머의 5' 말단들 사이의 거리에 의해 정해진 길이를 가진 별개의 이중 가닥 단편의 축적을 유발할 수 있도록 위치한다. 제공된 본 발명의 방법에서 이용될 수 있는 다른 증폭 기법은 예를 들면, AFLP(증폭된 단편 길이 다형성) PCR(예를 들면, 문헌(Vos et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-14) 참조), 대립형질 특이적 PCR(예를 들면, 문헌(Saiki R K, Bugawan T L, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes Nature 324: 163-166) 참조), Alu PCR, 조립 PCR(예를 들면, 문헌(Stemmer W P, Crameri A, Ha K D, Brennan T M, Heyneker H L (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides Gene 164: 49-53) 참조), 비대칭 PCR(예를 들면, 상기 문헌(Saiki R K) 참조), 콜로니 PCR, 헬리카제(helicase) 의존적 PCR(예를 들면, 문헌(Myriam Vincent, Yan Xu and Huimin Kong (2004). Helicase-dependent isothermal DNA amplification EMBO reports 5 (8): 795-800) 참조), 고온 시작 PCR, 역 PCR (예를 들면, 문헌(Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. Genetics. 1988 November; 120(3):621-3) 참조), 제자리 PCR, 서열간 특이적 PCR 또는 IS SR PCR, 디지탈 PCR, 선형-후-기하급수적 PCR 또는 LATE PCR(예를 들면, 문헌(Pierce K E and Wangh L T (2007). Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells Methods Mol. Med. 132: 65-85) 참조), 긴(long) PCR, 네스티드(nested) PCR, 실시간 PCR, 이중체 PCR, 다중체 PCR, 정량 PCR, 정량 형광 PCR(QF-PCR), 다중체 형광 PCR(MF-PCR), 제한 단편 길이 다형성 PCR(PCR-RFLP), PCK-RFLPIRT-PCR-IRFLP, 폴로노니(polonony) PCR, 제자리 롤링 서클 증폭(RCA), 가교(bridge) PCR, 피코타이터(picotiter) PCR 및 에멀젼(emulsion) PCR, 또는 단일 세포 PCR을 포함한다. 다른 적합한 증폭 방법은 전사 증폭, 자가-지속 서열 복제, 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 선택적 증폭, 컨센서스 서열-프라이밍된 중합효소 연쇄 반응(CP-PCR), 임의로 프라이밍된 중합효소 연쇄 반응(AP-PCR) 및 축퇴 올리고뉴클레오티드-프라이밍된 PCR(DOP-PCR)을 포함한다. 또 다른 증폭 방법은 단일 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 증폭을 포함한다. 증폭될 단일 가닥 폴리뉴클레오티드는 서로 실질적으로 또는 완전히 상보적이므로 함께 혼성화하여 스템-루프(stem-loop) 구조를 형성할 수 있는 2개의 비인접 서열들을 함유한다. 이 단일 가닥 폴리뉴클레오티드는 이미 폴리뉴클레오티드 분석물의 일부일 수 있거나 폴리뉴클레오티드 분석물의 존재의

결과로서 생성될 수 있다.

[0492] 핵산의 증폭이라는 결과를 달성하는 또 다른 방법은 리가제 연쇄 반응(LCR)로서 공지되어 있다. 이 방법은 리가제 효소를 사용하여 미리 형성된 핵산 프로브들의 쌍을 연결한다. 상기 프로브는 핵산 분석물(존재하는 경우)의 각각의 상보적 가닥과 혼성화하고, 리가제는 프로브들의 각각의 쌍을 함께 결합시켜, 다음 주기에서 특정 핵산 서열을 반복하는 데에 사용될 수 있는 2개의 주형들을 생성하는 데에 사용된다.

[0493] 핵산 증폭을 달성하는 또 다른 방법은 핵산 서열-기초 증폭(NASBA)이다. 이 방법은 특정 핵산의 시험관내 연속적인 균질한 등온 증폭을 유도하여 상기 핵산의 RNA 카피를 제공하는 프로모터-유도된 효소적 공정이다. NASBA를 수행하기 위한 시약은 프로모터를 포함하는 5'-꼬리를 가진 제1 DNA 프라이머, 제2 DNA 프라이머, 역전사효소, RNase-H, T7 RNA 중합효소, NTP들 및 dNTP들을 포함한다.

[0494] 핵산의 특정 군을 증폭하는 또 다른 방법은 그의 RNA 기질을 기하급수적으로 증폭하는 Q-베타-레플리카제(replicase)의 능력에 의존하는 Q-베타-레플리카제 방법이다. 이러한 증폭을 수행하기 위한 시약은 "미디(midi)-변이체 RNA"(증폭가능한 혼성화 프로브), NTP들 및 Q-베타-레플리카제를 포함한다.

[0495] 핵산을 증폭하는 또 다른 방법은 3SR로서 공지되어 있고 RNase-H 활성이 역전사효소에 존재한다는 점을 제외하고 NASBA와 유사하다. 3SR에 의한 증폭은 RNA가 프로모터-유도된 RNA 중합효소, 역전사효소 및 RNase-H를 표적 RNA와 병용하는 등온 공정에서 증폭되는 RNA 특이적 표적 방법이다. 예를 들면, 문헌(Fahy et al. PCR Methods Appl. 1:25-33 (1991))을 참조한다.

[0496] 핵산을 증폭하는 또 다른 방법은 진-프로브(Gen-Probe)에 의해 사용된 전사-매개된 증폭(TMA)이다. 이 방법은 자가-지속된 서열 복제에서 2종의 효소들을 사용한다는 점에서 NASBA와 유사하다. 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,299,491호를 참조한다.

[0497] 핵산을 증폭하는 또 다른 방법은 그의 인식 부위의 헤미포스포로티오에이트 형태의 비변형된 가닥을 닉킹하는 제한 엔도뉴클레아제, 예컨대, HincII 또는 BsoBI의 능력, 및 닉에서 3'-말단을 연장시키고 하류 DNA 가닥을 치환시키는 엑소뉴클레아제 결핍 DNA 중합효소, 예컨대, 클레나우 엑소 마이너스 중합효소 또는 Bst 중합효소의 능력에 기초한 등온 증폭 기법인 가닥 치환 증폭(SDA)이다(Westin et al 2000, Nature Biotechnology, 18, 199-202; Walker et al 1992, Nucleic Acids Research, 20, 7, 1691-1696). 기하급수적 증폭은 센스 반응과 안티센스 반응의 커플링으로부터 발생되는데, 이때 센스 반응으로부터 치환된 가닥은 안티센스 반응을 위한 표적으로서 사용되거나, 역으로 안티센스 반응으로부터 치환된 가닥은 센스 반응을 위한 표적으로 사용된다.

[0498] 또 다른 핵산 증폭 방법은 롤링 서클 증폭(RCA)이다(Lizardi et al. 1998, Nature Genetics, 19:225-232). RCA를 이용하여 단일 가닥 분자를 원 형태의 핵산으로 증폭할 수 있다. RCA는 그의 가장 단순한 형태에서 단일 프라이머와 환형 핵산의 혼성화를 포함한다. 가닥 치환 활성을 가진 DNA 중합효소에 의한 프라이머의 연장은 단일 DNA 가닥으로 연쇄적으로 연결된 환형 핵산의 다수의 카피들을 생성한다.

[0499] 본 발명의 일부 실시양태들에서, RCA는 라이게이션과 커플링된다. 예를 들면, 단일 올리고뉴클레오티드는 라이게이션을 위해 사용될 수 있고 RCA를 위한 환형 주형으로서도 사용될 수 있다. 이 유형의 폴리뉴클레오티드는 "자물쇠(padlock) 프로브" 또는 "RCA 프로브"로서 지칭될 수 있다. 자물쇠 프로브의 경우, 올리고뉴클레오티드의 양 말단들은 관심있는 핵산 서열 내의 도메인에 상보적인 서열을 함유한다. 자물쇠 프로브의 제1 말단은 관심있는 핵산 서열 상의 제1 도메인에 실질적으로 상보적이고, 자물쇠 프로브의 제2 말단은 제1 도메인에 인접하거나 제1 도메인 근처에 있는 제2 도메인에 실질적으로 상보적이다. 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산의 혼성화는 혼성화 복합체를 형성한다. 자물쇠 프로브의 말단들의 라이게이션은 환형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 변형된 혼성화 복합체를 형성한다. 일부 경우, 라이게이션 전, 중합효소는 자물쇠 프로브의 한 말단을 연장시킴으로써 갭을 채울 수 있다. 이로써 형성된 환형 폴리뉴클레오티드는 중합효소의 첨가 시 증폭된 생성물 핵산을 형성하는 RCA를 위한 주형으로서 사용될 수 있다. 본원에 기재된 본 발명의 방법은 5'-말단 및 3'-말단 둘 다 상에서 정해진 서열을 가진 증폭된 생성물을 생성할 수 있다. 이러한 증폭된 생성물은 자물쇠 프로브로서 사용될 수 있다.

[0500] 본 발명의 일부 양태들은 핵산 또는 폴리뉴클레오티드의 선형 증폭을 이용한다. 선형 증폭은 일반적으로 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 분자, 통상적으로 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 분석물의 한 가닥만의 상보체의 하나 이상의 카피들의 형성을 포함하는 방법을 지칭한다. 따라서, 선형 증폭과 기하급수적 증폭 사이의 주요 차이점은 기하급수적 증폭 공정에서는 생성물이 보다 더 많은 생성물의 형성을 위한 기질로서 사용되는 반면, 선형 증폭 공정에서는 출발 서열이 생성물의 형성을 위한 기질이고 반응, 즉 출발 주형의 복제의 생성물은 생성물의 생성

을 위한 기질이 아니라는 점이다. 형성된 생성물의 양이 시간의 기하급수적 함수인 기하급수적 증폭과 대조적으로, 선형 증폭에서 형성된 생성물의 양은 시간의 선형 함수로서 증가한다.

[0501] 일부 실시양태들에서, 증폭 방법은 당업자에 의해 잘 인식될 바와 같이 고체상 증폭, 폴로니 증폭, 콜로니 증폭, 에멀젼 PCR, 비드 RCA, 표면 RCA, 표면 SDA 등일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 용액 중의 자유 DNA 분자, 또는 DNA 분자의 단지 한 말단에 의해 적합한 매트릭스에 고착된 DNA 분자의 증폭을 야기하는 증폭 방법이 이용될 수 있다. PCR 프라이머들 둘 다가 표면에 부착되어 있는 가교 PCR에 의존하는 방법(예를 들면, PCT 공보 제WO 2000/018957호 및 문헌(Adessi et al., Nucleic Acids Research (2000): 28(20): E87) 참조)이 이용될 수 있다. 일부 경우, 본 발명의 방법은 동일한 앰플리콘들의 공간적 클러스터링을 유지하는 다중체 증폭을 지칭하는 "중합효소 콜로니 기술" 또는 "폴로니"를 생성할 수 있다(하버드 분자 기술 그룹 및 리퍼 전산유전학 센터(Harvard Molecular Technology Group and Lipper Center for Computational Genetics) 웹사이트 참조). 이 방법은 예를 들면, 제자리 폴로니(Mitra and Church, Nucleic Acid Research 27, e34, Dec. 15, 1999), 제자리 롤링 서클 증폭(RCA)(Lizardi et al., Nature Genetics 19, 225, July 1998), 가교 PCR(미국 특허 제5,641,658호), 피코타이터 PCR(Leamon et al., Electrophoresis 24, 3769, November 2003), 및 에멀젼 PCR(Dressman et al., PNAS 100, 8817, Jul. 22, 2003)을 포함한다. 본 발명의 방법은 폴로니를 생성하고 사용하는 신규 방법을 제공한다.

[0502] 증폭은 표적 서열의 카피 수가 증가하는 임의의 공정, 예를 들면, PCR을 통해 달성될 수 있다. PCR에 의한 표적 서열의 증폭에 유리한 조건은 당분야에서 공지되어 있고, 공정의 다양한 단계들에서 최적화될 수 있고, 반응에서의 요소들의 특성, 예컨대, 표적 유형, 표적 농도, 증폭될 서열 길이, 표적 및/또는 하나 이상의 프라이머의 서열, 프라이머 길이, 프라이머 농도, 사용된 중합효소, 반응 부피, 하나 이상의 요소 대 하나 이상의 다른 요소의 비 등(이들의 일부 또는 전부가 변경될 수 있음)에 의존한다. 일반적으로, PCR은 표적 서열을 증폭하기 위해 증폭될 표적을 변성시키는 단계(이중 가닥인 경우), 하나 이상의 프라이머와 표적을 혼성화시키는 단계, 및 DNA 중합효소로 프라이머를 연장시키는 단계를 반복된(또는 "순환된") 단계로 포함한다. 이 공정의 단계들은 다양한 결과를 위해, 예컨대, 수율을 향상시키고/시키거나, 부정확한 생성물의 형성을 감소시키고/시키거나, 프라이머 어닐링의 특이성을 증가시키거나 감소시키도록 최적화될 수 있다. 최적화 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있고, 증폭 반응에서 요소의 유형 및 양의 조절, 및/또는 공정 내의 주어진 단계의 조건, 예컨대, 특정 단계의 온도, 특정 단계의 지속시간 및/또는 주기의 수의 조절을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 증폭 반응은 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 50 이상의 주기들을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 증폭 반응은 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 50 이하의 주기들을 포함한다. 주기는 임의의 수의 단계, 예컨대, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 단계들을 함유할 수 있다. 단계는 3' 말단 연장(예를 들면, 어댑터 충전), 프라이머 어닐링, 프라이머 연장 및 가닥 변성을 포함하나 이들로 한정되지 않는 주어진 단계의 목적을 달성하기에 적합한 임의의 온도 또는 온도 구배를 포함할 수 있다. 단계들은 약 1초, 5초, 10초, 15초, 20초, 25초, 30초, 35초, 40초, 45초, 50초, 55초, 60초, 70초, 80초, 90초, 100초, 120초, 180초, 240초, 300초, 360초, 420초, 480초, 540초 또는 600초 이하 또는 이상을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 지속시간(수동으로 중단될 때까지 무한 지속시간을 포함함) 동안 지속될 수 있다. 상이한 단계들을 포함하는 임의의 수의 주기들이 임의의 순서로 조합될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 상이한 단계들을 포함하는 상이한 주기들은 조합되는 주기의 총수가 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 50 이하 또는 이상의 주기이도록 조합된다. 증폭은 본 발명의 방법 및 조성물을 사용한 다중반응 절차 동안 임의의 시점에서, 예를 들면, 독립적인 반응 부피로부터의 시퀀싱 라이브러리들의 풀링 전 또는 후에 수행될 수 있고, 본원에 기재된 임의의 적합한 표적 분자를 증폭하는 데에 이용될 수 있다.

[0503] **라이게이션 반응**

[0504] 일부 실시양태들에서, 올리고뉴클레오티드는 어댑터 또는 바코드에 라이게이션될 수 있거나 연결될 수 있다. 연결제는 리가제일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 리가제는 잘 공지된 절차(Maniatis, T. in Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982))를 이용하는 T4 DNA 리가제일 수 있다. 다른 DNA 리가제도 사용될 수 있다. 라이게이션과 관련하여, 다른 리가제, 예컨대, 호열성 유기체로부터 유래된 리가제를 사용하여 고온에서 라이게이션을 허용함으로써, (증가된 특이성을 가진) 보다 더 긴 올리고뉴클레오티드들의 사용을 가능하게 하는데, 이러한 올리고뉴클레오티드들은 그들의 어닐링을 위해 통상적으로 허용될 수 있는 고온 하에서 동시에 어닐링될 수 있고 라이게이션될 수 있다.

[0505] 2개의 폴리뉴클레오티드들과 관련하여 본원에서 사용된 용어 "연결" 및 "라이게이션"은 연속 골격을 가진 보다 더 큰 단일 폴리뉴클레오티드를 생성하기 위한 2개의 별개의 폴리뉴클레오티드들의 공유부착을 지칭한다. 2개의

폴리뉴클레오티드들을 연결하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 효소적 방법 및 비-효소적(예를 들면, 화학적) 방법을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 비-효소적 방법인 라이게이션 반응의 예는 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제5,780,613호 및 제5,476,930호에 기재된 비-효소적 라이게이션 기법을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 어댑터 올리고뉴클레오티드는 리가제, 예를 들면, DNA 리가제 또는 RNA 리가제에 의해 표적 폴리뉴클레오티드에 연결된다. 특징규명된 반응 조건을 각각 가진 다수의 리가제들이 당분야에서 공지되어 있고, tRNA 리가제, Taq DNA 리가제, 써머스 필리포르미스(*Thermus filiformis*) DNA 리가제, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) DNA 리가제, Tth DNA 리가제, 써머스 스코토덕터스(*Thermus scotoductus*) DNA 리가제(I 및 II), 열안정성 리가제, 앰플리가제(Ampligase) 열안정성 DNA 리가제, VanC-유형 리가제, 9°N DNA 리가제, Tsp DNA 리가제, 및 생물자원탐사(bioprospecting)에 의해 발견된 신규 리가제를 비롯한 NAD+ 의존적 리가제; T4 RNA 리가제, T4 DNA 리가제, T3 DNA 리가제, T7 DNA 리가제, Pfu DNA 리가제, DNA 리가제 1, DNA 리가제 III, DNA 리가제 IV, 및 생물자원탐사에 의해 발견된 신규 리가제를 비롯한 ATP 의존적 리가제; 및 야생형, 돌연변이체 동종형(isoforms), 및 이들의 유전적으로 조작된 변이체를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 라이게이션은 혼성화가능한 서열, 예컨대, 상보적 오버행을 가진 폴리뉴클레오티드들 사이의 라이게이션일 수 있다. 라이게이션은 2개의 블런트 말단들 사이의 라이게이션일 수도 있다. 일반적으로, 5' 포스페이트가 라이게이션 반응에서 사용된다. 5' 포스페이트는 표적 폴리뉴클레오티드, 어댑터 올리고뉴클레오티드, 또는 이들 둘 다에 의해 제공될 수 있다. 5' 포스페이트는 필요한 경우 연결될 폴리뉴클레오티드들에 추가될 수 있거나 이 폴리뉴클레오티드들로부터 제거될 수 있다. 5' 포스페이트를 추가하거나 제거하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 효소적 공정 및 화학적 공정을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 5' 포스페이트의 추가 및/또는 제거에 유용한 효소는 키나제, 포스파타제 및 중합효소를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 라이게이션 반응에서 연결된 2개의 말단들 둘 다(예를 들면, 어댑터 말단 및 표적 폴리뉴클레오티드 말단)가 상기 2개의 말단들의 연결 시 2개의 공유결합이 만들어지도록 5' 포스페이트를 제공한다. 일부 실시양태들에서, 라이게이션 반응에서 연결된 2개의 말단들 중 하나만(예를 들면, 어댑터 말단 및 표적 폴리뉴클레오티드 말단 중 하나만)이 상기 2개의 말단들의 연결 시 하나의 공유결합만이 만들어지도록 5' 포스페이트를 제공한다. 일부 실시양태들에서, 표적 폴리뉴클레오티드의 한 말단 또는 양 말단들에서 한 가닥만이 어댑터 올리고뉴클레오티드에 연결된다. 일부 실시양태들에서, 표적 폴리뉴클레오티드의 한 말단 또는 양 말단들에서 양 가닥들이 어댑터 올리고뉴클레오티드에 연결된다. 일부 실시양태들에서, 라이게이션 전에 3' 포스페이트가 제거된다. 일부 실시양태들에서, 어댑터 올리고뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드의 양 말단들에 추가되는데, 이때 각각의 말단에서 한 가닥 또는 양 가닥들이 하나 이상의 어댑터 올리고뉴클레오티드에 연결된다. 양 말단들에서 양 가닥들이 어댑터 올리고뉴클레오티드에 연결될 때, 어댑터 올리고뉴클레오티드로부터 유래된 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있는 상응하는 3' 말단의 연장을 위한 주형으로서 사용될 수 있는 5' 오버행을 남기는 절단 반응이 연결 후 수행될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 표적 폴리뉴클레오티드는 한 말단 상의 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드 및 다른 말단 상의 제2 어댑터 올리고뉴클레오티드에 연결된다. 일부 실시양태들에서, 표적 폴리뉴클레오티드, 및 그에 연결되는 어댑터는 블런트 말단을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 바코드 서열이 하나 초과의 샘플의 표적 폴리뉴클레오티드에 연결되지 않도록 각각의 샘플에 대한 하나 이상의 바코드 서열을 포함하는 상이한 제1 어댑터 올리고뉴클레오티드를 사용하여 각각의 샘플에 대해 별개의 라이게이션 반응을 수행한다. 그 자신에 연결된 어댑터/프라이머 올리고뉴클레오티드를 가진 표적 폴리뉴클레오티드는 연결된 어댑터에 의해 "태깅된" 것으로서 간주된다.

[0506] 일부 실시양태들에서, 클릭 화학반응을 이용하여 본원에 기재된 핵산을 연결한다. 클릭 화학반응을 이용하여 다양한 분자들을 연결하기에 적합한 방법은 당분야에서 공지되어 있다(올리고뉴클레오티드들의 클릭 화학반응 연결에 대해서는 예를 들면, 문헌(El-Sagheer et al., PNAS, 108:28, 11338-11343, 2011) 참조). 클릭 화학반응은 Cu1의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0507] **바코드**

[0508] 바코드는 전형적으로 바코드와 연결된 폴리뉴클레오티드의 일부 특징이 식별될 수 있게 하는 공지된 핵산 서열이다. 일부 실시양태들에서, 바코드는 표적 폴리뉴클레오티드에 연결될 때 표적 폴리뉴클레티드가 유래된 샘플의 식별자로서 작용하는 핵산 서열을 포함한다.

[0509] 바코드는 충분한 정도의 식별을 가능하기에 적합한 길이, 예를 들면, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개, 53개, 54개 또는 55개 이상의 뉴클레오티드 길이를

갖도록 디자인될 수 있다. 다수의 바코드들, 예컨대, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 바코드들이 임의적으로 비-바코드 서열에 의해 분리된 상태로 동일한 분자 상에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 바코드는 10개, 9개, 8개, 7개, 6개, 5개 또는 4개 뉴클레오티드 길이보다 더 짧다. 일부 실시양태들에서, 일부 폴리뉴클레오티드들과 연결된 바코드는 다른 폴리뉴클레오티드들과 연결된 바코드와 상이한 길이를 가진다. 일반적으로, 바코드는 충분한 길이를 갖고, 샘플과 연결된 바코드에 기초한 샘플의 식별을 가능하게 할 정도로 충분히 상이한 서열을 포함한다. 일부 실시양태들에서, 바코드, 및 이와 연결된 샘플 공급원은 바코드 서열 내의 하나 이상의 뉴클레오티드의 돌연변이, 삽입 또는 결실, 예컨대, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 뉴클레오티드의 돌연변이, 삽입 또는 결실 후 정확히 식별될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 복수의 바코드들 중 각각의 바코드는 3개 이상의 뉴클레오티드 위치들, 예컨대, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 위치들에서 상기 복수의 바코드들 중 모든 다른 바코드들과 상이하다.

[0510] **서열결정**

[0511] 본원에 기재된, 드 노보 합성된 올리고뉴클레오티드 및 보다 더 긴 폴리뉴클레오티드 생성물은 절차, 예컨대, 다중반응 절차의 후속 단계로 진행하기 전에 품질 조절을 받을 수 있다. 품질 조절은 별개의 부피 내에서, 예컨대, 본원에 기재된 기판의 분리된 특징부들 상에서 개별 생성물을 유지하면서 적용될 수 있다. 품질 조절을 위해 분획이 분취될 수 있는 반면, 각각의 생성물을 구획화하는 부피의 나머지는 개별적으로 접근가능한 상태로 남아있다.

[0512] 도 17은 차세대 서열결정을 포함하는 품질 조절 절차의 일례를 보여준다. 특정 생성물을 표적화하는 유전자 특이적 자물쇠 프로브는 시험될 생성물의 중첩되는 서열 분절들을 커버하도록 디자인된다. 유전자 생성물에 대해 특이적인 개별 자물쇠 프로브의 말단들은 서열결정 동안 적절한 커버리지(coverage)를 위해 유전자 생성물을 따라 산재된 영역들에 혼성화될 수 있도록 디자인될 수 있다. 동일한 유전자 생성물에 대해 특이적인 모든 프로브들이 그 유전자 생성물과 연결된 바코드 서열을 포함할 수 있다. 적합한 중합효소 및/또는 리가제를 사용하여, 유전자 생성물 표적을 따라 자물쇠 프로브의 말단들 사이를 채울 수 있다. 일부 경우, 자물쇠 프로브는 환형 단일 가닥 DNA를 형성할 것이다. 전형적으로 선형 유전자 생성물은 예를 들면, 유전자 생성물 부피의 분획의 분취 후 분해될 수 있다. 대안적으로, 유전자 생성물 부피의 분획은 자물쇠 프로브의 첨가 후 분취될 수 있다. 유전자 생성물의 분절을 보유하는 자물쇠 프로브는 예를 들면, PCR의 이용을 통해 증폭될 수 있다. 자물쇠 프로브 상의 보편적 또는 특이적 프라이머 결합 영역이 증폭 동안 표적화될 수 있다. 서열결정 프라이머 결합 영역은 처음부터 자물쇠 프로브에 존재할 수 있거나, 예를 들면, 증폭 전, 동안 또는 후에 서열결정 어댑터를 사용함으로써 후속 단계 동안 첨가될 수 있다.

[0513] 다양한 실시양태들에서, 유전자 생성물 특이적 자물쇠 프로브는 초기 시퀀싱 라이브러리 단계 후에 풀링될 것이다. 이러한 경우, 유전자 생성물 특이적 바코드를 사용하여 개별 유전자 생성물에 대한 서열 정보를 역추적할 수 있다. 본원에 기재되어 있거나 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 수단에 의해 수득된 서열결정 정보는 예를 들면, 바코드 정보를 기초로 개별 서열 풀로 분류함으로써 해독될 수 있다. 당분야에서 공지되어 있는 적합한 정렬 및 서열 확인 알고리즘을 사용하여 품질 조절을 마무리할 수 있다. 오류율 및 위치는 서열 좌위, 유전자 생성물, 라이브러리 또는 라이브러리 하위분절에 의해 분석될 수 있다. 오류 분석은 후속 단계 또는 요청자에게의 전달을 위해 생성물의 수용 또는 거부를 알려줄 수 있다.

[0514] 임의의 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 검출 또는 정량 분석이 서열결정에 의해 달성될 수 있다. 서브유닛 또는 전체 합성된 올리고뉴클레오티드는 본원에 기재된 서열결정 방법들을 비롯한, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 방법들, 예를 들면, 일루미나(Illumina) HiSeq 2500에 의한 모든 올리고뉴클레오티드들의 전체 서열결정을 통해 검출될 수 있다.

[0515] 서열결정은 당분야에서 잘 공지되어 있는 고전적인 생거 서열결정 방법을 통해 달성될 수 있다. 서열결정은 고처리율 시스템들의 이용을 통해 달성될 수도 있는데, 이러한 시스템들 중 일부는 성장하는 가닥 내로의 도입 직후에 또는 이러한 도입 시 서열결정된 뉴클레오티드의 검출, 즉 실시간 또는 실질적으로 실시간 서열 검출을 가능하게 한다. 일부 경우, 고 처리율 서열결정은 시간당 1,000개 이상, 5,000개 이상, 10,000개 이상, 20,000개 이상, 30,000개 이상, 40,000개 이상, 50,000개 이상, 100,000개 이상 또는 500,000개 이상의 서열 리드들(reads)을 생성하고; 이때 각각의 리드는 리드당 50개 이상, 60개 이상, 70개 이상, 80개 이상, 90개 이상, 100개 이상, 120개 이상 또는 150개 이상의 염기를 가진다.

[0516] 일부 실시양태들에서, 고 처리율 서열결정은 일루미나의 게놈 분석기 IIX, MiSeq 개인용 서열분석기 또는 HiSeq

시스템, 예컨대, HiSeq 2500, HiSeq 1500, HiSeq 2000 또는 HiSeq 1000을 이용하는 HiSeq 시스템에 의해 이용될 수 있는 기술의 이용을 포함한다. 이 기계들은 합성 화학반응에 의한 가역적 종결요소(terminator)-기초 서열결정을 이용한다. 이 기계들은 8일 이내에 2천억 개의 DNA 또는 그 이상의 리드들을 처리할 수 있다. 3일, 2일, 1일 또는 이보다 더 짧은 시간 이내의 실행을 위해서는 보다 더 작은 시스템을 이용할 수 있다. 짧은 합성 주기를 이용하여 서열결정 결과를 수득하는 데에 소요되는 시간을 최소화할 수 있다.

[0517] 일부 실시양태들에서, 고 처리율 서열결정은 ABI 솔리드 시스템(Solid System)에 의해 이용될 수 있는 기술의 이용을 포함한다. 이 유전적 분석 플랫폼은 비드에 연결된, 클론 증폭된 DNA 단편의 대량 병렬식 서열결정을 가능하게 한다. 이 서열결정 방법은 염료로 표지된 올리고뉴클레오티드를 사용한 순차적 라이게이션에 기초한다.

[0518] 차세대 서열결정은 (예를 들면, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)로부터의 기술(이온 토렌트(Ion Torrent))을 이용하는) 이온 반도체 서열결정을 포함할 수 있다. 이온 반도체 서열결정은 뉴클레오티드가 DNA의 가닥 내로 도입될 때 이온이 방출될 수 있다는 사실을 이용할 수 있다. 이온 반도체 서열결정을 수행하기 위해, 미세가공된(micromachined) 웰의 고밀도 어레이를 형성할 수 있다. 각각의 웰은 단일 DNA 주형을 보유할 수 있다. 웰 아래에 이온 민감성 층이 존재할 수 있고, 이온 민감성 층 아래에 이온 센서가 존재할 수 있다. 뉴클레오티드가 DNA에 추가될 때, H+가 방출될 수 있는데, 이것은 pH의 변화로서 측정될 수 있다. H+ 이온은 전압으로 전환될 수 있고 반도체 센서에 의해 기록될 수 있다. 어레이 칩은 잇따라 하나의 뉴클레오티드로 순차적으로 침수될 수 있다. 스캐닝, 광 또는 카메라가 요구되지 않을 수 있다. 일부 경우, IONPROTON™ 서열결정기를 이용하여 핵산을 서열결정한다. 일부 경우, IONPGM™ 서열결정기를 이용한다. 이온 토렌트 개인용 게놈 기계(PGM)는 2시간 이내에 1천만 개의 리드들을 처리할 수 있다.

[0519] 일부 실시양태들에서, 고 처리율 서열결정은 헬리코스 바이오사이언시스 코포레이션(Helicos BioSciences Corporation)(미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)에 의해 입수될 수 있는 기술, 예컨대, 합성에 의한 단일 분자 서열결정(SMSS) 방법의 이용을 포함한다. SMSS는 최대 24시간 이내에 전체 인간 게놈을 서열결정할 수 있게 하기 때문에 독특하다. 최종적으로, SMSS는 MIP 기술처럼 혼성화 전 예비증폭 단계를 요구하지 않기 때문에 강력하다. 사실상, SMSS는 임의의 증폭을 요구하지 않는다. SMSS는 미국 특허출원 공보 제20060024711호, 제20060024678호, 제20060012793호, 제20060012784호 및 제20050100932호에 부분적으로 기재되어 있다.

[0520] 일부 실시양태들에서, 고 처리율 서열결정은 454 라이프사이언시스 인코포레이티드(454 Lifesciences, Inc.)(미국 코넥티컷주 브랜포드 소재)에 의해 입수될 수 있는 기술, 예컨대, 기계 내의 CCD 카메라에 의해 기록될, 서열결정 반응에 의해 생성된 화학발광 신호를 전달하는 광섬유 플레이트를 포함하는 피코 타이터(Pico Titer) 플레이트 디바이스의 이용을 포함한다. 이러한 광섬유의 사용은 4.5시간 이내에 최소 2천만 개의 염기쌍들의 검출을 가능하게 한다.

[0521] 비드 증폭에 이어서 광섬유 검출을 이용하는 방법은 미국 특허출원 공보 제20020012930호, 제20030058629호, 제20030100102호, 제20030148344호, 제20040248161호, 제20050079510호, 제20050124022호 및 제20060078909호뿐만 아니라 문헌(Marguiles, M., et al. "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors", Nature, doi: 10.1038/nature03959)에도 기재되어 있다.

[0522] 일부 실시양태들에서, 가역적 종결요소 화학반응을 이용하는 클론성 단일 분자 어레이(솔렉사 인코포레이티드(Solexa, Inc.)) 또는 합성에 의한 서열결정(SBS)을 이용하여 고 처리율 서열결정을 수행한다. 이 기술들은 미국 특허 제6,969,488호, 제6,897,023호, 제6,833,246호 및 제6,787,308호; 미국 특허출원 공보 제20040106130호, 제20030064398호 및 제20030022207호; 및 문헌(Constans, A., The Scientist 2003, 17(13):36)에 부분적으로 기재되어 있다. 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 서열결정 방법, 예컨대, 파시픽 바이오사이언시스(Pacific Biosciences), 컴플리트 게노믹스(Complete Genomics), 제니아 테크놀로지스(Genia Technologies), 할사이언 몰레큘라(Halcyon Molecular), 옥스포드 나노포어 테크놀로지스(Oxford Nanopore Technologies) 등에 의해 시판된 서열결정 방법을 이용하여 올리고뉴클레오티드의 고 처리율 서열결정을 달성할 수 있다. 다른 고처리율 서열결정 시스템은 미국 특허출원 공보 제20030044781호 및 제2006/0078937호뿐만 아니라 문헌(Venter, J., et al. Science 16 February 2001), 문헌(Adams, M. et al, Science 24 March 2000) 및 문헌(M. J, Levene, et al. Science 299:682-686, January 2003)에도 개시된 시스템들을 포함한다. 요약하건대, 이러한 시스템들은 올리고뉴클레오티드의 분자에 대해 측정되는 중합 반응을 통한 염기의 일시적 추가에 의해 복수의 염기들을 가진 표적 올리고뉴클레오티드 분자를 서열결정하는 단계를 포함한다. 즉, 서열결정될 주형 올리고뉴클레오티드 분자에 대한 핵산 중합효소의 활성이 실시간으로 추적된다. 그 다음, 순차적인 염기 추가에 있어서 각각의 단계에서 핵산 중합효소의 촉매 활성에 의해 표적 올리고뉴클레오티드의 성장하는 상보적 가닥 내로 어떤

염기가 도입되는지를 확인함으로써 서열을 유추할 수 있다. 표적 올리고뉴클레오티드 분자 복합체 상의 중합효소는 표적 올리고뉴클레오티드 분자를 따라 이동하기에 적합한 위치에서 제공되고 활성 부위에서 올리고뉴클레오티드 프라이머를 연장시킨다. 복수의 표지된 유형의 뉴클레오티드 유사체들이 활성 부위 근처에서 제공되는데, 이때 각각의 구별가능한 유형의 뉴클레오티드 유사체는 표적 올리고뉴클레오티드 서열 내의 상이한 뉴클레오티드에 상보적이다. 성장하는 올리고뉴클레오티드 가닥은 중합효소를 사용하여 뉴클레오티드 유사체를 활성 부위에서 올리고뉴클레오티드 가닥에 추가함으로써 연장되는데, 이때 추가되는 상기 뉴클레오티드 유사체는 활성 부위에서 표적 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드에 상보적이다. 중합 단계의 결과로서 올리고뉴클레오티드 프라이머에 추가된 뉴클레오티드 유사체가 식별된다. 표지된 뉴클레오티드 유사체를 제공하는 단계, 성장하는 올리고뉴클레오티드 가닥을 중합하는 단계, 및 추가된 뉴클레오티드 유사체를 식별하는 단계는 올리고뉴클레오티드 가닥이 더 연장되고 표적 올리고뉴클레오티드의 서열이 확인되도록 반복된다.

[0523] 차세대 서열결정 기법은 파시픽 바이오사이언시스에 의한 실시간(SMRT™) 기술을 포함할 수 있다. SMRT에서, 4개의 DNA 염기들 각각이 4개의 상이한 형광 염료들 중 하나에 부착될 수 있다. 이 염료들은 인-연결될 수 있다. 단일 DNA 중합효소는 제로-모드 도파관(ZMW)의 하부에서 주형 단일 가닥 DNA의 단일 분자에 의해 고정될 수 있다. ZMW는 ZMW의 외부에서 (마이크로초 이내에) 신속히 확산할 수 있는 형광 뉴클레오티드의 배경으로부터 DNA 중합효소에 의한 단일 뉴클레오티드의 도입을 관찰할 수 있게 하는 밀폐 구조물일 수 있다. 뉴클레오티드를 성장하는 가닥 내로 도입하기 위해 수 밀리초(milliseconds)가 소요될 수 있다. 이 시간 동안 형광 표지는 여기될 수 있고 형광 신호를 생성할 수 있고, 형광 태그는 절단될 수 있다. ZMW는 아래부터 조명될 수 있다. 여기 빔으로부터의 약화된 광은 각각의 ZMW의 하부 20 내지 30 nm를 침투할 수 있다. 20 젭토리터(10" 리터)의 검출 한계를 가진 현미경이 생성될 수 있다. 작은 검출 부피는 배경 노이즈(noise)의 감소에서의 1000배 개선을 제공할 수 있다. 염료의 상응하는 형광의 검출은 어떤 염기가 도입되었는지를 표시할 수 있다. 공정은 반복될 수 있다.

[0524] 일부 경우, 차세대 서열결정은 나노공극 서열결정이다(예를 들면, 문헌(Soni GV and Meller A. (2007) Clin Chem 53: 1996-2001) 참조). 나노공극은 직경이 대략 약 1 나노미터인 작은 홀일 수 있다. 전도 유체에서의 나노공극의 함침 및 이를 가로지르는 전위의 적용은 나노공극을 통한 이온의 전도로 인해 약간의 전류를 발생시킬 수 있다. 흐르는 전류의 양은 나노공극의 크기에 민감할 수 있다. DNA 분자가 나노공극을 통과할 때, DNA 분자 상의 각각의 뉴클레오티드는 상이한 정도로 나노공극을 폐쇄시킬 수 있다. 따라서, DNA 분자가 나노공극을 통과할 때 나노공극을 통과하는 전류에서의 변화는 DNA 서열의 판독을 표시할 수 있다. 나노공극 서열결정 기술은 옥스포드 나노포어 테크놀로지스(Oxford Nanopore Technologies)로부터의 나노공극 서열결정 기술, 예를 들면, GridION 시스템일 수 있다. 단일 나노공극은 마이크로웰의 상부를 가로지른 중합체 막 내에 삽입될 수 있다. 각각의 마이크로웰은 개별 감지를 위한 전극을 가질 수 있다. 마이크로웰은 칩당 100,000개 이상(예를 들면, 200,000개, 300,000개, 400,000개, 500,000개, 600,000개, 700,000개, 800,000개, 900,000개 또는 1,000,000개 초과)의 마이크로웰을 가진 어레이 칩 내에 제작될 수 있다. 기계(또는 노드(node))를 이용하여 칩을 분석할 수 있다. 데이터는 실시간으로 분석될 수 있다. 하나 이상의 기계가 한번에 작동될 수 있다. 나노공극은 단백질 나노공극, 예를 들면, 단백질 알파-헤몰라이신, 헵타머성 단백질 공극일 수 있다. 나노공극은 만들어진 고체 상태 나노공극, 예를 들면, 합성 막(예를 들면, SiN_x 또는 Si_2)에서 형성된 나노미터 크기의 홀일 수 있다. 나노공극은 하이브리드 공극(예를 들면, 고체 상태 막 내로의 단백질 공극의 삽입)일 수 있다. 나노공극은 내장된 센서(예를 들면, 터널링 전극 검출기, 전기용량 검출기, 그라펜-기제 나노-갭 또는 가장자리 상태 검출기(예를 들면, 문헌(Garaj et al. (2010) Nature vol. 67, doi: 10.1038/nature09379) 참조)를 가진 나노공극일 수 있다. 나노공극은 특정 유형의 분자(예를 들면, DNA, RNA 또는 단백질)를 분석하기 위해 작용화될 수 있다. 나노공극 서열결정은 DNA가 공극을 통해 전위할 때 실시간으로 서열결정되면서 온전한 DNA 중합체가 단백질 나노공극을 통과할 수 있는 "가닥 서열결정"을 포함할 수 있다. 효소는 이중 가닥 DNA의 가닥들을 분리할 수 있고 나노공극을 통해 가닥을 공급할 수 있다. DNA는 한 말단에서 헤어핀을 가질 수 있고, 시스템은 양 가닥들을 판독할 수 있다. 일부 경우, 나노공극 서열결정은 개별 뉴클레오티드가 전진하는 엑소뉴클레아제에 의해 DNA 가닥으로부터 절단될 수 있고 뉴클레오티드가 단백질 나노공극을 통과할 수 있는 "엑소뉴클레아제 서열결정"이다. 뉴클레오티드는 공극 내의 분자(예를 들면, 사이클로덱스트란)에 일시적으로 결합할 수 있다. 전류에서의 특징적인 단절을 이용하여 염기를 식별할 수 있다.

[0525] 제니아(GENIA)로부터의 나노공극 서열결정 기술이 이용될 수 있다. 조작된 단백질 공극은 지질 이중층 막 내에 매립될 수 있다. "활성 조절" 기술을 이용하여 효율적인 나노공극-막 조립, 및 채널을 통한 DNA 이동의 조절을 가능하게 할 수 있다. 일부 경우, 나노공극 서열결정 기술은 냅시스(NABsys)로부터의 나노공극 서열결정 기술이다. 게놈 DNA는 약 100 kb의 평균 길이를 가진 가닥으로 단편화될 수 있다. 100 kb 단편은 단일 가닥으로 만들

어진 후 6-머 프로브와 혼성화될 수 있다. 프로브를 가진 게놈 단편은 나노공극을 통과할 수 있고, 이것은 전류 대 시간 추적기록(tracing)을 생성할 수 있다. 전류 추적기록은 각각의 게놈 단편 상의 프로브의 위치를 제공할 수 있다. 게놈 단편을 정렬하여 게놈에 대한 프로브 맵을 생성할 수 있다. 상기 공정을 프로브의 라이브러리에 대해 동시에 수행할 수 있다. 각각의 프로브에 대한 게놈-길이 프로브 맵을 생성할 수 있다. 오류를 "혼성화에 의한 이동 윈도우 서열결정(mwSBH)"으로서 지칭되는 공정으로 고정할 수 있다. 일부 경우, 나노공극 서열결정 기술은 IBM/로슈(Roche)로부터의 나노공극 서열결정 기술이다. 전자 빔을 이용하여 마이크로칩에서 나노공극 크기의 개구를 만들 수 있다. 전기장을 이용하여 나노공극을 통해 DNA를 끌어당기거나 관통시킬 수 있다. 나노공극 내의 DNA 트랜지스터 디바이스는 금속과 유전체가 교대로 존재하는 나노미터 크기의 층을 포함할 수 있다. DNA 골격에서의 별개의 전하를 DNA 나노공극 내부의 전기장으로 끌어들일 수 있다. 게이트 전압을 끄고 켜는 것은 DNA 서열이 판독될 수 있게 할 수 있다.

[0526] 차세대 서열결정은 DNA 나노볼(nanoball) 서열결정을 포함할 수 있다(예를 들면, 컴플리트 게노믹스(Complete Genomics)에 의해 수행됨; 예를 들면, 문헌(Drmanac et al. (2010) Science 327: 78-81) 참조). DNA를 단리할 수 있고 단편화할 수 있고 크기를 선택할 수 있다. 예를 들면, DNA를 (예를 들면, 초음파처리로) 약 500 bp의 평균 길이까지 단편화할 수 있다. 어댑터(Ad1)를 단편의 말단에 부착시킬 수 있다. 어댑터를 사용하여 서열결정 반응을 위한 고착제에 혼성화시킬 수 있다. 각각의 말단에 결합된 어댑터를 가진 DNA를 PCR로 증폭할 수 있다. 상보적 단일 가닥 말단들이 서로 결합하여 환형 DNA를 형성하도록 어댑터 서열을 변경시킬 수 있다. DNA를 메틸화하여 후속 단계에서 사용되는 IIS형 제한 효소에 의한 절단으로부터 DNA를 보호할 수 있다. 어댑터(예를 들면, 우측 어댑터)는 제한 인식 부위를 가질 수 있고, 제한 인식 부위는 메틸화되지 않은 상태로 남아있을 수 있다. 어댑터에서 메틸화되지 않은 제한 인식 부위는 제한 효소(예를 들면, Acu1)에 의해 인식될 수 있고, DNA는 우측 어댑터의 우측 쪽으로 13 bp에서 Acu1에 의해 절단되어 선형 이중 가닥 DNA를 형성할 수 있다. 제2 라운드의 우측 어댑터 및 좌측 어댑터(Ad2)를 선형 DNA의 어느 한 말단에 라이게이션시킬 수 있고, 결합된 두 어댑터들을 가진 모든 DNA들을 (예를 들면, PCR로) PCR 증폭할 수 있다. Ad2 서열들이 서로 결합하여 환형 DNA를 형성할 수 있도록 이 서열들을 변경시킬 수 있다. DNA를 메틸화시킬 수 있지만, 제한 효소 인식 부위는 좌측 Ad1 어댑터 상에서 메틸화되지 않은 상태로 남아있을 수 있다. 제한 효소(예를 들면, Acu1)를 적용할 수 있고, DNA는 Ad1의 좌측 쪽으로 13 bp에서 절단되어 선형 DNA 단편을 형성할 수 있다. 제3 라운드의 우측 어댑터 및 좌측 어댑터(Ad3)를 선형 DNA의 우측 측면(flank) 및 좌측 측면에 라이게이션시킬 수 있고, 생성된 단편을 PCR로 증폭할 수 있다. 어댑터들이 서로 결합하여 환형 DNA를 형성할 수 있도록 이 어댑터들을 변경시킬 수 있다. III형 제한 효소(예를 들면, EcoP15)를 첨가할 수 있고; EcoP15는 Ad3의 좌측 쪽으로 26 bp 및 Ad2의 우측 쪽으로 26 bp에서 DNA를 절단할 수 있다. 이 절단은 DNA의 큰 분절을 제거할 수 있고 DNA를 한 번 더 선형화할 수 있다. 제4 라운드의 우측 어댑터 및 좌측 어댑터(Ad4)를 DNA에 라이게이션시킬 수 있고, DNA를 (예를 들면, PCR로) 증폭할 수 있고, 이들이 서로 결합하여 완성된 환형 DNA 주형을 형성하도록 변경할 수 있다.

[0527] (예를 들면, Phi 29 DNA 중합효소를 사용하는) 롤링 서클 복제를 이용하여 DNA의 작은 단편을 증폭할 수 있다. 4개의 어댑터 서열들은 혼성화할 수 있는 회문식 서열을 함유할 수 있고, 단일 가닥은 그 자체 상에서 접혀져, 평균적으로 대략 200 내지 300 나노미터의 직경을 가질 수 있는 DNA 나노볼(DNB™)을 형성할 수 있다. DNA 나노볼을 (예를 들면, 흡착으로) 마이크로어레이(서열결정 유동셀)에 부착시킬 수 있다. 유동셀은 이산화규소, 티타늄 및 헥사메틸디실라잔(HMDS) 및 포토레지스트 물질로 코팅된 실리콘 웨이퍼일 수 있다. 형광 프로브를 DNA에 라이게이션시켜 비연쇄 서열결정으로 서열결정을 수행할 수 있다. 조사된 위치의 형광의 색채를 고해상 카메라로 가시화할 수 있다. 어댑터 서열들 사이의 뉴클레오티드 서열의 동일성을 확인할 수 있다.

[0528] **잉크젯 침착**

[0529] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 조성물을 지지체의 표면 상의 또는 내의 특정 위치에서 침착시키거나, 위치시키거나 배치하는 것을 이용한다. 침착은 한 조성물을 또 다른 조성물과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 침착은 수동 또는 자동 침착일 수 있는데, 예를 들면, 침착은 자동화된 로봇 디바이스에 의해 달성될 수 있다. 펄스젯 또는 잉크젯을 이용하여 유체 조성물의 점적을 지지체 상에 분배할 수 있다. 펄스젯은 전형적으로 점적이 상기 출구 또는 개구로부터 분배될 수 있도록 (예컨대, 압전 또는 열전기 요소로) 압력의 펄스를 출구 또는 개구에 인접한 액체에게 전달함으로써 작동한다.

[0530] 당분야에서 공지되어 있는 다양한 방법들 또는 시스템들을 이용하여 시약의 액체를 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 기판의 분해된 좌위들에 침착시킬 수 있다. 유체의 미세점적을 마이크론 미만의 정밀도로 본 발명에 기재된 기판 상의 또는 내의 표면 또는 분해된 좌위들에게 전달할 수 있다. 유체 부피에 대해 마이크로분배 방법으로서 잉크젯 기술을 이용하는 상업적으로 입수가능한 분배 장치를 이용할 수 있다. 잉크젯 기술을 이용하여

생성한 점적은 고도로 재생성될 수 있고, 점적이 디지털적으로 저장된 영상 데이터에 따라 특정 시간에서 특정 위치 상에 배치될 수 있도록 조절될 수 있다. 디맨드 모드(demand mode) 잉크젯 디바이스를 위한 전형적인 점적 직경은 14 내지 520 pl의 점적 부피에 해당하는 30 내지 100 ㎛일 수 있다. 디맨드 모드 잉크젯 디바이스를 위한 점적 생성률은 초당 2000개 내지 5000개의 점적일 수 있다. 디맨드 모드 잉크젯 마이크로분배를 적절한 해상도 및 처리율에서 사용하여 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 고밀도의 분해된 좌위들을 가진 기판을 제공할 수 있다. 시약을 침착시키거나 전달하는 방법 및 시스템은 미국 특허 제5,843,767호 및 제6,893,816호(이들 둘 다가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 더 상세히 기재되어 있다.

[0531] 시약을 분해된 좌위들에 침착시키거나 전달하는 시스템은 마이크로젯 분배 헤드, 유체 전달 시스템 또는 잉크젯 펌프, X-Y 위치선정 시스템, 비젼(vision) 시스템 및 또는 시스템 조절기를 포함하나 이들로 한정되지 않는 하나 이상의 하위시스템을 포함할 수 있다. 마이크로젯 분배 헤드는 복수의 마이크로젯 디바이스들(예를 들면, 8개의 마이크로젯 디바이스들) 및 요구된 구동 전자장치의 조립체일 수 있다. 구동 전자장치의 단일 채널을 사용하여 8개 또는 10개의 분배 디바이스들을 다중체화하여 시스템 복잡성을 최소화할 수 있다. 각각의 개별 디바이스를 위한 구동 파형 요건을 시스템 조절기로부터 다운로딩할 수 있다. 당분야에서 공지되어 있는 통상적인 방법을 이용하여 구동 전자장치를 구축할 수 있다. 유체 전달 시스템, 또는 잉크젯 펌프는 다중 시약 투입 시스템으로서 작용하도록 변형된 벡크만 바이오멕(Beckman Biomec)일 수 있다. 이것과 마이크로젯 분배 헤드 사이에 시스템 조절기에 의해 조절되는 솔레노이드(solenoid) 밸브의 시스템이 존재할 수 있다. 이들은 가압된 세척액(flushing fluid) 및 공기를 제공하여 시스템으로부터 시약을 퍼징하고 진공을 제공하여 시약을 시스템 내로 적재한다. X-Y 위치선정 시스템은 조절기를 가진 임의의 상업적으로 입수가능한 정밀 X-Y 위치선정 시스템일 수 있다. 위치선정 시스템은 복수의 센서들을 수용할 정도의 크기를 가질 수 있다. 비젼시스템을 이용하여 위치선정 시스템을 기준으로 각각의 마이크로젯 디바이스의 "착륙 대역(landing zone)"을 계산할 수 있다. 계산은 각각의 시약 적재 주기 후 일어날 수 있다. 또한, 비젼 시스템은 센서 트레이가 센서 상의 기준 마크를 통해 먼저 적재될 때 각각의 센서 상에서 각각의 분배 부위를 위치시킬 수 있다. 소프트웨어-기초 시스템 또는 하드웨어-기초 비젼 시스템을 이용할 수 있다. 시스템 조절기는 전체 시스템 조절기로서 이용되는 표준 컴퓨터 시스템일 수 있다. 비젼 시스템 영상 포획 및 프로세싱도 시스템 조절기 상에 존재한다. 시약을 분해된 좌위들에 침착시키거나 전달하는 시스템은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 PCT 공보 제WO2000039344호에 더 상세히 기재되어 있다.

[0532] 도 18은 잉크젯 조립체의 일례를 보여준다. 일부 실시양태들에서, 잉크젯 조립체는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 32개, 34개, 36개, 38개, 40개, 45개, 48개, 50개, 56개, 60개, 64개, 72개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개 또는 100개 이상의 잉크젯 헤드를 포함할 수 있다. 잉크젯 헤드는 상이한 코돈(트리뉴클레오티드) 빌딩 블록을 각각 침착시킬 수 있다. 예시적 실시양태에서, 잉크젯 헤드는 254 ㎛ 중심 및 100 ㎛ 비행 높이 상에서 256개의 노즐들을 가진 실리콘 오리피스 플레이트를 가질 수 있다. 각각의 헤드는 횡단하는 각각의 웰에 접근할 수 있다. 잉크젯 조립체는 이동 (x,y) 평면에서 약 2 ㎛의 정밀도와 함께 약 100 ㎜/s의 스캔 속도를 가질 수 있다. 일부 경우, 잉크젯 조립체의 웨이퍼 상에서의 스캔 높이는 약 100 ㎛일 수 있고, 이때 편평도 런아웃(flatness runout)은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 ㎛이다. 일부 경우, 잉크젯 조립체는 잉크젯을 진공 척 상에서 고정된 기판, 예를 들면, 실리콘 웨이퍼와 정렬하기 위한 비젼 시스템을 일부 경우 유동셀 조립체의 일부로서 포함할 수 있다.

[0533] 일부 경우, 시약을 본원에 기재된 복수의 분해된 좌위들에 침착시키는 방법 및 시스템은 잉크젯 펌프를 통해 제1 시약의 하나 이상의 마이크로점적을 복수의 좌위들 중 제1 좌위에 적용하고 잉크젯 펌프를 통해 제2 시약의 하나 이상의 마이크로점적을 복수의 분해된 좌위들 중 제2 좌위에 적용하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 제2 좌위는 제1 좌위에 인접할 수 있고, 제1 시약과 제2 시약은 상이할 수 있다. 제1 좌위 및 제2 좌위는 지지체 표면 내에 제작된 마이크로구조물 상에 존재할 수 있고, 마이크로구조물은 하나 이상의 채널을 포함할 수 있다. 일부 경우, 하나 이상의 채널은 100 ㎛ 초과의 깊이를 가진다. 일부 실시양태들에서, 제1 시약과 제2 시약은 동일할 수 있다. 일부 경우, 마이크로구조물은 큰 마이크로채널, 및 제1 마이크로채널에 유체 연결된 하나 이상의 마이크로채널을 포함한다. 큰 초기 마이크로채널은 처음에 침착된 액체를 수용하여, 인접 마이크로구조물에의 또는 인접 마이크로구조물로부터의 시약의 임의의 교차오염을 감소시킨다. 그 후, 점적의 내용물은 본원에 기재된 반응, 예컨대, 올리고뉴클레오티드 합성에 적합한 표면을 가질 수 있는 하나 이상의 보다 더 작은 마이크로채널 내로 유동할 수 있다.

[0534] 하나 이상의 채널은 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있는 깊이를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 채널은 약 50 내지 100 ㎛, 50 내지 150 ㎛, 50 내지 200 ㎛, 100 내지 200 ㎛, 100 내지 300 ㎛, 20 내지 300 ㎛, 또는 20 내지 100 ㎛일 수 있는 깊이를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 하나 이상의 채널은 100 ㎛ 초과의 깊이를 가질 수 있다.

[0535] 시약의 점적들 각각은 가속도를 잃지 않으면서 마이크로채널의 깊이를 통해 횡단할 수 있는 적합한 부피를 가질 수 있다. 적합한 부피는 올리고뉴클레오티드 합성을 위해 원하는 양의 시약을 포함할 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 시약을 포함하는 점적 각각은 약 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500 pl, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200 또는 500 nl 이상의 부피를 가질 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 시스템은 침착된 점적을 추적하는 임의의 위성(satellite) 점적이 교차오염을 최소화하기에 충분할 정도로 작도록 조절된다. 잉크젯의 경우, 프린트헤드는 침착된 점적 및 그의 위성 점적이 에어로졸 이동 전에 기판의 채널 내에 실질적으로 존재하도록 기판에 충분히 가까울, 예를 들면, 100 ㎛ 이내에 있을 수 있다. 위성 점적은 0.5, 1, 1.5 또는 2 ㎛ 미만의 직경을 가질 수 있다. 다양한 실시양태들에서, 에어로졸 이동에 참여하는 위성 점적의 부피 분획은 침착된 점적의 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% 또는 0.01% 미만이다.

[0536] 본원의 다른 부분에 기재되어 있는 바와 같이, 마이크로구조물은 서로 유체 소통하는 다수의 채널들을 포함할 수 있다. 일부 경우, 마이크로구조물은 유체 소통하는 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 채널들을 포함할 수 있다. 채널들은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 상이한 치수, 예를 들면, 폭 또는 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물의 유체 연결된 채널들은 동일한 폭, 길이 및/또는 다른 치수를 가진 2개 이상의 채널들을 포함할 수 있다.

[0537] 유체의 마이크로점적은 최소한의 교차오염을 가지면서 높은 정밀도로 본원의 다른 부분에 기재된 바와 같이 기판 내의 표면 또는 분해된 좌위들에게 전달될 수 있다. 일부 경우, 제1 좌위는 제2 좌위에 침착될 제2 시약을 0.1% 미만의 함량으로 수용할 수 있고, 유사하게 제2 좌위는 제1 시약을 0.1% 미만의 함량으로 수용할 수 있다. 일부 경우, 제1 좌위는 제2 시약을 약 0.5%, 0.45%, 0.4%, 0.35%, 0.3%, 0.25%, 0.2%, 0.15%, 0.1%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02% 또는 0.01% 미만의 함량으로 수용할 수 있다. 제2 좌위는 제1 시약을 약 0.5%, 0.45%, 0.4%, 0.35%, 0.3%, 0.25%, 0.2%, 0.15%, 0.1%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02% 또는 0.01% 미만의 함량으로 수용할 수 있다.

[0538] 일부 경우, 시약은 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 200 ㎛의 직경을 가진 점적으로 전달될 수 있다. 시약의 점적은 약 2 ㎛ 이상의 직경을 가질 수 있다. 시약은 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 또는 200 ㎛ 미만의 직경을 가진 점적으로 전달될 수 있다. 시약은 2 내지 10 ㎛, 2 내지 5 ㎛, 10 내지 200 ㎛, 10 내지 150 ㎛, 10 내지 100 ㎛, 10 내지 500 ㎛, 20 내지 200 ㎛, 20 내지 150 ㎛, 20 내지 100 ㎛, 30 내지 100 ㎛, 30 내지 200 ㎛, 30 내지 150 ㎛, 40 내지 100 ㎛, 40 내지 80 ㎛, 또는 50 내지 60 ㎛의 직경을 가진 점적으로 전달될 수 있다.

[0539] 시약의 점적은 초당 약 1000개, 1500개, 2000개, 2500개, 3000개, 3500개, 4000개, 4500개 또는 5000개 점적들의 속도로 침착될 수 있다.

[0540] **연착륙(soft landing)**

[0541] 점적을 복수의 마이크로웰들에 침착시키는 시스템 및 방법도 본원에 기재되어 있다. 한 양태에서, 점적은 복수의 마이크로웰들을 가진 제1 표면을 포함하는 마이크로플루이딕 시스템의 마이크로웰 내에 침착될 수 있다. 점적은 마이크로웰의 하부에 도달할 때 액체의 바운싱(bouncing)이 최소화되도록 적합한 레이놀즈 수, 예컨대, 약 1 내지 1000, 1 내지 2000, 1 내지 3000, 0.5 내지 1000, 0.5 내지 2000, 0.5 내지 3000, 0.5 내지 4000, 0.5 내지 5000, 1 내지 500, 2 내지 500, 1 내지 100, 2 내지 100, 5 내지 100, 1 내지 50, 2 내지 50, 5 내지 50, 또는 10 내지 50을 가질 수 있다. 당업자는 레이놀즈 수가 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 임의의 범위(예를 들면, 약 0.5 내지 약 500) 내에 속할 수 있다는 것을 인식한다. 유체 시스템에서 레이놀즈 수를 정확히 추정하는 적합한 방법은 문헌(Clift, Roland, John R. Grace, and Martin E. Weber, Bubbles, Drops and Particles, 2005. Dover Publications) 및 문헌(Happel, John and Howard Brenner, 1965. Prentice-Hall)(이들 둘 다가 전체로서 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있다.

[0542] 복수의 마이크로웰들의 밀도는 ㎟당 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 또는 1000 초과일 수 있다. 본원에 기재된 방법 후, 액체의 점적은 마이크로웰을 통해 부드럽게 유동할 수 있고 마이크로웰의 하부 상에 연착륙할 수 있다.

[0543] 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법 및 시스템을 이용하여 액체 점적을 침착시킬 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로플루이딕 시스템은 잉크젯 펌프를 추가로 포함할 수 있다. 잉크젯 펌프를 이용하여 액체 점적을 복수의 마이크로웰들 중 하나에 침착시킬 수 있다. 액체 침착 시스템의 다양한 실시양태들은 본 명세서의 다른 부분에 기재되어 있다.

[0544] 일부 경우, 마이크로웰들은 기판의 하부영역 내에서 상이한 폭, 동일한 폭, 또는 동일한 또는 상이한 폭의 조합으로 존재할 수 있다. 마이크로웰들은 임의의 상이한 폭을 가질 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 마이크로웰의 폭은 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있다.

[0545] 마이크로웰들은 임의의 상이한 길이를 가질 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 마이크로웰의 길이는 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 ㎛ 이상 또는 이하일 수 있다.

[0546] 마이크로웰은 하나 이상의 마이크로채널에 유체 연결될 수 있다. 마이크로웰은 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ㎛ 이상 또는 이하의 표면적 대 길이의 비, 또는 둘레를 포함할 수 있다.

[0547] 액체의 점적은 본원에 기재된 방법에 적합한 부피를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 점적은 약 0.5 마이크로리터(㎕), 1 ㎕ 미만, 약 1.5 ㎕ 미만, 약 2 ㎕ 미만, 약 2.5 ㎕ 미만, 약 3 ㎕ 미만, 약 3.5 ㎕ 미만, 약 4 ㎕ 미만, 약 4.5 ㎕ 미만, 약 5 ㎕ 미만, 약 5.5 ㎕ 미만, 약 6 ㎕ 미만, 약 6.5 ㎕ 미만, 약 7 ㎕ 미만, 약 7.5 ㎕ 미만, 약 8 ㎕ 미만, 약 8.5 ㎕ 미만, 약 9 ㎕ 미만, 약 9.5 ㎕ 미만, 약 10 ㎕ 미만, 약 11 ㎕ 미만, 약 12 ㎕ 미만, 약 13 ㎕ 미만, 약 14 ㎕ 미만, 약 15 ㎕ 미만, 약 16 ㎕ 미만, 약 17 ㎕ 미만, 약 18 ㎕ 미만, 약 19 ㎕ 미만, 약 20 ㎕ 미만, 약 25 ㎕ 미만, 약 30 ㎕ 미만, 약 35 ㎕ 미만, 약 40 ㎕ 미만, 약 45 ㎕ 미만, 약 50 ㎕ 미만, 약 55 ㎕ 미만, 약 60 ㎕ 미만, 약 65 ㎕ 미만, 약 70 ㎕ 미만, 약 75 ㎕ 미만, 약 80 ㎕ 미만, 약 85 ㎕ 미만, 약 90 ㎕ 미만, 약 95 ㎕ 미만 또는 약 100 ㎕ 미만인 부피를 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 점적은 약 0.5 마이크로리터(㎕), 약 1 ㎕, 약 1.5 ㎕, 약 2 ㎕, 약 2.5 ㎕, 약 3 ㎕, 약 3.5 ㎕, 약 4 ㎕, 약 4.5 ㎕, 약 5 ㎕, 약 5.5 ㎕, 약 6 ㎕, 약 6.5 ㎕, 약 7 ㎕, 약 7.5 ㎕, 약 8 ㎕, 약 8.5 ㎕, 약 9 ㎕, 약 9.5 ㎕, 약 10 ㎕, 약 11 ㎕, 약 12 ㎕, 약 13 ㎕, 약 14 ㎕, 약 15 ㎕, 약 16 ㎕, 약 17 ㎕, 약 18 ㎕, 약 19 ㎕, 약 20 ㎕, 약 25 ㎕, 약 30 ㎕, 약 35 ㎕, 약 40 ㎕, 약 45 ㎕, 약 50 ㎕, 약 55 ㎕, 약 60 ㎕, 약 65 ㎕, 약 70 ㎕, 약 75 ㎕, 약 80 ㎕, 약 85 ㎕, 약 90 ㎕, 약 95 ㎕ 또는 약 100 ㎕인 부피를 가질 수 있다.

[0548] 일부 경우, 마이크로채널은 표면 에너지를 증가시키는 모이어티, 예컨대, 화학적 불활성 모이어티로 코팅될 수 있다. 적합한 화학적 불활성 또는 반응성 모이어티의 유형은 본 명세서의 다른 부분에 기재되어 있다.

[0549] 점적의 레이놀즈 수는 본원에 기재된 바와 같이 액체가 마이크로웰 및/또는 마이크로채널을 통해 부드럽게 유동할 수 있게 하는 레이놀즈 수의 범위에 있을 수 있다. 일부 실시양태들에서, 점적의 레이놀즈 수는 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 미만일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 점적의 레이놀즈 수는 약 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 초과일 수 있다. 일부 경우, 점적은 층류 또는 거의 층류로 마이크로웰을 통해 유동할 수 있다.

[0550] 점적은 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 m/sec 이상의 속도로 적용될 수 있거나 침착될 수 있다.

[0551] **프로그래밍가능한 분할**

[0552] 본원에 기재된 시스템은 함께 밀봉되어 복수의 분해된 반응기들을 형성할 수 있는 복수의 분해된 좌위들 및 복수의 분해된 반응기 캡들을 포함할 수 있다. 복수의 분해된 반응기들은 시약을 함유할 수 있다. 밀봉은 가역적일 수 있거나 느슨할 수 있고, 복수의 분해된 반응기 캡들은 복수의 분해된 좌위들로부터 이형될 수 있다. 복수의 분해된 좌위들을 포함하는 제1 표면으로부터 이형될 때, 반응기 캡들은 시약의 적어도 일부를 보유할 수 있다. 복수의 분해된 좌위들로부터의 반응기 캡들의 이형을 조절함으로써 액체 또는 시약의 분할을 조절할 수 있다. 본 발명의 한 양태에서, 분할 방법이 본원에 기재되어 있다. 상기 방법은 복수의 제1 분해된 좌위들에서 액체를 포함하는 제1 표면을 복수의 제2 분해된 좌위들, 예컨대, 반응기 캡들을 포함하는 제2 표면과 접촉시키는 단계로서, 이때 상기 제1 표면이 상기 액체와의 제1 표면 장력을 포함할 수 있고, 상기 제2 표면이 상기 액체와의 제2 표면 장력을 포함할 수 있는 것인 단계; 및 액체의 원하는 분획이 복수의 제1 분해된 좌위들로부터 복수의 제2 분해된 좌위들에게 전달될 수 있도록 이형 속도를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 이 계산된 속도에서 제1 표면으로부터 제2 표면을 탈착시킬 때, 반응기의 내용물의 원하는 분획은 반응기 내에 보유될 수 있다. 복수의 제1 분해된 좌위들을 포함하는 제1 표면은 올리고뉴클레오티드로 코팅되는 복수의 분해된 좌위들을 포함할 수 있다. 복수의 제2 분해된 좌위들을 포함하는 제2 표면은 복수의 반응기 캡들을 포함하는 캡핑 요소일 수 있다. 일부 경우, 상기 방법은 복수의 제3 분해된 좌위들을 가진 제3 표면을 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 다양한 양태들 또는 실시양태들이 본원에 기재되어 있다.

[0553] 제2 표면에서 보유되는 액체는 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 보유될 수 있다. 일부 경우, 제1 또는 제2 표면은 액체의 적어도 일부를 보유하는 마이크로채널을 포함할 수 있다. 일부 경우, 제1 또는 제2 표면은 액체의 적어도 일부를 보유하는 나노반응기를 포함할 수 있다. 일부 경우, 액체는 제1 표면과 제2 표면 사이의 표면 장력 차이로 인해 보유될 수 있다. 이론에 의해 구속받지 않지만, 물-기제 액체의 경우, 액체의 보다 더 많은 부분이 보다 더 높은 표면 에너지 또는 보다 더 낮은 소수성을 가진 표면 상에서 보유될 수 있다.

[0554] 액체는 시약의 원하는 분획이 이형 시 제1 또는 제2 표면 상에 보유될 수 있도록 분할될 수 있다. 예를 들면, 한정되지 않으나, 원하는 분획은 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 또는 이하일 수 있다.

[0555] **병렬식 마이크로플루이딕 혼합 방법**

[0556] 본 발명의 또 다른 양태에서, 액체를 혼합하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 상기 방법은 제작된 복수의 마이크로구조물들을 포함하는 제1 기판을 제공하는 단계; 복수의 분해된 반응기 캡들을 포함하는 제2 기판을 제공하는 단계; 복수의 제1 반응기 캡들이 제1 기판에서 n개의 마이크로구조물들로부터 액체를 수용하도록 구성되게끔 제1 기판 및 제2 기판을 정렬하는 단계; 및 액체를 n개의 마이크로구조물들로부터 제1 반응기 캡 내로 전달함으로써 n개의 마이크로구조물들로부터의 액체를 혼합하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 다양한 실시양태들 및 변경들이 본원에 기재되어 있다.

[0557] 분해된 반응기 캡들의 밀도는 제1 기판의 마이크로구조물과 제2 기판의 반응기 캡의 원하는 정렬을 가능하게 하는 임의의 적합한 밀도일 수 있다. 일부 경우, 분해된 반응기 캡들의 밀도는 1/㎟ 이상일 수 있다. 일부 경우, 분해된 반응기들의 밀도는 1 ㎟당 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 약 50개, 약 75개, 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 900개, 약 1000개, 약 1500개 또는 약 2000개 부위일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 분해된 반응기들의 밀도는 1 ㎟당 약 1개 이상, 약 2개 이상, 약 3개 이상, 약 4개 이상, 약 5개 이상, 약 6개 이상, 약 7개 이상, 약 8개 이상, 약 9개 이상, 약 10개 이상, 약 20개 이상, 약 30개 이상, 약 40개 이상, 약 50개 이상, 약 75개 이상, 약 100개 이상, 약 200개 이상, 약 300개 이상, 약 400개 이상, 약 500개 이상, 약 600개 이상, 약 700개 이상, 약 800개 이상, 약 900개 이상, 약 1000개 이상, 약 1500개 이상, 약 2000개 이상 또는 약 3000개 이상의 부위일 수 있다.

[0558] 마이크로구조물들은 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 실시될 수 있는 임의의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 경우, 마이크로구조물들은 1 ㎟당 약 1개, 약 2개, 약 3개, 약 4개, 약 5개, 약 6개, 약 7개, 약 8개, 약 9개, 약 10개, 약 15개, 약 20개, 약 25개, 약 30개, 약 35개, 약 40개, 약 50개, 약 75개, 약 100개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 500개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 900개, 약 1000개, 약 1500개, 약 2000개 또는 약 3000개 이상 또는 이하의 부위의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 마이크로구조물들은 1 ㎟당 100 이상의 밀도로 존재할 수 있다. 일부 경우, 마이크로구조물들은 분해된 반응기들의 밀도와 거의 동일한 표면 밀도를 가질 수 있다.

[0559] 일부 경우, 복수의 제1 반응기 캡들이 제1 기판에서 n개의 마이크로구조물들로부터 액체를 수용하도록 구성되게끔 제1 기판 및 제2 기판을 정렬한 후 제1 기판과 제2 기판 사이에 갭, 예를 들면, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 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 또는 200 ㎛ 미만의 갭이 있을 수 있다.

[0560] 일부 경우, 혼합물 또는 액체는 복수의 제1 반응기 캡들이 제1 기판에서 n개의 마이크로구조물들로부터 액체를 수용하도록 구성되게끔 제1 기판 및 제2 기판을 정렬한 후 제1 기판과 제2 기판 사이의 갭 내로 부분적으로 퍼질 수 있다. 상기 갭 내로 부분적으로 퍼지는 액체 또는 혼합물은 모세관 파열 밸브를 형성할 수 있다. 혼합 방법은 제1 기판과 제2 기판을 함께 더 가까이 있게 함으로써 갭을 밀봉하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우, 제1 기판과 제2 기판은 직접 물리적으로 접촉할 수 있다.

[0561] 복수의 마이크로구조물들 및 반응기 캡들은 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 임의의 원하는 디자인 또는 치수를 가질 수 있다. 하나 이상의 채널은 원 모양으로 존재하고 약 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 ㎛ 이상 또는 이하의 횡단면적의 반경을 포함할 수 있는 횡단면적을 가질 수 있다.

[0562] 일부 경우, 채널은 90° 미만의 물 접촉각에 상응하는 표면 에너지를 증가시키는 모이어티, 예컨대, 화학적 불활성 모이어티로 코팅될 수 있다. 표면의 표면 에너지 또는 소수성은 물 접촉각을 측정함으로써 평가될 수 있거나 측정될 수 있다. 90°보다 더 작은 물 접촉각은 상대적으로 친수성 방식으로 고체 표면을 작용화할 수 있다. 90°보다 더 큰 물 접촉각은 상대적으로 소수성 방식으로 고체 표면을 작용화할 수 있다. 낮은 표면 에너지를 가진 고도 소수성 표면은 120°보다 더 큰 물 접촉각을 가질 수 있다. 일부 경우, 본원에 기재된 채널들, 또는 2개의 채널들 중 하나의 표면은 소수성을 갖거나, 낮은 표면 에너지를 갖거나, 굽어지지 않은 표면 상에서 측정될 때 약 90°, 95°, 100°, 105°, 110°, 115°, 120°, 125°, 130°, 135°, 140°, 145° 또는 150°보다 더 클 수 있는 물 접촉각을 갖도록 작용화될 수 있거나 변경될 수 있다. 일부 경우, 본원에 기재된 채널들, 또는 2개의 채널들 중 하나의 표면은 친수성을 갖거나, 높은 표면 에너지를 갖거나, 굽어지지 않은 표면 상에서 측정될 때 90°, 85°, 80°, 75°, 70°, 65°, 60°, 55°, 50°, 45°, 40°, 35°, 30°, 25°, 20°, 15° 또는 10°보다 더 작을 수 있는 물 접촉각을 갖도록 작용화될 수 있거나 변경될 수 있다. 채널들, 또는 2개의 채널들 중 하나의 표면은 보다 더 높은 친수성 또는 소수성을 갖도록 작용화될 수 있거나 변경될 수 있다. 일부 경우, 제1 기판 및 제2 기판의 표면은 주어진 액체, 예컨대, 물과 상이한 표면 에너지를 포함할 수 있다. 일부 경우, 제1 기판 및 제2 기판의 표면은 약 5°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70°, 80° 또는 90°의 물 접촉각 차이를 포함할 수 있다. 표면을 작용화하는 다른 방법은 전체로서 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,028,189호에 기재되어 있다.

[0563] 일부 실시양태들에서, 전달은 압력에 의해 수행될 수 있다. 액체를 n개의 마이크로구조물들로부터 제1 반응기 캡 내로 전달하여 n개의 마이크로구조물들로부터의 액체를 혼합함으로써 혼합물을 형성할 수 있다.

[0564] 일부 경우, 총 혼합물 액체의 부피는 반응기 캡의 부피보다 더 클 수 있다. 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재되어 있고 당분야에서 공지되어 있는 적합한 표면 변경 방법을 이용하여 반응기 캡 표면, 예컨대, 테두리 표면의 전부 또는 일부를 변경시킬 수 있다. 일부 경우, 표면 불규칙성을 조작한다. 화학적 표면 변경 및 불규칙성은 테두리의 물 접촉각을 조절하는 데에 기여할 수 있다. 유사한 표면 처리도 반응기 캡에 가까이 인접하여 밀봉, 예를 들면, 가역적 밀봉을 형성하는 기판의 표면 상에 적용될 수 있다. 본원의 다른 부분에 더 상세히 기재된 바와 같이 2개의 표면들 사이에서 모세관 파열 밸브를 이용할 수 있다. 표면 처리는 모세관 파열 밸브를 포함하는 이러한 밀봉의 정밀한 조절에 유용할 수 있다.

[0565] 일부 경우, 제1 표면으로부터의 캡핑 요소의 이형, 및 제2 표면으로부터의 캡핑 요소의 이형을 상이한 속도로 수행할 수 있다. 캡핑 요소를 상응하는 표면으로부터 이형시킬 때 보유되는 시약의 일부의 양은 캡핑 요소 및 상응하는 표면의 속도 또는 표면 에너지에 의해 조절될 수 있다. 캡핑 요소와 상응하는 표면의 표면 에너지 또는 소수성 차이는 이형 시 보유되는 시약의 일부를 조절하기 위한 파라미터일 수 있다. 제1 반응의 부피와 제2 반응의 부피는 상이할 수 있다.

[0566] **하류 적용**

[0567] 본 발명의 방법 및 조성물은 핵산 혼성화 연구, 예컨대, 유전자 발현 분석, 유전형분석, 이종이중체 분석, 혼성화에 기초한 핵산 서열결정, DNA, RNA, 펩티드, 단백질 또는 다른 올리고머성 또는 비-올리고머성 분자의 합성, 및 후보 약물의 평가를 위한 조합 라이브러리를 위해 이용될 수 있다.

[0568] 본 발명에 따라 합성된 DNA 및 RNA는 예를 들면, 혼합화 방법, 예컨대, 유전자 발현 분석, 혼성화(경쟁적 혼성화 및 이종이중체 분석)에 의한 유전형분석, 또는 혼성화에 의한 서열결정을 위한 프로브; 서던 블롯 분석을 위한 프로브(표지된 프라이머); 어레이(마이크로어레이 또는 필터 어레이) 혼성화를 위한 프로브; 유전형분석 또는 발현 분석에서 혼성화를 검출하기 위해 에너지 전달 염료와 함께 사용될 수 있는 "자물쇠" 프로브; 및 다른 유형의 프로브를 비롯한 임의의 적용에서 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 DNA 및 RNA는 효소-기제 반응, 예컨대, 중합효소 연쇄 반응(PCR), PCR용 프라이머로서, PCR용 주형으로서, 대립형질 특이적 PCR(유전형분석/반수체분석(haplotyping)) 기법, 실시간 PCR, 정량 PCR, 역전사효소 PCR 및 다른 PCR 기법에서 사용될 수도 있다. 상기 DNA 및 RNA는 라이게이션-기초 유전형분석, 올리고 라이게이션 분석(OLA), 라이게이션-기초 증폭, 클로닝 실험을 위한 어댑터 서열의 라이게이션, 생거 디데옥시 서열결정(프라이머, 표지된 프라이머), (전기영동 분리 또는 다른 분리 방법을 이용하는) 고 처리율 서열결정, 프라이머 연장, 미니-서열결정 및 단일 염기 연장(SBE)을 비롯한 다양한 라이게이션 기법들을 위해 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 제조된 DNA 및 RNA는 (올리고머를 사용하여 돌연변이를 공지된 서열 내로 도입하는) 돌연변이 연구, (RNA 전사체의 cDNA 카피를 제조하는) 역전사, 유전자 합성, 제한 부위의 도입(돌연변이유발의 한 형태), 단백질-DNA 결합 연구 및 기타 실험에서 사용될 수 있다. 본 방법에 의해 생성된 DNA 및 RNA의 다양한 다른 용도들은 당업자에게 그 자체로 암시될 것이고, 이러한 용도들도 본 개시내용의 범위 내에 있는 것으로서 간주된다.

[0569] **컴퓨터 시스템**

[0570] 다양한 실험들에서, 본 발명의 방법 및 시스템은 컴퓨터 시스템 상의 소프트웨어 프로그램 및 이의 사용을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 분배/진공/재충전 기능의 동시화, 예컨대, 프린트헤드 이동, 분배 작용 및 진공 작동의 조직화 및 동시화를 위한 전산화된 조절은 본 발명의 범위 내에 있다. 컴퓨터 시스템은 사용자에 의해 특정된 염기 서열과 분배기 헤드의 위치를 접속시켜 정확한 시약을 기판의 특정된 영역에게 전달하도록 프로그래밍될 수 있다.

[0571] 도 19에 예시된 컴퓨터 시스템(1900)은 고정된 매체(1912)를 가진 서버(1909)에 임의적으로 연결될 수 있는 매체(1911) 및/또는 네트워크 포트(1905)로부터의 지시를 판독할 수 있는 논리 장치로서 이해될 수 있다. 예컨대, 도 19에 나타낸 시스템은 CPU(1901), 디스크 드라이브(1903), 임의적 입력 디바이스, 예컨대, 키보드(1915) 및/또는 마우스(1916), 및 임의적 모니터(1907)를 포함할 수 있다. 데이터 통신은 표시된 통신 매체를 통해 근거리 또는 원거리에 위치하는 서버 쪽으로 달성될 수 있다. 통신 매체는 데이터를 전송하고/하거나 수용하는 임의의 수단을 포함할 수 있다. 예를 들면, 통신 매체는 네트워크 연결, 무선 연결 또는 인터넷 연결일 수 있다. 이러한 연결은 월드 와이드 웹(World Wide Web) 상에서의 통신을 제공할 수 있다. 본 개시내용에 대한 데이터는 도 19에 예시된 바와 같이 단체(party)(1922)에 의한 접수 및/또는 검토를 위해 이러한 네트워크 또는 연결 상에서 전송될 수 있다는 것이 예상된다.

[0572] 도 20은 본 발명의 예시적 실시양태들과 관련하여 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템(2000)의 첫 번째 예시적 구조를 보여주는 블록도이다. 도 20에 도시된 바와 같이, 예시적 컴퓨터 시스템은 지시를 프로세싱하기 위한 프로세서(2002)를 포함할 수 있다. 프로세서의 비-한정적 예는 인텔(Intel) 제온(Xeon)™ 프로세서, AMD 옵테론(Opteron)™ 프로세서, 삼성(Samsung) 32-비트(bit) RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0™ 프로세서, ARM 코텍스(Cortex)-A8 삼성 S5PC100™ 프로세서, ARM 코텍스-A8 애플(Apple) A4™ 프로세서, 마벨(Marvell) PXA 930™ 프로세서, 또는 기능적으로 동등한 프로세서를 포함한다. 다수의 실행 쓰레드들(threads of execution)이 병렬식 프로세싱을 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 다수의 프로세서들, 또는 다수의 코어들을 가진 프로세서들도 단일 컴퓨터 시스템, 클러스터, 또는 복수의 컴퓨터들, 휴대전화들 및/또는 개인용 데이터 단말기 디바이스들을 포함하는, 네트워크 상에 걸쳐 분산된 시스템에서 사용될 수 있다.

[0573] 도 20에 예시된 바와 같이, 고속 캐시(cache)(2004)를 프로세서(2002)에 연결하거나 도입하여, 프로세서(2002)에 의해 최근에 사용되었거나 빈번하게 사용되는 지시 또는 데이터를 위한 고속 메모리를 제공할 수 있다. 프로세서(2002)는 프로세서 버스(2008)에 의해 노쓰 브리지(north bridge)(2006)에 연결된다. 노쓰 브리지(2006)는 메모리 버스(2012)에 의해 랜덤 접근 메모리(RAM)에 연결되고 프로세서(2002)로 RAM(2010)에의 접근을 관리한다. 노쓰 브리지(2006)는 칩셋(chipset) 버스(2016)에 의해 사우쓰 브리지(south bridge)(2014)에도 연결된다. 이어서, 사우쓰 브리지(2014)는 주변 버스(2018)에 연결된다. 주변 버스는 예를 들면, PCI, PCI-X, PCI

익스프레스(Express) 또는 다른 주변 버스일 수 있다. 노쓰 브리지 및 사우쓰 브리지는 종종 프로세서 칩셋으로서 지칭되고, 프로세서, RAM, 및 주변 버스(2018) 상의 주변 구성요소 사이의 데이터 전달을 관리한다. 일부 대안적 구성에서, 별개의 노쓰 브리지 칩을 사용하는 대신에 노쓰 브리지의 기능성을 프로세서 내로 도입할 수 있다.

[0574] 일부 실시양태들에서, 시스템(2000)은 주변 버스(2018)에 부착된 엑셀러레이터 카드(accelerator card)(2022)를 포함할 수 있다. 엑셀러레이터는 필드 프로그래밍 게이트 어레이(FPGA), 또는 일부 프로세싱을 가속화하기 위한 다른 하드웨어를 포함할 수 있다. 예를 들면, 엑셀러레이터는 적응 데이터 재구조화를 위해, 또는 연장된 세트 프로세싱에서 사용된 대수적 표현의 평가를 위해 사용될 수 있다.

[0575] 소프트웨어 및 데이터는 외부 저장장치(2024) 내에 저장되고 프로세서에 의한 사용을 위해 RAM(2010) 및/또는 캐시(2004) 내에 적재될 수 있다. 시스템(2000)은 시스템 자원을 관리하기 위한 운용 시스템을 포함하고; 운용 시스템의 비-한정적 예는 본 발명의 예시적 실시양태에 따라 데이터 저장 및 최적화를 관리하기 위한 운영 시스템의 상부 상에서 실행되는 응용 소프트웨어뿐만 아니라, 리눅스(Linux), 윈도우™, 마코스(MACOS)™, 블랙베리(BlackBerry) OS™, iOS™ 및 다른 기능적으로 동등한 운영 시스템도 포함한다.

[0576] 이 예에서, 시스템(2000)은 외부 저장장치, 예컨대, 네트워크 부착된 저장장치(NAS)에의 네트워크 접속을 제공하기 위해 주변 버스에 연결된 네트워크 접속 카드들(NIC들)(2020 및 2021), 및 분산된 병렬식 프로세싱을 위해 이용될 수 있는 다른 컴퓨터 시스템도 포함한다.

[0577] 도 21은 복수의 컴퓨터 시스템들(2102a 및 2102b), 복수의 휴대전화들 및 개인용 데이터 단말기(2102c) 및 네트워크 부착된 저장장치(NAS)(2104a 및 2104b)를 가진 네트워크(2100)를 보여주는 도면이다. 예시적 실시양태들에서, 시스템(2102a, 2102b 및 2102c)은 데이터 저장을 관리할 수 있고 네트워크 부착된 저장장치(NAS)(2104a 및 2104b)에 저장된 데이터에 대한 데이터 접근을 최적화할 수 있다. 데이터를 위해 수학적 모델을 이용할 수 있고, 컴퓨터 시스템(2102a 및 2102b), 및 휴대전화 및 개인용 데이터 단말기 시스템(2102c)에 걸쳐 분산된 병렬식 프로세싱을 이용하여 이러한 모델을 평가할 수 있다. 컴퓨터 시스템(2102a 및 2102b), 및 휴대전화 및 개인용 데이터 단말기 시스템(2102c)도 네트워크 부착된 저장장치(NAS)(2104a 및 2104b)에 저장된 데이터의 적응 데이터 재구조화를 위한 병렬식 프로세싱을 제공할 수 있다. 도 21은 일례만을 보여주지만, 매우 다양한 다른 컴퓨터 구조들 및 시스템들이 본 발명의 다양한 실시양태들과 함께 이용될 수 있다. 예를 들면, 블레이드(blade) 서버를 이용하여 병렬식 프로세싱을 제공할 수 있다. 후평면(back plane)을 통해 프로세서 블레이드들을 연결하여 병렬식 프로세싱을 제공할 수 있다. 저장장치도 후평면에 연결될 수 있거나 별개의 네트워크 접속을 통해 네트워크 부착된 저장장치(NAS)로서 연결될 수 있다.

[0578] 일부 예시적 실시양태들에서, 프로세서는 별개의 메모리 공간을 유지할 수 있고 다른 프로세서에 의한 병렬식 프로세싱을 위해 네트워크 접속, 후평면 또는 다른 연결기를 통해 데이터를 전송할 수 있다. 다른 실시양태에서, 프로세서들의 일부 또는 전부가 공유된 가상 주소 메모리 공간을 이용할 수 있다.

[0579] 도 22는 예시적 실시양태에 따라 공유된 가상 주소 메모리 공간을 이용하는 멀티프로세서 컴퓨터 시스템(2200)의 블록도이다. 상기 시스템은 공유된 메모리 서브시스템(2204)에 접근할 수 있는 복수의 프로세서들(2202a 내지 2202f)을 포함한다. 상기 시스템은 복수의 프로그래밍가능한 하드웨어 메모리 알고리즘 프로세서들(MAP들)(2206a 내지 2206f)을 메모리 서브시스템(2204) 내로 도입한다. 각각의 MAP(2206a 내지 2206f)는 메모리(2208a 내지 2208f) 및 하나 이상의 필드 프로그래밍가능한 게이트 어레이(FPGA)(2210a 내지 2210f)를 포함할 수 있다. MAP는 설정가능한 기능적 유닛을 제공하고, 특정 알고리즘 또는 알고리즘들의 일부는 각각의 프로세서와 긴밀히 협력된 프로세싱을 위해 FPGA들(2210a 내지 2210f)에게 제공될 수 있다. 예를 들면, 예시적 실시양태에서 MAP들을 이용하여 데이터 모델에 대한 대수적 표현을 평가하고 적응 데이터 재구조화를 수행할 수 있다. 이 예에서, 각각의 MAP는 이 목적들을 위해 모든 프로세서들에 의해 전체적으로 접근될 수 있다. 한 구성에서, 각각의 MAP는 직접 메모리 접근(DMA)을 이용하여 관련된 메모리(2208a 내지 2208f)에 접근함으로써, 상기 메모리가 각각의 마이크로프로세서(2202a 내지 2202f)로부터 독립적으로 및 비동기적으로 과제를 실행하게 할 수 있다. 이 구성에서, MAP는 알고리즘의 파이프라이닝(pipelining) 및 병렬식 실행을 위해 결과를 또 다른 MAP에게 직접 공급할 수 있다.

[0580] 상기 컴퓨터 구조 및 시스템은 단지 예일 뿐이고, 일반적인 프로세서, 보조프로세서, FPGA 및 다른 프로그래밍가능한 논리 디바이스의 임의의 조합을 이용하는 시스템, 칩 상 시스템(SOC), 응용 특이적 통합 회로(ASIC), 및 다른 프로세싱 및 논리 요소를 비롯한, 매우 다양한 다른 컴퓨터, 휴대전화 및 개인용 데이터 단말기 구조들 및 시스템들이 예시적 실시양태와 관련하여 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 컴퓨터 시스템의 전부 또는 일

부가 소프트웨어 또는 하드웨어에서 실행될 수 있다. 랜덤 접근 메모리, 하드 드라이브, 플래쉬 메모리, 테이프 드라이브, 디스크 어레이, 네트워크 부착된 저장장치(NAS), 및 다른 근거리 또는 분산된 데이터 저장 디바이스 및 시스템을 비롯한, 임의의 다양한 데이터 저장 매체들이 예시적 실시양태와 관련하여 사용될 수 있다.

[0581] 예시적 실시양태에서, 상기 또는 다른 컴퓨터 구조들 및 시스템들 중 임의의 컴퓨터 구조 및 시스템 상에서 실행하는 소프트웨어 모듈을 이용하여 컴퓨터 시스템을 실행할 수 있다. 다른 실시양태에서, 펌웨어(firmware) 프로그래밍가능한 논리 디바이스, 예컨대, 도 22에서 참조된 필드 프로그래밍가능한 게이트 어레이(FPGA), 칩 상 시스템(SOC), 응용 특이적 통합 회로(ASIC), 또는 다른 프로세싱 및 논리 요소에서 시스템의 기능을 부분적으로 또는 완전히 실행할 수 있다. 예를 들면, 하드웨어 엑셀러레이터 카드, 예컨대, 도 20에 나타낸 엑셀러레이터 카드(122)의 사용을 통한 하드웨어 가속으로 세트 프로세서 및 옵티마이저(Optimizer)를 실행할 수 있다.

[0582] **실시예 1: 마이크로웰을 생성하기 위한 실리콘 웨이퍼의 프론트-엔드 프로세싱**

[0583] 도 23에 예시된 프론트-엔드 프로세싱 방법을 이용하여 실리콘 웨이퍼를 식각함으로써 복수의 마이크로웰들을 포함하는 예시적 기판을 생성한다. 포토리쏘그래피 방법을 이용하여, 기판의 양 표면 상에서 산화물 층을 가진 SOI 기판으로 출발하여 바람직한 위치에서 기판의 핸들 면 상에 포토레지스트의 층을 코팅한다. 포토레지스트의 코팅 후, 웨이퍼의 중간에서 산화물의 층에 도달할 때까지 핸들 면 상에서 DRIE를 수행한다. 그 다음, 포토레지스트의 코팅을 벗겨내어 아래 산화물 층을 노출시킨다. 유사하게, 포토리쏘그래피 방법을 이용하여 바람직한 위치에서 적합한 직경을 가진 기판의 디바이스 면 상에 포토레지스트의 제2층을 코팅한다. 포토레지스트의 제2층의 코팅 후, 실리콘 웨이퍼의 중간에서 산화물 층에 도달할 때까지 실리콘 웨이퍼의 디바이스 면 상에서 DRIE를 다시 수행한다. 그 다음, 웨이퍼의 중간에서 포토레지스트 및 산화물 층을 벗겨낸다. 마지막으로, 웨이퍼의 모든 표면들 상에 산화물을 코팅하여, 보다 더 큰 마이크로웰, 및 이 마이크로웰에 유체 연결된 하나 이상의 마이크로채널을 각각 포함하는 복수의 마이크로구조물들을 가진 실리콘 웨이퍼를 생성한다.

[0584] **실시예 2: 마이크로웰의 선택된 표면을 작용화하기 위한 실리콘 웨이퍼의 백-엔드 프로세싱**

[0585] 도 24에 예시된 백-엔드 프로세싱 방법을 이용하여 식각된 마이크로웰을 가진 실리콘 웨이퍼를 더 프로세싱함으로써 상기 마이크로웰의 선택된 부분을 작용화한다. 표면 에너지를 증가시키는 능동 작용화제로 마이크로웰 내의 보다 더 작은 마이크로웰의 표면만을 코팅하기 위해, 실시예 1로부터의 생성물을 출발 물질로서 사용한다. 본원에 기재된 바와 같이 잉크젯 프린터를 이용하여 포토레지스트의 점적을 마이크로채널 내에 침착시킨다. 포토레지스트의 점적은 마이크로웰에 유체 연결된 마이크로채널 내로 퍼진다. 포토레지스트 침착 후, 산소 플라스마 식각을 수행하여, 도 24에 예시된 바와 같이 포토레지스트의 보다 더 매끄러운 표면을 남기면서 과량의 포토레지스트를 다시 식각한다. 화학적 불활성 모이어티의 층을 실리콘 웨이퍼의 모든 노출된 표면들 상에 코팅하여 낮은 표면 에너지를 가진 수동 작용화 층을 생성한다. 그 후, 포토레지스트를 벗겨내어 마이크로웰과 유체 소통하는 보다 더 작은 마이크로채널의 표면을 노출시킨다. 포토레지스트의 제거 시, 능동 작용화제의 층을 보다 더 작은 마이크로채널의 표면 상에 코팅하여 마이크로웰의 표면의 표면 에너지를 증가시키고/시키거나 올리고뉴클레오티드 성장을 위한 표면 화학반응을 제공한다. 미리 작용화된 표면은 표면 작용화의 제2 적용에 의해 실질적으로 영향을 받지 않은 상태로 남아있다. 그 결과, 제2 표면 작용화를 가진 하나 이상의 마이크로채널과 각각 유체 소통하는, 제1 표면 작용화를 가진 복수의 마이크로웰들이 고체 기판 상에서 제작된다.

[0586] **실시예 3: 마이크로플루이딕 디바이스**

[0587] 도 25d에 나타낸 바와 같이 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 실질적으로 평평한 기판 부분을 포함하는 마이크로플루이딕 디바이스를 제작하였다. 기판의 횡단면은 도 25e에 표시되어 있다. 기판은 108개의 클러스터들을 포함하고, 이때 각각의 클러스터는 유체 연결들의 109개 군들을 포함한다. 각각의 군은 제1 채널로부터 뻣어나오는 5개의 제2 채널들을 포함한다. 도 25a는 109개의 군들을 포함하는 각각의 클러스터의 디바이스 조감도이다. 도 25c는 도 25a의 클러스터의 핸들 조감도이다. 도 25b는 한 줄의 11개 군들을 보여주는 도 25a의 단면도이다. 도 25f는 도 25d에 나타낸 기판의 또 다른 조감도인데, 이때 표지의 위치가 가시화된다. 도 25g는 클러스터의 109개 군들을 표시하는, 도 25a의 확대도이다.

[0588] 도 25a 및 25c에 나타낸 바와 같이, 109개의 군들은 오프셋 줄로 정렬되어 원 유사 패턴으로 클러스터를 형성하는데, 이때 개별 영역들은 서로 중첩되지 않는다. 개별 군들은 원을 형성한다. 2503으로 표시된 바와 같이, 이 군들의 세 줄들 사이의 거리는 0.254 mm이다. 2506으로 표시된 바와 같이, 한 줄의 군들에서 2개의 군들 사이의 거리는 0.0978 mm이다. 2504로 표시된 바와 같이, 군 내의 제1 채널의 횡단면은 0.075 mm이다. 2505로 표시된 바와 같이, 군 내의 각각의 제2 채널의 횡단면은 0.020 mm이다. 2502로 표시된 바와 같이, 군 내의 제1 채널의

길이는 0.400 ㎜이다. 2501로 표시된 바와 같이, 군 내의 각각의 제2 채널의 길이는 0.030 ㎜이다.

[0589] 도 25a 및 25c에 나타낸 109개의 군들의 클러스터는 도 25a 및 25c에서 클러스터에 인접하여 배치될 수 있는 단일 반응 웰 내에 배치되기에 적합한 배열로 정렬된다. 도 25d에서 나머지 클러스터들은 다수의 반응 웰들, 예컨대, 도 26 및 실시예 4에 기재된 나노반응기 플레이트 내로의 전달을 용이하게 하는 방식으로 유사하게 정렬된다. 기판은 108개의 반응 웰들을 포함하여 11,772개의 군들을 제공한다.

[0590] 2508로 표시된 바와 같이, 한 차원을 따른 기판의 폭은 32.000 ㎜이다. 2519로 표시된 바와 같이, 또 다른 차원을 따른 기판의 폭은 32.000 ㎜이다.

[0591] 도 25d에 나타낸 바와 같이, 실질적으로 평평한 기판 부분은 군들의 108개 클러스터들을 포함한다. 클러스터들은 정사각형 모양을 형성하는 줄로 정렬된다. 2518로 표시된 바와 같이, 한 차원에서 클러스터의 중심부터 원점까지의 최장 거리는 24.467 ㎜이다. 2509로 표시된 바와 같이, 또 다른 차원에서 클러스터의 중심부터 원점까지의 최장 거리는 23.620 ㎜이다. 2517로 표시된 바와 같이, 한 차원에서 클러스터의 중심부터 원점까지의 최단 거리는 7.533 ㎜이다. 2512로 표시된 바와 같이, 또 다른 차원에서 클러스터의 중심부터 원점까지의 최단 거리는 8.380 ㎜이다. 2507 및 2522로 표시된 바와 같이, 동일한 줄에서 2개의 클러스터들의 중심들 사이의 거리는 1.69334 ㎜이다.

[0592] 기판은 마이크로플루이딕 디바이스와 시스템의 다른 구성요소의 정렬을 용이하게 하기 위해 3개의 기준 마크들을 포함한다. 제1 기준 마크는 원점 근처에 위치하는데, 이때 상기 기준 마크는 어느 한 클러스터보다 원점에 더 가깝다. 제1 기준 마크는 한 차원에서 원점으로부터 5.840 ㎜의 거리를 두고 위치하고(2516) 또 다른 차원에서 원점으로부터 6.687 ㎜의 거리를 두고 위치한다(2513). 제1 기준 마크는 한 차원에서 클러스터로부터 1.69334 ㎜의 거리를 두고 위치하고(2515) 또 다른 차원에서 동일한 클러스터로부터 1.69344 ㎜의 거리를 두고 위치한다(2514). 2개의 다른 기준 마크들은 기판의 가장자리로부터 0.500 ㎜의 거리를 두고 각각 위치하고(2510 및 2520), 원점으로부터 16.000 ㎜의 거리를 두고 위치한다(2511 및 2521).

[0593] 기판의 횡단면은 도 25e에 표시되어 있는데, 이때 2523으로 표시된 군의 총 길이는 0.430 ㎜이다.

[0594] 기판의 또 다른 조감도는 108개의 클러스터들의 정렬과 표지의 위치를 보여주는 도 25f에 제시되어 있다. 상기 표지는 기판의 가장자리로부터 1.5 ㎜(2603)의 거리를 두고 위치한다. 상기 표지는 원점으로부터 측정될 때 4.0 ㎜(2602) 내지 9.0 ㎜(2601)의 거리를 두고 위치한다.

[0595] **실시예 4: 나노반응기**

[0596] 도 26b 및 26c에 나타낸 바와 같이 본 발명의 방법 및 조성물에 따라 나노반응기를 제작하였다. 나노반응기의 횡단면은 도 26a에 표시되어 있다. 나노반응기는 108개의 웰들을 포함한다. 도 26d는 나노반응기의 핸들 조감도이다. 도 26e는 도 26b에 나타낸 나노반응기의 또 다른 조감도인데, 이때 표지의 위치가 가시화된다.

[0597] 도 26b에 나타낸 바와 같이, 108개의 웰들은 줄로 정렬되어 정사각형 패턴을 형성하는데, 이때 개별 웰들은 나노반응기 바닥 상에서 상승되어 있다. 2711로 표시된 바와 같이, 한 줄의 웰들에서 2개의 웰들의 중심들 사이의 거리는 1.69334 ㎜이다. 2721로 표시된 바와 같이, 웰의 내부의 횡단면은 1.15 ㎜이다. 2720으로 표시된 바와 같이, 웰의 테두리를 포함하는 웰의 횡단면은 1.450 ㎜이다. 2702로 표시된 바와 같이, 나노반응기에서 웰의 높이는 0.450 ㎜이다. 2701로 표시된 바와 같이, 나노반응기의 총 높이는 0.725 ㎜이다.

[0598] 도 26에 의해 예시된 바와 같이, 도 26b에서 웰들은 108개의 웰들을 가진 마이크로플루이딕 디바이스로부터 나노반응기의 108개의 반응 웰들 내로 전달되는 것을 용이하게 하는 방식으로 정렬된다.

[0599] 2703으로 표시된 바와 같이, 한 차원을 따른 나노반응기의 폭은 24.000 ㎜이다. 2704로 표시된 바와 같이, 또 다른 차원을 따른 나노반응기의 폭은 24.000 ㎜이다.

[0600] 도 26b에 나타낸 바와 같이, 나노반응기는 108개의 웰들을 포함한다. 웰들은 줄로 정렬되어 정사각형 모양을 형성한다. 2706으로 표시된 바와 같이, 한 차원에서 웰의 중심부터 원점까지의 최장 거리는 20.467 ㎜이다. 2705로 표시된 바와 같이, 또 다른 차원에서 웰의 중심부터 원점까지의 최장 거리는 19.620 ㎜이다. 2710으로 표시된 바와 같이, 한 차원에서 웰의 중심부터 원점까지의 최단 거리는 3.533 ㎜이다. 2709로 표시된 바와 같이, 또 다른 차원에서 웰의 중심부터 원점까지의 최단 거리는 4.380 ㎜이다. 2711 및 2712로 표시된 바와 같이, 동일한 줄에서 2개의 웰들의 중심들 사이의 거리는 1.69334 ㎜이다. 2707로 표시된 바와 같이, 한 차원에서 웰의 중심부터 나노반응기의 가장자리까지의 거리는 3.387 ㎜이다. 2708로 표시된 바와 같이, 또 다른 차원에서 웰의 중

심부터 나노반응기의 가장자리까지의 거리는 2.540 ㎜이다.

[0601] 나노반응기는 나노반응기와 시스템의 다른 구성요소, 예를 들면, 실시예 3에 기재된 마이크로플루이딕 디바이스의 정렬을 용이하게 하기 위해 디바이스 면 상에서 3개의 기준 마크들을 포함한다. 제1 기준 마크는 원점 근처에 위치하는데, 이때 상기 기준 마크는 어느 한 웰보다 원점에 더 가깝다. 제1 기준 마크는 한 차원에서 원점으로부터 1.840 ㎜의 거리를 두고 위치하고(2717) 또 다른 차원에서 원점으로부터 2.687 ㎜의 거리를 두고 위치한다(2716). 제1 기준 마크는 한 차원에서 웰로부터 1.6933 ㎜의 거리를 두고 위치하고(2719) 또 다른 차원에서 동일한 웰로부터 1.6934 ㎜의 거리를 두고 위치한다(2718). 2개의 다른 기준 마크들은 나노반응기의 가장자리로부터 0.500 ㎜의 거리를 두고 각각 위치하고(2714 및 2715) 원점으로부터 12.000 ㎜의 거리를 두고 위치한다(2713).

[0602] 나노반응기는 도 26d에 나타낸 바와 같이 핸들 면 상에서 4개의 기준 마크들을 포함한다. 한 차원에서 중심 또는 기준 마크부터 나노반응기의 가장 가까운 모서리 사이까지의 거리는 1.000 ㎜(2722 및 2723)이다. 한 차원에서 기준 마크의 길이는 1.000 ㎜(2724 및 2725)이다. 2726으로 표시된 바와 같이, 기준 마크의 폭은 0.050 ㎜이다.

[0603] 나노반응기의 또 다른 조감도는 108개의 웰들의 정렬 및 표지의 위치를 보여주는 도 26e에 제시되어 있다. 상기 표지는 나노반응기의 가장자리로부터 1.5 ㎜(2728)의 거리를 두고 위치한다. 상기 표지는 나노반응기의 모서리로부터 1.0 ㎜(2727)의 거리를 두고 위치한다. 상기 표지는 9.0 ㎜(2726)의 길이를 가진다.

[0604] **실시예 5: 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 제작**

[0605] 도 28에 예시된 프론트-엔드 프로세싱 방법을 이용하여, 이산화규소의 전기 절연체 층을 사이에 두고 존재하는 약 30 ㎛ 두께의 디바이스 층 및 약 400 ㎛ 두께의 핸들 층을 가진 절연체 상 실리콘(SOI) 웨이퍼를 식각하여, 3차원 마이크로플루이딕 연결부를 가진 복수의 특징부들을 포함하는, 실시예 3에 기재된 예시적 기판을 생성하였다. 도 27은 디바이스의 디자인 특징을 세부적으로 보여준다. SOI 웨이퍼를 산화하여 양 표면 상에서 이를 열 산화물로 덮었다(도 28a). 도 28b에 나타낸 바와 같이, 포토리쏘그래피를 디바이스 면에 적용하여 포토레지스트의 마스크(적색)를 생성하였다. 깊은 반응성-이온 식각(DRIE) 단계를 이용하여 포토레지스트를 결여한 위치에서 SOI 산화물 층까지 약 30 ㎛의 깊이로 수직 측벽을 식각하였다(도 28c). 당분야에서 공지되어 있는 표준 레지스트 스트립핑 공정을 이용하여 포토레지스트를 스크립핑하였다.

[0606] 포토리쏘그래피, DRIE 및 포토레지스트의 스트립핑을 핸들 면 상에서 반복하여(도 28e 내지 28g) 실시예 3에 기재된 디바이스에 따라 원하는 패턴을 생성하였다. 습식 식각 공정을 이용하여 묻혀있는 산화물(BOX)을 제거하였다(도 28g). 마이크로플루이딕 특징부의 측벽 상에 침착되었을 수 있는 오염 플루오로중합체를 열 산화로 제거하였다. 습식 식각 공정을 이용하여 열 산화를 스트립핑하였다.

[0607] 식각된 SOI 웨이퍼를 도 29에 기재된 프로세싱 단계로 처리하였다.

[0608] 먼저, 피라나 용액에 이어서 무수 O_2 플라스마 노출을 이용하여 웨이퍼를 습식 세정 단계로 세정하였다. 칩의 (도 29b에서 상부 상의) 디바이스 층을 약 20 ㎛ 폭의 디바이스 층 채널 내로의 위킹에 의해 좌우된 공정에서 포토레지스트로 코팅하였다. 포토리쏘그래피를 이용하여 포토레지스트를 패턴화함으로써 수동 상태(추후 올리고뉴클레오티드 합성이 없음)로 만들고자 하는 영역을 노출시켰다. 이 공정은 관심있는 패턴을 가진 이원 마스크를 통해 레지스트를 광에 노출시킴으로써 작용한다. 노출 후, 노출된 영역 내의 레지스트는 현상제 용액에서 제거되었다(도 29c).

[0609] 포토레지스트를 갖지 않은 표면을 화학적 증착(CVD)으로 플루오로실란 기체에 노출시켰다. 이것은 포토레지스트를 갖지 않은 표면 상에 탄화불소를 침착시킨다. 대안적 적용에서, 탄화수소 실란이 이 단계를 위해 사용된다. 실란화된 표면은 표면 상에서 단일층을 생성하는 실란의 추가 층에 반응하지 않는다. 그 다음, 포토레지스트를 유기 용매에 용해시켜, 표면 상에서 플루오르화를 남기고 포토레지스트 아래에 있는 실리콘/이산화규소를 노출시켰다. 마지막 단계인 능동 작용화를 수행하여 올리고뉴클레오티드 성장을 위한 표면을 제조하였다(도 29f).

[0610] 4시간 동안 에탄올 및 아세트산 중의 N-(3-트리에톡시실릴프로필-4-하이드록시부티르마이드의 1% 용액을 사용하는 습식 공정을 수행한 후, 14시간 동안 칩을 150℃의 고온 플레이트 상에 놓아둠으로써 하이드록실 기의 조절된 표면 밀도(도 30)를 표면 상에서 달성하였다. 대안적 적용에서, 실란을 기체 상태로 표면에게 전달하고 약 200 mTor의 조절된 침착 압력 및 약 150℃의 조절된 온도를 적용하여 CVD 공정을 수행한다. CVD 공정은 제자리 플라스마 세정을 가능하게 하고 고도로 정돈된 자가-조립된 단일층들(SAM들)을 생성하기에 매우 적합하다.

[0611] 도 31은 상기 방법에 따라 제작된 디바이스의 영상을 보여준다.

[0612] **실시예 6: 나노반응기 디바이스의 제작**

[0613] 도 32에 기재된 바와 같이 나노웰을 가진 나노반응기 칩을 제작하였다. 적합한 크기의 실리콘 웨이퍼를 산화하여 양 표면 상에서 이를 열 산화물로 덮었다(도 33a).

[0614] 도 33b에 나타낸 바와 같이, 포토리쏘그래피를 후면에 적용하여 포토레지스트의 마스크(적색)를 생성하였다. 상기 후면을, 포토레지스트를 결여하는 위치에서 식각함으로써 열 산화물 층 위에서 얕은 웰을 생성하였다(도 33c). 당분야에서 공지되어 있는 표준 레지스트 스트립핑 공정을 이용하여 포토레지스트를 스트립핑하였다(도 33d).

[0615] 포토리쏘그래피 단계를 도 33e의 패턴에 따라 전면 상에서 반복하였다. 깊은 반응성-이온 식각(DRIE) 단계를 이용하여 시한 식각으로 약 450 ㎛의 깊이까지 수직 측벽을 식각하였다. 다른 경우, SOI 웨이퍼를 사용하고 핸들 층을 BOX까지 식각하는데, 이때 BOX는 식각 중단제로서 작용할 수 있다(도 33f). 전면 상의 포토레지스트를 스트립핑하여(도 33g), 도 32에 기재된 디바이스에 따라 원하는 패턴을 생성하였다. 마이크로플루이딕 특징부의 측벽 상에 침착되었을 수 있는 오염 플루오로중합체를 열 산화로 제거하였고 습식 식각 공정을 이용하여 열 산화를 스트립핑하였다(도 33h).

[0616] 그 다음, 피라나 용액에 이어서 무수 O_2 플라스마 노출을 이용하는 습식 세정 단계로 웨이퍼를 세정하였다(도 34a). 이어서, 마이크로점적 침착 시스템(도 34b에서 상부)을 이용하여 레지스트를 개별 웰들 내에 침착시켰다. 레지스트를 갖지 않은 표면을 화학적 증착(CVD; 도 34c)으로 플루오로실란 기체에 노출시켰다. 이것은 레지스트를 갖지 않은 표면 상에서 탄화불소를 침착시킨다. 대안적 적용에서, 탄화수소 실란 또는 다른 유형의 실란이 이 단계를 위해 사용된다. 실란화된 표면은 표면 상에서 단일층을 생성하는 실란의 추가 층에 반응하지 않는다. 그 다음, 레지스트를 유기 용매에 용해시켜, 표면 상에서 플루오르화를 남기고 레지스트 아래에 있는 실리콘 표면을 노출시켰다.

[0617] 도 35a 및 35b는 기재된 바와 같이 제작된 나노반응기 디바이스 내의 나노웰을 보여준다.

[0618] **실시예 7: 2D 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서의 50-머 서열의 합성**

[0619] 2차원 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스를 유동셀에 연결된 유동셀로 조립하였다(어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems)(ABI394 DNA 합성기)). 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 합성 방법을 이용하여 2차원 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스를 N-(3-트리에톡시실릴프로필)-4-하이드록시부티르아미드(Gelest, shop.gelest.com/Product.aspx?catnum=SIT8189.5&Index=0&TotalCount=1)로 균일하게 작용화하고 이를 이용하여 50 bp의 예시적 올리고뉴클레오티드("50-머 올리고뉴클레오티드")를 합성하였다.

[0620] 50-머의 서열은 서열번호 1에 기재된 바와 같았다:

[0621] 5'AGACAATCAACCATTTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTCGGCAT##TTTTTTTTTT3'(서열번호 1)

[0622] 상기 서열에서, #은 탈보호 동안 표면으로부터 올리고머를 방출할 수 있게 하는 절단가능한 링커인 타이미딘-석시닐 헥사마이드 CED 포스포라미다이트(켐진스(ChemGenes)로부터의 CLP-2244)를 표시한다.

[0623] 표 3의 프로토콜에 따른 표준 DNA 합성 화학반응(커플링, 캡핑, 산화 및 탈차단) 및 ABI 합성기를 이용하여 합성을 수행하였다.

[0624] [표 3]

표 3		
일반적인 DNA 합성 공정 명칭	공정 단계	시간(초)
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	23
	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4
DNA 염기 첨가 (포스포라미다이트 + 활성화제 유동)	활성화제 매니폴드 세척	2
	유동셀로 향하는 활성화제	6
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	6
	유동셀로 향하는 활성화제	0.5
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	5
	유동셀로 향하는 활성화제	0.5
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	5
	유동셀로 향하는 활성화제	0.5
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	5
	25 초 동안 항온처리	25
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4
DNA 염기 첨가 (포스포라미다이트 +	활성화제 매니폴드 세척	2
	유동셀로 향하는	5

[0625]

표 3

일반적인 DNA 합성 공정 명칭	공정 단계	시간(초)
활성화제 유동)	활성화제	
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	18
	25 초 동안 항온처리	25
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4
캡핑 (CapA+B, 1:1, 유동)	유동셀로 향하는 CapA+B	15
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	아세토니트릴 시스템 세척	4
산화 (산화제 유동)	유동셀로 향하는 산화제	18
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4
	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	23
	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템	4

[0626]

표 3

일반적인 DNA 합성 공정 명칭	공정 단계	시간(초)
	세척	
탈차단 (탈차단제 유동)	유동셀로 향하는 탈차단제	36
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4
	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	18
	N_2 시스템 세척	4.13
	아세토니트릴 시스템 세척	4.13
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15

[0627]

[0628] 포스포라미다이트/활성화제 조합을, 유동셀을 통한 대부분의 시약들의 전달과 유사하게 전달하였다. 환경이 전체 시간 동안 시약에 의해 "습한" 상태로 유지되기 때문에 건조 단계를 수행하지 않았다.

[0629] 유동 제한제(restrictor)를 ABI 394 합성기로부터 제거하여 보다 더 빠른 유동을 가능하게 하였다. 유동 제한제를 이용하지 않았을 때, 아미다이트(ACN 중의 0.1 M), 활성화제(ACN 중의 0.25 M 벤조일티오테트라졸("BTT"; 글렌리서치(GlenResearch)로부터의 30-3070-xx) 및 Ox(20% 피리딘, 10% 물 및 70% THF 중의 0.02 M I_2)에 대한 유속은 대략 약 100 ㎕/초이었고, 아세토니트릴("ACN") 및 캡핑 시약(CapA와 CapB의 1:1 혼합물, 이때 CapA는 THF/피리딘 중의 아세트산 무수물이고 CapB는 THF 중의 16% 1-메틸이미다졸임)에 대한 유속은 대략 약 200 ㎕/초이었고, 탈차단제(톨루엔 중의 3% 디클로로아세트산)에 대한 유속은 대략 300 ㎕/초이었다(유속 제한제를 사용하였을 때 모든 시약들에 대한 약 50 ㎕/초의 유속과 비교됨).

[0630] 산화제를 완전히 밀어내기 위한 시간을 관찰하였고, 이에 따라 화학적 유동 시간에 대한 타이밍을 조절하였고, 여분의 ACN 세척을 상이한 화합물들 사이에 도입하였다.

[0631] 올리고뉴클레오티드 합성 후, 칩을 75 psi에서 암모니아 기체로 밤새 탈보호하였다. 5개의 물방울을 표면에 적용하여 올리고머를 회수하였다(도 45a). 그 다음, 회수된 올리고머를 생물분석기 작은 RNA 칩 상에서 분석하였다(도 45b)

[0632] **실시예 8: 2D 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서의 100-머 서열의 합성**

[0633] 50-머 서열의 합성을 위한 실시예 7에 기재된 공정과 동일한 공정을 2개의 상이한 실리콘 칩들(N-(3-트리에톡시실릴프로필)-4-하이드록시부티르아미드로 균일하게 작용화된 제1칩, 및 11-아세톡시운데실트리에톡시실란 및 n-데실트리에톡시실란의 5/95 혼합물로 작용화된 제2칩) 상에서 이용하여 100-머 올리고뉴클레오티드("100-mer 올리고뉴클레오티드"; 5' CGGGATCCTTATCGTCATCGTCGTACAGATCCCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGATGAGAACCCCGCAT##TTTTTTTTTT3', 이때 #은 타이미딘-석시닐 헥사마이드 CED 포스포라미다이트(켐진스로부터의 CLP-2244; 서열번호 2)를 표시함)를 합성하였고, 표면으로부터 추출된 올리고머를 생물분석기 기계 상에서 분석하였다(도 46).

[0634] 50 ㎕ PCR 혼합물(25 ㎕ NEB Q5 마스터믹스, 2.5 ㎕ 10 μM 정방향 프라이머, 2.5 ㎕ 10 μM 역방향 프라이머, 표면으로부터 추출된 1 ㎕ 올리고머, 및 50 ㎕까지 채우는 물) 중의 정방향 프라이머(5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'; 서열번호 3) 및 역방향 프라이머(5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'; 서열번호 4)를 사용하고 하기 열순환 프로그램을 이용하여 상기 2개의 칩들로부터의 모든 10개 샘플들을 PCR로 더 증폭하였다:

[0635] 98℃, 30초

[0636] 98℃, 10초; 63℃, 10초; 72℃, 10초; 12 주기 반복

[0637] 72℃, 2분

[0638] 또한, PCR 생성물을 생물분석기 상에서 분석하여(도 47) 100-머 위치에서 날카로운 피크를 입증하였다.

[0639] 그 다음, PCR에 의해 증폭된 샘플을 클로닝하고 생거 서열결정하였다. 표 4는 칩 1로부터의 스폿 1 내지 5로부터 채취된 샘플들 및 칩 2로부터의 스폿 6 내지 10으로부터 채취된 샘플들에 대한 생거 서열결정으로부터의 결과를 요약한다.

[0640] [표 4]

스폿	오류율	주기 효율
1	1/763 bp	99.87%
2	1/824 bp	99.88%
3	1/780 bp	99.87%
4	1/429 bp	99.77%
5	1/1525 bp	99.93%
6	1/1615 bp	99.94%
7	1/531 bp	99.81%
8	1/1769 bp	99.94%
9	1/854 bp	99.88%
10	1/1451 bp	99.93%

[0641]

[0642] 따라서, 합성된 올리고뉴클레오티드의 고품질 및 균일성은 상이한 표면 화학반응을 가진 2개의 칩들 상에서 반복되었다. 종합하건대, 서열결정된 262개의 100-머들 중 233개에 상응하는 89%가 오류 없는 완벽한 서열이었다.

[0643] 도 48 및 49는 각각 스폿 8 및 7로부터 채취된 샘플들에 대한 정렬 맵을 보여주는데, 이때 "x"는 단일 염기 결실을 표시하고, "별모양"은 단일 염기 돌연변이를 표시하고, "+"는 생거 서열결정에서 저품질 스폿을 표시한다. 도 48에서 정렬된 서열들은 함께 약 97%의 오류율을 나타내는데, 이때 29개의 리드들 중 28개의 리드들이 완벽한 서열에 상응한다. 도 49에서 정렬된 서열들은 함께 약 81%의 오류율을 나타내는데, 이때 27개의 리드들 중 22개의 리드들이 완벽한 서열에 상응한다.

[0644] 마지막으로, 표 5는 스폿 1 내지 10으로부터의 올리고뉴클레오티드 샘플들로부터 수득된 서열들에 대한 핵심 오류 특성을 요약한다.

[0645] [표 5]

샘플 ID/스폿 번호	OSA_0046/1	OSA_0047/2	OSA_0048/3	OSA_0049/4	OSA_0050/5	OSA_0051/6	OSA_0052/7	OSA_0053/8	OSA_0054/9	OSA_0055/10
총 서열	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
서열결정 품질	28 중 25	27 중 27	30 중 26	23 중 21	26 중 25	30 중 29	31 중 27	31 중 29	29 중 28	28 중 25
올리고 품질	25 중 23	27 중 25	26 중 22	21 중 18	25 중 24	29 중 25	27 중 22	29 중 28	28 중 26	25 중 20
ROI 일치 카운트	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
ROI 돌연변이	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
ROI 다중 염기 결실	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 작은 삽입	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 단일 염기 결실	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
큰 결실 카운트	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
돌연변이: G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
돌연변이: T>C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ROI 오류 카운트	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1
ROI 오류율	오류율: 약 1/834	오류율: 약 1/1350	오류율: 약 1/1282	오류율: 약 1/708	오류율: 약 1/2500	오류율: 약 1/2667	오류율: 약 1/876	오류율: 약 1/2900	오류율: 약 1/1400	오류율: 약 1/2349
ROI 마이너스 프라이머오류율	MP 오류율: 약 1/763	MP 오류율: 약 1/824	MP 오류율: 약 1/780	MP 오류율: 약 1/429	MP 오류율: 약 1/1525	MP 오류율: 약 1/1615	MP 오류율: 약 1/531	MP 오류율: 약 1/1769	MP 오류율: 약 1/854	MP 오류율: 약 1/1451

[0646]

[0647] **실시예 9: 3D 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서의 100-머 서열의 합성**

[0648] 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 합성 방법을 이용하여, 합성을 위한 활성 영역 상에서 11-아세톡시운데실트리에톡시실란과 n-데실트리에톡시실란의 5/95 혼합물로 상이하게 작용화된, 실시예 3에 기재된 3차원 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스를 유동셀로 조립함으로써 실시예 8의 100-머 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. 표 3의 프로토콜에 따라 실시예 7에 기재된 표준 DNA 합성 화학반응(커플링, 캡핑, 산화 및 탈차단)을 이용하여 합성을 수행하였다. 칩을 75 psi에서 암모니아 기체로 밤새 탈보호하였고, 올리고머를 500 ㎕ 물로 용출하였다. 증발 후, 하류 분석을 위해 모든 올리고머들을 20 ㎕ 물에 재현탁하였다. 재현탁된 샘플을 생물분석기 기계 상에서 분석하였다(도 50a).

[0649] 하기 열순환 프로그램에 따라, 25 ㎕ NEB Q5 마스터믹스, 2.5 ㎕ 10 μM 정방향 프라이머, 2.5 ㎕ 10 μM 역방향 프라이머, 표면으로부터 추출된 1 ㎕ 올리고머, 및 50 ㎕까지 채우는 물을 포함하는 50 ㎕ PCR 혼합물 중의 정방향 프라이머(5'ATGCGGGGTTCTCATCATC3'; 서열번호 5) 및 역방향 프라이머(5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'; 서열

번호 6)를 사용하여 재현탁된 샘플도 PCR로 증폭하였다:

[0650] 1 주기: 98℃, 30초

[0651] 12 주기: 98℃, 10초; 63℃, 10초; 72℃, 10초

[0652] 1 주기: 72℃, 2분

[0653] 또한, PCR 생성물을 생물분석기 상에서 분석하여(도 50b) 100-머 위치에서 날카로운 피크를 보여주었다.

[0654] PCR 생성물의 서열결정 결과는 도 51에서 정렬 맵에 의해 예시된 바와 같이 29개의 서열들 중 23개의 서열들이 완벽하였고 오류율이 약 1/600 bp이었다는 것을 보여주었는데, 이때 "x"는 단일 염기 결실을 표시하고, "별모양"은 단일 염기 돌연변이를 표시하고, "+"는 생거 서열결정에서 저품질 스폿을 표시한다.

[0655] **실시예 10: 3차원 마이크로플루이딕 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서의 병렬식 올리고뉴클레오티드 합성**

[0656] 실시예 9의 3차원 마이크로플루이딕 디바이스 상에서 병렬식 올리고뉴클레오티드 합성을 수행하기 위해 하우스 셋업을 이용하여 실시예 7의 합성 프로토콜을 변경한다.

[0657] 표 6은 2개의 프로토콜들을 나란히 비교하여 보여준다.

[0658] [표 6]

	실시예 7 프로토콜		트위스트 인-하우스(Twist In-House) 합성기 프로토콜	
일반적인 DNA 합성 공정 명칭	실시예 7 공정 단계	시간(초)	트위스트 공정 단계	시간(초)
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4	NA	
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	23		
	N_2 시스템 세척	4		
	아세토니트릴 시스템 세척	4		
DNA 염기 첨가 (포스포라미다이트 + 활성화제 유동)	활성화제 매니폴드 세척	2	프린트헤드는 칩 활성 부위 상에서 직접적으로 활성화제 + 포스포라미다이트를 1:1 프린팅한다.	120
	유동셀로 향하는 활성화제	6		
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	6		
	유동셀로 향하는 활성화제	0.5		
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	5		
	유동셀로 향하는 활성화제	0.5		
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	5		
	유동셀로 향하는 활성화제	0.5		
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	5		
	25 초 동안 항온처리	25		
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4		
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15		
	N_2 시스템 세척	4		
	아세토니트릴 시스템 세척	4		

[0659]

	실시예 7 프로토콜		트위스트 인-하우스(Twist In-House) 합성기 프로토콜	
일반적인 DNA 합성 공정 명칭	실시예 7 공정 단계	시간(초)	트위스트 공정 단계	시간(초)
DNA 염기 첨가 (포스포라미다이트 + 활성화제 유동)	활성화제 매니폴드 세척	2		
	유동셀로 향하는 활성화제	5		
	유동셀로 향하는 활성화제 + 포스포라미다이트	18		
	25 초 동안 항온처리	25		
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	N_2 시스템 세척	4	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
캡핑(CapA+B, 1:1, 유동)	유동셀로 향하는 CapA+B	15	유동셀로 향하는 CapA+B	15
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
산화 (산화제 유동)	유동셀로 향하는 산화제	18	유동셀로 향하는 산화제	18
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	N_2 시스템 세척	4	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
	N_2 시스템 세척	4	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4

[0660]

일반적인 DNA 합성 공정 명칭	실시예 7 프로토콜		트위스트 인-하우스(Twist In-House) 합성기 프로토콜	
	실시예 7 공정 단계	시간(초)	트위스트 공정 단계	시간(초)
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	23	유동셀로 향하는 아세토니트릴	23
	N_2 시스템 세척	4	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
탈차단 (탈차단제 유동)	유동셀로 향하는 탈차단제	36	유동셀로 향하는 탈차단제	36
세척 (아세토니트릴 세척 유동)	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	N_2 시스템 세척	4	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	18	유동셀로 향하는 아세토니트릴	18
	N_2 시스템 세척	4	N_2 시스템 세척	4
	아세토니트릴 시스템 세척	4	아세토니트릴 시스템 세척	4
	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15	유동셀로 향하는 아세토니트릴	15
유동셀 건조 (트위스트 합성기에 대해 특이적임)	NA		N_2 시스템 세척	4
			유동셀로 향하는 N_2	19.5
			N_2 시스템 세척	4
			유동셀 상에서의 진공 건조 흡입	10
			N_2 시스템 세척	4
			유동셀로 향하는 N_2	19.5

[0661]

[0662] 아세토니트릴(ACN)을 인-라인 탈기장치(in-line degasser)(모델 번호 403-0202-1; 랜덤 테크놀로지스(Random Technologies))에 통과시킴으로써, 50 내지 400 ㎕/초의 유속에서 작용하고 이론에 의해 구속되지 않지만 아마도 기포를 불포화된 용매에 용해시켜 유동셀 상에서 형성하는 기포를 제거하는 것으로 이미 밝혀진, 매우 높은 소수성을 가진 막의 측면을 따라 액체를 통과시킨다.

[0663] 시약을 다음과 같이 유동셀에서 상이한 시약으로 교환한다:

[0664] 1) 유동셀을 향한 시약 유동을 시작한다.

[0665] 2) 새로운 시약으로 이전 시약을 전달 라인으로부터 "밀어내도록" 밸브를 설정함으로써 프라이밍한다. 이 밸브 상태는 3.75초 동안 유지된다.

[0666] 3) 2D 밸브 상태: 유동셀의 표면 상에서 체류하는 이전 시약을 새로운 시약으로 교체하도록 밸브를 설정한다. 이것은 단계 2가 3.75초 동안 활성 상태로 있는 동안 일어난다. 단계 2 및 3은 0.25초 동안 동시에 활성 상태이고, 그 후 프라이밍 밸브 상태가 꺼진다.

[0667] 4) 3D 밸브 상태: 밸브는 시약이 유동셀에서 실리콘의 3차원 마이크로플루이딕 특징부를 통해 유동하도록 전환하는데, 이것은 단계 3에서 2D 밸브 상태의 0.75초가 경과한 후 시작된다.

[0668] 5) 시약의 유동: 2D 밸브 상태 및 3D 밸브 상태는 적절한 용량의 시약이 칩 내의 실리콘 표면에 부착할 수 있도록 지정된 시간 동안 개방된 상태로 남아있다.

[0669] 따라서, 시약 교환의 5초 주기 동안, 0초 내지 4초에 걸친 초기 시간 동안 프라이밍하고 3.75초 내지 5초에 걸친 시간 동안 2D 밸브 상태를 켜고 4.5초 내지 5초에 걸친 시간 동안 3D 밸브 상태를 켬으로써 유체 전달을 수행한다.

[0670] 잉크젯 프린팅 단계를 이용하여 포스포라미다이트/활성화제 조합을 전달한다. 전달은 실리콘 표면 상으로의 1:1

점적-상-점적(drop-on-drop) 침착일 수 있다. 점적 크기는 약 10 pl일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 점적 크기는 약 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400 또는 500 피코리터 이상이다. 일부 실시양태들에서, 점적 크기는 약 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1 또는 0.1 피코리터 이하이다. 점적 크기는 0.1 내지 50 피코리터, 1 내지 150 피코리터, 또는 5 내지 75 피코리터일 수 있다. 점적 크기는 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 범위, 예를 들면, 2 내지 50 피코리터 내에 속할 수 있다. 점적은 1 내지 100 m/초의 초기 속도로 침착될 수 있다. 일부 경우, 점적은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 40, 35, 40, 45, 50, 75 또는 100 m/초 이상의 초기 속도로 침착될 수 있다. 일부 경우, 점적은 약 100, 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 m/초 이하의 초기 속도로 침착될 수 있다. 점적은 약 1 내지 50 m/초, 5 내지 15 m/초, 5 내지 30 m/sec, 또는 1 내지 30 m/초에 속하는 초기 속도로 침착될 수 있다. 당업자는 점적이 이 값들 중 임의의 값에 의해 한정된 범위에 속하는 초기 속도로 침착될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0671] 건조 단계는 대부분의 시약 순서 후 프린팅 단계 동안 실리콘 표면을 제조한다. 프린팅된 시약들이 반응하는 것을 용이하게 하는 건조 조건을 달성하기 위해, 유동셀을 약 19.5초 동안 약 5 psi에서 N_2 기체로 씻어내고, 작은 진공을 10초 동안 유동셀 챔버 상에 뽑아내고, 유동셀을 다시 19.5초 동안 N_2 기체로 씻어낸다. 모든 시약들을 약 200-400 ㎕/초에서 유동시킨다.

[0672] 상이한 압력을 이용하여 유속을 인-하우스(in-house) 시스템에서 조절할 수 있다. 유속은 상업적으로 입수가능한 합성기들의 한정 양태들 중 하나이다. 인-하우스 기계 셋업에서, 유속을 실시예 7에 기재된 그의 값에 일치시키거나, 적절한 경우 증가된 또는 감소된 유속에 일치시켜 합성 공정을 개선할 수 있다. 일반적으로, 보다 더 빠른 유동은 보다 더 느린 유속과 비교될 때 기포를 훨씬 더 효율적으로 제거할 수 있게 하고 주어진 시간 간격 동안 새로운 시약을 표면 쪽으로 더 많이 교환할 수 있게 하기 때문에 이점을 제공한다.

[0673] **실시예 11: 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스로부터 나노반응기 디바이스로의 블롯팅-기초 올리고뉴클레오티드 전달**

[0674] 50-머 올리고뉴클레오티드를 실시예 9에 기재된 바와 같이 3-D 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서 합성하였다. 능동 작용화를 적용하지 않았다. 도 53a 및 53b는 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 디바이스 면 상의 클러스터에서 올리고뉴클레오티드 합성 채널 분포를 예시하고, 도 53c는 표면 작용화를 예시한다. 올리고뉴클레오티드를 14시간 동안 75 psi에서 암모니아 기체 챔버에서 처리하여 표면으로부터 방출시켰다.

[0675] 친수성 내벽 및 소수성 상부 덮개를 가진, 실시예 4에 따라 제작된 나노반응기 디바이스의 웰(도 54)을 먼저 음성 대조군으로서 PCA 적합한 완충제(5X Q5 완충제; 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))로 채웠다. 200 내지 300 nl의 분취액을 손으로 피펫팅하여 생물분석기 내로 공급함으로써 개별 나노반응기들에서 임의의 오염 핵산의 부재를 보여주었다(도 55).

[0676] 그 다음, 나노반응기를 약 650 nl의 PCA 완충제로 채워 약간 튀어나온 반월판을 형성하였다(도 53). 나노반응기 디바이스를 올리고뉴클레오티드 디바이스와 접속시켜, 올리고뉴클레오티드 합성 채널("리볼버")을 약 5 ㎜/초의 속도로 PCA 완충제로 침수시켰다. 다른 경우, 상기 2개의 디바이스들을 접속시키기 위한 맨틀링(mantling) 속도를 본원에 기재된 바와 같이 변경시켜, 특히 디바이스들 사이의 다소 효율적인 액체 전달을 달성함으로써 원하는 부피의 액체의 조절된 분취 또는 조절된 증발을 야기할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 디바이스와 나노반응기는 약 10분 동안 이들 2개의 디바이스들 사이에 약 50 ㎛의 갭을 가지면서 접속된 상태로 유지됨으로써, 올리고뉴클레오티드가 용액 내로 확산되게 하였다(도 57). 일부 경우, 조립체 또는 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스만을 진동시키거나 왕복시켜 보다 더 빠른 확산을 용이하게 할 수 있다. 10분보다 더 긴, 예컨대, 약 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 20분 또는 25분 이상의 확산 시간을 이용하여 보다 더 높은 수율을 용이하게 할 수도 있다. 나노반응기 디바이스를 약 5 ㎜/초의 속도로 올리고뉴클레오티드 디바이스로부터 이형시켜, 방출된 올리고뉴클레오티드를 개별 나노반응기 내에 포획하였다. 다른 경우, 상기 2개의 디바이스들을 접속시키기 위한 디스맨틀링(dismantling) 속도를 본원에 기재된 바와 같이 변경시켜, 특히 상기 디바이스들 사이의 다소 효율적인 액체 전달을 달성함으로써 원하는 부피의 액체의 조절된 분취를 야기할 수 있다. 미량의 액체가 올리고뉴클레오티드 디바이스 상에서 남는다는 것을 관찰하였다.

[0677] 나노반응기 디바이스 내의 여러 개별 나노반응기들로부터 약 300 nl의 샘플을 피펫팅하고 1 ㎕의 부피로 희석하여 4.3배 희석을 확립하였다. 희석된 샘플을 생물분석기에서 개별적으로 분석하여 나노반응기 내로의 올리고뉴클레오티드의 방출을 확립하였다(도 55).

[0678] 수동 주사기를 이용하여 추가 샘플을 양성 대조군으로서 채취하였다. 타이곤 튜빙(Tygon tubing)을 이용하여 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스와의 면 밀봉을 생성하였다. 500 ㎕의 물로 채워진 주사기를 이용하여 한 전체 클러스터 및 인접 클러스터들의 일부를 통해 핸들 면으로부터 액체를 씻어내렸다. 씻어내려진 액체를 디바이스 면 상의 1.5 ㎖ 에펜도르프 튜브 내에 수집하였다. 샘플을 진공에서 건조한 후 10 ㎕의 물에 재현탁하였다. 그 다음, 샘플을 생물분석기에서 유사하게 분석하였다. 희석률을 참작할 때, 양성 대조군 방법 및 나노반응기 블롯 방법의 이용에 의해 필적할만한 농도의 올리고뉴클레오티드가 방출되었다.

[0679] **실시예 12: 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스로부터 나노반응기로의 주입-기초 올리고뉴클레오티드 전달**

[0680] 50-머 올리고뉴클레오티드를 실시예 9에 기재된 바와 같이 3-D 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서 합성한다. 올리고뉴클레오티드를 약 14시간 동안 약 75 psi에서 암모니아 챔버에서 처리하여 표면으로부터 방출시킨다. 대안적으로, 올리고뉴클레오티드의 방출을 위해 20 내지 120 psi의 압력을 1시간 내지 48시간 이상 동안 사용할 수 있다. 온도는 실온이다. 일부 경우, 온도를 예를 들면, 약 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃ 또는 65℃ 이상까지 증가시킴으로써 탈보호율을 증가시킬 수 있다. 메틸아민 기체도 실온에서, 또는 약 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃ 또는 65℃ 이상의 승온에서 탈보호를 위해 사용될 수 있다. 메틸아민에서의 탈보호는 전형적으로 암모니아 기체에서의 탈보호보다 더 신속히 진행된다.

[0681] 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스를, 단일 입구 및 단일 출구를 가진 헬레-쇼 유동셀로 조립한다. 타이곤 튜빙을 통해 유동셀에 연결되고 수동으로 조절되는 주사기를 이용하여 유동을 발생시킨다(도 57). 도 56은 유동셀에서의 유체공학의 개략도를 보여준다. 유체 회로를 이용하여 유체를 핸들 면으로부터 제1 채널(또는 비아) 내로 유동시키고, 유체를 제2 채널, 예를 들면, 올리고뉴클레오티드 합성 부위를 포함하는 리볼버 패턴을 형성하는 제2 채널 내로 더 끌어들인다. 유체는 단일 포인트 입구로부터 전달되고 단일 포인트 출구로부터 수집된다(도 56b). 다른 경우, 라인 공급구 및 라인 싱크(line sink)를 이용하여 유체를 통과시킬 수 있다(도 56a). 이론에 의해 구속받지 않지만, 포인트 공급구/싱크 조합은 모든 액체를 헬레-쇼 유동셀로부터 밀어내는 데에 보다 더 효율적일 수 있는 균일한 공기 프론트를 형성할 것으로 예상된다. 액체를 유동셀로부터 제거할 때, 액체는 핸들 면 상의 비아, 및 제2 채널 또는 올리고뉴클레오티드 합성 채널, 예를 들면, 디바이스 면 상의 리볼버 패턴에만 함유된다. 이 부피는 비아((또는 제1 채널)의 클러스터당 300 nl인 것으로 추정된다. 유체의 이러한 봉쇄는 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 디바이스 층 표면 상에서의 균일한 고착 점적들의 형성을 용이하게 할 수 있다.

[0682] 이 단계를 위해, 적합한 방출 완충제, 예컨대, PCA 상용성 완충제를 선택하여 방출된 올리고뉴클레오티드를 용액 내에 용해시킨다. 비아 및 제2 채널을 채울 때, 조립 클러스터당 300 nl인 것으로 추정되는 액체만을 디바이스의 정체 대역(핸들 및 리볼버)에 남기면서, 약 500 내지 1000 Pa을 이용하여 올리고뉴클레오티드 합성 칩의 핸들 면 상의 헬레-쇼 유동셀로부터 액체를 씻어낸다(도 56c). 단일 포인트 출구를 차단하고 가압된 공기를 약 3000 내지 5000 Pa에서 핸들 층 표면 상에서 유동시켜 점적을 디바이스 층 표면 상으로 배출한다(도 56d). 유동셀을 통해 충분한 방출 완충제를 밀어넣어, 제2 채널(또는 올리고뉴클레오티드 합성 채널)로부터 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 디바이스 면 표면 상으로 나오는 고착 점적을 형성한다. 고착 점적 크기는 약 300 내지 400 nl일 수 있으나, 올리고뉴클레오티드 합성 클러스터 및/또는 나노반응기의 구체적인 치수, 및 올리고뉴클레오티드의 원하는 농도에 따라 적합한 크기로 변경될 수 있다. 예를 들면, 약 500 nl의 고착 점적 크기가 형성될 수 있다. 고착 점적 형성을 임의적으로 현미경으로 모니터링하여, 점적 형성이 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스에 걸쳐 완전한지를 확인한다. 일부 경우, 고착 점적을 형성하는 액체는 원하는 접촉각이 디바이스 층 상에서 달성되도록 성분들의 혼합물로부터 제조될 수 있다. 따라서, 용액을 성분, 예컨대, 세제, 예를 들면, 폴리소르베이트 20(폴리옥시에틸렌 (20) 소르비탄 모노라우레이트, 트윈-20으로서도 공지되어 있음)으로 보충할 수 있다.

[0683] 대안적으로, 적합한 양의 방출 완충제를 핸들 면으로부터의 개별 웰들/제1 채널들 내에 침착시키고, 예를 들면, 핸들 면 상에서 헬레-쇼 유동셀을 형성하여 핸들 면으로부터 압력을 적용함으로써 올리고뉴클레오티드 합성 채널을 통해 상기 방출 완충제를 밀어넣는다. 나노반응기 디바이스를 적합한 속도, 예를 들면, 약 1 내지 10 ㎜/초 및 거리, 예를 들면, 약 50 ㎛에서 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 디바이스 면에 반하여 맨틀링시킨다. 맨틀링은 증발을 피하기 위해 점적 형성 후 신속히 수행될 수 있다. 일단 2개의 디바이스들(나노반응기 및 올리고뉴클레오티드 합성 반응기)이 맨틀링되면 증발도 최소화된다.

[0684] **실시예 13: 올리고뉴클레오티드 합성의 디바이스 면으로부터 전달된 반응 혼합물로부터의 PCA를 이용한 나노반응기에서의 유전자 조립**

[0685] 표 8로부터의 서열번호 7 내지 66을 사용하여 PCA 반응 혼합물을 표 7에 기재된 바와 같이 제조함으로써 3075 bp LacZ 유전자를 조립하였다(서열번호 67; 표 8).

[0686] [표 7]

PCA	1(x100 ㎕)	최종 농도
H_2O	62.00	
5x Q5 완충제	20.00	1x
10 mM dNTP	1.00	100 μM
BSA 20 mg/㎖	5.00	1 mg/㎖
올리고 혼합물 각각 50 nM	10.00	5 nM
Q5 중합효소 2 U/㎕	2.00	2 U/50 ㎕

[0687]

[0688] [표 8]

서열 명칭	서열
올리고_1, 서열번호 7	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGG3'
올리고_2, 서열번호 8	5'GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC3'
올리고_3, 서열번호 9	5'CCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC3'
올리고_4, 서열번호 10	5'CGGCACCGCTTCTGGTGCCGGAAACCAGGCAAAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3'
올리고_5, 서열번호 11	5'CACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTC3'
올리고_6, 서열번호 12	5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCTGCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGG3'
올리고_7, 서열번호 13	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTG3'
올리고_8, 서열번호 14	5'GTCTGGCCTTCCTGTAGCCAGCTTTCATCAACATTAAATGTGAGCGAGTAACAACCCGTCGGATTCTCCGTG3'
올리고_9, 서열번호 15	5'GCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG3'
올리고_10, 서열번호 16	5'CAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACTGTCCTGGCCGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACG3'
올리고_11, 서열번호 17	5'CGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTG3'
올리고_12, 서열번호 18	5'GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCGTCACTCCAGCGCAGCACCATCACCGCGAG3'
올리고_13, 서열번호 19	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTC3'
올리고_14, 서열번호 20	5'CTCCAGTACAGCGCGGCTGAAATCATCATTAAAGCGAGTGGCAACATGGAAATCGCTGATTTGTGTAGTCGGTTTATG3'
올리고_15, 서열번호 21	5'ATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTT3'
올리고_16, 서열번호 22	5'AAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTTTCACCCTGCCATAAAGAAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACG3'
올리고_17, 서열번호 23	5'GCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACG3'
올리고_18, 서열번호 24	5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCCACAGTTTCGGGTTTTCGACGTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCA3'
올리고_19, 서열번호 25	5'GAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAG3'

[0689]

서열 명칭	서열
올리고_20, 서열번호 26	5'CAGCAGCAGACCATTTTCAATCCGCACCTCGCGGAAACC GACATCGCAGGCTTCTGCTTCAATCAGCGTGCCG3'
올리고_21, 서열번호 27	5'CGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCG TTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCA3'
올리고_22, 서열번호 28	5'GCAGGATATCCTGCACCATCGTCTGCTCATCCATGACCTG ACCATGCAGAGGATGATGCTCGTGACGGTTAACGC3'
올리고_23, 서열번호 29	5'CAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAAC AACTTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAAC3'
올리고_24, 서열번호 30	5'TCCACCACATACAGGCCGTAGCGGTCGCACAGCGTGTAC CACAGCGGATGGTTCGGATAATGCGAACAGCGCAC3'
올리고_25, 서열번호 31	5'GCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAAC CCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATG3'
올리고_26, 서열번호 32	5'GCACCATTCGCGTTACGCGTTCGCTCATCGCCGGTAGCCA GCGCGGATCATCGGTCAGACGATTCATTGGCAC3'
올리고_27, 서열번호 33	5'CGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCG AGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAG3'
올리고_28, 서열번호 34	5'GGATCGACAGATTTGATCCAGCGATACAGCGCGTCGTGA TTAGCGCCGTGGCCTGATTCATTCCCCAGCGACCAGATG3'
올리고_29, 서열번호 35	5'GTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTG CAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGC3'
올리고_30, 서열번호 36	5'CGGGAAGGGCTGGTCTTCATCCACGCGCGCGTACATCGG GCAAATAATATCGGTGGCCGTGGTGTCGGCTC3'
올리고_31, 서열번호 37	5'TGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGT CCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGAC3'
올리고_32, 서열번호 38	5'CCAAGACTGTTACCCATCGCGTGGGCGTATTCGCAAAGG ATCAGCGGGCGCGTCTCTCCAGGTAGCGAAAGCC3'
올리고_33, 서열번호 39	5'CGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTG GCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGC3'
올리고_34, 서열번호 40	5'GCCGTTTTCATCATATTTAATCAGCGACTGATCCACCCAG TCCCAGACGAAGCCGCCCTGTAAACGGGGATACTGACG3'
올리고_35, 서열번호 41	5'CAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGG TCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACG3'
올리고_36, 서열번호 42	5'GCGGCGTGCGGTCGGCAAAGACCAGACCGTTCATACAG AACTGGCGATCGTTCGGCGTATCGCCAAA3'
올리고_37, 서열번호 43	5'CGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAAC ACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCG3'
올리고_38, 서열번호 44	5'CTCGTTATCGCTATGACGGAACAGGTATTCGCTGGTCACT TCGATGGTTTGCCCGGATAAACGGAACTGGAAAAACTGC3'
올리고_39, 서열번호 45	5'AATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTG

[0690]

서열 명칭	서열
	GATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCG3'
올리고_40, 서열번호 46	5'GTTCAGGCAGTTCAATCAACTGTTTACCTTGTGGAGCGA CATCCAGAGGCACTTCACCGCTTGCCAGCGGCTTACC3'
올리고_41, 서열번호 47	5'CAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAG CCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTA3'
올리고_42, 서열번호 48	5'GCGCTGATGTGCCCGGCTTCTGACCATGCGGTCGCGTTC GGTTGCACTACGCGTACTGTGAGCCAGAGTTG3'
올리고_43, 서열번호 49	5'CCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCG GAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGC3'
올리고_44, 서열번호 50	5'CCAGCTCGATGCAAAAATCCATTTCGCTGGTGGTCAGAT GCGGGATGGCGTGGGACGCGGCGGGGAGCGTC3'
올리고_45, 서열번호 51	5'CGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGG CAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTG3'
올리고_46, 서열번호 52	5'TGAACTGATCGCGCAGCGGCGTCAGCAGTTGTTTTTTATC GCCAATCCACATCTGTGAAAGAAAGCCTGACTGG3'
올리고_47, 서열번호 53	5'GCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAA CGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGAC3'
올리고_48, 서열번호 54	5'GGCCTGGTAATGGCCCGCCGCCTTCCAGCGTTCGACCCA GGCGTTAGGGTCAATGCGGGTCGCTTCACTTA3'
올리고_49, 서열번호 55	5'CGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCA CGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGAT3'
올리고_50, 서열번호 56	5'TCCGGCTGATAAATAAGGTTTTCCCCTGATGCTGCCACGC GTGAGCGGTCGTAATCAGCACCGCATCAGCAAGTG3'
올리고_51, 서열번호 57	5'GGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGAT TGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGA3'
올리고_52, 서열번호 58	5'GGCAGTTCAGGCCAATCCGCGCCGGATGCGGTGTATCGC TCGCCACTTCAACATCAACGGTAATCGCCATTTGAC3'
올리고_53, 서열번호 59	5'GCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAG AGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAG3'
올리고_54, 서열번호 60	5'GGCAGATCCCAGCGGTCAAAACAGGCGGCAGTAAGGCG GTCGGGATAGTTTTCTTGCGGCCCTAATCCGAGC3'
올리고_55, 서열번호 61	5'GTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATAC CCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGC3'
올리고_56, 서열번호 62	5'GTCGCCGCGCCACTGGTGTGGGCCATAATTCAATTCGCG CGTCCCGCAGCGCAGACCGTTTTCGCTCGG3'
올리고_57, 서열번호 63	5'ACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCT ACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATC3'
올리고_58, 서열번호 64	5'GAAACCGTCGATATTCAGCCATGTGCCTTCTTCCGCGTGC AGCAGATGGCGATGGCTGGTTTCCATCAGTTGCTG3'

[0691]

서열 명칭	서열
올리고_59, 서열번호 65	5'CATGGCTGAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGG CGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCG3'
올리고_60, 서열번호 66	5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGGTAGCGACCG GCGCTCAGCTGGAATTCCGCCGATACTGACGGGC3'
LacZ 유전자 – 서열번호 67	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAA CGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATC GCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAG CGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGC AGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCAC CAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTC CTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGAT GCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTAT CCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATC CGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAG CTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGC GTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGG TCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGA CCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCG GTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAA GATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACG TCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTT CCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCT GTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGT GACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAA CGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAA TTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACT ACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGA AATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACC GCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTC GGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGC TGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCA CGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAG ACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAAC TTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAACCATCCGC TGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGT GGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAAT GAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATG AGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAAT CACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAG GCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAA ATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGC GGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGT ACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCC GAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGA GACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCCACGCGATG GGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGT TTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGA

[0692]

서열 명칭	서열
	CTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGG CAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATACG CCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTG CCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAAC ACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAAC CATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGAT AACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAG CCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCAC AAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGC CGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAG TGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACA TCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCA GTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCT GACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAAT AAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCAC AGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGACGCCGC TGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACAT TGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTG GGTCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGA AGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGAT GCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAG GGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGATTG ATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGT GGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAA CTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCT CGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTACT GCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACA TGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCG CTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCCACACCAGTG GCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAA CAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCAC GCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCAT ATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTAT CGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCA GTTGGTCTGGTGTCAAAAATAA3'

[0693]

[0694] 맨티스(Mantis) 분배기(포뮬라트릭스(Formulatrix), 미국 매사추세츠주 소재)를 이용하여 약 400 nl의 점적을 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스의 디바이스 면 상의 리볼버(올리고뉴클레오티드 합성 채널)의 상부 상에 분배하였다. 나노반응기 칩을 올리고뉴클레오티드 디바이스와 수동을 접속시켜 PCA 반응 혼합물을 가진 점적을 선별하였다. 선별 직후, 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스로부터 나노반응기를 이형시킴으로써 점적을 나노반응기 칩 내의 개별 나노반응기 내로 선별하였다(도 59).

[0695] 나노반응기를 가열 밀봉 필름/테이프 커버(에펜도르프(Eppendorf), eshop.eppendorfna.com/products/Eppendorf_Heat_Sealing_PCR_Film_and_Foil)로 밀봉하고, 열순환기 키트(오픈피씨알(OpenPCR))를 사용함으로써 구축된, 적절한 형상을 가진 열순환기 내에 배치하였다.

[0696] 열순환기 상에서 하기 온도 프로토콜을 이용하였다:

[0697] 1 주기: 98℃, 45초

[0698] 40 주기: 98℃, 15초; 63℃, 45초; 72℃, 60초

[0699] 1 주기: 72℃, 5분

[0700] 1 주기: 4℃, 유지

[0701] 0.50 ㎕의 분취액을 도 60에 나타낸 개별 웰 1 내지 10으로부터 수집하고, 정방향 프라이머(F-프라이머; 5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3'; 서열번호 68) 및 역방향 프라이머(R-프라이머; 5'TTATTTTTGACACCAGACCAACTGGTAATGG3'; 서열번호 69)를 사용하여 하기 열순환기 프로그램에 따라 플라스틱 튜브 내의 PCR 반응 혼합물(표 9)에서 상기 분취액을 증폭하였다:

[0702] 열순환기:

[0703] 1 주기: 98℃, 30초

[0704] 30 주기: 98℃, 7초; 63℃, 30초; 72℃, 90초

[0705] 1 주기: 72℃, 5분

[0706] 1 주기: 4℃, 유지

[0707] [표 9]

PCR	1 (x25 ㎕)	최종 농도
H_2O	17.50	
5x Q5 완충제	5.00	1x
10 mM dNTP	0.50	200 μM
F-프라이머 20 μM	0.63	0.5 μM
R-프라이머 20 μM	0.63	0.5 μM
BSA 20 mg/㎖	0.00	
Q5 중합효소 2 U/㎕	0.25	1 U/50 ㎕
주형(PCA 조립)	0.50	1 ㎕/50 ㎕ rxn

[0708]

[0709] 생성된 증폭 생성물을 생물분석기 기계(도 60b, 패널 1 내지 10) 및 겔(도 60c) 상에서 분석하여, 3000 bp보다 약간 더 큰 생성물을 보여주었다. 양성 대조군으로서 플라스틱 튜브 내에서 수행된 PCA 반응을 이용하여 11번째 PCR 반응을 수행하였다(도 60b, 패널 11, 및 도 60c). 생성물을 보이지 않는 음성 대조군으로서 PCA 주형을 사용하지 않는 12번째 PCR 반응을 수행하였다(도 60b, 패널 12, 및 도 60c).

[0710] **실시예 14: 조립된 핵산들의 오류 보정**

[0711] [표 10]

핵산	서열
조립된 유전자, 서열번호 70	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT GACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTT GCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAG TGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGC AGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCC CATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGT TGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAG GCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCT GTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTG CCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACC GCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGA AGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCG TTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCA CTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGT TCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCT TTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCG GCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCAC ACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAAT CCCGAATCTCTATC3'
조립 올리고뉴클레오티드 1, 서열번호 71	5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT GACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCAC ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC 3'
조립 올리고뉴클레오티드 2, 서열번호 72	5'GATAGGTCACGTTGGTGTAGATGGGCGCATCGTAACCGTGCATCT GCCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTATCGGCCTCAGGAAGATCGC ACTCCAGCCAGCTTTCCGGCACCGCTTCTGGTGCCGGAAACCAGGC AAAGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGA3'
조립 올리고뉴클레오티드 3, 서열번호 73	5'CCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCG TTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTA ATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTT TGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGG3'
조립 올리고뉴클레오티드 4, 서열번호 74	5' GCCGCTCATCCGCCACATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCGTCA CTCCAGCGCAGCACCATCACCGCGAGGCGGTTTTCTCCGGCGCGTA AAAATGCGCTCAGGTCAAATTCAGACGGCAAACGACTGTCCTGGC CGTAACCGACCCAGCGCCCGTTGCACCACAGATGAAACG 3'
조립 올리고뉴클레오티드 5,	5'AGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGC TGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCG CTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAG ATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTT 3'

[0712]

핵산	서열
서열번호 75	
조립 올리고뉴클레오티드 6, 서열번호 76	5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCCACAGTTTCGGGTTTTCGA CGTTCAGACGTAGTGTGACGCGATCGGCATAACCACCACGCTCATC GATAATTTCACCGCCGAAAGGCGCGGTGCCGCTGGCGACCTGCGTT TCACCCTGCCATAAAGAAACTGTTACCCGTAGGTAGTCACG 3'

[0713]

[0714] 6개의 구입된 올리고뉴클레오티드들(PCA 동안 각각 5 nM)을 사용하여 약 1 kb의 유전자(서열번호 70; 표 10)를 조립하고 0.02 U/㎕ Q5 고온-출발 고신뢰성 중합효소 및 100 μM dNTP를 가진 1x NEB Q5 완충제를 사용하여 다음과 같이 PCA 반응에서 조립하였다:

[0715] 1 주기: 98℃, 30초

[0716] 15 주기: 98℃, 7초; 62℃, 30초; 72℃, 30초

[0717] 1 주기: 72℃, 5분

[0718] 울트라머 올리고뉴클레오티드는 1/500개 뉴클레오티드 이상, 보다 더 가능하게는 1/200개 뉴클레오티드 이상의 오류율을 가질 것으로 예상된다.

[0719] 정방향 프라이머(5'ATGACCATGATTACGGATTCACTGGCC3'; 서열번호 77) 및 역방향 프라이머(5'GATAGAGATTCGGGATTTCGGCGCTCC3'; 서열번호 78)를 사용하고 0.02 U/㎕ Q5 고온-출발 고신뢰성 중합효소, 200 μM dNTP 및 0.5 μM 프라이머를 가진 1x NEB Q5 완충제를 사용하여 조립된 유전자를 다음과 같이 PCR 반응에서 증폭하였다:

[0720] 1 주기: 98℃, 30초

[0721] 30 주기: 98℃, 7초; 65℃, 30초; 72℃, 45초

[0722] 1 주기: 72℃, 5분

[0723] 증폭되고 조립된 유전자를 생물분석기(도 52a)에서 분석하고 클로닝하였다. 약 24개의 콜로니들로부터의 미니-프렙(Mini-preps)을 생거 서열결정하였다. 생물분석기 분석은 보정되지 않은 유전자에 대한 넓은 피크 및 꼬리를 제공하였는데, 이것은 높은 오류율을 표시하였다. 서열결정은 1/789의 오류율을 표시하였다(데이터는 표시되어 있지 않음). CorrectASE(라이프 테크놀로지스, www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/A14972)를 제조자의 지시에 따라 사용하여 2 라운드의 오류 보정을 수행하였다. 생성된 유전자 샘플을 1 라운드(도 60b) 및 2 라운드(도 60c) 후 생물분석기에서 유사하게 분석하고 클로닝하였다. 서열결정을 위해 24개의 콜로니들을 선별하였다. 서열결정 결과는 각각 제1 라운드 및 제2 라운드의 오류 보정 후 1/5190 bp 및 1/6315 bp의 오류율을 표시하였다.

[0724] **실시예 15: 다량의 프라이머 부재 단일 가닥 올리고뉴클레오티드의 생성**

[0725] 시약. 달리 언급되어 있지 않은 한, phi29 DNA 중합효소를 제외한 모든 효소들 및 완충제들을 NEB로부터 구입하였다. Phi29 DNA 중합효소를 엔자이매틱스(Enzymatics)로부터 구입하였다.

[0726] 올리고뉴클레오티드의 생성. 원하는 올리고뉴클레오티드에 대한 역상보체 서열을 가진 자물쇠 올리고뉴클레오티드(OS_1518)를 IDT로 합성하였다(표 1). 추가 자물쇠 올리고뉴클레오티드들 OS_1515, OS_1516, OS_1517 및 OS_1519도 합성하여 상이한 제한 효소 세트들과 함께 사용되는 어댑터/보조 올리고뉴클레오티드 조합과 함께 사용하였다. 5 ㎕ 자물쇠(200 nM)를 5 ㎕ T4 PNK 완충제, 0.5 ㎕ ATP(100 mM), 2 ㎕ T4 PNK(10 U/㎕), 1 ㎕ BSA(100 ㎍/㎕), 2 ㎕ DTT(100 mM) 및 32.5 ㎕ 물과 혼합하고 37℃에서 60분 동안 혼합물을 항온처리한 후 65℃에서 20분 동안 항온처리함으로써 자물쇠 올리고뉴클레오티드를 인산화시켰다. 자물쇠 올리고뉴클레오티드에 대한 상보체 서열을 가진 어댑터 올리고뉴클레오티드를 IDT로 합성하였다(표 11). 어댑터 올리고뉴클레오티드에 대한 상보적 서열을 가진 보조 올리고뉴클레오티드를 IDT로 합성하고 바이오티닐화시켰다.

[0727] [표 11] 올리고뉴클레오티드 서열

자물쇠, 서열번호 79	5'ATCTTTGAGTCTTCTGCTTGGTCAGACGAGTGCATGTGCGTGACA AATTGGCGCGAGGAGCTCGTGTCATTCACAACTGCTCTTAGGCTAC TCAGGCATGGTGAGATGCTACGGTGGTTGATGGATACCTAGAT3'
어댑터, 서열번호 80	5'CAGAAGACTCAAAGATATCTAGGTATCCATCAAC3'
보조, 서열번호 81	/5Biosg/GTTGATGGATACCTAGATATCTTTGAGTCTTCTG3'
밑줄 = 어댑터 올리고뉴클레오티드에 대한 상보성 구불구불한 밑줄 = 제한 부위 /5Biosg/ = 바이오티닐화 부위	

[0728]

[0729] 혼성화 및 라이게이션. 48 ㎕의 자물쇠 인산화 반응 혼합물을 1.5 ㎕ 어댑터 올리고뉴클레오티드(2 μM) 및 0.5 ㎕ T4 리가제와 조합하였다. 반응물을 37℃에서 60분 동안 항온처리한 후 65℃에서 20분 동안 항온처리하였다. 5 ㎕ 반응 샘플을 5 ㎕ 2X 적재 완충제와 혼합하고 15% TBE-우레아 겔(180 V, 75분) 상에서 분석하였다.

[0730] 임의적 엑소뉴클레아제 처리를 다음과 같이 수행하였다. 10 ㎕ 라이게이션 생성물을 60분 동안 37℃에서 0.15 ㎕ ExoI 및 ExoIII(NEB 또는 엔자이매틱스)으로 처리한 후 20분 동안 95℃에서 처리하였다. 항온처리 후, 0.3 ㎕ 어댑터 올리고뉴클레오티드(2 μM)를 각각의 10 ㎕ 용액에 첨가하고 5분 동안 95℃까지 가열하고 서서히 냉각시켰다. 5 ㎕ 반응 샘플을 5 ㎕ 2X 적재 완충제와 혼합하고 15% TBE-우레아 겔(180 V, 75분) 상에서 분석하였다.

[0731] 롤링 서클 증폭. 0.6 ㎕ phi29 DNA 중합효소(저농도, 엔자이매틱스), 0.5 ㎕ 10 mM dNTP, 1 ㎕ T4 PNK 완충제, 0.2 ㎕ 100x BSA, 0.5 ㎕ 100 mM DTT 및 7.2 ㎕ 물을 얼음 상에서 조합함으로써 10 ㎕ 2X RCA 마스터믹스를 제조하였다. 일부 경우, PCR 첨가제, 예컨대. 베타인, 예를 들면, 5 M 베타인을 사용하여 증폭 편향을 감소시킬 수 있다. 10 ㎕의 RCA 마스터믹스를 (엑소뉴클레아제로 처리되거나 처리되지 않은) 10 ㎕ 라이게이션 생성물과 조합하고 90분 또는 4시간 동안 40℃에서 항온처리하였다. 그 다음, 반응물을 10분 동안 70℃에서 항온처리하여 phi29 DNA 중합효소를 불활성화시켰다. 0.1 ㎕ 반응 샘플을 4.9 ㎕ 물 및 5 ㎕ 2X 적재 완충제와 혼합하고, 혼합물을 15% TBE-우레아 겔(180 V, 75분) 상에서 분석하였다.

[0732] 제한 엔도뉴클레아제 분해. RCA 생성물의 2 ㎕ 샘플을 2 ㎕ 10x 컷스마트(CutSmart), 2 ㎕ 바이오티닐화된 보조 올리고뉴클레오티드(20 μM) 및 12 ㎕ 물과 혼합하였다. 혼합물을 98℃까지 가열하고 실온까지 서서히 냉각시켰다. 각각 1 ㎕의 BciVI 및 MlyI를 혼합물에 첨가한 후, 37℃에서 1시간 동안 항온처리한 다음, 80℃에서 20분 동안 항온처리하였다. 1 ㎕ 반응 샘플을 4 ㎕ 물 및 5 ㎕ 2X 적재 완충제와 혼합하고, 혼합물을 15% TBE-우레아 겔(180 V, 75분) 상에서 분석하였다.

[0733] 임의적 정제 단계를 다음과 같이 수행하였다. 1 ㎕의 제한 엔도뉴클레아제 분해 샘플을 예비정제 샘플로서 보유한다. 나노링크(NanoLink) 비드(솔루링크(Solulink))를 격렬히 볼텍싱하여 재현탁한다. 비드의 5 ㎕ 분취액을 1.5 ml 튜브에 첨가하였다. 핵산 결합 및 세척 완충제 및 NABWB(50 mM 트리스-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% 트윈 20, pH 8.0)를 튜브에 250 ㎕의 최종 부피까지 첨가하고 튜브를 혼합하여 재현탁하였다. 튜브를 자기 스탠드 상에 2분 동안 배치한 후, 상청액을 제거하였다. 튜브를 자석으로부터 제거하고 비드를 180 ㎕ NABWB로 재현탁하였다. 180 ㎕의 재현탁된 비드를 20 ㎕의 제한 엔도뉴클레아제 분해 반응물에 첨가하고, 혼합물을 볼텍싱하였다. 상기 비드가 가라앉지 않도록 혼합물을 플랫폼(platform) 진탕기 상에서 40℃에서 60분 동안 항온처리하였다. 그 다음, 튜브를 2분 동안 자석 상에 배치하고 정제된 생성물을 포함하는 상청액을 새로운 튜브로 옮겼다. 정제된 생성물의 10 ㎕ 샘플을 5 ㎕ 2X 적재 완충제와 혼합하고 15% TBE-우레아 겔(180 V, 75분) 상에서 분석하였다. 큐빗(Qubit) ssDNA 키트를 사용하여 정제된 RCA 생성물의 농도를 측정하였다.

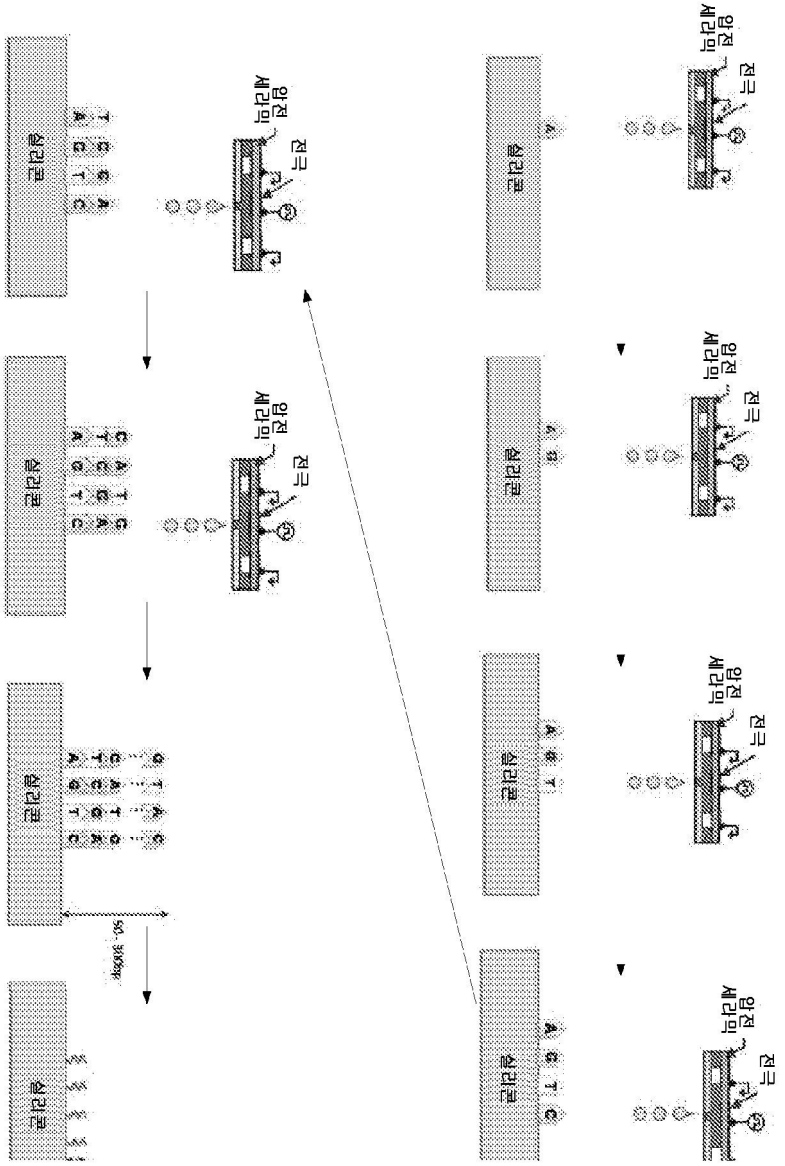
[0734] 대안적 정제. 일부 작업흐름에서, (고성능 액체 크로마토그래피) HPLC를 이용하여 분해된 올리고뉴클레오티드를 정제할 수 있다.

[0735] 도 63은 제한 효소에 의해 절단된 증폭 생성물의 분리를 보여주는데, 이때 각각의 단일 가닥 증폭 생성물은 절단 전에 어댑터 카피 부위에서 증폭 생성물에 상보적인 보조 올리고뉴클레오티드와 혼성화되었다. 상이한 제한 효소 세트들과 함께 자물쇠 프로브 OS_1515, OS_1516, OS_1517, OS_1518 및 OS_1519를 사용하는 단일 가닥 핵산 증폭에 대한 데이터도 제시되어 있다.

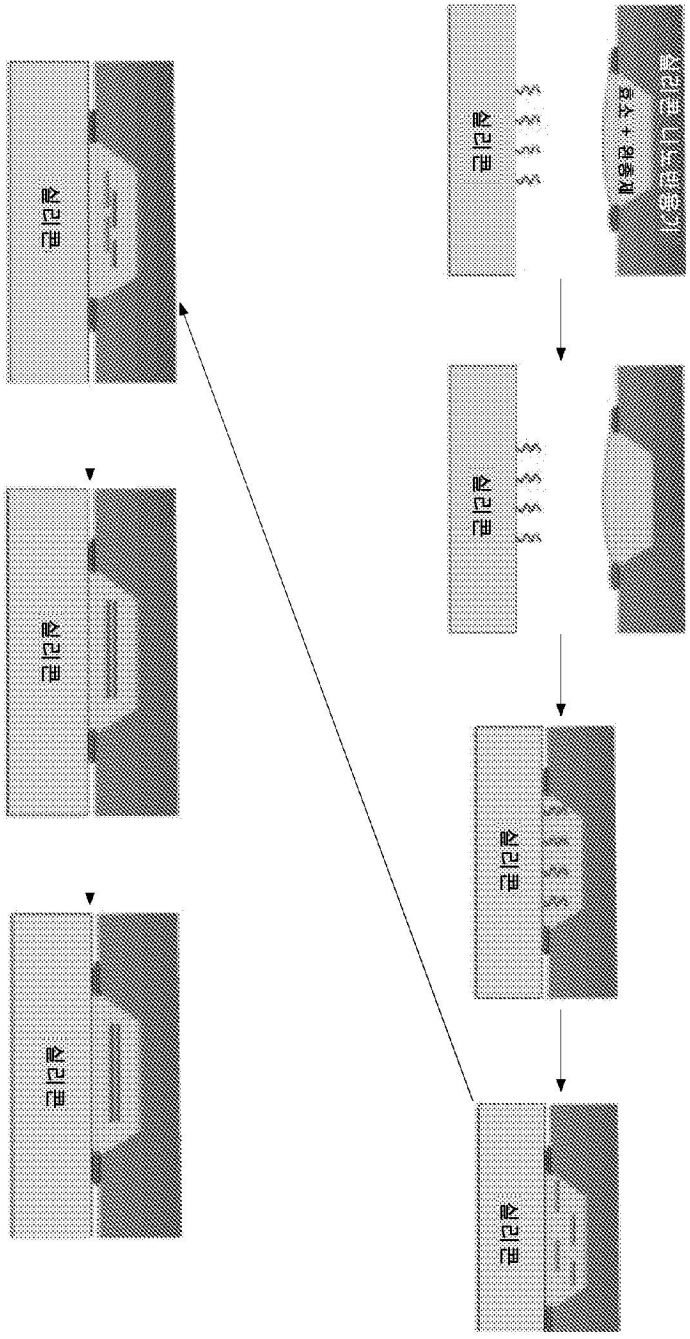
[0736] 본 발명의 바람직한 실시양태들이 본원에 제시되어 있고 기재되어 있지만, 이러한 실시양태들이 단지 예로서 제공된다는 것이 당업자에게 자명할 것이다. 본 발명을 벗어나지 않으면서 다수의 변경, 변화 및 치환이 당업자에게 인식될 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태들에 대한 다양한 대안들이 본 발명을 실시하는 데에 사용될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 하기 청구범위는 본 발명의 범위를 정의하고 이 청구범위 내의 방법들 및 구조물들, 및 이들의 등가물은 이에 의해 커버된다.

도면

도면1a


실리콘
실리콘
실리콘

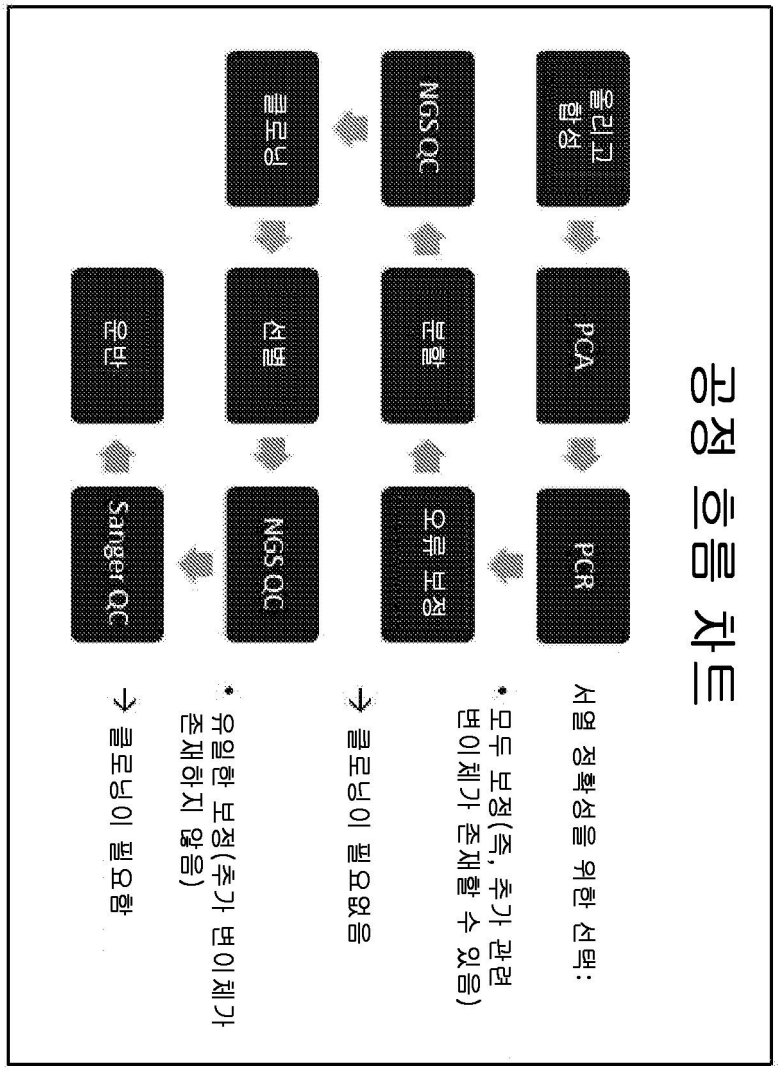
도면1b



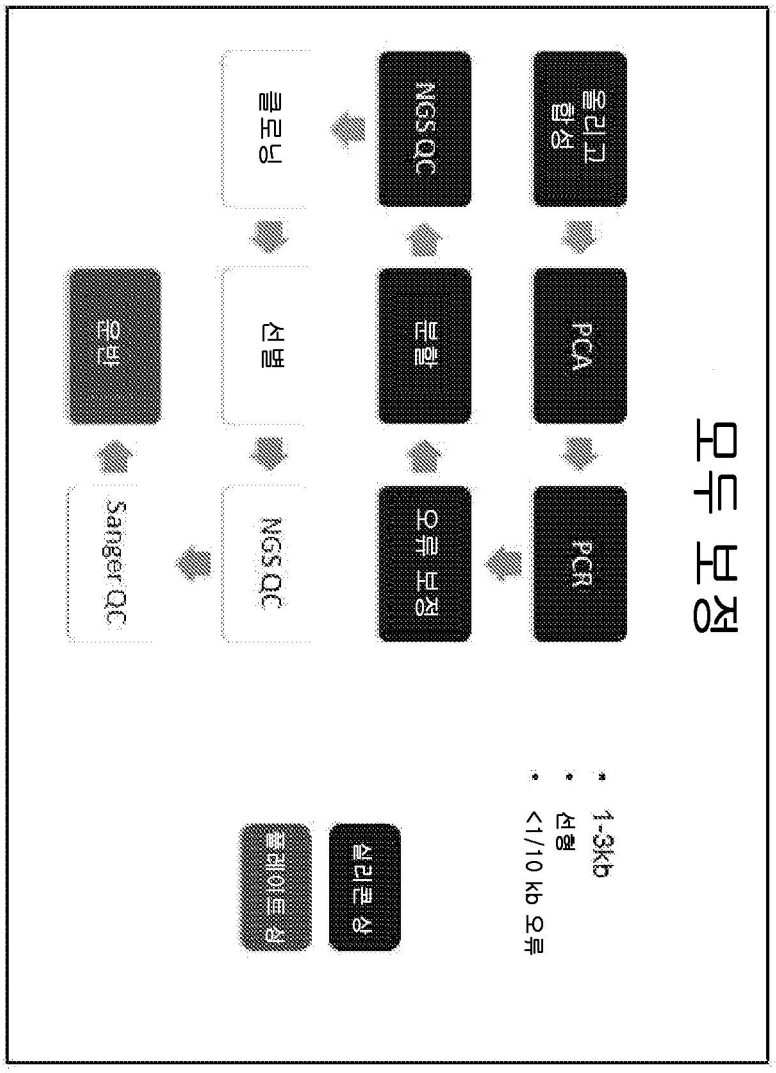
도면1c

유전자 프린팅 및 나노반응기 기술
* 잉크젯 DNA 프린팅
* 고 처리율
* 낮은 오류율
* Si 나노반응기 유전자 조립
* 정확한 조절(제어)
* 적은 시약 사용
실리콘
잉크젯 프린트헤드
실리콘 나노반응기
합성
유전자 조립 시약의 첨가
온도 순환
나노반응기의 밀봉
2 킬로염기 유전자

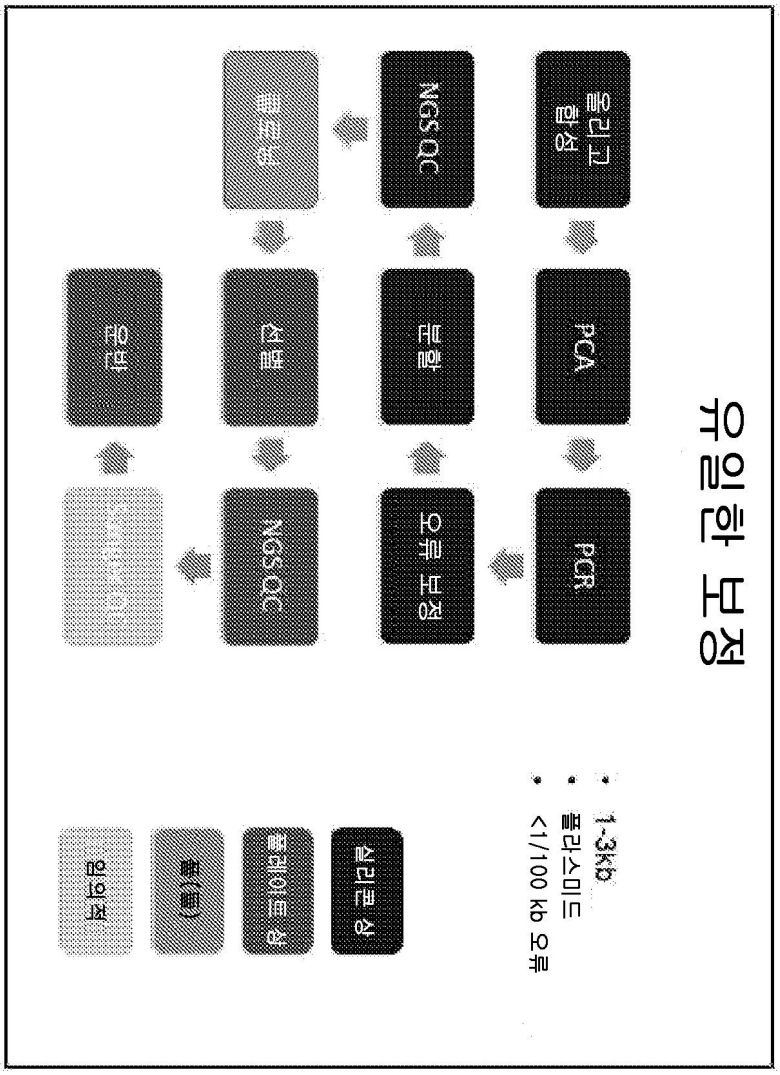
도면2a


공정 흐름 차트
올리고 합성
PCA
PCR
서열 정확성을 위한 선택:
• 모두 보정(즉, 추가 관련 변이체가 존재할 수 있음)
오류 보정
클로닝이 필요없음
NGS QC
분할
PCA
NGS QC
• 유일한 보정(추가 변이체가 존재하지 않음)
클로닝
선별
NGS QC
클로닝이 필요함
출하
Sanger QC

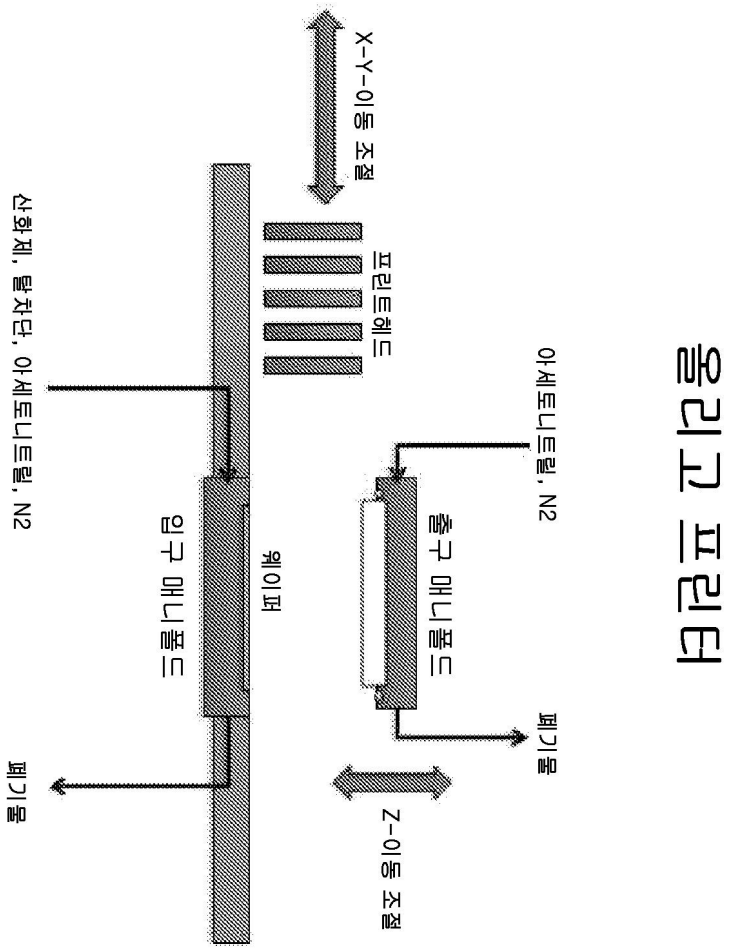
도면2b


올리고 합성
PCA
PCR
오류 교정
농축
NGS QC
클로닝
서열
NGS QC
Sanger QC
합성
유전자 조합
올리고 풀
* 1-3kb
* 선형
* <1/10 kb 오류

도면2c

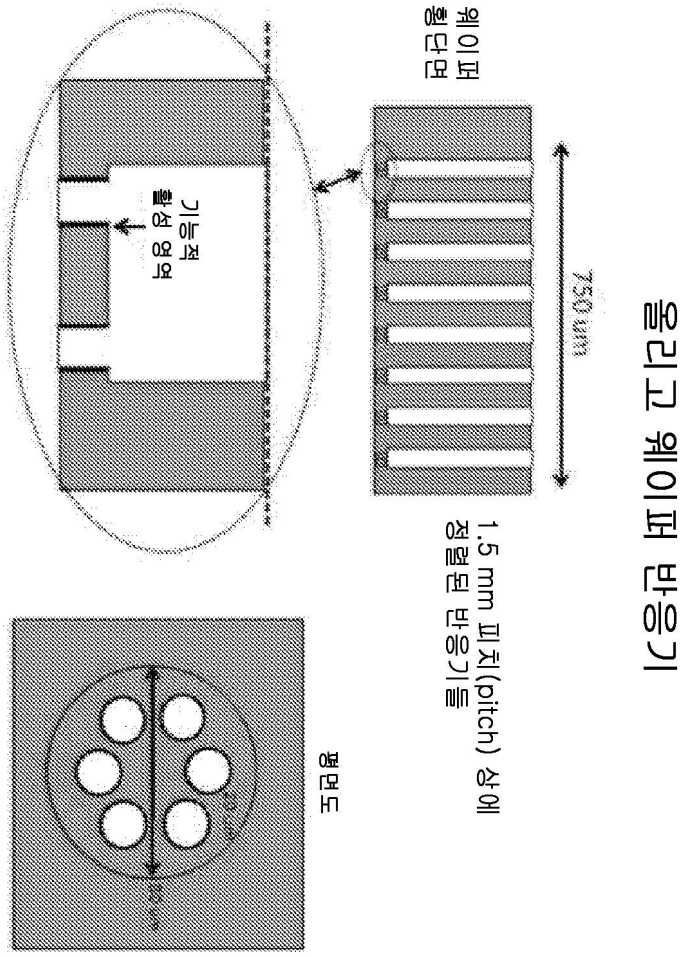

유일한 보정
올리고 합성
PCA
PCR
오류 보정
분할
NGS QC
클로닝
선별
NGS QC
유전자 조립
유전자
• 1-3kb
• 플라스미드
• <1/100 kb 오류
실리콘 상
플레이트 상
튜브(들)
입자체

도면3


X-Y-이동 조절
프린트헤드
산화제, 탈착단, 아세토니트릴, N2
입구 매니폴드
웨이퍼
아세토니트릴, N2
출구 매니폴드
폐기물
폐기물
Z-이동 조절

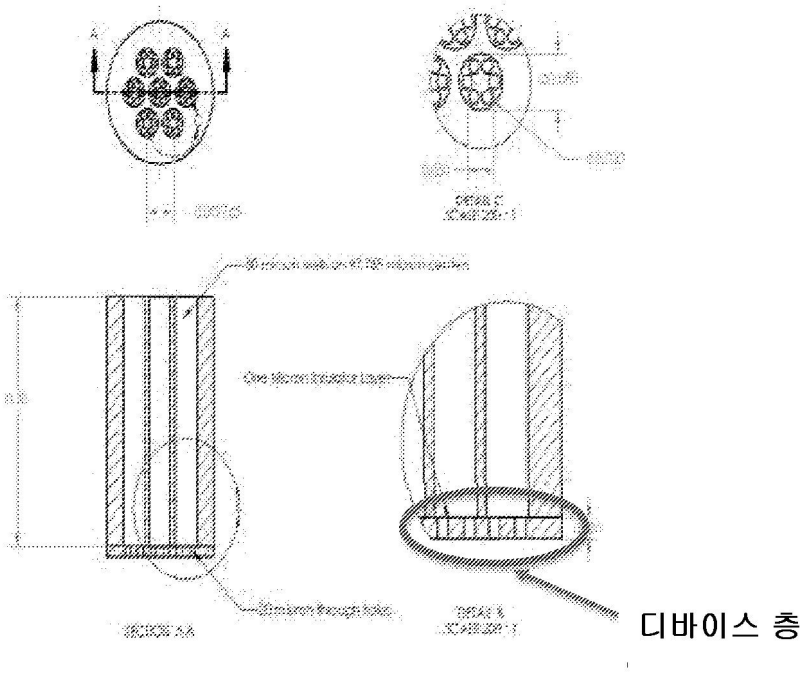
클리닝 프리터

도면4

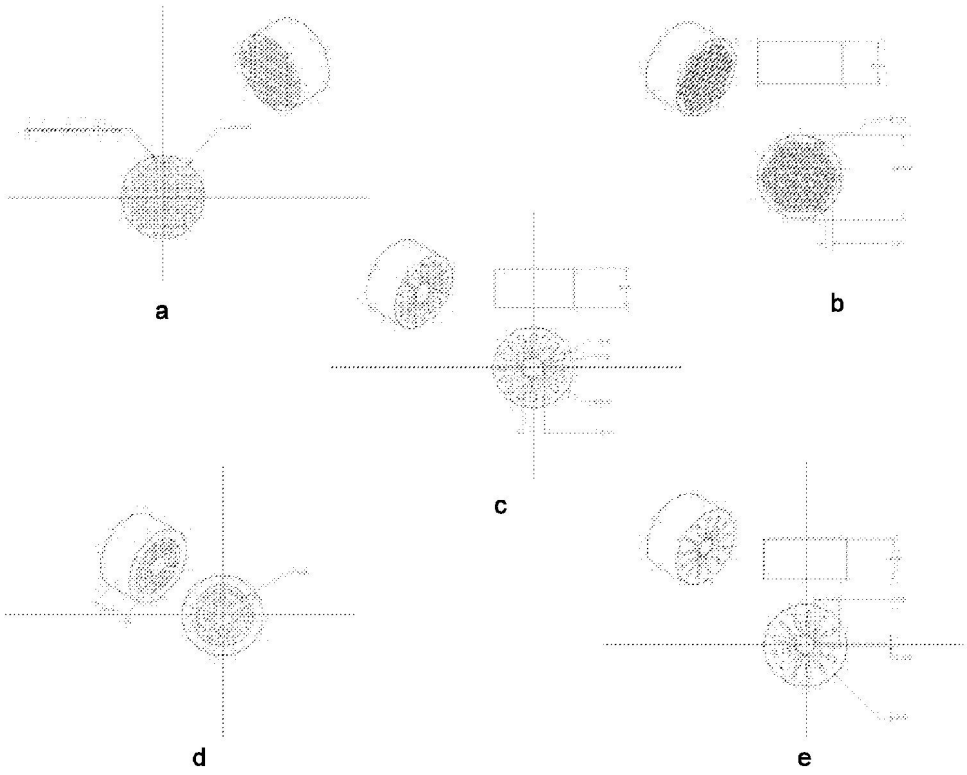

올리고 웨이퍼 반응기
웨이퍼 횡단면
750 um
1.5 mm 피치(pitch) 상에 정렬된 반응기들
기능적 활성 영역
평면도

도면5

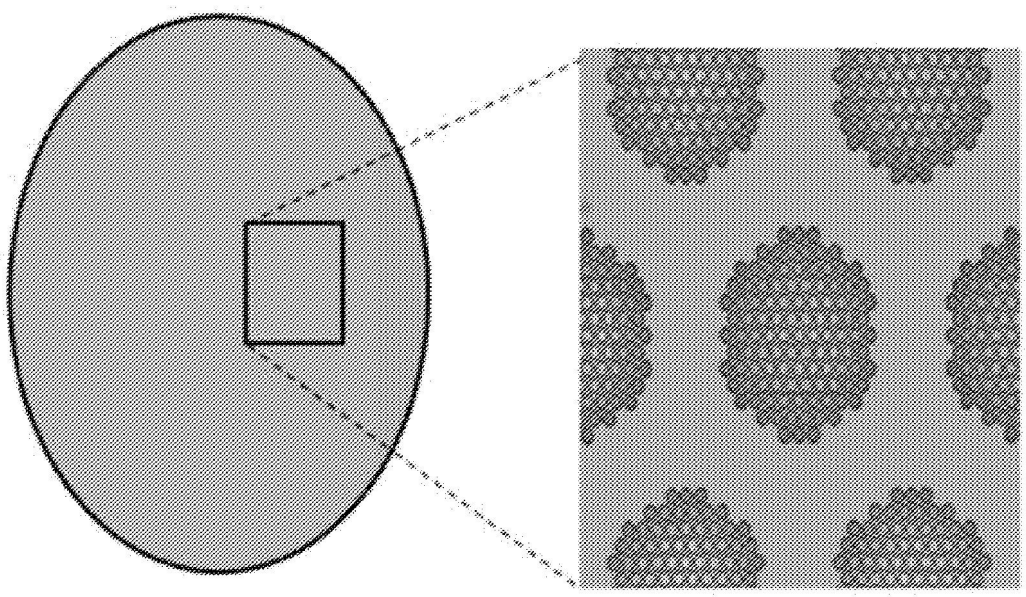
도면6a



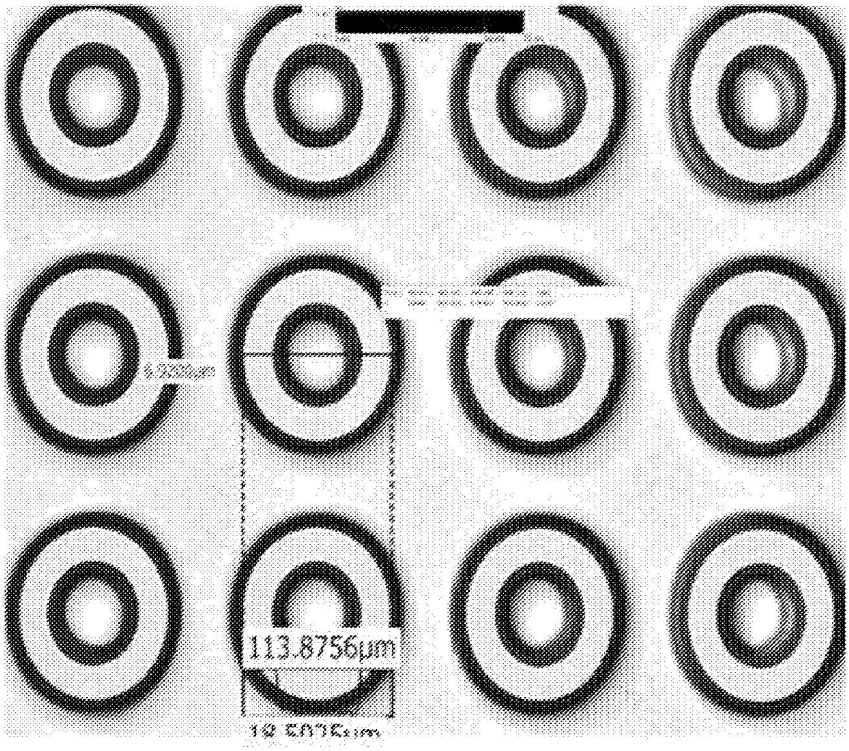
도면6b



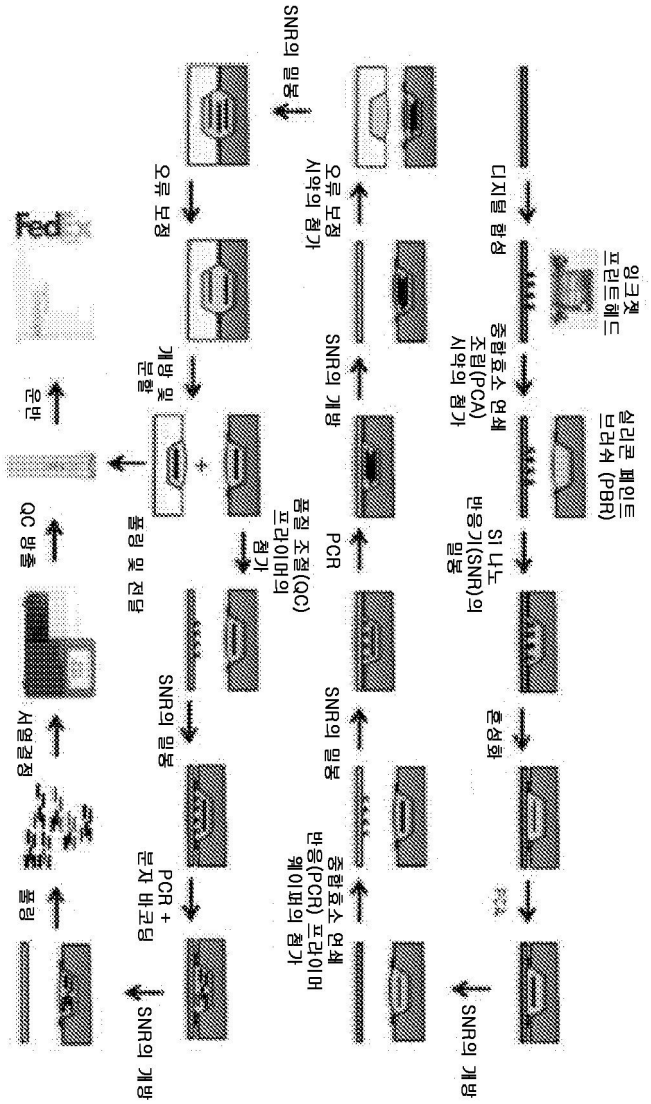
도면6c



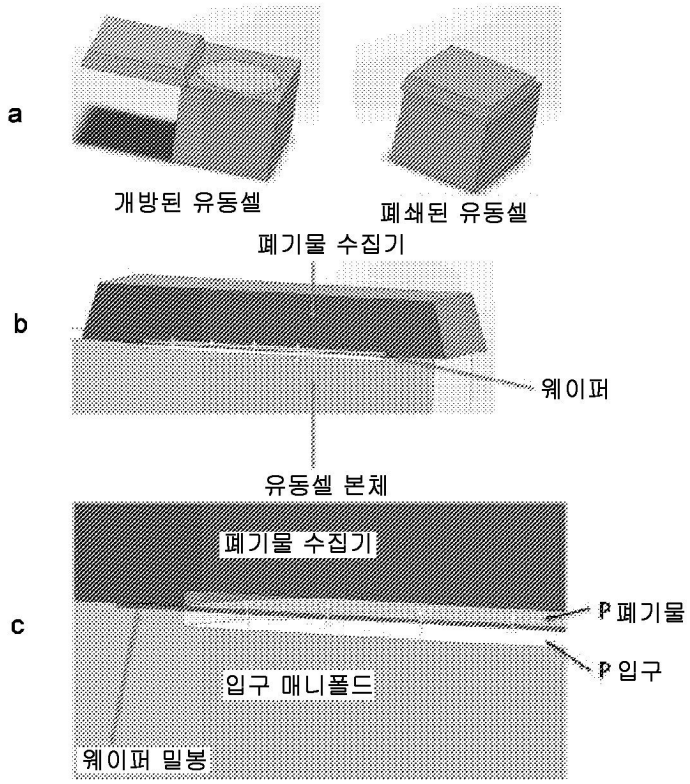
도면7



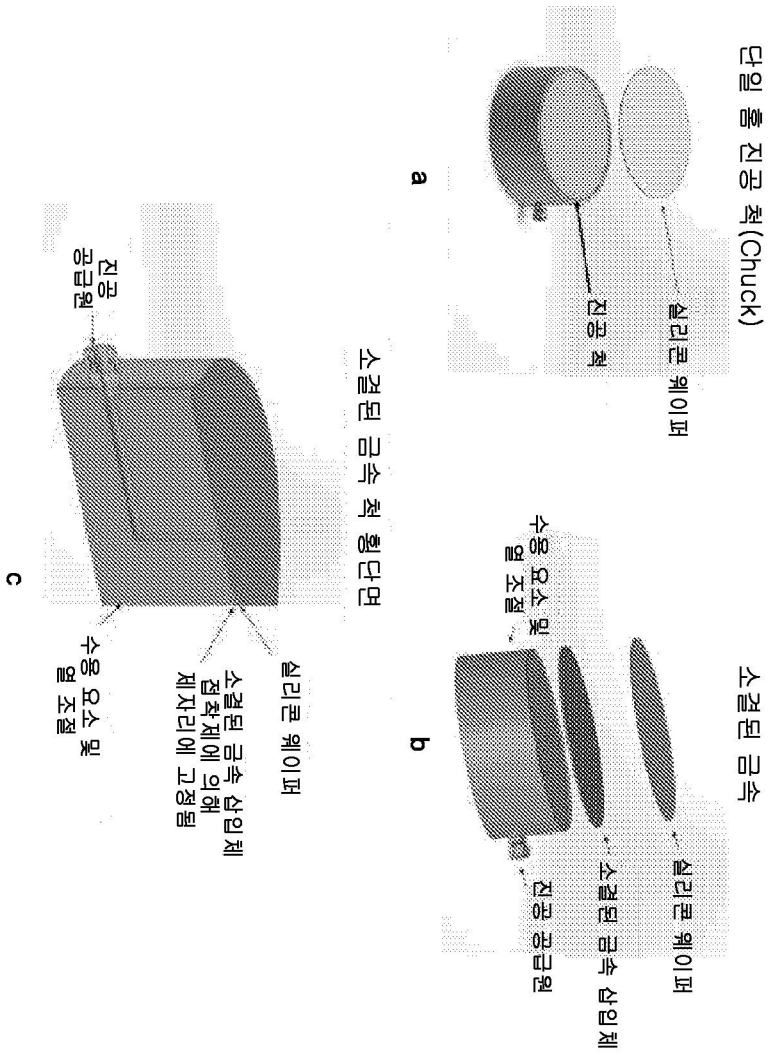
도면8


고정 자원 흐름
SNR의 개량
PCR + 글자 바코딩
서열결정
SNR의 밀봉
QC 통과
오류 보정
SNR의 개량
PCR
프로필 조절(QC) 프라이머의 절개
SNR의 밀봉
중합효소 연쇄 반응(PCR) 프라이머 웨이퍼의 절개
오류 보정 시약의 절개
SNR의 개량
SI 나노 볼 반응기(SNR)의 로딩
중합효소 연쇄 조립(PCA) 시약의 절개
디지털 합성
실리콘 웨이퍼 드러서 (PBR)
잉크젯 프린트헤드

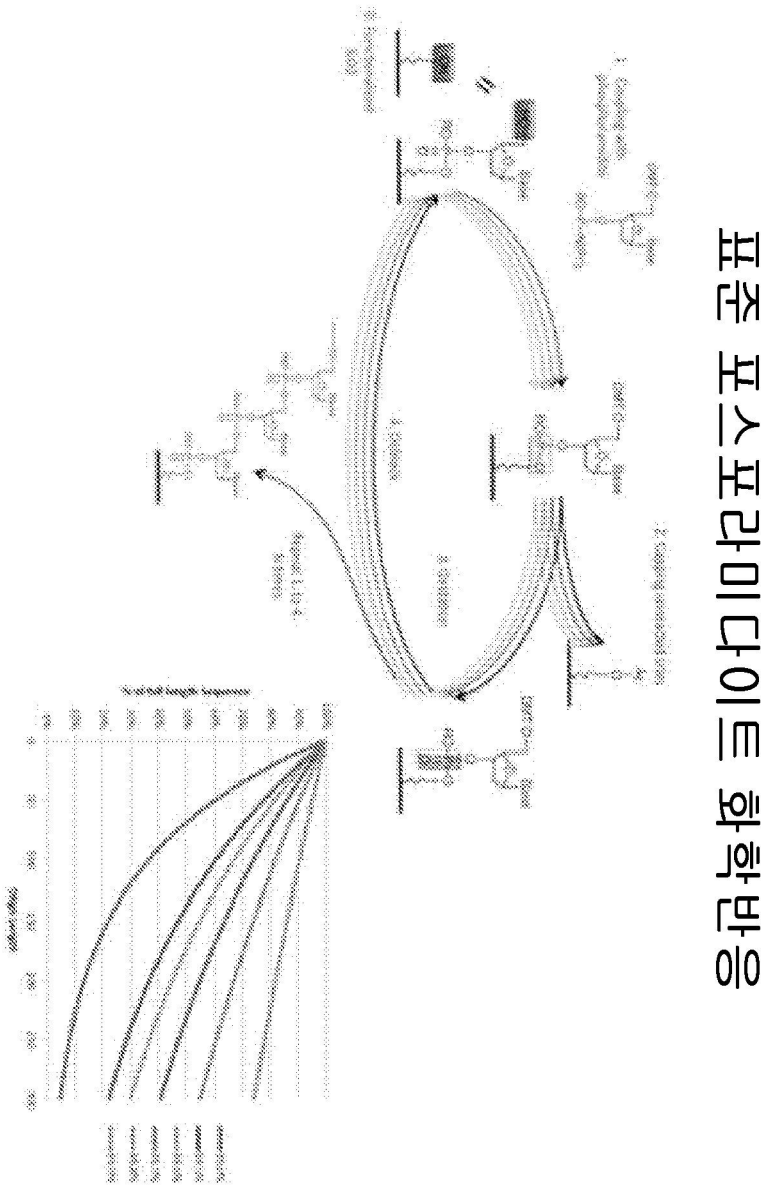
도면9


a
개방된 유동셀
폐쇄된 유동셀
폐기물 수집기
b
웨이퍼
유동셀 본체
폐기물 수집기
c
폐기물
입구
입구 매니폴드
웨이퍼 밀봉

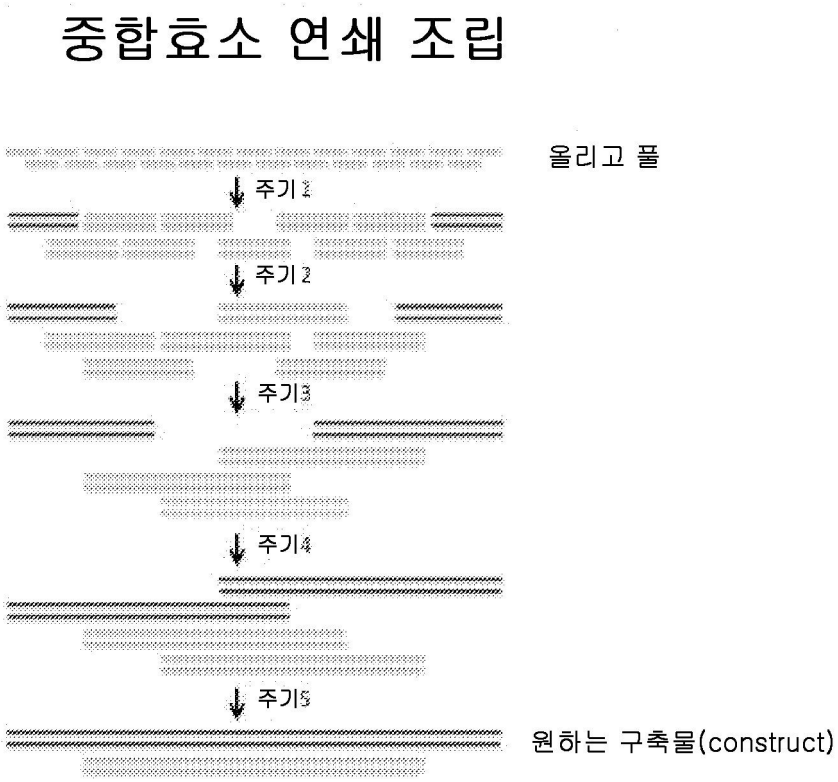
도면10


a
단일 홀 진공 척(Chuck)
실리콘 웨이퍼
진공 척
b
소결된 금속
실리콘 웨이퍼
소결된 금속 삽입체
진공 유입원
수용 요소 및
열 조절
c
소결된 금속 척 횡단면
진공
유입원
수용 요소 및
열 조절
소결된 금속 삽입체
접착제에 의해
제자리에 고정됨
실리콘 웨이퍼

도면11



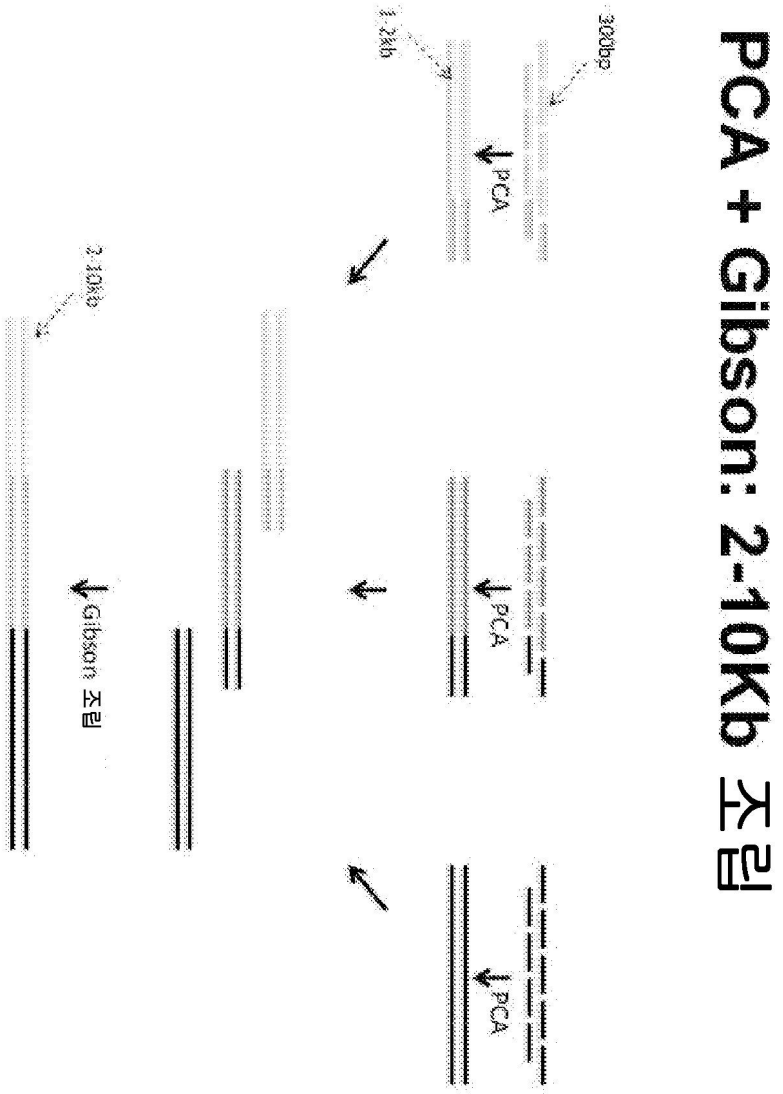
도면12



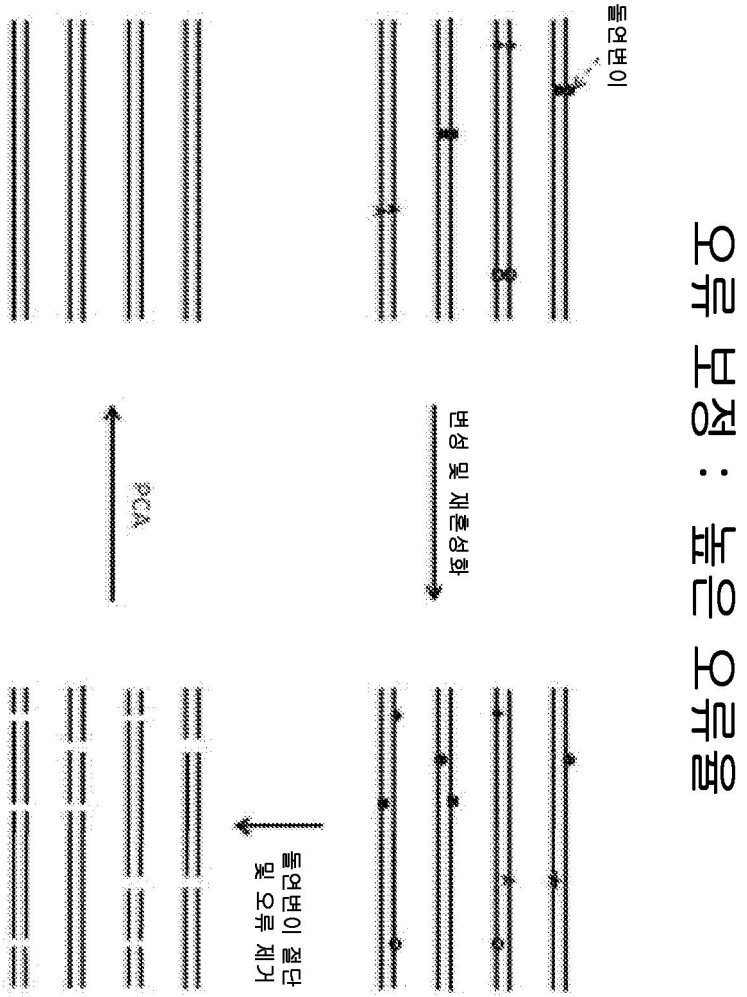
도면13

긴 올리고의 이점
짧은 올리고 (50bp)
상동성 또는 높은 GC
합성 및 혼성화
부정확한 혼성화
조립
부정확한 구축물
긴 올리고 (300bp)
상동성 또는 높은 GC
합성 및 혼성화
가능한 부정확한 혼성화 없음
조립
완벽한 구축물

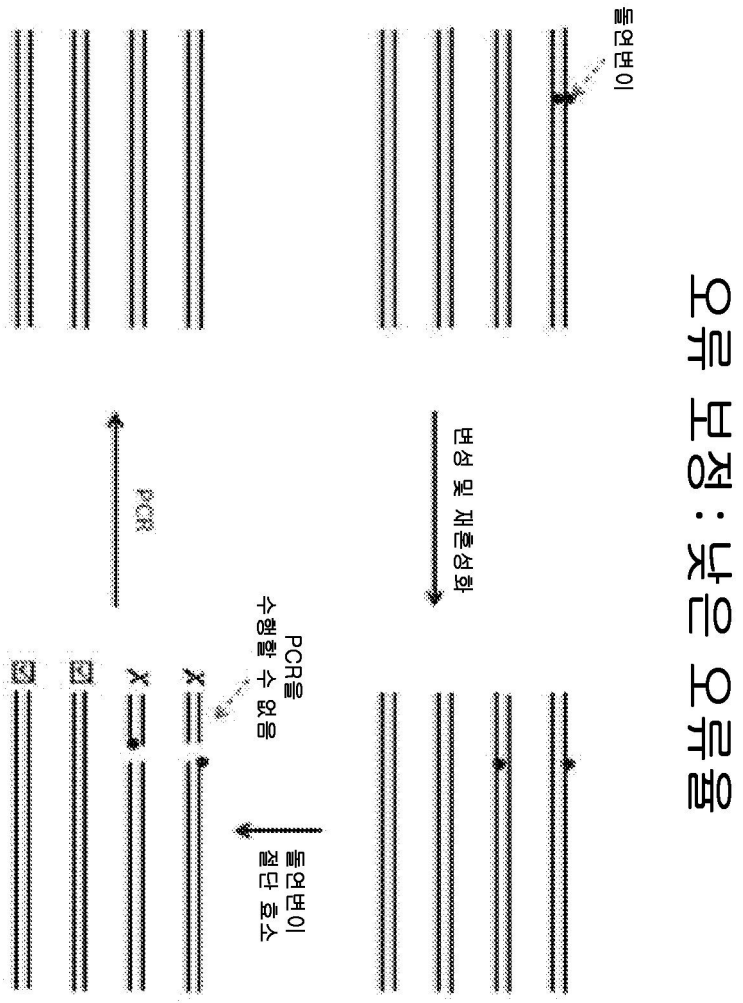
도면14



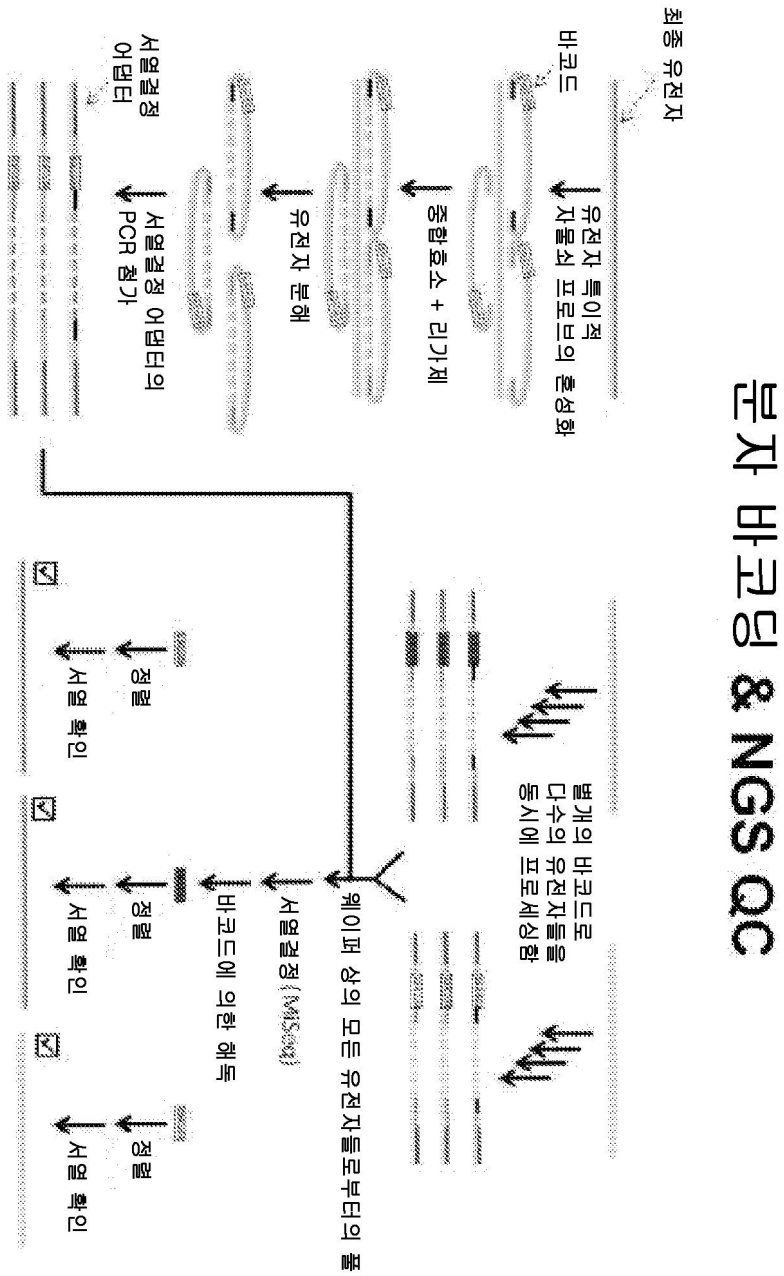
도면15



도면16

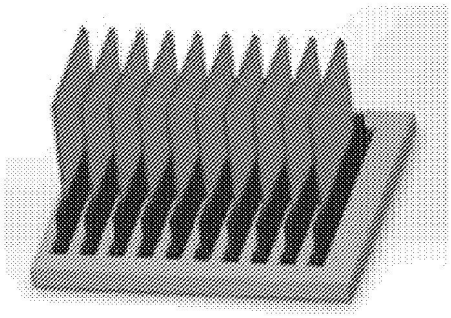


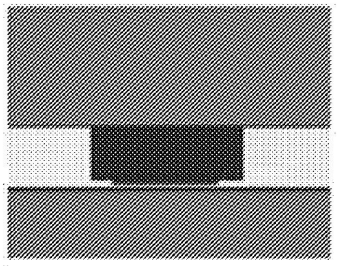
도면17


분자 바코딩 & NGS QC
최종 유전자
바코드
유전자 특이적
자물쇠 프로브의 혼성화
중합효소 + 리가제
유전자 분해
서열결정 어댑터
서열결정 어댑터의
PCR 첨가
별개의 바코드로
다수의 유전자들을
동시에 프로세싱함
웨이퍼 상의 모든 유전자들로부터의 풀
서열결정 (MiSeq)
바코드에 의한 해독
정렬
서열 확인
정렬
서열 확인
정렬
서열 확인

도면18

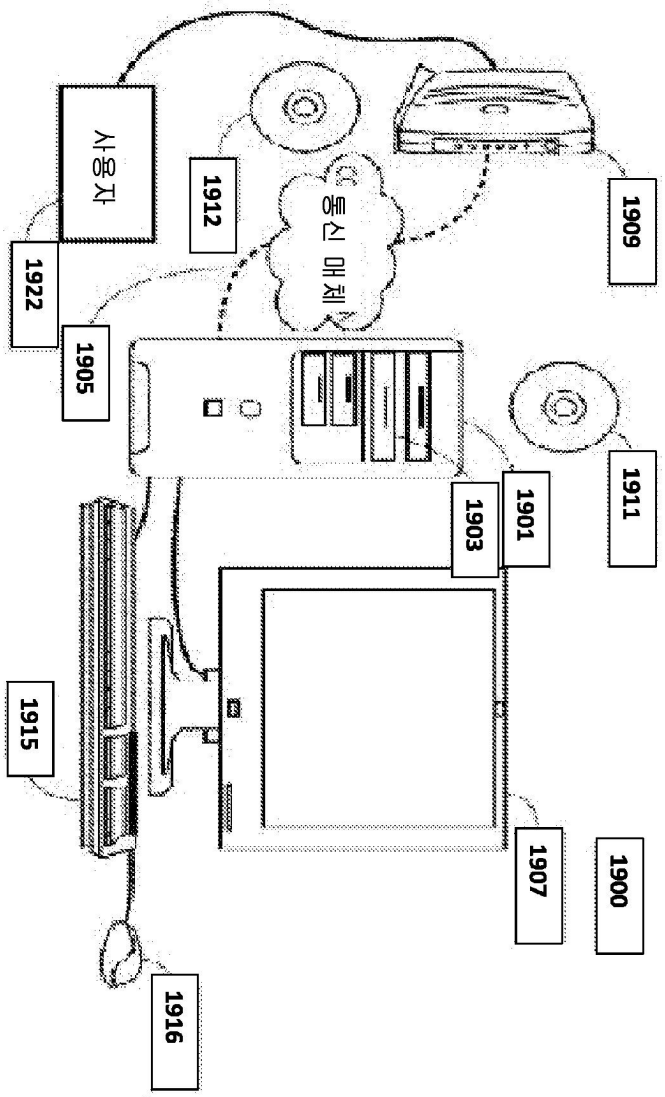
잉크젯 조립



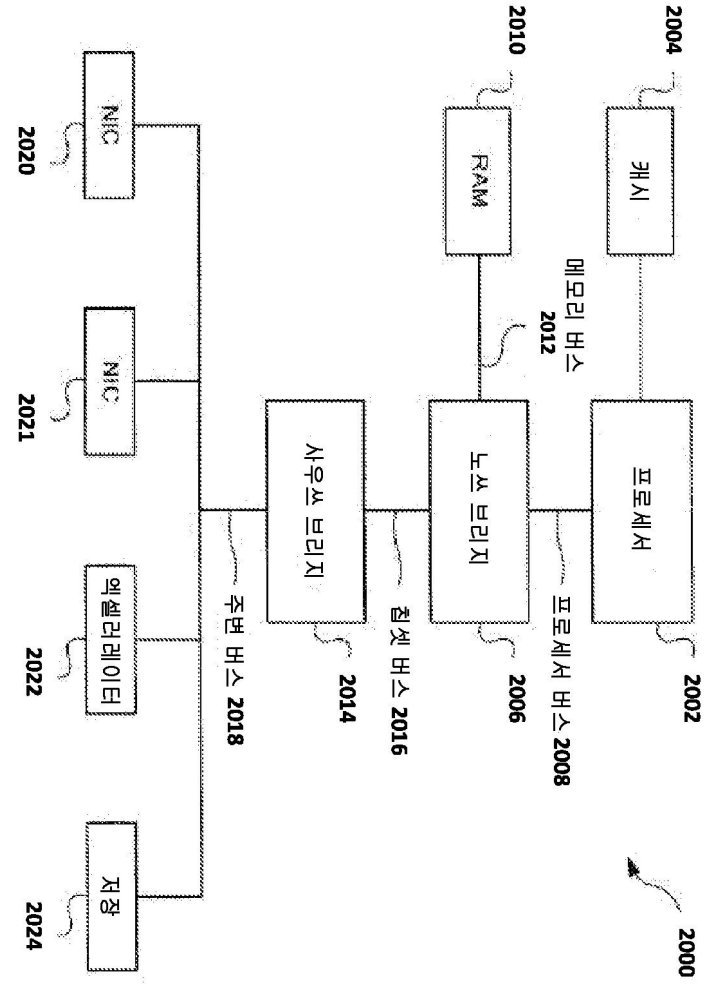


- 10개 헤드의 잉크젯 조립
- 잉크젯 헤드는 254 ㎛ 중심 상에서 256개의 노즐들을 가진 실리콘 오리피스 플레이트를 가진다.
- 100 마이크론 비행 높이
- 각각의 헤드는 횡단하는 각각의 웰에 접근할 필요가 있다.

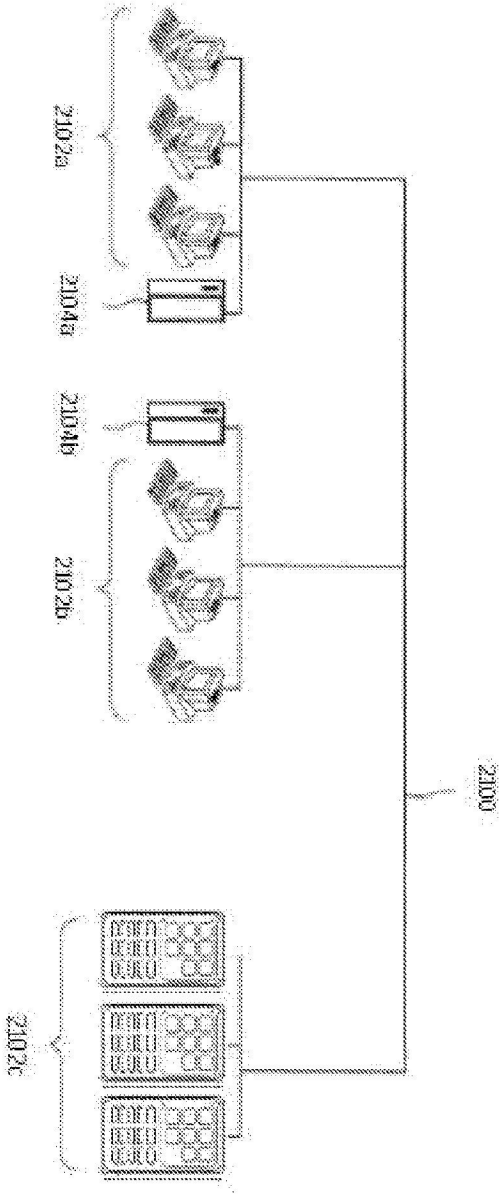
도면19


사용자
1922
1912
통신 매체
1909
1905
1911
1903
1901
1915
1907
1900
1916

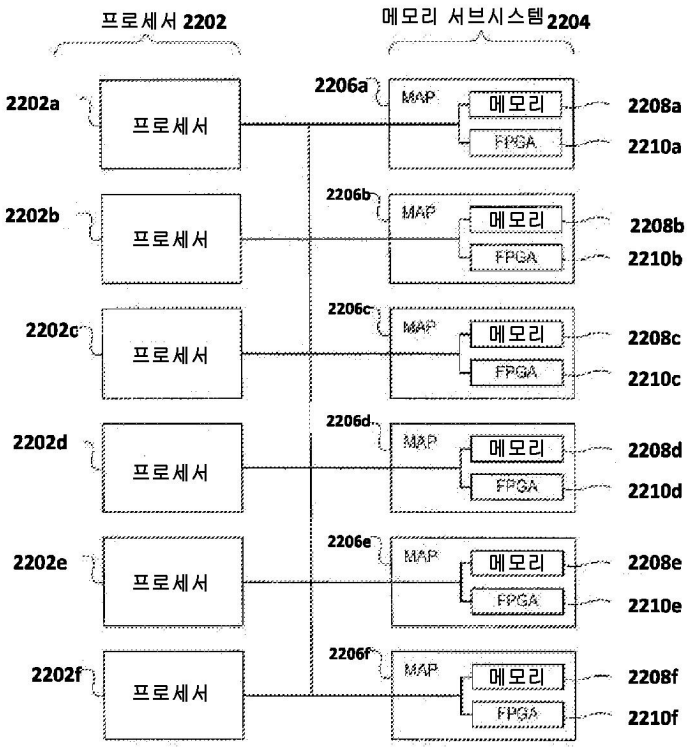
도면20


2004
캐시
2010
RAM
메모리 버스
2012
2020
NIC
2021
NIC
2022
엑셀러레이터
2024
저장
사우스 브리지
주변 버스 2018
2014
칩셋 버스 2016
노스 브리지
2006
프로세서 버스 2008
프로세서
2002
2000

도면21



도면22


프로세서 2202
메모리 서브시스템 2204
2202a
프로세서
2206a
MAP
메모리
FPGA
2208a
2210a
2202b
프로세서
2206b
MAP
메모리
FPGA
2208b
2210b
2202c
프로세서
2206c
MAP
메모리
FPGA
2208c
2210c
2202d
프로세서
2206d
MAP
메모리
FPGA
2208d
2210d
2202e
프로세서
2206e
MAP
메모리
FPGA
2208e
2210e
2202f
프로세서
2206f
MAP
메모리
FPGA
2208f
2210f

도면23

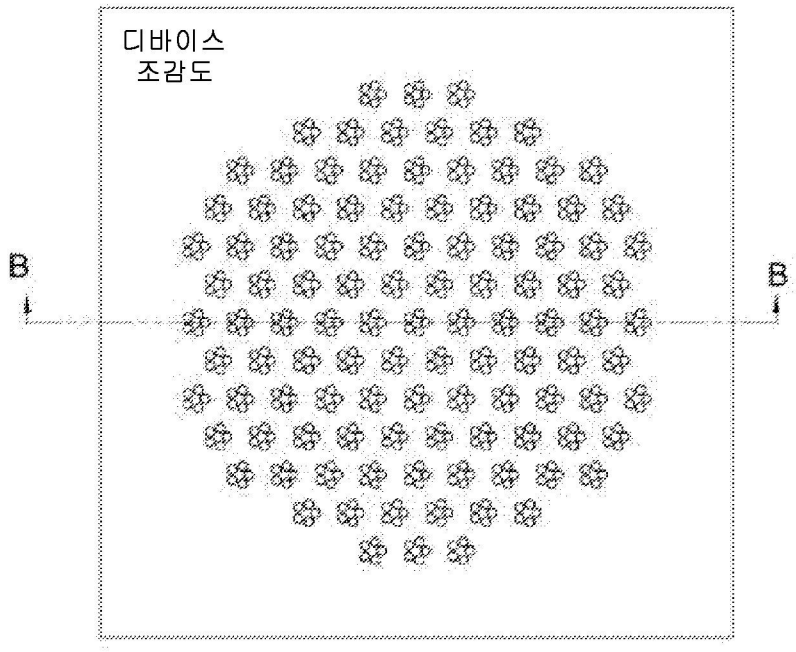
프론트-엔드 프로세싱

1. 산화물을 가진 SOI 기판
2. 핸들-측(side) 포토리쏘그래피
3. 핸들-측 깊은 RIE
4. 포토레지스트 스트립
5. 디바이스-측 포토리쏘그래피
6. 디바이스-측 깊은 RIE
7. 포토레지스트 & 산화물 스트립
8. 산화물 성장

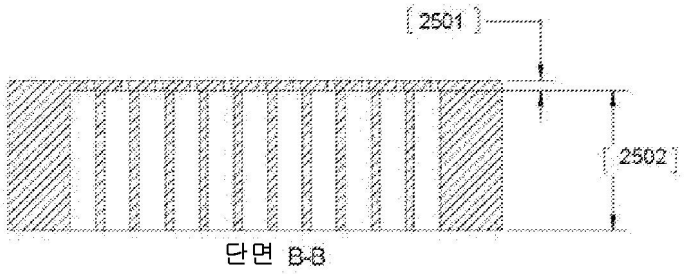
도면24

백-엔드 프로세싱
1. 프론트-엔드 프로세싱 결과
2. 잉크젯 포토레지스트
3. 산소 플라스마 식각
4. 수동 작용화(functionalization)
5. 포토레지스트 스트립
6. 능동 작용화

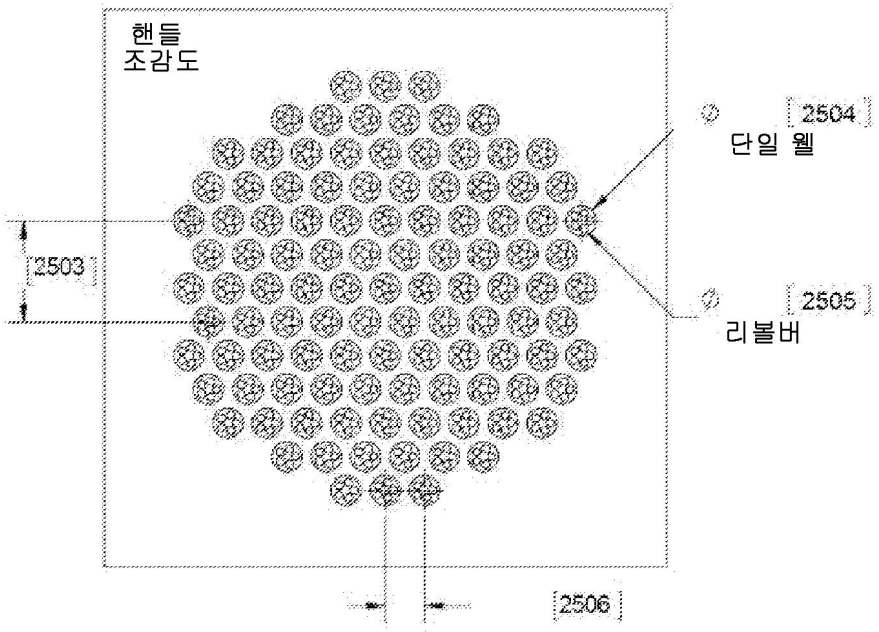
도면25a



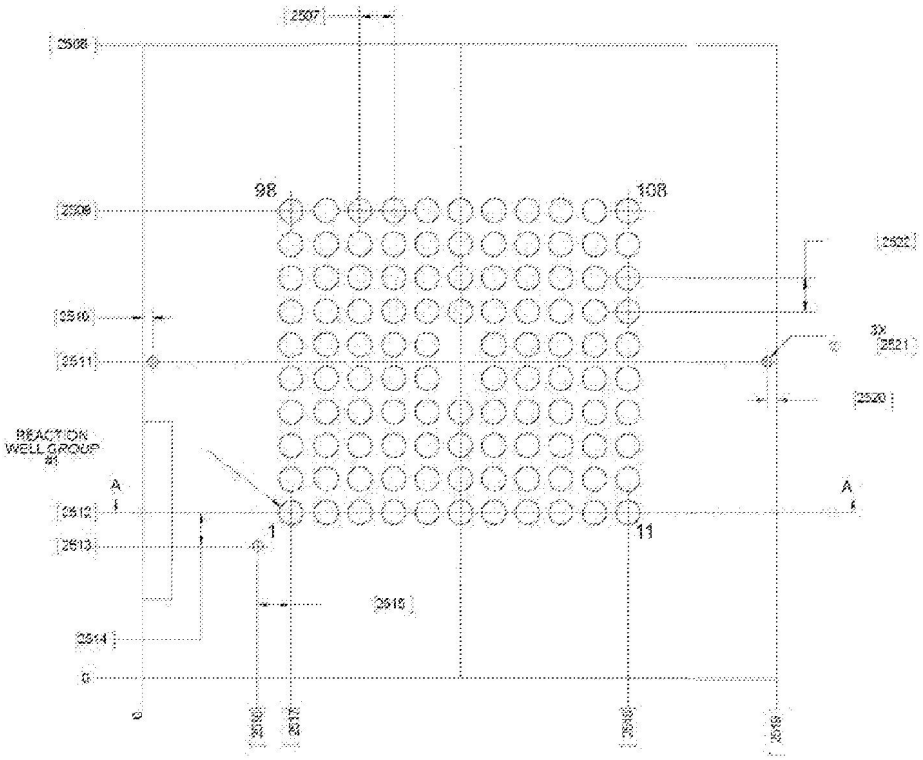
도면25b



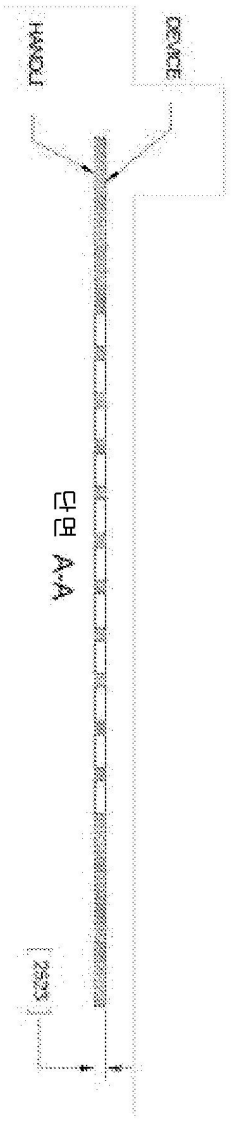
도면25c


핸들
조감도
2504
단일 웰
2503
2505
리볼버
2506

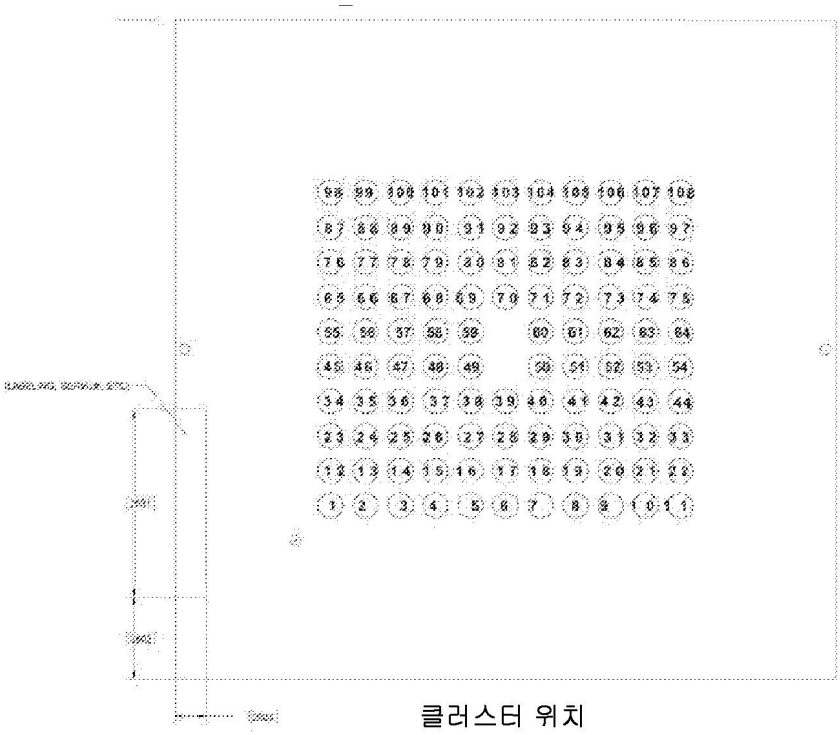
도면25d


2507
2508
98
108
2509
2522
2510
2521
2511
2520
REACTION WELL GROUP #1
A
A
2512
1
11
2513
2518
2514
2515
2516
2517
2519

도면25e



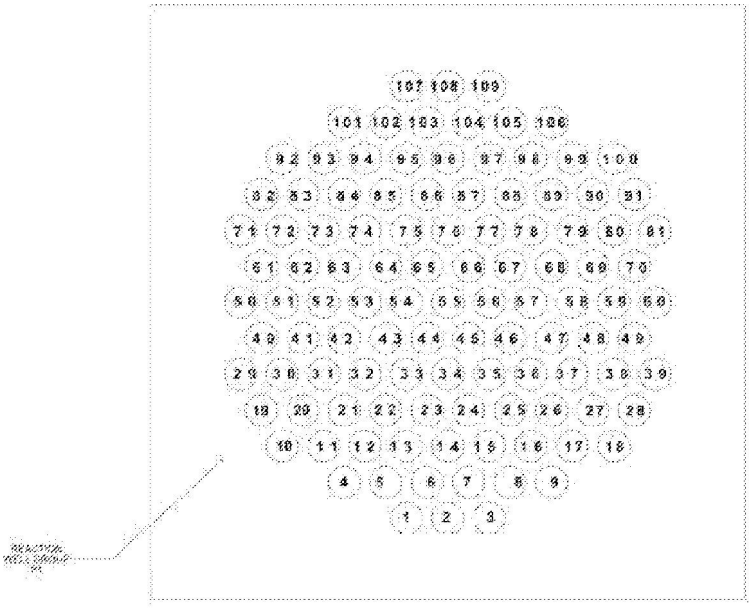
도면25f



클러스터 위치

(디바이스 조감도)

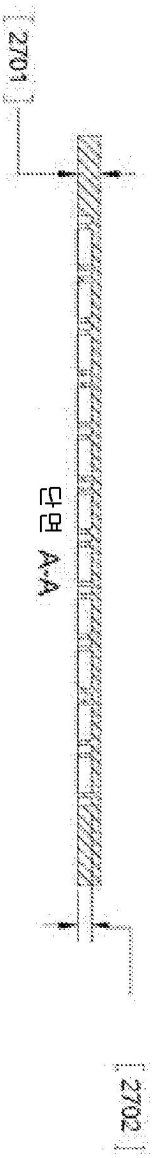
도면25g



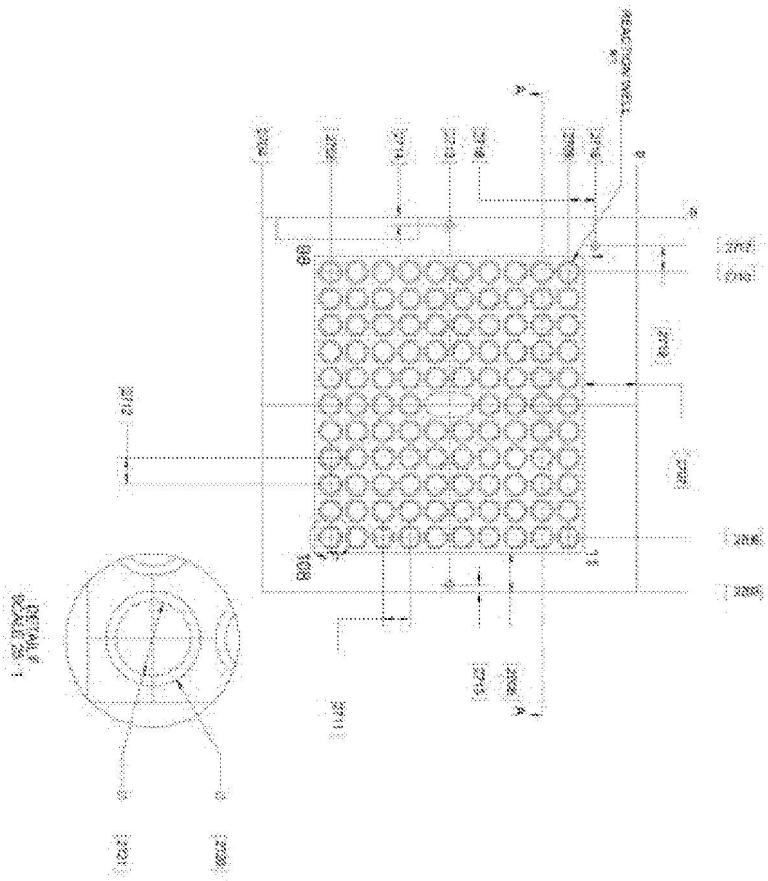
개별 클러스터 내의 웰 위치

(디바이스 조감도)

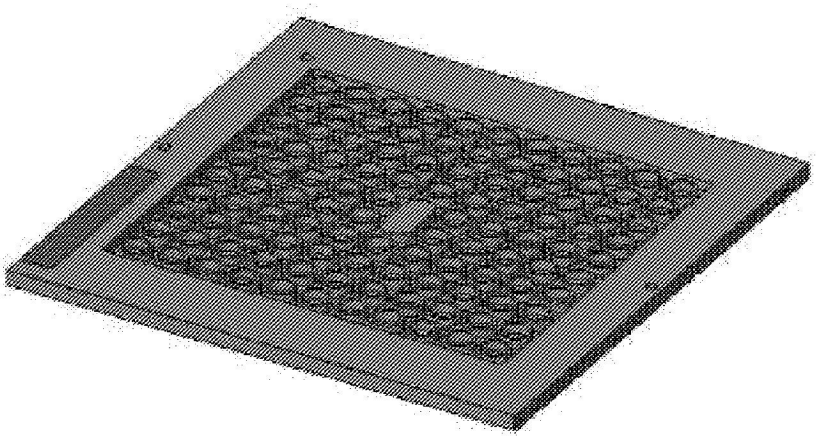
도면26a



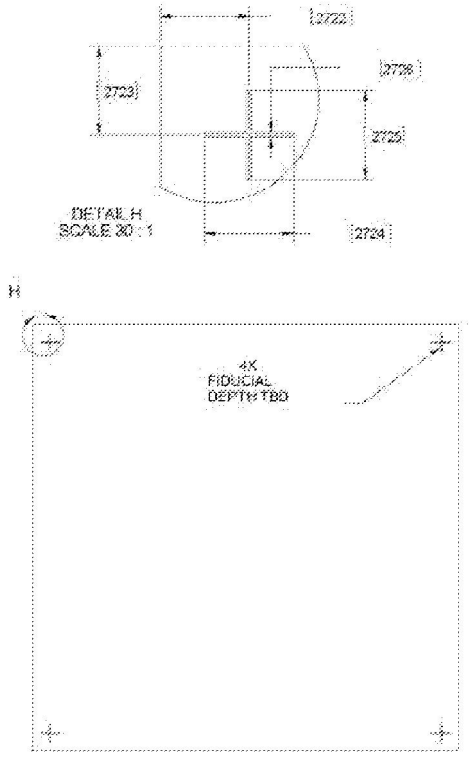
도면26b



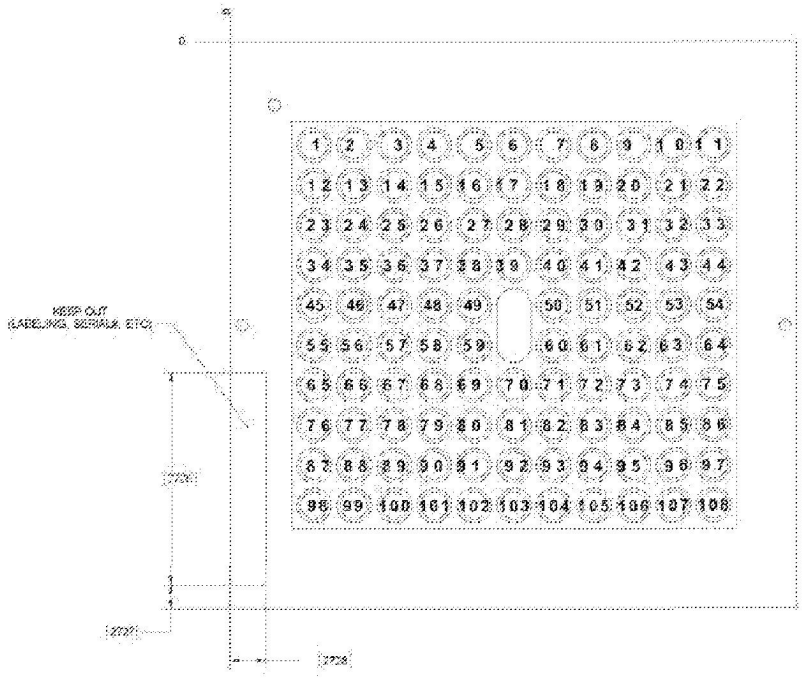
도면26c



도면26d

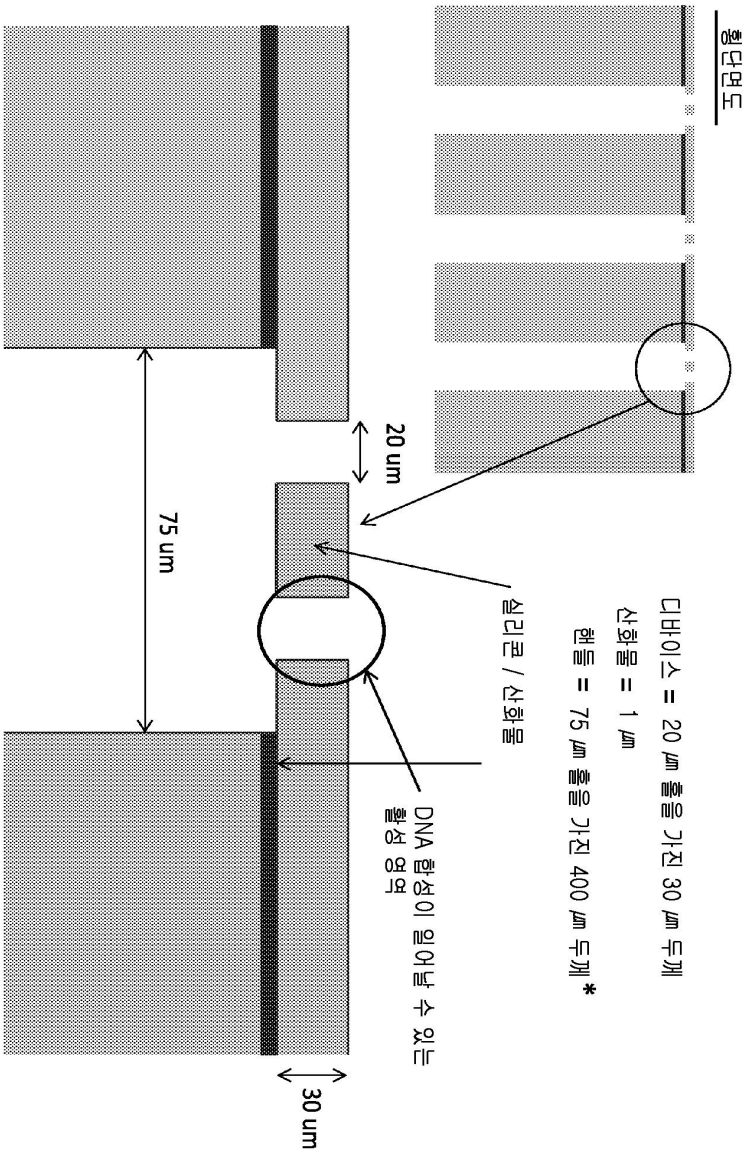


도면26e

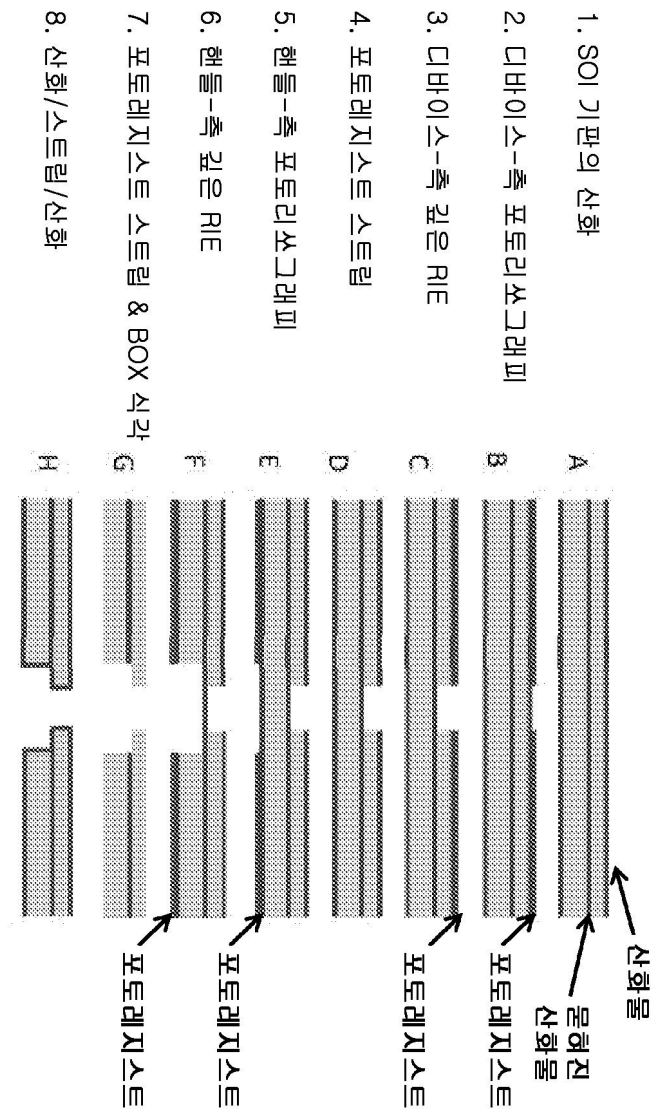


반응 웰 위치

도면27


횡단면도
20 um
75 um
실리콘 / 산화물
DNA 합성이 일어날 수 있는
활성 영역
30 um
디바이스 = 20 ㎛ 홀을 가진 30 ㎛ 두께
산화물 = 1 ㎛
웰들 = 75 ㎛ 홀을 가진 400 ㎛ 두께*

도면28


1. SOI 기판의 산화
2. 디바이스-측 포토리쏘그래피
3. 디바이스-측 깊은 RIE
4. 포토레지스트 스트립
5. 핸들-측 포토리쏘그래피
6. 핸들-측 깊은 RIE
7. 포토레지스트 스트립 & BOX 식각
8. 산화/스트립/산화
A
B
C
D
E
F
G
H
산화물
물려진 산화물
포토레지스트
포토레지스트
포토레지스트

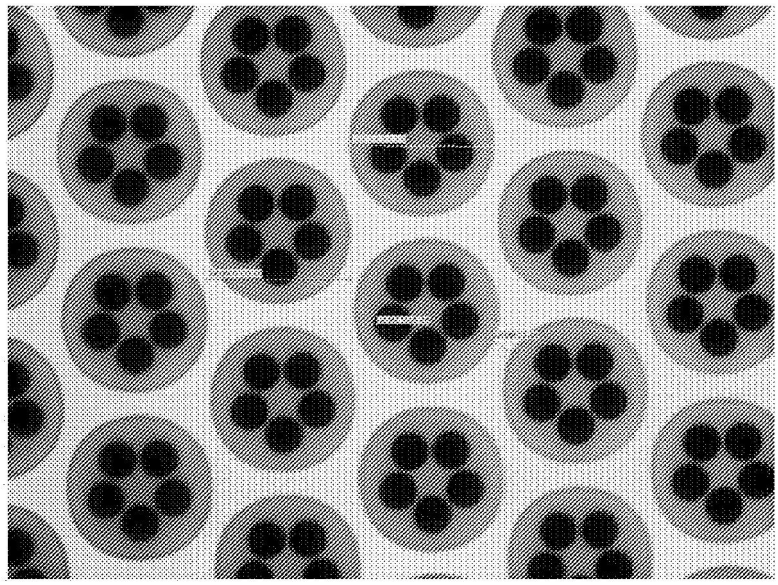
도면29

1. 칩 세정(피라나 + O_2 플라스마)
2. 포토레지스트를 사용한 코팅
3. 포토리쏘그래피 + 디스컴(descum)
4. 에칭 들면, 플루오로실란 CVD를 이용한 작용화
5. 레지스트 스트립
6. 능동 작용화
A
B
C
D
E
F
포토레지스트
포토레지스트
실란화된 표면
에칭 들면, 수동 작용화
실란화된 표면
에칭 들면, 능동 작용화

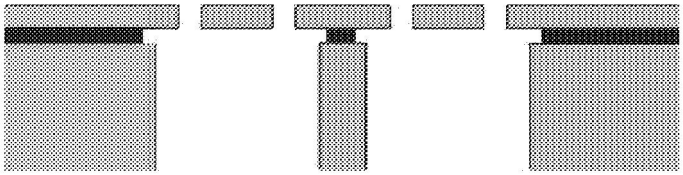
도면30

도면31

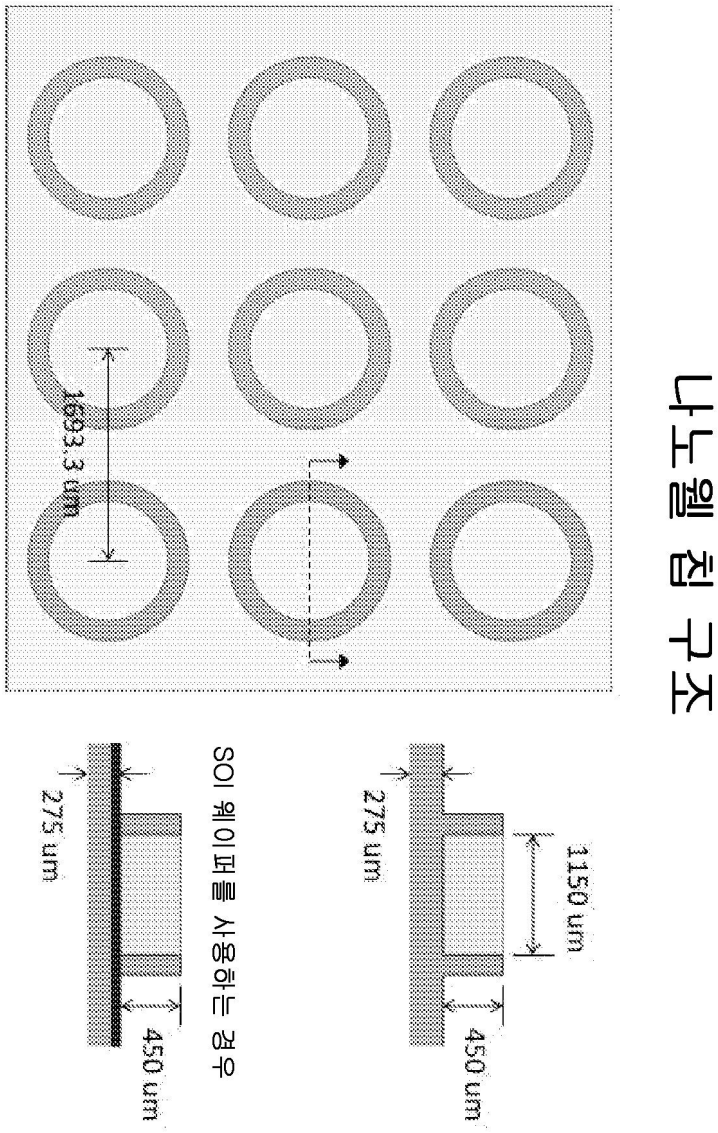
A



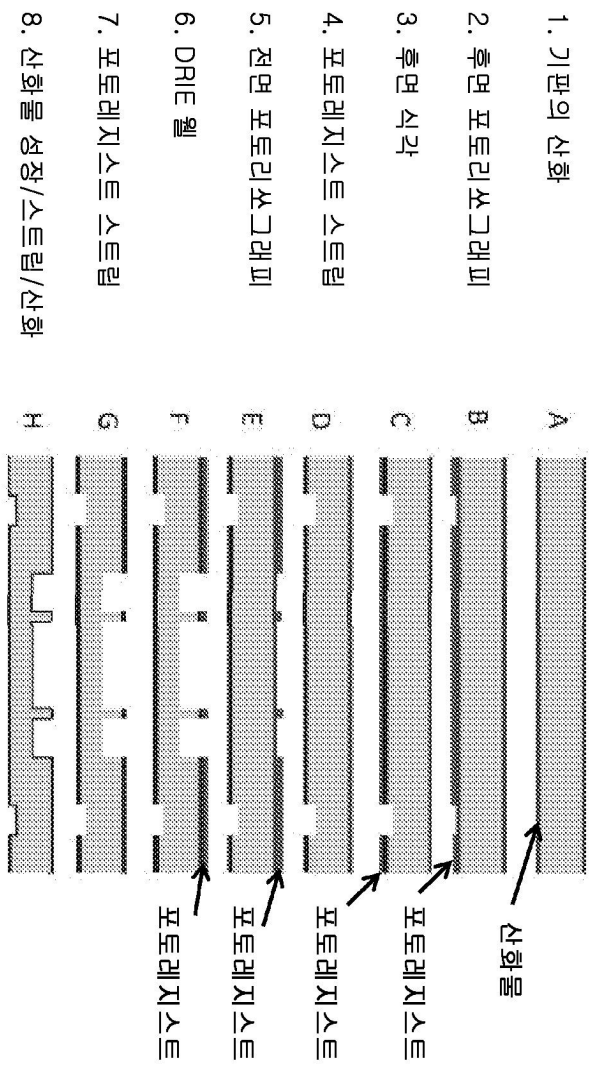
B



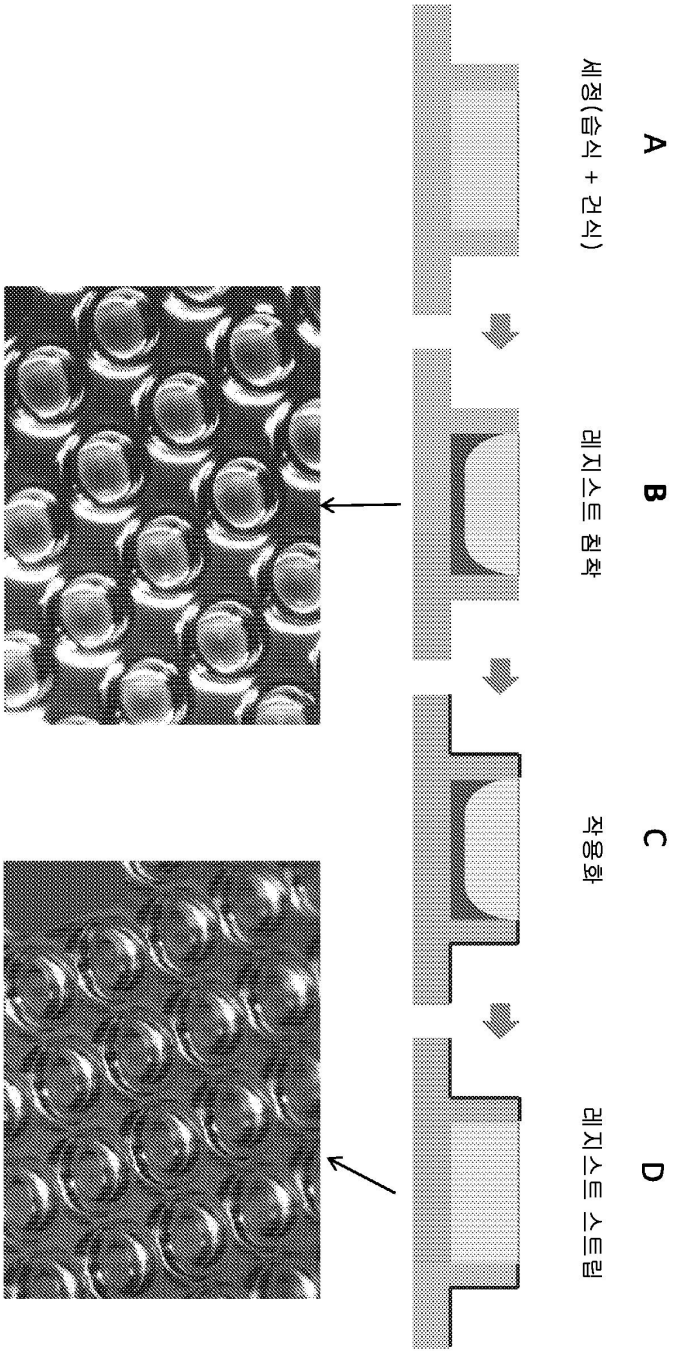
도면32


나노웰 칩 구조
1693.3 um
1150 um
275 um
450 um
SOI 웨이퍼를 사용하는 경우
275 um
450 um

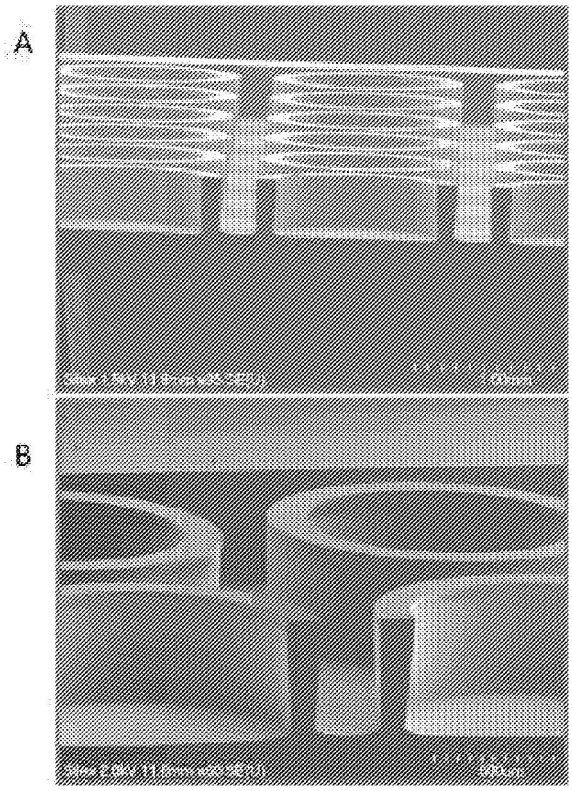
도면33


1. 기판의 산화
2. 후면 포토리쏘그래피
3. 후면 식각
4. 포토레지스트 스트립
5. 전면 포토리쏘그래피
6. DRIE 홀
7. 포토레지스트 스트립
8. 산화물 성장/스트립/산화
A
B
C
D
E
F
G
H
산화물
포토레지스트
포토레지스트
포토레지스트
포토레지스트

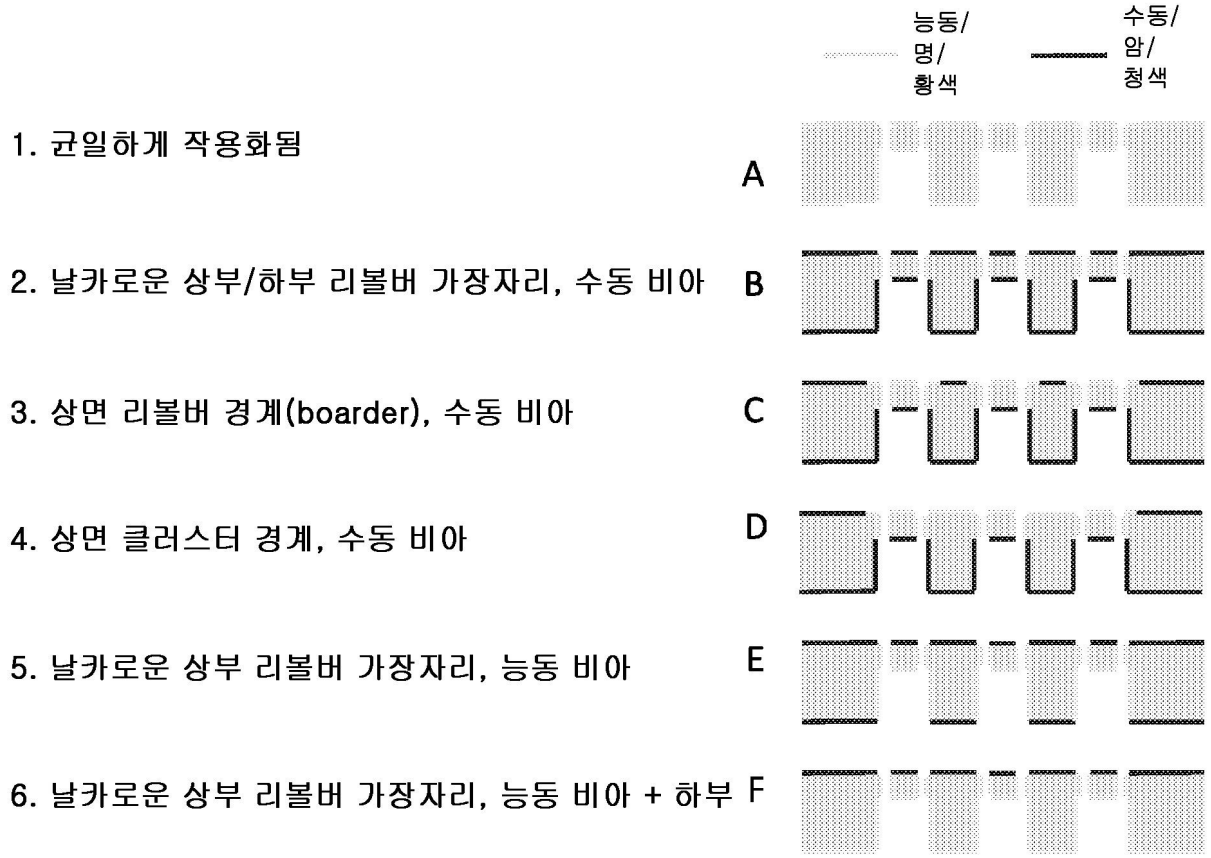
도면34



도면35



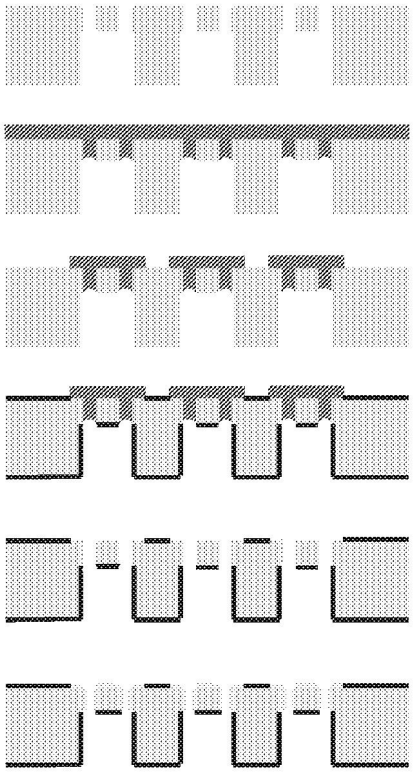
다양한 기능적 배열



도면36

(배열 2 내지 4에 대한) 공정 흐름 A

1. 칩 세정(피라나 + O_2 플라스마)
2. 포토레지스트의 적용
3. 포토리쏘그래피 + 디스컴
4. 플루오로실란 침착
5. 용매 중의 레지스트 스트립
6. 능동 작용화



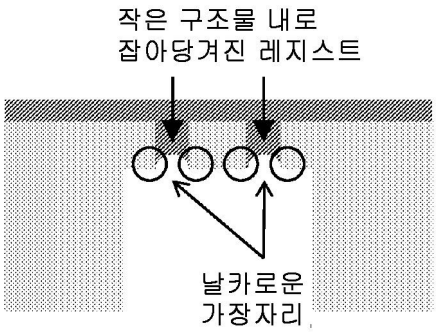
레지스트가 세정되는 부위를 조절하기 위해 마스크 패턴을 변경시킨다.

표면을 부동태화하는 임의의 유기 층일 수 있는 플루오로실란일 필요가 없다.

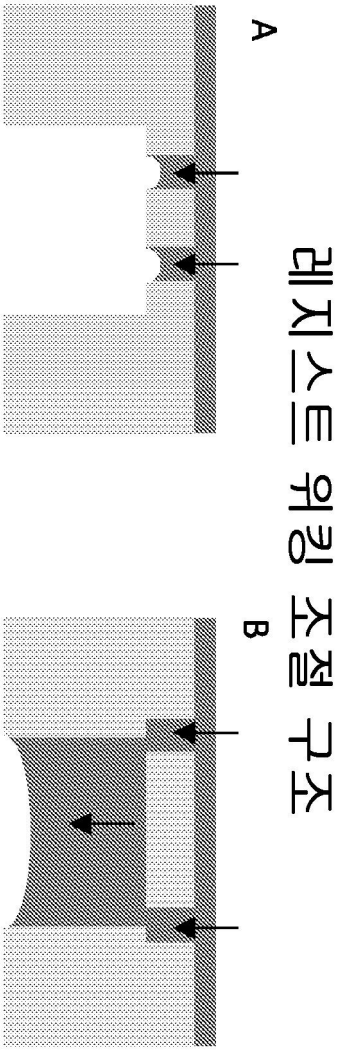
도면37

도면38

레지스트 위킹(wicking) 조절 공정

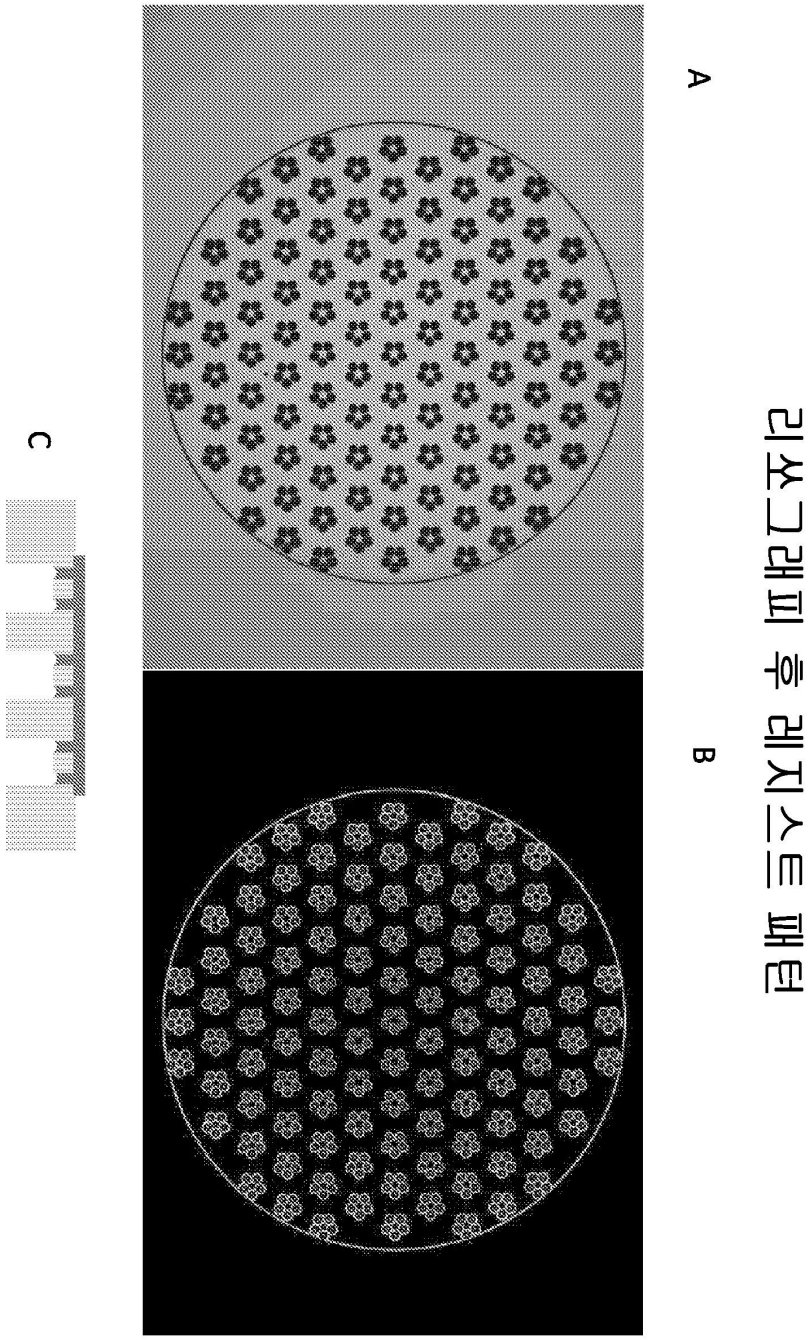


도면39



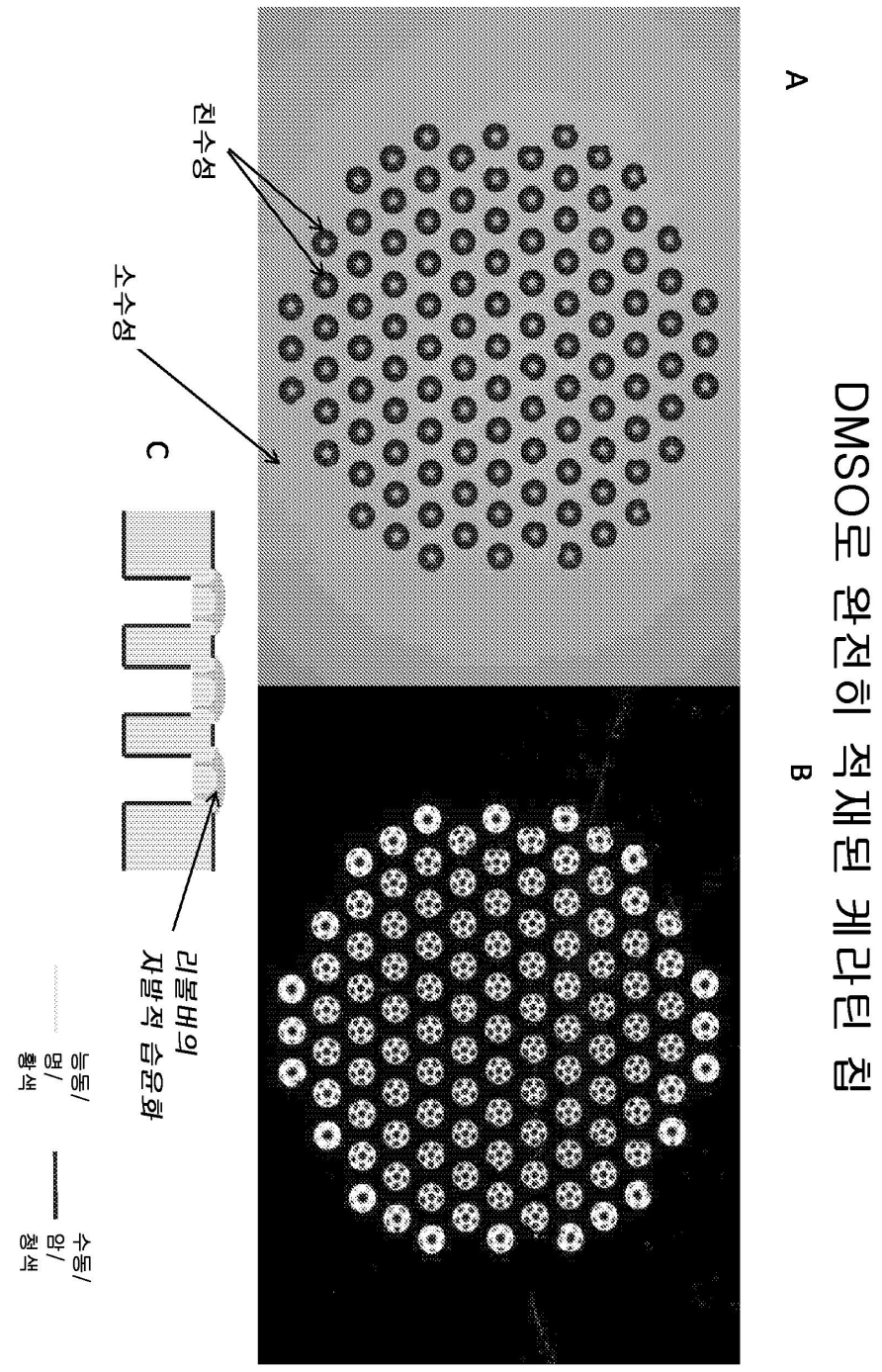
도면40

도면41



도면42

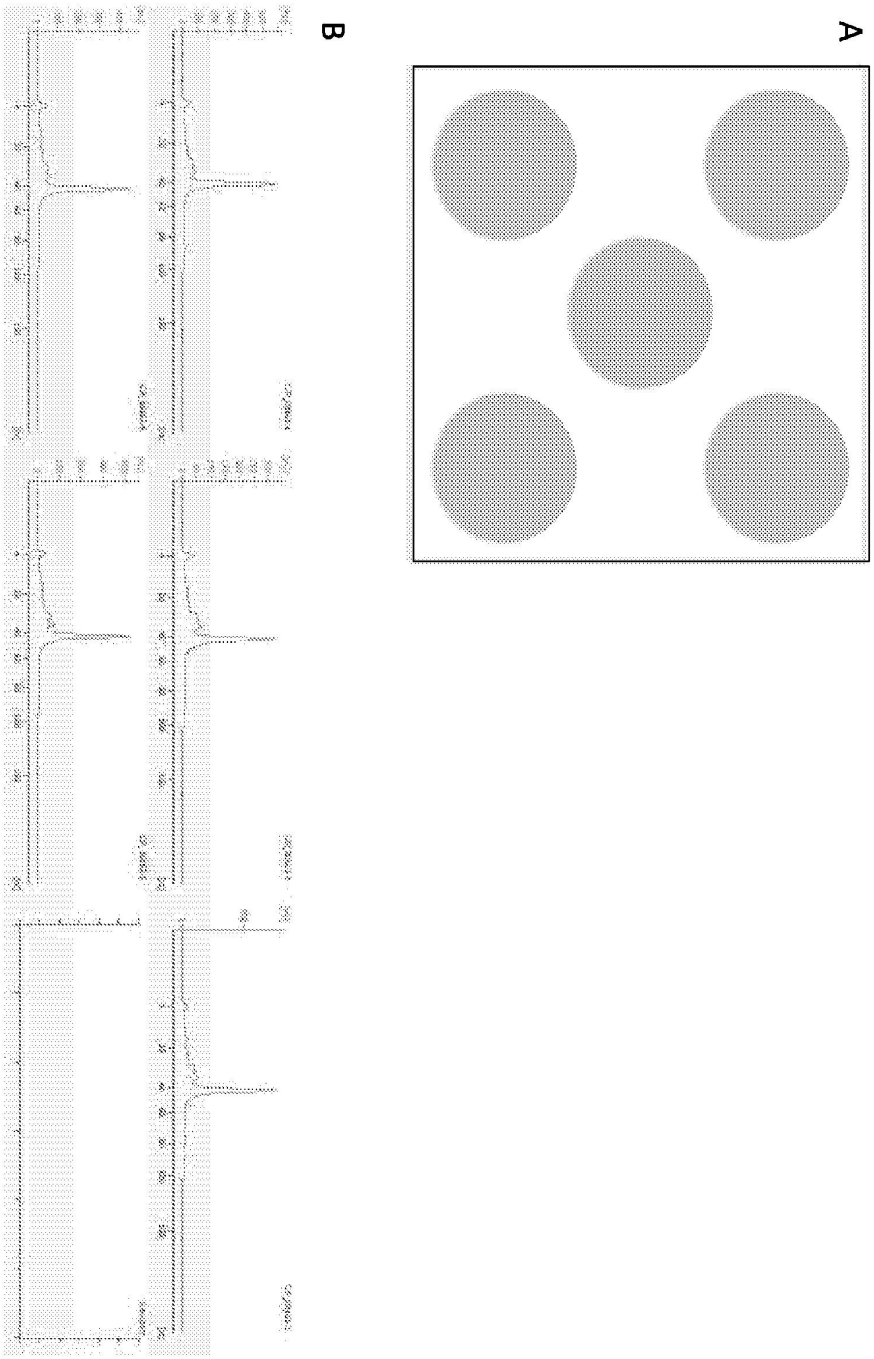
도면43



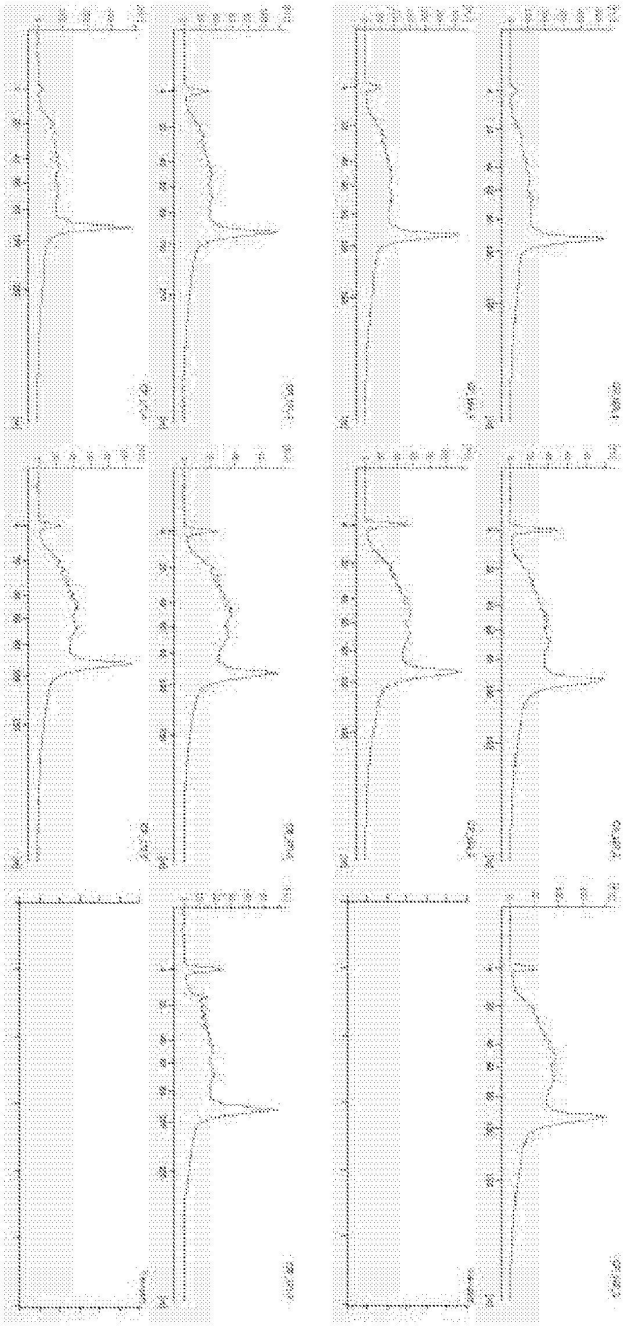
도면44

(배열 6에 대한) 공정 흐름 B
수동/
얇/
혼성
수동/
얇/
혼성
1. 칩 세정(피라냐 + O_2 플라스마)
2. 수동 작용화
3. 레지스트 적용
4. 포토리쏘그래피 + 식각
5. 레지스트 스트립
6. 능동 작용화
A
B
C
D
E
F

도면45

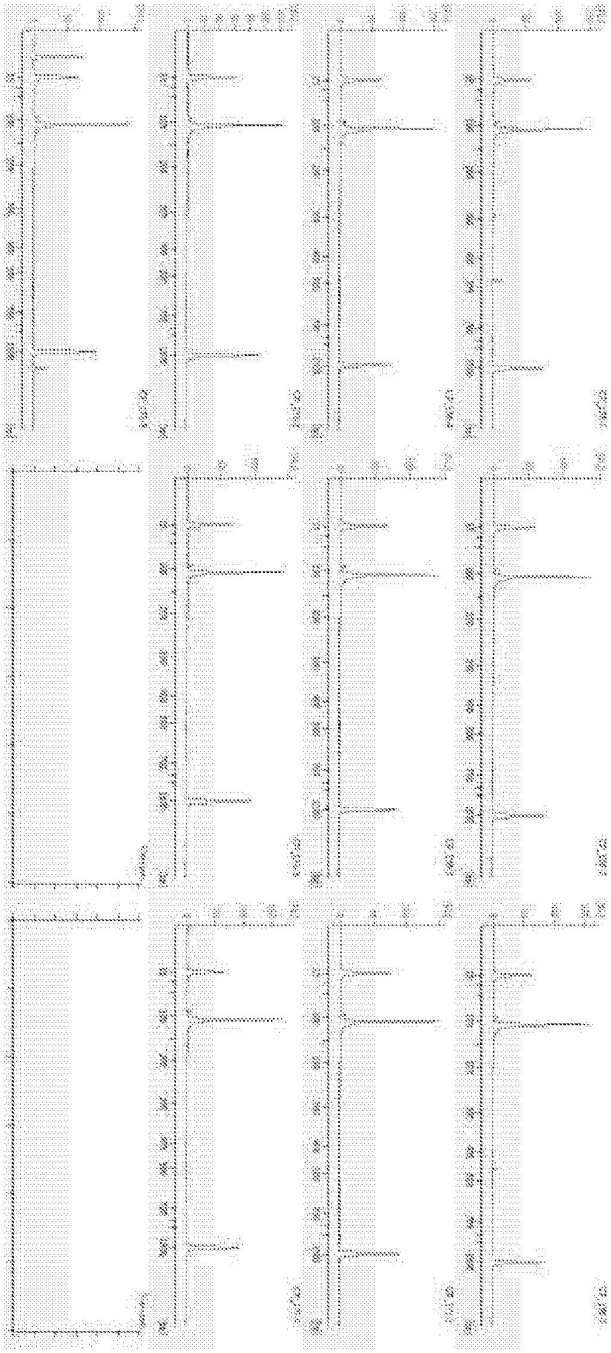


도면46

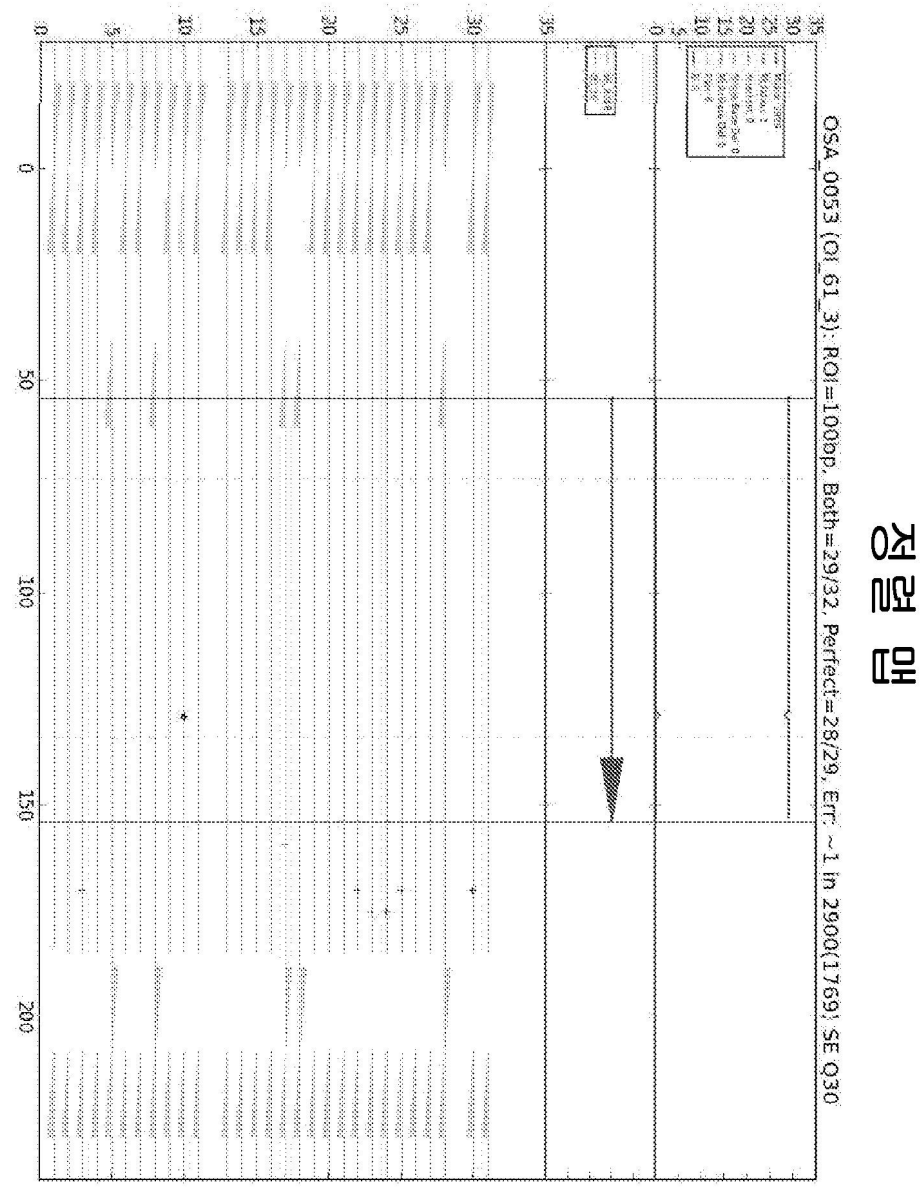


2D 올리고뉴클레오티드 합성 디바이스 상에서의
100-머(mer) 서열의 합성

도면47

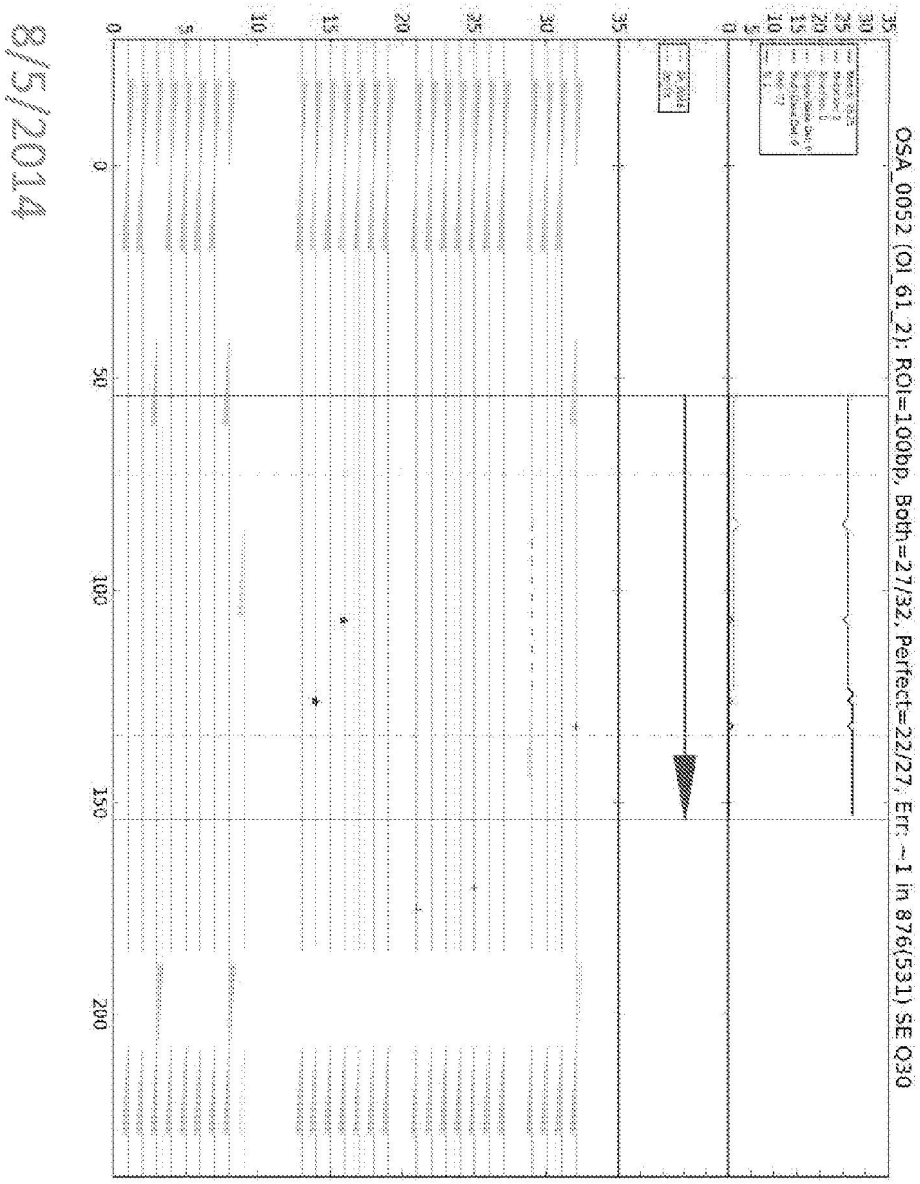


도면48


OSA_0053 (OI_61_3): ROI=100bp, Both=29/32, Perfect=28/29, Err: ~1 in 2900(1769), SE Q30
0
50
100
150
200
0
5
10
15
20
25
30
35

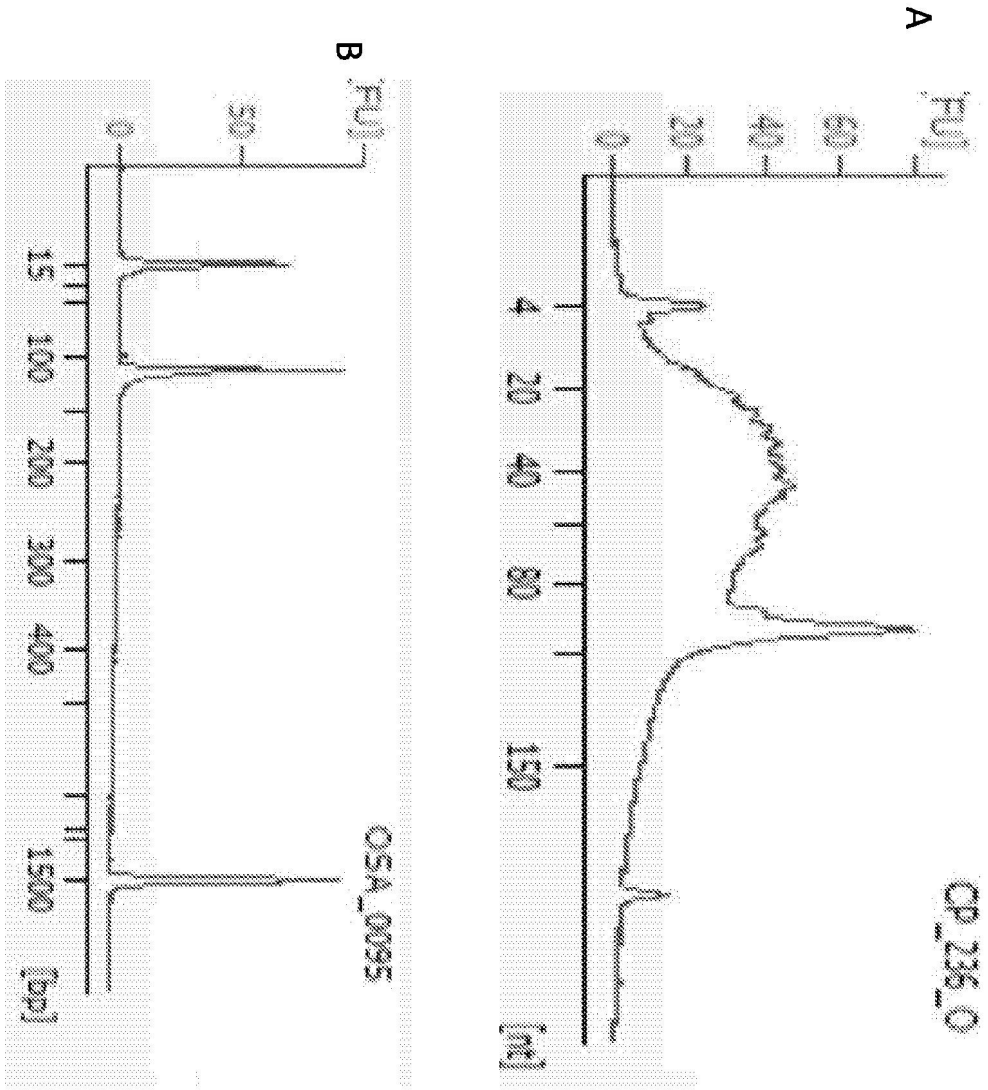
정렬 맵

도면49

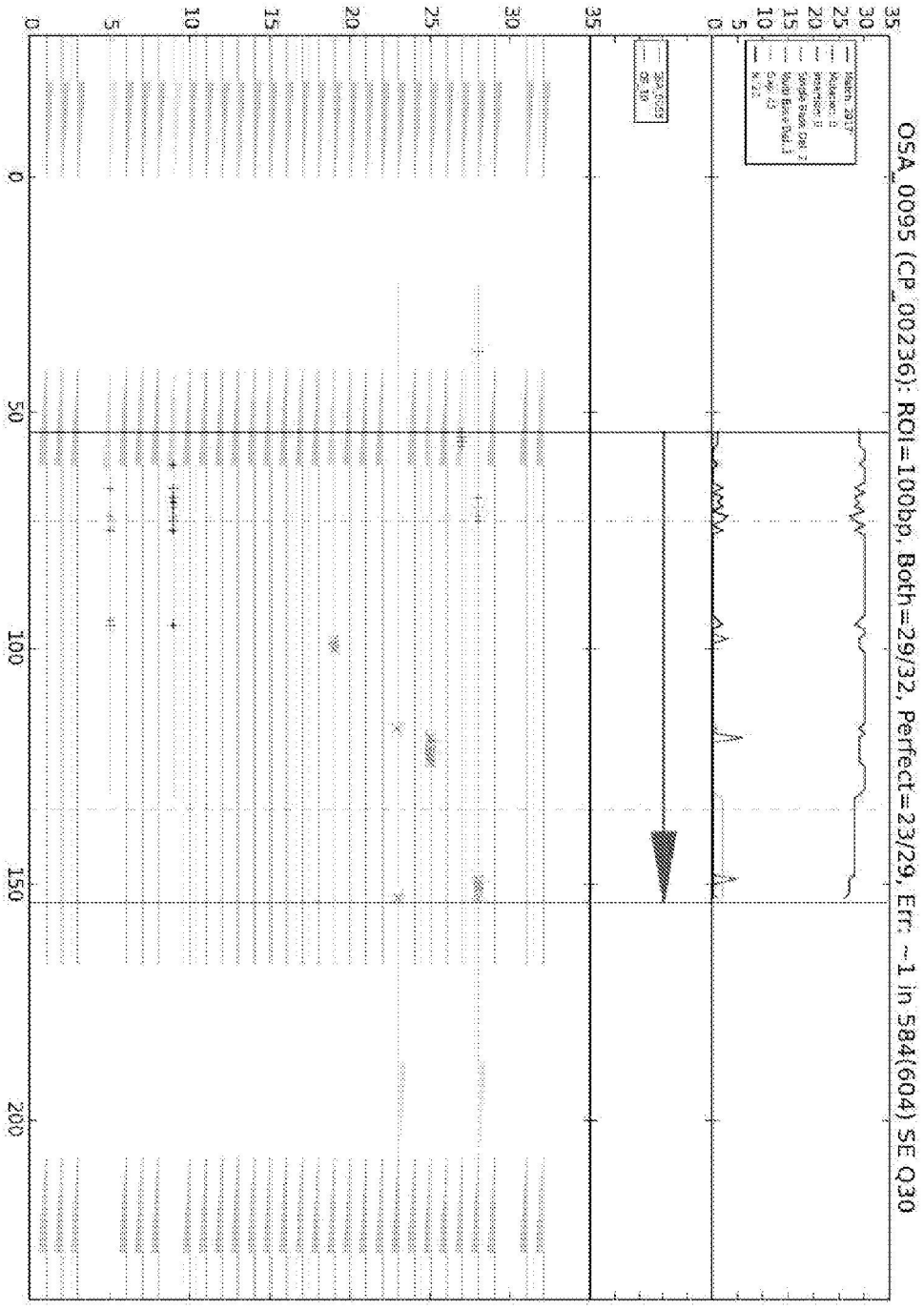

8/5/2014
OSA_0052 (01_61_2): ROI=100bp, Both=27/32, Perfect=22/27, Err: ~1 in 876(531) SE Q30

정렬 맵

도면50


A
[μV]
0
2
4
6
8
[s]
4
20
40
80
150
CP_135_0
B
[μV]
0
5
15
100
200
300
400
1500
[s]
OSA_0065

도면51

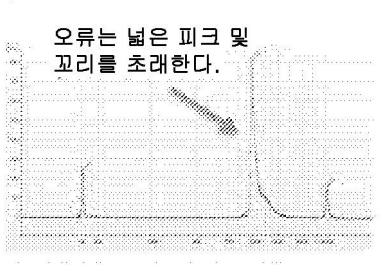

OSA_0095 (CP_00236): ROI=100bp, Both=29/32, Perfect=23/29, Err: ~1 in 584(604) SE Q30

종료 문서

오류 보정

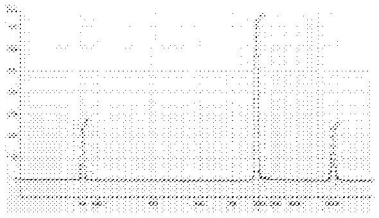
- CorrectASE로 달성된 성능 – 5 kb 당 1개의 오류보다 더 낮은 오류율

1 kb의 CorrectASE 처리

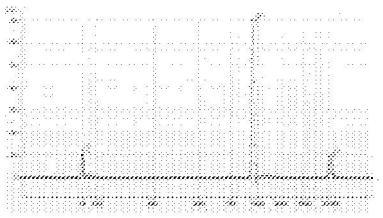


오류 보정 전,
789 bp 당 1개 오류

저품질의 올리고로부터 합성된 유전자



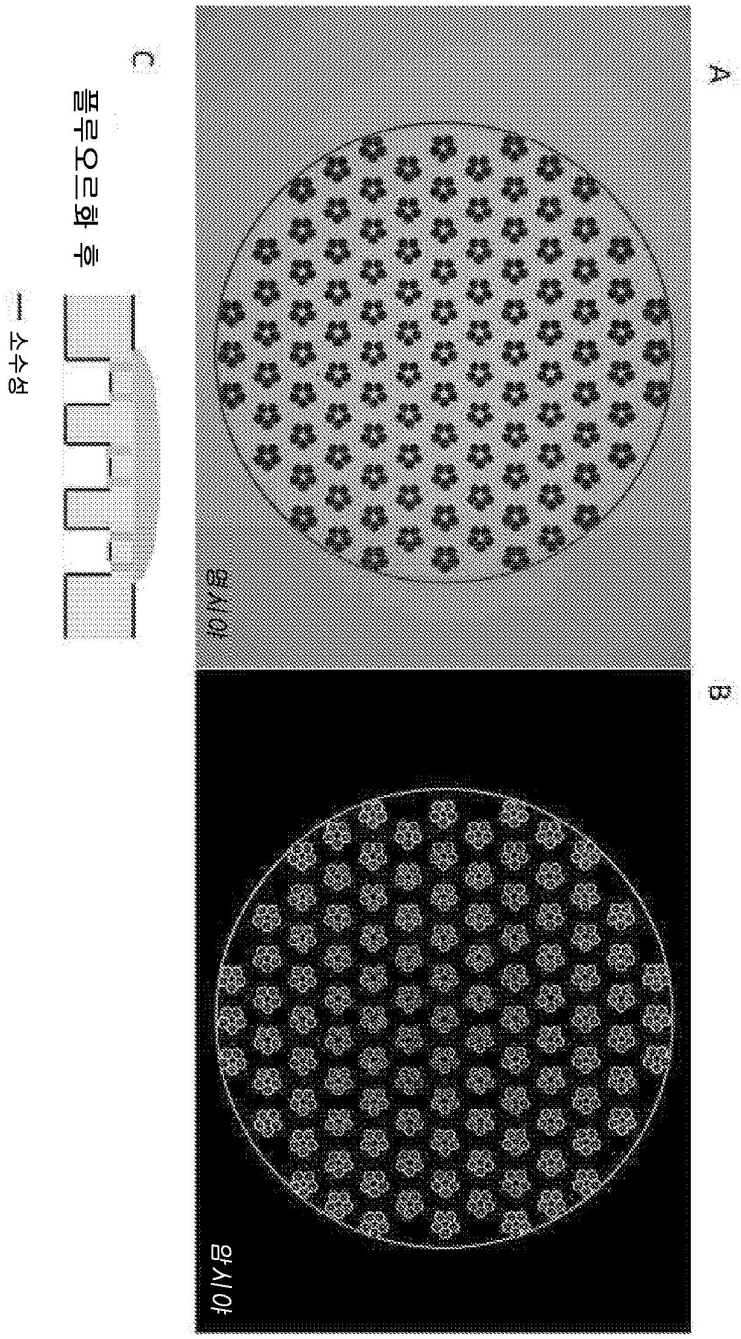
1차 오류 보정 후,
5,190 bp 당 1개 오류



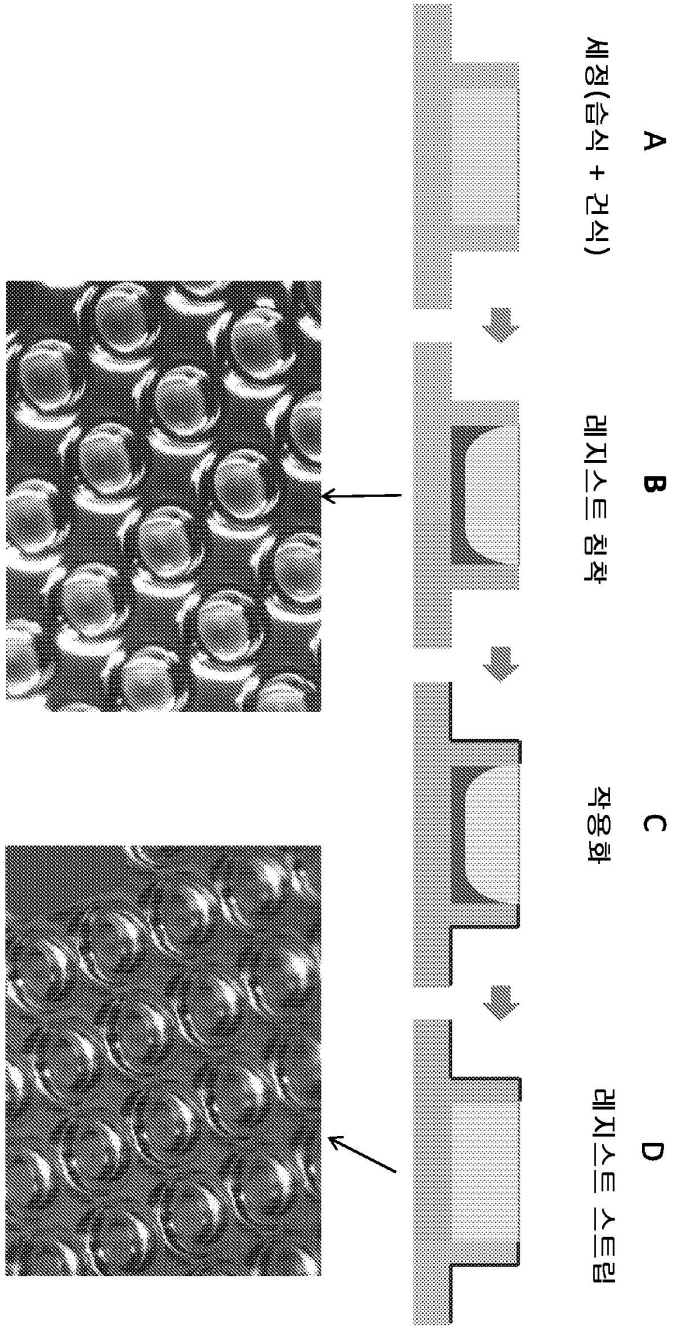
2차 오류 보정 후,
6,315 bp 당 1개 오류

도면52

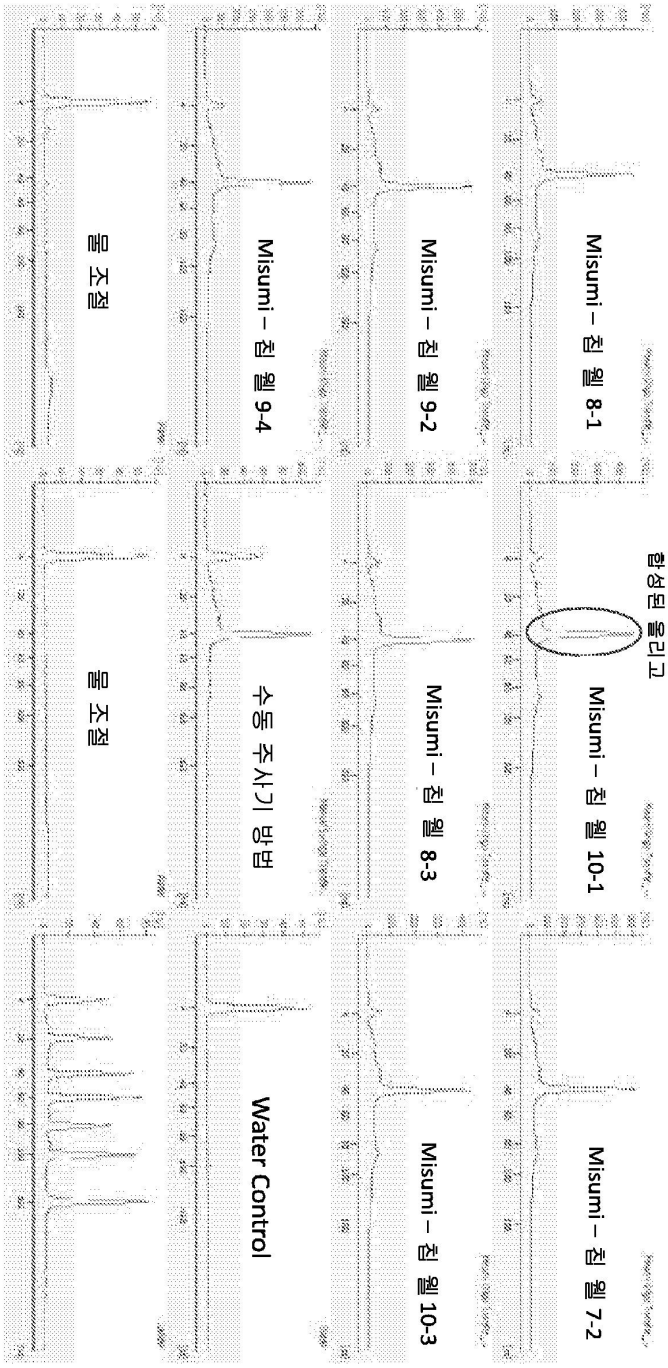
도면53



도면54

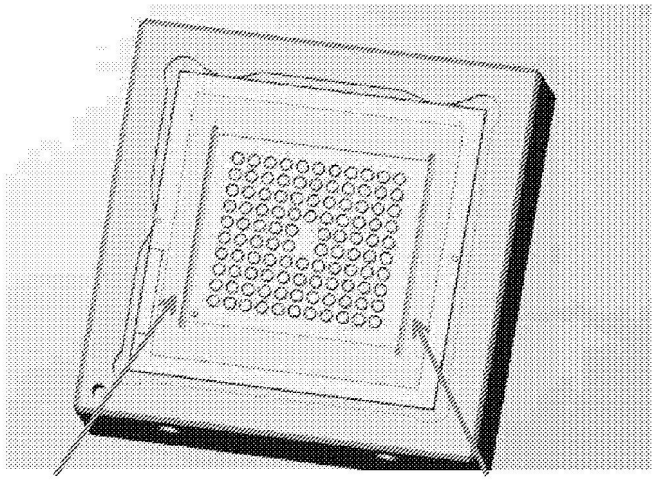


도면55


생물분석기 결과
Misumi – 칩 월 8-1
Misumi – 칩 월 9-2
Misumi – 칩 월 9-4
물 조절
합성된 올리고
Misumi – 칩 월 10-1
Misumi – 칩 월 8-3
수동 주사기 방법
물 조절
Misumi – 칩 월 7-2
Misumi – 칩 월 10-3
Water Control

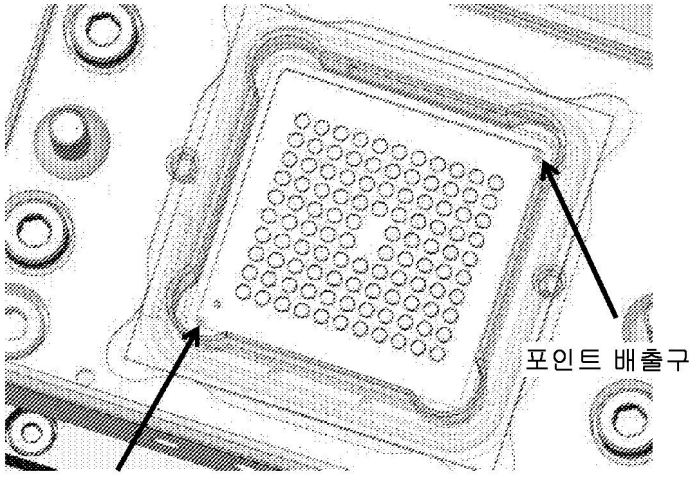
포인트 공급구 및 포인트 배출구

A



유동셀 디자인 **1**
(라인 공급구, 라인 배출구)

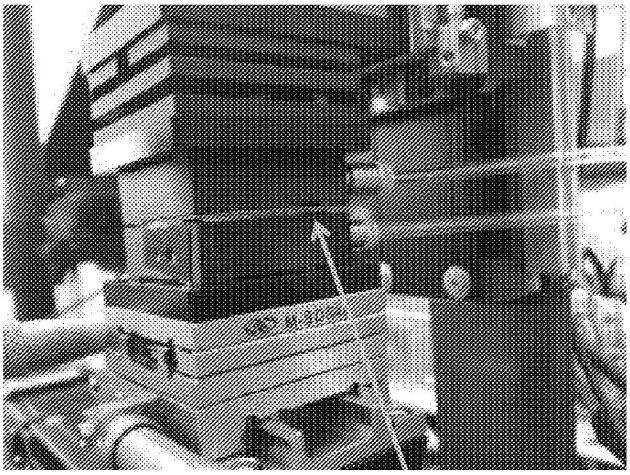
B



유동셀 디자인 **2**
(포인트 공급구, 포인트 배출구)

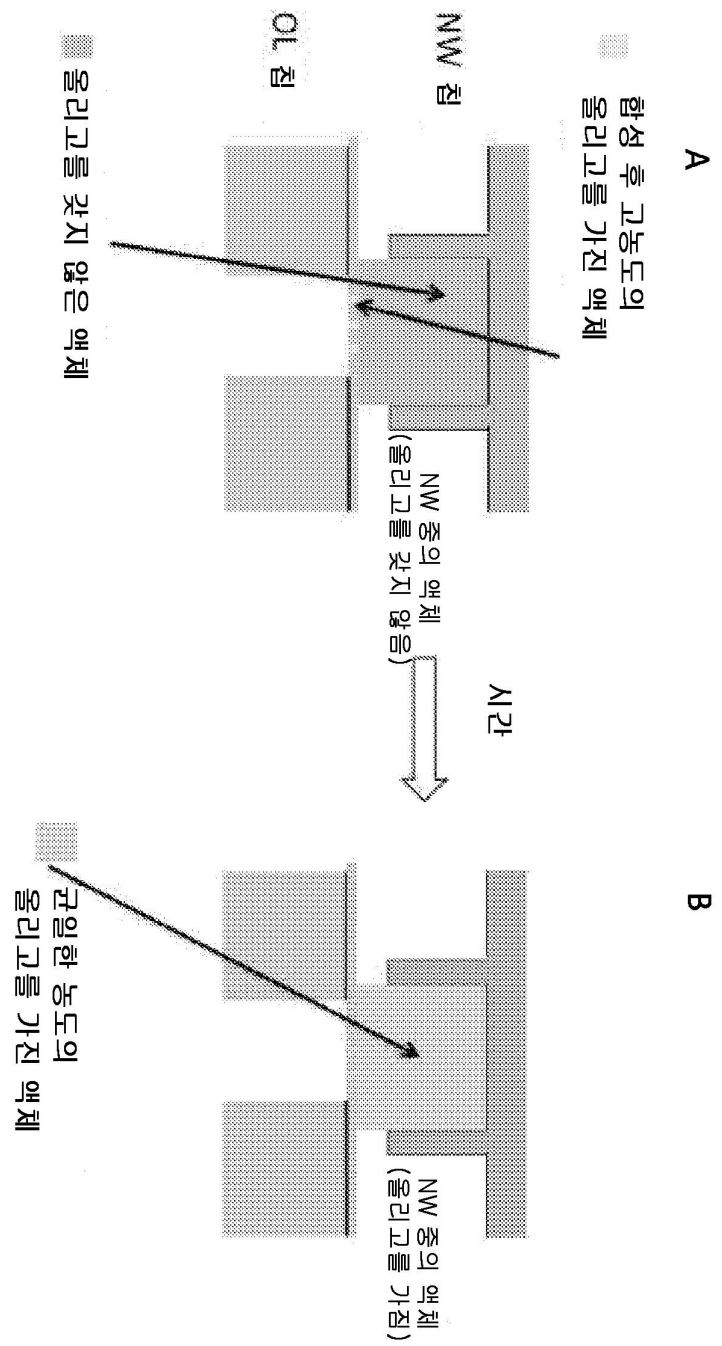
도면55

도면57



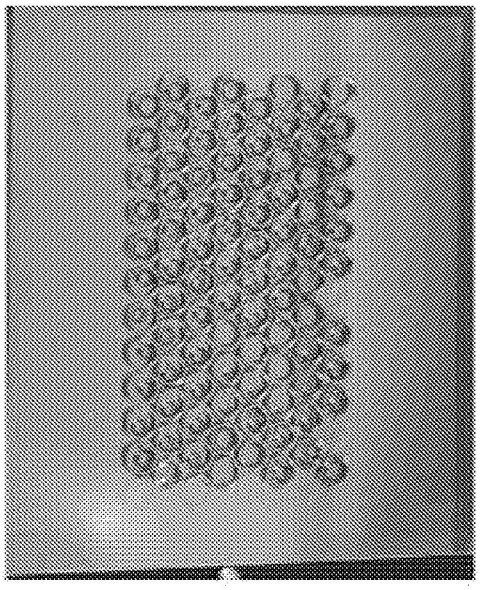
~ 50um 갭, 10분

도면58

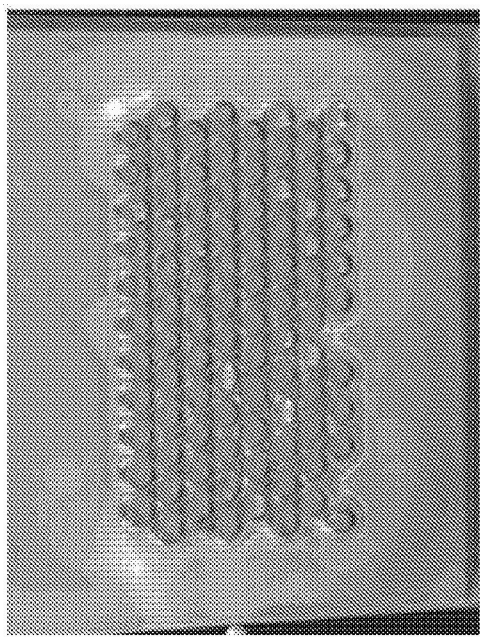

A
합성 후 고농도의
올리고를 가진 액체
NW 칩
OL 칩
올리고를 갖지 않은 액체
NW 중의 액체
(올리고를 갖지 않음)
시간
B
균일한 농도의
올리고를 가진 액체
NW 중의 액체
(올리고를 가짐)

도면59

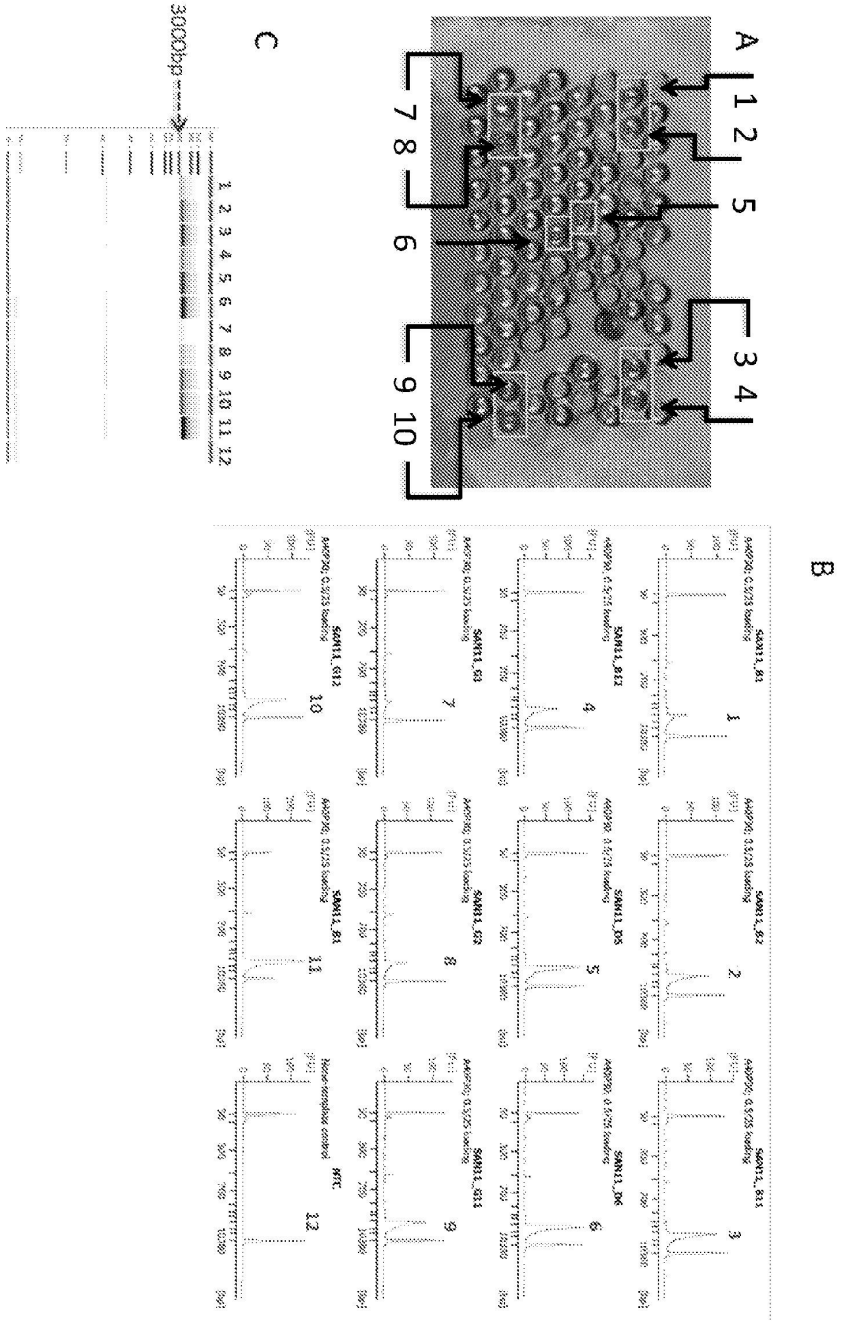
PCA 전



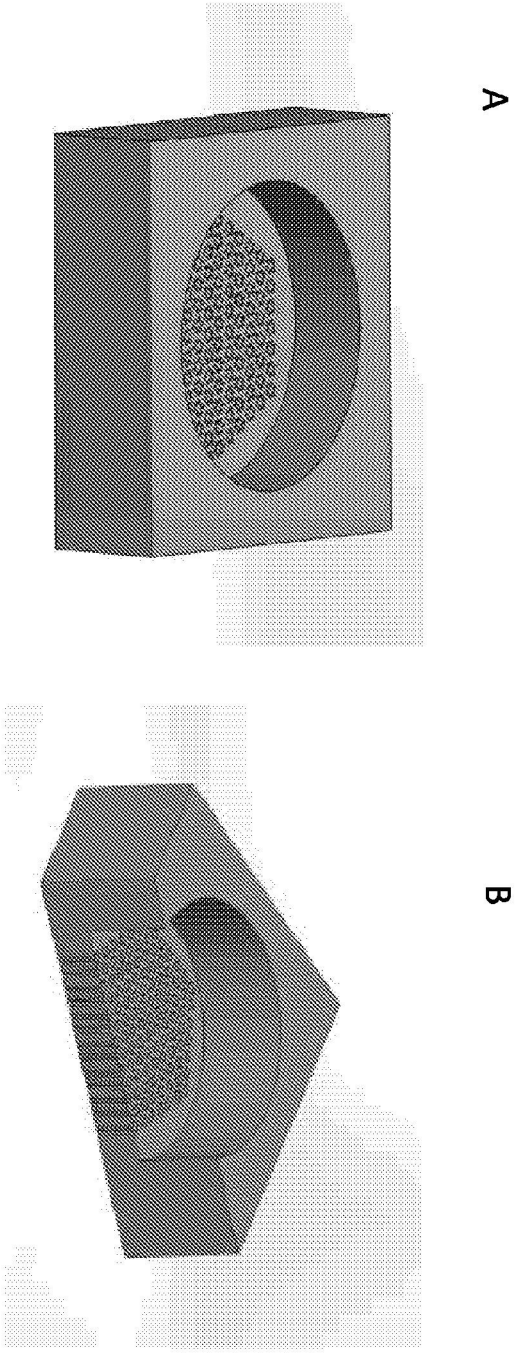
PCA 후



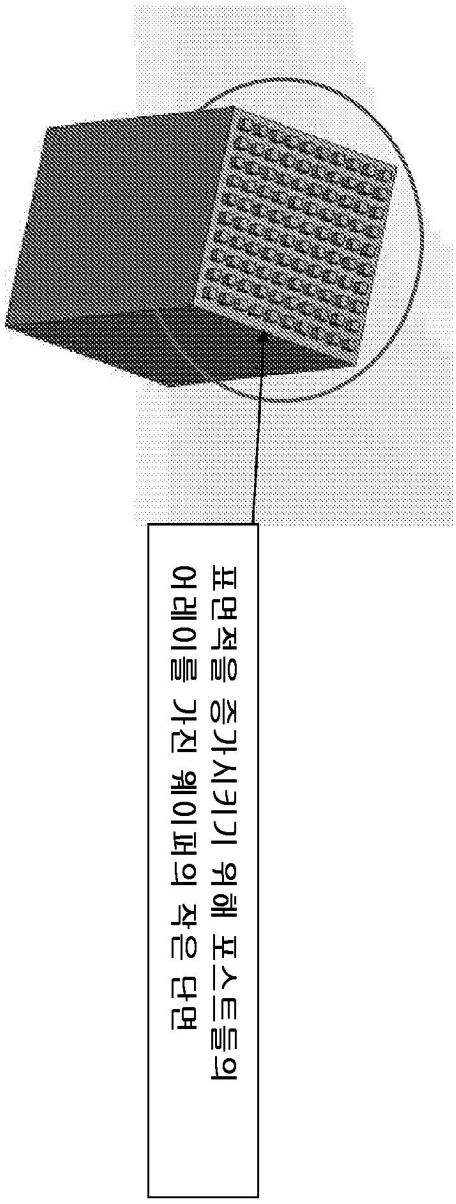
도면60



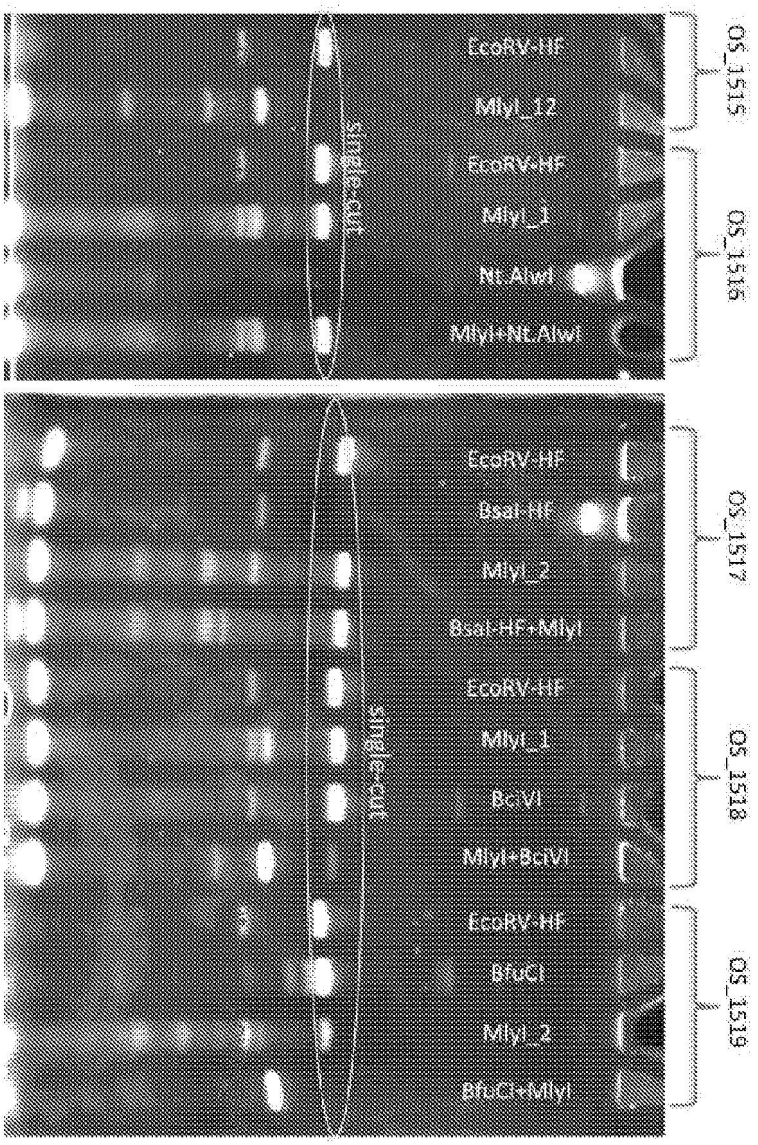
도면61



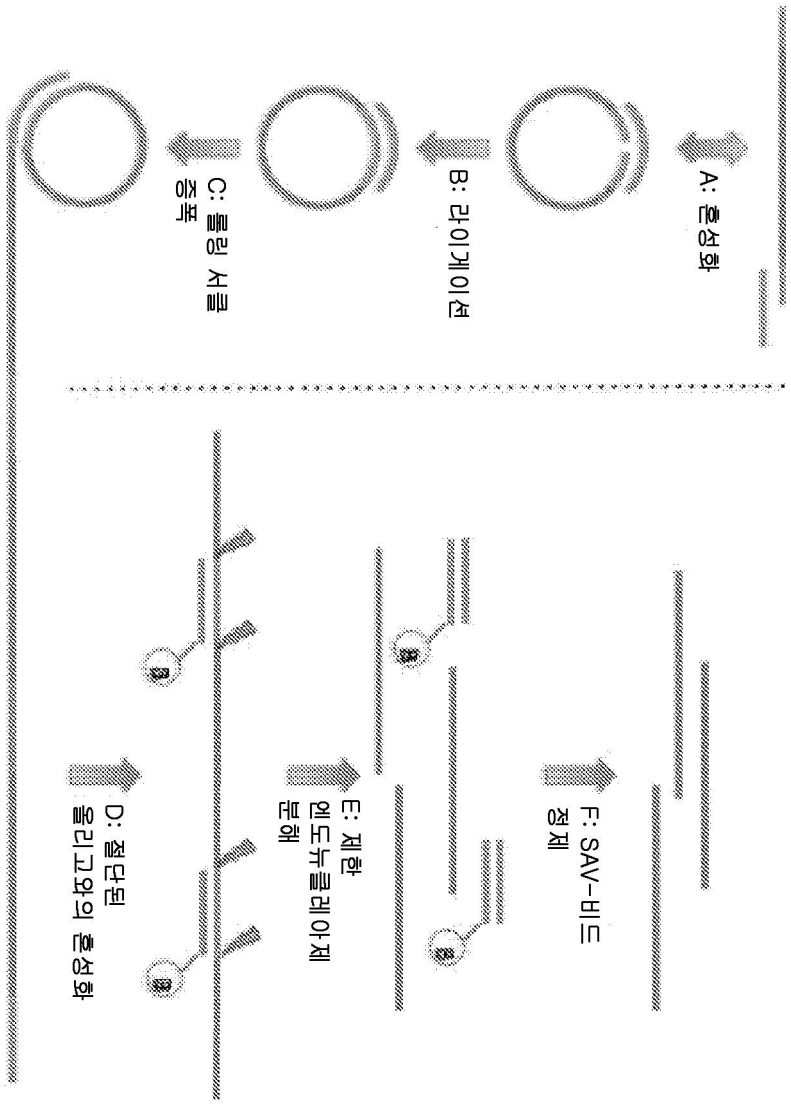
도면62



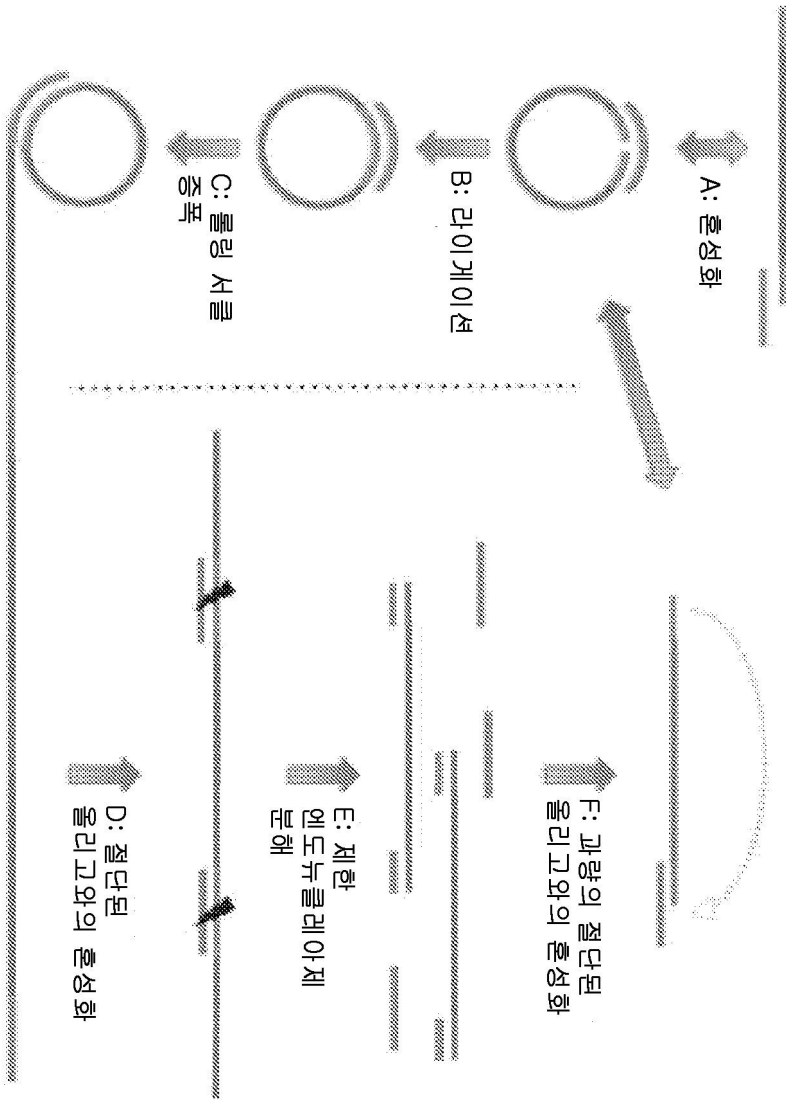
도면63


OS_1515
EcoRV-HF
MlyI_12
OS_1516
EcoRV-HF
MlyI_1
Nt.AlwI
MlyI+Nt.AlwI
Single-cut
OS_1517
EcoRV-HF
BsaI-HF
MlyI_2
BsaI-HF+MlyI
OS_1518
EcoRV-HF
MlyI_1
BciVI
MlyI+BciVI
OS_1519
EcoRV-HF
BfuCI
MlyI_2
BfuCI+MlyI
Single-cut

도면64



도면65



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> TWIST BIOSCIENCE CORPORATION

<120> DE NOVO SYNTHESIZED GENE LIBRARIES

<130> 44854-701.601

<140> PCT/US2014/049834

<141> 2014-08-05

<150> 61/862,445

<151> 2013-08-05

<150> 61/862,457

<151> 2013-08-05

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (51)..(52)

<223
> Thymidine-succinyl hexamide CED phosphoramidite

<400> 1

agacaatcaa ccatttgggg tggacagcct tgacctctag acttcggcat ttttttttt 60

tt 62

<210> 2

<211> 112

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (101)..(102)

<223> Thymidine-succinyl hexamide CED phosphoramidite

<400> 2

cgggatcctt atcgtcatcg tcgtacagat cccgacccat ttgctgtcca ccagtcatgc 60

tagccatacc atgatgatga tgatgatgag aaccccgcat ttttttttt tt 112

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 3

atgcggggtt ctcatcatc 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 4

cgggatcctt atcgtcatcg 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 5

atgcggggtt ctcatcatc 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 6

cgggatcctt atcgtcatcg 20

<210> 7

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 7

atgaccatga ttacggattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 60

gg 62

<210> 8

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 8

gccagctggc gaaaggggga tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt 60

cccagtcacg ac 72

<210> 9

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 9

ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag 60

ttgcgcagcc 70

<210> 10

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 10

cggcaccgct tctggtgccg gaaaccaggc aaagcgccat tcgccattca ggctgcgcaa 60

ctgttggga 69

<210> 11

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 11

caccagaagc ggtgccggaa agctggctgg agtgcgatct tcctgaggcc gatactgtcg 60

tcgtcccctc 70

<210> 12

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 12

gataggtcac gttggtgtag atgggcgcat cgtaaccgtg catctgccag tttgagggga 60

cgacgacagt atcgg 75

<210> 13

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 13

cccatctaca ccaacgtgac ctatcccatt acggtcaatc cgccgtttgt tcccacggag 60

aatccgacgg gttg 74

<210> 14

<211> 72

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 14

gtctggcctt cctgtagcca gctttcatca acattaaatg tgagcgagta acaacccgtc 60

ggattctccg tg 72

<210> 15

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 15

gctggctaca ggaaggccag acgcgaatta tttttgatgg cgttaactcg gcgtttcatc 60

tgtggtgcaa cgg 73

<210> 16

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 16

caggtcaaat tcagacggca aacgactgtc ctggccgtaa ccgacccagc gcccgttgca 60

ccacagatga aacg 74

<210> 17

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 17

cgtttgccgt ctgaatttga cctgagcgca tttttacgcg ccggagaaaa ccgcctcgcg 60

gtgatggtgc tg 72

<210> 18

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 18

gccgctcatc cgccacatat cctgatcttc cagataactg ccgtcactcc agcgcagcac 60

catcaccgcg ag 72

<210> 19

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 19

aggatatgtg gcggatgagc ggcattttcc gtgacgtctc gttgctgcat aaaccgacta 60

cacaaatcag cgatttc 77

<210> 20

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 20

ctccagtaca gcgcggctga aatcatcatt aaagcgagtg gcaacatgga aatcgctgat 60

ttgtgtagtc ggtttatg 78

<210> 21

<211> 75

<212> DNA

<213
> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 21

atttcagccg cgctgtactg gaggctgaag ttcagatgtg cggcgagttg cgtgactacc 60

tacgggtaac agttt 75

<210> 22

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 22

aaaggcgcgg tgccgctggc gacctgcgtt tcaccctgcc ataaagaaac tgttacccgt 60

aggtagtcac g 71

<210> 23

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 23

gcggcaccgc gcctttcggc ggtgaaatta tcgatgagcg tggtggttat gccgatcgcg 60

tcacactacg 70

<210> 24

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 24

gatagagatt cgggatttcg gcgctccaca gtttcgggtt ttcgacgttc agacgtagtg 60

tgacgcgatc ggca 74

<210> 25

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 25

gagcgccgaa atcccgaatc tctatcgtgc ggtggttgaa ctgcacaccg ccgacggcac 60

gctgattgaa gcag 74

<210> 26

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 26

cagcagcaga ccattttcaa tccgcacctc gcggaaaccg acatcgcagg cttctgcttc 60

aatcagcgtg ccg 73

<210> 27

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 27

cggattgaaa atggtctgct gctgctgaac ggcaagccgt tgctgattcg aggcgttaac 60

cgtcacgagc atca 74

<210> 28

<211> 75

<212> DNA

<213
> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 28

gcaggatatc ctgcaccatc gtctgctcat ccatgacctg accatgcaga ggatgatgct 60

cgtgacggtt aacgc 75

<210> 29

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 29

cagacgatgg tgcaggatat cctgctgatg aagcagaaca actttaacgc cgtgcgctgt 60

tcgcattatc cgaac 75

<210> 30

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 30

tccaccacat acaggccgta gcggtcgcac agcgtgtacc acagcggatg gttcggataa 60

tgcgaacagc gcac 74

<210> 31

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 31

gctacggcct gtatgtggtg gatgaagcca atattgaaac ccacggcatg gtgccaatga 60

atcgtctgac cgatg 75

<210> 32

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 32

gcaccattcg cgttacgcgt tcgctcatcg ccggtagcca gcgcggatca tcggtcagac 60

gattcattgg cac 73

<210> 33

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 33

cgcgtaacgc gaatggtgca gcgcgatcgt aatcacccga gtgtgatcat ctggtcgctg 60

gggaatgaat cag 73

<210> 34

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 34

ggatcgacag atttgatcca gcgatacagc gcgtcgtgat tagcgccgtg gcctgattca 60

ttccccagcg accagatg 78

<210> 35

<211> 72

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 35

gtatcgctgg atcaaatctg tcgatccttc ccgcccggtg cagtatgaag gcggcggagc 60

cgacaccacg gc 72

<210> 36

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 36

cgggaagggc tggtcttcat ccacgcgcgc gtacatcggg caaataatat cggtggccgt 60

ggtgtcggct c 71

<210> 37

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 37

tggatgaaga ccagcccttc ccggctgtgc cgaaatggtc catcaaaaaa tggctttcgc 60

tacctggaga gac 73

<210> 38

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 38

ccaagactgt tacccatcgc gtgggcgtat tcgcaaagga tcagcgggcg cgtctctcca 60

ggtagcgaaa gcc 73

<210> 39

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 39

cgcgatgggt aacagtcttg gcggtttcgc taaatactgg caggcgtttc gtcagtatcc 60

ccgtttacag ggc 73

<210> 40

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 40

gccgttttca tcatatttaa tcagcgactg atccacccag tcccagacga agccgccctg 60

taaacgggga tactgacg 78

<210> 41

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 41

cagtcgctga ttaaatatga tgaaaacggc aacccgtggt cggcttacgg cggtgatttt 60

ggcgatacgc cgaacg 76

<210> 42

<211> 67

<212> DNA

<213
> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 42

gcggcgtgcg gtcggcaaag accagaccgt tcatacagaa ctggcgatcg ttcggcgtat 60

cgccaaa 67

<210> 43

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 43

cgaccgcacg ccgcatccag cgctgacgga agcaaaacac cagcagcagt ttttccagtt 60

ccgtttatcc g 71

<210> 44

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 44

ctcgttatcg ctatgacgga acaggtattc gctggtcact tcgatggttt gcccggataa 60

acggaactgg aaaaactgc 79

<210> 45

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 45

aatacctgtt ccgtcatagc gataacgagc tcctgcactg gatggtggcg ctggatggta 60

agccgctggc aagcg 75

<210> 46

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 46

gttcaggcag ttcaatcaac tgtttacctt gtggagcgac atccagaggc acttcaccgc 60

ttgccagcgg cttacc 76

<210> 47

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 47

caaggtaaac agttgattga actgcctgaa ctaccgcagc cggagagcgc cgggcaactc 60

tggctcacag tacgcgta 78

<210> 48

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 48

gcgctgatgt gcccggcttc tgaccatgcg gtcgcgttcg gttgcactac gcgtactgtg 60

agccagagtt g 71

<210> 49

<211> 67

<212> DNA

<213
> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 49

ccgggcacat cagcgcctgg cagcagtggc gtctggcgga aaacctcagt gtgacgctcc 60

ccgccgc 67

<210> 50

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 50

ccagctcgat gcaaaaatcc atttcgctgg tggtcagatg cgggatggcg tgggacgcgg 60

cggggagcgt c 71

<210> 51

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 51

cgaaatggat ttttgcatcg agctgggtaa taagcgttgg caatttaacc gccagtcagg 60

ctttctttca cagatgtg 78

<210> 52

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 52

tgaactgatc gcgcagcggc gtcagcagtt gttttttatc gccaatccac atctgtgaaa 60

gaaagcctga ctgg 74

<210> 53

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 53

gccgctgcgc gatcagttca cccgtgcacc gctggataac gacattggcg taagtgaagc 60

gacccgcatt gac 73

<210> 54

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 54

ggcctggtaa tggcccgccg ccttccagcg ttcgacccag gcgttagggt caatgcgggt 60

cgcttcactt a 71

<210> 55

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 55

cgggccatta ccaggccgaa gcagcgttgt tgcagtgcac ggcagataca cttgctgatg 60

cggtgctgat 70

<210> 56

<211> 75

<212> DNA

<213
> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 56

tccggctgat aaataaggtt ttcccctgat gctgccacgc gtgagcggtc gtaatcagca 60

ccgcatcagc aagtg 75

<210> 57

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 57

ggggaaaacc ttatttatca gccggaaaac ctaccggatt gatggtagtg gtcaaatggc 60

gattaccgtt gatgttga 78

<210> 58

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 58

ggcagttcag gccaatccgc gccggatgcg gtgtatcgct cgccacttca acatcaacgg 60

taatcgccat ttgac 75

<210> 59

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 59

gcggattggc ctgaactgcc agctggcgca ggtagcagag cgggtaaact ggctcggatt 60

agggccgcaa g 71

<210> 60

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 60

ggcagatccc agcggtcaaa acaggcggca gtaaggcggt cgggatagtt ttcttgcggc 60

cctaatccga gc 72

<210> 61

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 61

gttttgaccg ctgggatctg ccattgtcag acatgtatac cccgtacgtc ttcccgagcg 60

aaaacggtct gc 72

<210> 62

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 62

gtcgccgcgc cactggtgtg ggccataatt caattcgcgc gtcccgcagc gcagaccgtt 60

ttcgctcgg 69

<210> 63

<211> 72

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 63

accagtggcg cggcgacttc cagttcaaca tcagccgcta cagtcaacag caactgatgg 60

aaaccagcca tc 72

<210> 64

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 64

gaaaccgtcg atattcagcc atgtgccttc ttccgcgtgc agcagatggc gatggctggt 60

ttccatcagt tgctg 75

<210> 65

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 65

catggctgaa tatcgacggt ttccatatgg ggattggtgg cgacgactcc tggagcccgt 60

cagtatcggc g 71

<210> 66

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 66

ttatttttga caccagacca actggtaatg gtagcgaccg gcgctcagct ggaattccgc 60

cgatactgac gggc 74

<210> 67

<211> 3075

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 67

atgaccatga ttacggattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 60

ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 120

gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 180

tttgcctggt ttccggcacc agaagcggtg ccggaaagct ggctggagtg cgatcttcct 240

gaggccgata ctgtcgtcgt cccctcaaac tggcagatgc acggttacga tgcgcccatc 300

tacaccaacg tgacctatcc cattacggtc aatccgccgt ttgttcccac ggagaatccg 360

acgggttgtt actcgctcac atttaatgtt gatgaaagct ggctacagga aggccagacg 420

cgaattattt ttgatggcgt taactcggcg tttcatctgt ggtgcaacgg gcgctgggtc 480

ggttacggcc aggacagtcg tttgccgtct gaatttgacc tgagcgcatt tttacgcgcc 540

ggagaaaacc gcctcgcggt gatggtgctg cgctggagtg acggcagtta tctggaagat 600

caggatatgt ggcggatgag cggcattttc cgtgacgtct cgttgctgca taaaccgact 660

acacaaatca gcgatttcca tgttgccact cgctttaatg atgatttcag ccgcgctgta 720

ctggaggctg aagttcagat gtgcggcgag ttgcgtgact acctacgggt aacagtttct 780

ttatggcagg gtgaaacgca ggtcgccagc ggcaccgcgc ctttcggcgg tgaaattatc 840

gatgagcgtg gtggttatgc cgatcgcgtc acactacgtc tgaacgtcga aaacccgaaa 900

ctgtggagcg ccgaaatccc gaatctctat cgtgcggtgg ttgaactgca caccgccgac 960

ggcacgctga ttgaagcaga agcctgcgat gtcggtttcc gcgaggtgcg gattgaaaat 1020

ggtctgctgc tgctgaacgg caagccgttg ctgattcgag gcgttaaccg tcacgagcat 1080

catcctctgc atggtcaggt catggatgag cagacgatgg tgcaggatat cctgctgatg 1140

aagcagaaca actttaacgc cgtgcgctgt tcgcattatc cgaaccatcc gctgtggtac 1200

acgctgtgcg accgctacgg cctgtatgtg gtggatgaag ccaatattga aacccacggc 1260

atggtgccaa tgaatcgtct gaccgatgat ccgcgctggc taccggcgat gagcgaacgc 1320

gtaacgcgaa tggtgcagcg cgatcgtaat cacccgagtg tgatcatctg gtcgctgggg 1380

aatgaatcag gccacggcgc taatcacgac gcgctgtatc gctggatcaa atctgtcgat 1440

ccttcccgcc cggtgcagta tgaaggcggc ggagccgaca ccacggccac cgatattatt 1500

tgcccgatgt acgcgcgcgt ggatgaagac agcccttcc cggctgtgcc gaaatggtcc 1560

atcaaaaaat ggctttcgct acctggagag acgcgcccgc tgatcctttg cgaatacgcc 1620

cacgcgatgg gtaacagtct tggcggtttc gctaaatact ggcaggcgtt tcgtcagtat 1680

ccccgtttac agggcggctt cgtctgggac tgggtggatc agtcgctgat taaatatgat 1740

gaaaacggca acccgtggtc ggcttacggc ggtgattttg gcgatacgcc gaacgatcgc 1800

cagttctgta tgaacggtct ggtctttgcc gaccgcacgc cgcatccagc gctgacggaa 1860

gcaaaacacc agcagcagtt tttccagttc cgtttatccg ggcaaaccat cgaagtgacc 1920

agcgaatacc tgttccgtca tagcgataac gagctcctgc actggatggt ggcgctggat 1980

ggtaagccgc tggcaagcgg tgaagtgcct ctggatgtcg ctccacaagg taaacagttg 2040

attgaactgc ctgaactacc gcagccggag agcgccgggc aactctggct cacagtacgc 2100

gtagtgcaac cgaacgcgac cgcatggtca gaagccgggc acatcagcgc ctggcagcag 2160

tggcgtctgg cggaaaacct cagtgtgacg ctccccgccg cgtcccacgc catcccgcat 2220

ctgaccacca gcgaaatgga tttttgcatc gagctgggta ataagcgttg gcaatttaac 2280

cgccagtcag gctttctttc acagatgtgg attggcgata aaaaacaact gctgacgccg 2340

ctgcgcgatc agttcacccg tgcaccgctg gataacgaca ttggcgtaag tgaagcgacc 2400

cgcattgacc ctaacgcctg ggtcgaacgc tggaaggcgg cgggccatta ccaggccgaa 2460

gcagcgttgt tgcagtgcac ggcagataca cttgctgatg cggtgctgat tacgaccgct 2520

cacgcgtggc agcatcaggg gaaaacctta tttatcagcc ggaaaaccta ccggattgat 2580

ggtagtggtc aaatggcgat taccgttgat gttgaagtgg cgagcgatac accgcatccg 2640

gcgcggattg gcctgaactg ccagctggcg caggtagcag agcgggtaaa ctggctcgga 2700

ttagggccgc aagaaaacta tcccgaccgc cttactgccg cctgttttga ccgctgggat 2760

ctgccattgt cagacatgta taccccgtac gtcttcccga gcgaaaacgg tctgcgctgc 2820

gggacgcgcg aattgaatta tggcccacac cagtggcgcg gcgacttcca gttcaacatc 2880

agccgctaca gtcaacagca actgatggaa accagccatc gccatctgct gcacgcggaa 2940

gaaggcacat ggctgaatat cgacggtttc catatgggga ttggtggcga cgactcctgg 3000

agcccgtcag tatcggcgga attccagctg agcgccggtc gctaccatta ccagttggtc 3060

tggtgtcaaa aataa 3075

<210> 68

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 68

atgaccatga ttacggattc actggcc 27

<210> 69

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 69

ttatttttga caccagacca actggtaatg g 31

<210> 70

<211> 931

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 70

atgaccatga ttacggattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 60

ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 120

gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 180

tttgcctggt ttccggcacc agaagcggtg ccggaaagct ggctggagtg cgatcttcct 240

gaggccgata ctgtcgtcgt cccctcaaac tggcagatgc acggttacga tgcgcccatc 300

tacaccaacg tgacctatcc cattacggtc aatccgccgt ttgttcccac ggagaatccg 360

acgggttgtt actcgctcac atttaatgtt gatgaaagct ggctacagga aggccagacg 420

cgaattattt ttgatggcgt taactcggcg tttcatctgt ggtgcaacgg gcgctgggtc 480

ggttacggcc aggacagtcg tttgccgtct gaatttgacc tgagcgcatt tttacgcgcc 540

ggagaaaacc gcctcgcggt gatggtgctg cgctggagtg acggcagtta tctggaagat 600

caggatatgt ggcggatgag cggcattttc cgtgacgtct cgttgctgca taaaccgact 660

acacaaatca gcgatttcca tgttgccact cgctttaatg atgatttcag ccgcgctgta 720

ctggaggctg aagttcagat gtgcggcgag ttgcgtgact acctacgggt aacagtttct 780

ttatggcagg gtgaaacgca ggtcgccagc ggcaccgcgc ctttcggcgg tgaaattatc 840

gatgagcgtg gtggttatgc cgatcgcgtc acactacgtc tgaacgtcga aaacccgaaa 900

ctgtggagcg ccgaaatccc gaatctctat c 931

<210> 71

<211> 163

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 71

atgaccatga ttacggattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaccct 60

ggcgttaccc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 120

gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcc 163

<210> 72

<211> 175

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 72

gataggtcac gttggtgtag atgggcgcat cgtaaccgtg catctgccag tttgagggga 60

cgacgacagt atcggcctca ggaagatcgc actccagcca gctttccggc accgcttctg 120

gtgccggaaa ccaggcaaag cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tggga 175

<210> 73

<211> 176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 73

cccatctaca ccaacgtgac ctatcccatt acggtcaatc cgccgtttgt tcccacggag 60

aatccgacgg gttgttactc gctcacattt aatgttgatg aaagctggct acaggaaggc 120

cagacgcgaa ttatttttga tggcgttaac tcggcgtttc atctgtggtg caacgg 176

<210> 74

<211> 176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 74

gccgctcatc cgccacatat cctgatcttc cagataactg ccgtcactcc agcgcagcac 60

catcaccgcg aggcggtttt ctccggcgcg taaaaatgcg ctcaggtcaa attcagacgg 120

caaacgactg tcctggccgt aaccgaccca gcgcccgttg caccacagat gaaacg 176

<210> 75

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 75

aggatatgtg gcggatgagc ggcattttcc gtgacgtctc gttgctgcat aaaccgacta 60

cacaaatcag cgatttccat gttgccactc gctttaatga tgatttcagc cgcgctgtac 120

tggaggctga agttcagatg tgcggcgagt tgcgtgacta cctacgggta acagttt 177

<210> 76

<211> 178

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 76

gatagagatt cgggatttcg gcgctccaca gtttcgggtt ttcgacgttc agacgtagtg 60

tgacgcgatc ggcataacca ccacgctcat cgataatttc accgccgaaa ggcgcggtgc 120

cgctggcgac ctgcgtttca ccctgccata aagaaactgt tacccgtagg tagtcacg 178

<210> 77

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 77

atgaccatga ttacggattc actggcc 27

<210> 78

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 78

gatagagatt cgggatttcg gcgctcc 27

<210> 79

<211> 134

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 79

atctttgagt cttctgcttg gtcagacgag tgcatgtgcg tgacaaattg gcgcgaggag 60

ctcgtgtcat tcacaactgc tcttaggcta ctcaggcatg gtgagatgct acggtggttg 120

atggatacct agat 134

<210> 80

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 80

cagaagactc aaagatatct aggtatccat caac 34

<210> 81

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<400> 81

gttgatggat acctagatat ctttgagtct tctg 34