РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 729 688**(13) **C1**

(51) МПК
*B01L 3/00* (2006.01)

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
*B01L 3/00 (2020.02)*

(21)(22) Заявка: **2018145959, 02.05.2018**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
**02.05.2018**

Дата регистрации:
**11.08.2020**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
**11.05.2017 US 62/504,977**

(45) Опубликовано: **11.08.2020** Бюл. № **23**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **11.12.2019**

(86) Заявка PCT:
**US 2018/030689 (02.05.2018)**

(87) Публикация заявки PCT:
**WO 2018/208561 (15.11.2018)**

Адрес для переписки:
**197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ"**

(72) Автор(ы):
**РАМИРЕС, Шон М. (US),**
**МЕЙДЗЕР, Брайан Д. (US),**
**ЛИ, Эдвин (US),**
**МУН, Соджон (US),**
**КИМ, Иннсу Даниэль (US),**
**РИЧЕЗ, Александр (GB),**
**ВИНСЕНТ, Людовик (US),**
**ВОН ХАТТЕН, Хавьер (GB),**
**ТРАН, Хай Цюан (US),**
**ЦИММЕРЛИ, Максвелл (US),**
**МОРРИСОН, Джулия (GB),**
**АРТЬОЛИ, Джанлука Андреа (GB),**
**СЛАЙ, Кристал (US),**
**БЛЭК, Хейден (US),**
**КРАФТ, Льюис Дж. (US),**
**СЕ, Хун (SG),**
**ВЭЙ, Вэй (US),**
**СЭНФОРД, Райан (US)**

(73) Патентообладатель(и):
**ИЛЛЮМИНА, ИНК. (US),**
**ИЛЛЮМИНА КЕМБРИДЖ ЛИМИТЕД (GB),**
**ИЛЛЮМИНА, СИНГАПУР ПТЕ. ЛТД. (SG)**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 20160023208 A1, 28.01.2016. US 20150259735 A1, 17.09.2015. WO 2016022266 A1, 11.02.2016. US 20030040129 A1, 27.02.2003. RU 2008144969 A, 20.05.2010.**

## (54) ЗАЩИТНОЕ ПОВЕРХНОСТНОЕ ПОКРЫТИЕ ДЛЯ ПРОТОЧНЫХ ЯЧЕЕК

(57) Реферат:

Изобретение относится к проточным ячейкам с покрытием. Проточная ячейка включает: подложку, включающую открытую поверхность; слой покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанный с открытой поверхностью подложки через химическую группу, имеющуюся на открытой поверхности; праймер, прикрепленный к слою покрытия из функционализированного полимера; и водорастворимое защитное покрытие на праймере и слое покрытия из функционализированного полимера. Технический результат - обеспечение возможности генотипирования. 3 н. и 31 з.п. ф-лы, 22 ил., 2 табл.



RU 2729688 C1

RU 2729688 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 729 688**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
*B01L 3/00* (2006.01)

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
*B01L 3/00 (2020.02)*

(21)(22) Application: **2018145959, 02.05.2018**

(24) Effective date for property rights:
**02.05.2018**

Registration date:
**11.08.2020**

Priority:
(30) Convention priority:
**11.05.2017 US 62/504,977**

(45) Date of publication: **11.08.2020** Bull. № **23**

(85) Commencement of national phase: **11.12.2019**

(86) PCT application:
**US 2018/030689 (02.05.2018)**

(87) PCT publication:
**WO 2018/208561 (15.11.2018)**

Mail address:
**197101, Sankt-Peterburg, a/ya 128, "ARS-PATENT"**

(72) Inventor(s):
**RAMIRES, Shon M. (US),**
**MEJDZER, Brajan D. (US),**
**LI, Edvin (US),**
**MUN, Sodzhon (US),**
**KIM, Innsu Daniel (US),**
**RICHEZ, Aleksandr (GB),**
**VINSENT, Lyudovik (US),**
**VON KHATTEN, Khaver (GB),**
**TRAN, Khaj Tsyuan (US),**
**TSIMMERLI, Maksvell (US),**
**MORRISON, Dzhuliya (GB),**
**ARTOLI, Dzhanluka Andrea (GB),**
**SLAJ, Kristal (US),**
**BLEK, Khejden (US),**
**KRAFT, Lyuis Dzh. (US),**
**SE, Khun (SG),**
**VEJ, Vej (US),**
**SENFORD, Rajan (US)**

(73) Proprietor(s):
**ILLYUMINA, INK. (US),**
**ILLYUMINA KEMBRIDZH LIMITED (GB),**
**ILLYUMINA, SINGAPUR PTE. LTD. (SG)**

## (54) PROTECTIVE SURFACE COATING FOR FLOW CELLS

(57) Abstract:

FIELD: medical equipment.

SUBSTANCE: invention relates to coated flow cells. Flow cell includes: a substrate including an open surface; coating layer from functionalised polymer, covalently bonded to substrate exposed surface through chemical group available on exposed surface; primer attached to the functionalised polymer coating layer; and a water-soluble protective coating on the primer and the functionalised polymer coating layer.

EFFECT: technical result is possibility of genotyping.

34 cl, 22 dwg, 2 tbl

RU 2729688 C1

RU 2729688 C1

## ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка претендует на приоритет предварительной патентной заявки US 62/504977, поданной 11 мая 2017 г., которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

## ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Биологическая матрица (также называемая биочипом или биологическим блоком) - это один из огромного множества инструментов, применяемых для обнаружения и анализа молекул, включающих дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК). Матрицы для указанного применения конструируют таким образом, чтобы они включали зонды для нуклеотидных последовательностей, находящихся в генах человека и других организмов. Например, в некоторых вариантах применения отдельные зонды для ДНК и РНК могут быть присоединены к небольшим участкам, создаваемым на подложке матрицы (чипа) в виде геометрической сетки (или неупорядоченным образом). Например, испытуемый образец, полученный из организма определенного человека или другого организма, может быть нанесен на сетку таким образом, чтобы комплементарные фрагменты гибридизовались с зондами на индивидуальных сайтах матрицы. Затем матрица может быть исследована сканированием сайтов при определенных частотах света, и по флуоресценции тех сайтов, с которыми гибридизованы фрагменты, может быть установлено, какие именно фрагменты присутствуют в образце.

Биологические матрицы могут быть применены для проведения генетического секвенирования. В общем, генетическое секвенирование включает определение порядка нуклеотидов или нуклеиновых кислот по протяженности генетического материала, такого как фрагмент ДНК или РНК. Постепенно удлиняющиеся последовательности оснований анализируют, и полученная информация о последовательности может быть применена в различных биоинформационных методиках для логического расположения фрагментов относительно друг друга с целью надежного определения последовательности генетического материала большой длины, из которого были получены фрагменты. Были разработаны методики автоматизированного компьютеризированного исследования характеристических фрагментов, которые применяют для картирования генома, идентификации генов и их функций, оценки риска развития некоторых состояний и заболеваний и т.д. Кроме указанных применений биологические матрицы могут быть применены для обнаружения и исследования разнообразных молекул, семейств молекул, уровней экспрессии генов, однонуклеотидных полиморфизмов и для проведения генотипирования.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно одному из аспектов, проточная ячейка включает: подложку, крышку, присоединенную к соединительному участку подложки, где крышка и подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, а также включает находящиеся на поверхности химические вещества, расположенные на подложке и в проточном канале. Водорастворимое защитное покрытие закрывает находящиеся на поверхности подложки химические вещества.

Согласно одному из аспектов, проточная ячейка включает: подложку, включающую открытую поверхность; слой покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанный с открытой поверхностью подложки через химическую группу, имеющуюся на открытой поверхности; праймер, прикрепленный (привитый) к слою покрытия из функционализированного полимера; и водорастворимое защитное покрытие на праймере и слое покрытия из функционализированного полимера. В

некоторых примерах проточная ячейка дополнительно включает крышку, присоединенную к соединительному участку подложки, причем крышка и подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал.

В некоторых аспектах проточных ячеек, рассмотренных в настоящем описании, слой покрытия из функционализированного полимера ковалентно связывается с открытой поверхностью посредством реакции химической группы, находящейся на открытой поверхности, с первой реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера. В некоторых примерах праймер прикрепляется к слою покрытия из функционализированного полимера посредством реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера.

Один из примеров проточной ячейки, рассматриваемой в настоящем описании, включает структурированную подложку. Структурированная подложка включает углубления, разделенные промежуточными областями, и находящиеся на поверхности химические вещества расположены в углублениях. В некоторых примерах к соединительному участку структурированной подложки присоединена крышка, где крышка по меньшей мере частично ограничивает проточный канал, который находится в селективном взаимодействии с углублениями. Водорастворимое защитное покрытие закрывает находящиеся на поверхности углублений химические вещества. В некоторых примерах находящаяся на открытой поверхности химическая группа закреплена в углублениях подложки.

Другой пример проточной ячейки, рассматриваемой в настоящем описании, включает неструктурированную подложку. В некоторых примерах крышка присоединена к соединительному участку неструктурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий открытую поверхность. Находящееся на поверхности химическое вещество расположено на неструктурированной подложке и в проточном канале. Водорастворимое защитное покрытие закрывает находящиеся на поверхности химические вещества. В некоторых примерах химическая группа, находящаяся на открытой поверхности, присоединена к неструктурированной подложке.

Согласно другому аспекту, способ применения проточной ячейки, рассматриваемой в настоящем описании, включает: размещение проточной ячейки в устройстве для секвенирования; и удаление водорастворимого защитного покрытия под действием воды на водорастворимое защитное покрытие (необязательно в виде водного буферного раствора). Согласно некоторым аспектам, удаление выполняют элюированием, в результате которого водорастворимое защитное покрытие удаляется. Удаление водорастворимого защитного покрытия приводит к раскрытию праймера, который может быть затем использован для гибридизации с целевым олигонуклеотидом, который включает последовательность, комплементарную по меньшей мере части праймера.

В одном из примеров способа, рассмотренного в настоящем описании, находящееся на поверхности химическое вещество присоединяют к части подложки проточной ячейки, а водорастворимое защитное покрытие наносят по меньшей мере на находящееся на поверхности химическое вещество.

Согласно другому аспекту, способ включает: обеспечение подложки с открытой поверхностью, включающей первую химическую группу, где обеспечение необязательно включает модификацию открытой поверхности подложки с целью введения первой химической группы; реакцию первой химической группы с первой реакционноспособной группой молекулы функционализированного полимера с образованием слоя покрытия

из функционализированного полимера, ковалентно связанного с открытой поверхностью подложки; прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера посредством проведения реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера; и образование водорастворимого защитного покрытия на праймере и слое покрытия из функционализированного полимера.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Признаки примеров осуществления настоящего изобретения станут более понятными при их более подробном рассмотрении с учетом фигур, в которых подобные обозначения позиций на чертежах относятся к подобным, но не обязательно идентичным, компонентам. Для краткости позиции чертежей или признаки, имеющие функции, описанные ранее, могут быть описаны или могут не быть описаны в комбинации с другими фигурами, на которых они изображены.

На Фиг. 1 представлена блок-схема, на которой представлен один из примеров способа, рассмотренного в настоящем описании;

На Фиг. 2 представлена блок-схема, на которой более подробно представлены примеры способа, показанного на Фиг. 1;

На Фиг. 3 представлено поперечное сечение примера проточной ячейки, полученной способами, показанными на Фиг. 2;

На Фиг. 4 представлена блок-схема, на которой представлен другой пример способа, рассмотренного в настоящем описании;

На Фиг. 5A-5H представлены виды поперечных сечений, совокупность которых иллюстрирует пример способа, показанного на Фиг. 4;

На Фиг. 5A-5D и 5I-5L представлены виды поперечных сечений, совокупность которых иллюстрирует другой пример способа, показанного на Фиг. 4;

На Фиг. 6A-6E представлены виды поперечных сечений, совокупность которых иллюстрирует другой пример способов, рассмотренных в настоящем описании;

На Фиг. 7 представлена гистограмма, на которой показана степень удержания Hairpin-TET (HP-TET, т.е. конструкции "шпилька"-олигонуклеотид TET) в проточных ячейках после выдержки в течение 7 суток при 30°C в присутствии различных нанесенных на ячейки примеров защитного покрытия;

На Фиг. 8 представлена диаграмма, на которой показано удержание HP-TET в проточных ячейках, на которые нанесен пример защитного покрытия, и в контрольной ячейке без покрытия;

На Фиг. 9 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции после проведения первого или начального цикла секвенирования в проточных ячейках, включающих дорожки течения согласно примерам и дорожки течения согласно сравнительным примерам, после нахождения ячеек в упаковке при различных величинах влажности;

На Фиг. 10 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции после проведения первого цикла секвенирования в проточных ячейках, включающих дорожки течения согласно примерам и дорожки течения согласно сравнительным примерам, после того, как ячейки подвергались воздействию температуры, изменяющейся в определенном диапазоне в течение различных периодов времени, составляющих от 2 суток до 19 суток;

На Фиг. 11A представлена диаграмма интенсивности флуоресценции прочтения 1 (R1) после проведения первого начального цикла (C1) секвенирования, полученная для проточной ячейки согласно примеру осуществления и сравнительной проточной ячейки, которые выдерживали при 60°C в течение 6 суток;

На Фиг. 11B представлена диаграмма процентной доли кластеров, проходящих через фильтр (вверху), и диаграмма интенсивности флуоресценции прочтения 1 (R1) после проведения первого цикла (C1) секвенирования, полученная для проточной ячейки согласно примеру осуществления и сравнительной проточной ячейки, которые выдерживали при комнатной температуре в течение 7 суток;

На Фиг. 12A представлена диаграмма средней интенсивности, полученной для проточной ячейки согласно примеру осуществления, которую инкубировали при различных температурах в течение одного часа;

На Фиг. 12B представлена диаграмма средней интенсивности, полученная для сравнительной проточной ячейки, которую инкубировали при различных температурах в течение одного часа;

На Фиг. 13 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции прочтения 1 (R1) после проведения первого цикла секвенирования в проточных ячейках, включающих дорожки течения согласно примеру осуществления и дорожки течения согласно сравнительному примеру, после выдержки ячеек при различных температурах в течение различных периодов времени;

На Фиг. 14 представлен график зависимости выраженного в мкм расстояния по толщине покрытия (ось y) от выраженного в мм расстояния до различных участков защитного покрытия структурированной многослойной конструкции (ось x) (т.е. график зависимости толщины покрытия (мкм) от расстояния на поверхности многослойной конструкции (мм));

На Фиг. 15 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции после проведения анализа доступности поверхностного праймера (анализ с веществом Cal Fluor Red, сокращенно анализ с CFR), полученная для проточной ячейки согласно примеру осуществления и сравнительной проточной ячейки, после их выдержки при комнатной температуре в течение 28 суток, 35 суток и 71 суток;

На Фиг. 16 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции, полученная после проведения первого цикла секвенирования в проточной ячейке согласно примеру осуществления после выдержки этой ячейки в сухих условиях при 30°C в течение 0 недель, 2 недель и 6 недель, в сравнительной проточной ячейке после выдержки этой ячейки выдерживали в сухих условиях при 30°C в течение 2 недель и 6 недель, и в проточной ячейке согласно примеру осуществления после выдержки этой ячейки выдерживали в условиях повышенной влажности при 4°C в течение 6 недель;

На Фиг. 17 представлена диаграмма, на которой показаны результаты исследования удержания с Cal Fluor Red (CFR), спустя 11 суток выдержки в различных условиях выдержки, где удержание CFR означает отношение сигнала CFR после выдержки CFR к сигналу CFR в момент времени сутки 0;

На Фиг. 18 представлена гистограмма удержания CFR (%, отношение сигнала CFR в сутки X к сигналу в сутки 0)) в момент времени 0 (T0) и в сутки 1 и сутки 2, полученная для проточной ячейки согласно примеру и проточной ячейки согласно сравнительному примеру;

На Фиг. 19 представлена диаграмма процентного повышения интенсивности в частях проточной ячейки согласно примеру осуществления в сравнении с контрольными сухими частями в зависимости от толщины защитного покрытия на соответствующих частях примера проточной ячейки;

На Фиг. 20 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции двух прочтений после проведения первого цикла секвенирования (C1) в проточной ячейке, включающей дорожки согласно примеру осуществления и дорожки согласно сравнительному примеру;

На Фиг. 21 представлен график зависимости сигнала CFR (относительного сигнала) от процентной доли полимера в защитном покрытии, которое было сформировано одновременно с прикреплением праймера; и

На Фиг. 22 представлен график зависимости интенсивности (в произвольных единицах флуоресценции, англ. arbitrary fluorescence units, сокращенно AFU) от концентрации для примера защитного покрытия и нескольких защитных покрытий согласно сравнительным примерам.

## СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Проточная ячейка согласно первому аспекту включает структурированную подложку, включающую углубления, разделенные промежуточными областями, и находящееся на поверхности химическое вещество (например, слой покрытия из функционализированного полимера и с прикрепленным к нему праймером), расположенное в углублениях; крышку, присоединенную к соединительному участку структурированной подложки, где крышка по меньшей мере частично ограничивает проточный канал, который находится в селективном взаимодействии с углублениями; и водорастворимое защитное покрытие, покрывающее находящееся на поверхности в углублениях химическое вещество и по меньшей мере часть структурированной подложки.

Согласно одному из аспектов, проточная ячейка включает: подложку, включающую открытую поверхность; слой покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанный с открытой поверхностью подложки; праймер, прикрепленный к слою покрытия из функционализированного полимера; и водорастворимое защитное покрытие на праймере и слое покрытия из функционализированного полимера. В некоторых примерах проточная ячейка дополнительно включает крышку, присоединенную к соединительному участку подложки, причем крышка и подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал.

В некоторых примерах слой покрытия из функционализированного полимера ковалентно связывается с открытой поверхностью посредством реакции химической группы, находящейся на открытой поверхности, с первой реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера. В некоторых примерах праймер прикрепляется к слою покрытия из функционализированного полимера посредством реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера. В некоторых примерах праймер включает алкинильную группу, подходящую для реакции со второй реакционноспособной группой. В некоторых примерах химическая группа, присоединенная к открытой поверхности, представляет собой алкенильную, циклоалкенильную или норборненильную группу. В некоторых примерах химическая группа представляет собой часть линкера, такого как силан или производное силана, который присоединен к открытой поверхности подложки.

В некоторых примерах подложка представляет собой структурированную подложку. Структурированная подложка включает углубления, разделенные промежуточными областями. В некоторых примерах крышка присоединена к соединительному участку структурированной подложки, причем крышка по меньшей мере частично ограничивает проточный канал, который находится в селективном взаимодействии с углублениями. В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие закрывает слой покрытия из функционализированного полимера и праймер, находящиеся в углублениях. В некоторых примерах химическая группа, находящаяся на открытой поверхности,

присоединена к углублениям подложки, необязательно через линкер.

В других примерах подложка проточной ячейки представляет собой неструктурированную подложку. В некоторых примерах крышка присоединена к соединительному участку неструктурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий открытую поверхность. Слой покрытия из функционализированного полимера и праймер находятся на неструктурированной подложке и в проточном канале. Водорастворимое защитное покрытие закрывает слой покрытия из функционализированного полимера и праймер. В некоторых примерах химическая группа, находящаяся на открытой поверхности, присоединена к подложке, необязательно через линкер. Таким образом, согласно некоторым аспектам, проточная ячейка включает неструктурированную подложку; крышку, присоединенную к соединительному участку неструктурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал; находящееся на поверхности химическое вещество (например, слой покрытия из функционализированного полимера и закрепленный на нем праймер), расположенное на неструктурированной подложке и в проточном канале; и водорастворимое защитное покрытие, закрывающее находящееся на поверхности химическое вещество.

Согласно первому аспекту, способ включает добавление располагаемого на поверхности химического вещества к части подложки проточной ячейки, и нанесение водорастворимого защитного покрытия на по меньшей мере находящееся на поверхности химическое вещество. В одном из примеров первого аспекта способа добавление располагаемого на поверхности химического вещества включает формирование слоя покрытия из функционализированного полимера и прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера; и водорастворимое защитное покрытие наносят после закрепления праймера. Также, в этом примере первого аспекта водорастворимое защитное покрытие структурировано таким образом, что после образования водорастворимого защитного покрытия оно формирует соединительный участок подложки проточной ячейки; и способ дополнительно включает присоединение крышки к сформованному соединительному участку подложки проточной ячейки, в результате чего образуется проточный канал.

В другом примере первого аспекта способа добавление располагаемого на поверхности химического вещества включает формирование слоя покрытия из функционализированного полимера, и водорастворимое защитное покрытие наносят после формирования слоя покрытия из функционализированного полимера. Также, в этом примере первого аспекта материал водорастворимого защитного покрытия выбран из группы, состоящей из графтсополимера поливинилового спирта и полиэтиленгликоля, сахарозы, полиакриламида и полиэтиленгликоля. Дополнительно, в этом примере первого аспекта водорастворимое защитное покрытие структурировано таким образом, что после образования водорастворимого защитного покрытия это покрытие формирует соединительный участок подложки проточной ячейки, и способ дополнительно включает присоединение крышки к образованному соединительному участку подложки проточной ячейки, в результате чего образуется проточный канал. После присоединения способ дополнительно включает: удаление водорастворимого защитного покрытия, что приводит к раскрытию слоя покрытия из функционализированного полимера и другой части подложки; прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера; и образование второго водорастворимого защитного покрытия на праймере, слое покрытия из функционализированного полимера и другой части подложки

проточной ячейки. В одном из примеров этого аспекта удаление водорастворимого защитного покрытия включает растворение. Также, согласно этому аспекту, материал второго водорастворимого защитного покрытия выбран из группы, состоящей из некатионного синтетического полимера; натурального полисахарида или его производного; натурального белка или его производного; водорастворимой соли; низкомолекулярного соединения, выбранного из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля, глицерина и циклодекстрина; и комбинаций перечисленных соединений.

Один из аспектов относится к способу, в котором на открытой поверхности подложки образуется слой покрытия из функционализированного полимера. К слою покрытия из функционализированного полимера прикрепляется праймер. На слое покрытия из функционализированного полимера формируют водорастворимое защитное покрытие. В некоторых примерах открытая поверхность включает присоединенный к ней линкер (например, силан или производное силана). Согласно некоторым аспектам, способ включает присоединение линкера (например, силана или производного силана) к открытой поверхности. Согласно некоторым аспектам, подложка не является структурированной. Согласно другим аспектам, подложка структурирована, и в результате присоединения образуются функционализированные производными (например, силанизированные) углубления и функционализированные производными (например, силанизированные) промежуточные области.

Согласно одному из аспектов, способ включает: модификацию открытой поверхности подложки с целью введения первой химической группы; реакцию первой химической группы с первой реакционноспособной группой молекулы функционализированного полимера с образованием слоя покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанного с открытой поверхностью подложки; прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера посредством проведения реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера; и образование водорастворимого защитного покрытия на праймере и слое покрытия из функционализированного полимера.

В другом примере способа, рассмотренного в настоящем описании, модификация открытой поверхности включает присоединение линкера (например, силана или производного силана) к открытой поверхности подложки. В некоторых примерах линкер (например, силан или производное силана) включает первую химическую группу. В некоторых примерах линкер представляет собой силан или производное силана. В некоторых примерах модификация открытой поверхности включает плазменное травление. В некоторых примерах модификация включает плазменное травление для получения протравленной под действием плазмы поверхности и присоединение к этой поверхности линкера (например, силана или производного силана).

В некоторых примерах подложка не является структурированной. В некоторых примерах в результате реакции первой химической группы с первой реакционноспособной группой молекулы функционализированного полимера образуется слой покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанный с открытой поверхностью подложки через линкер (например, силан или производное силана). В некоторых примерах после проведения модификации открытой поверхности способ дополнительно включает присоединение крышки к соединительному участку неструктурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий некоторую

часть открытой поверхности.

В других примерах подложка не является структурированной. В некоторых примерах модификация открытой поверхности включает плазменное травление, и после проведения модификации открытой поверхности способ дополнительно включает присоединение крышки к соединительному участку неструктурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий некоторую часть открытой поверхности.

В некоторых примерах подложка представляет собой структурированную подложку (включающую углубления, разделенные промежуточными областями). В некоторых примерах в углублениях формируют слой покрытия из функционализированного полимера, получая функционализированные углубления, и на функционализированных углублениях формируют водорастворимое защитное покрытие. Согласно некоторым аспектам, к углублениям в подложке присоединяют химическую группу, и проточный канал находится в селективном взаимодействии с углублениями. В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие располагают в углублениях и на по меньшей мере части промежуточных областей.

В некоторых примерах структурированная подложка включает линкер (например, силан или производное силана), присоединенный к открытой поверхности. В некоторых примерах линкер присоединен к открытой поверхности углублений, и в некоторых примерах линкер присоединен к открытой поверхности, находящейся в углублениях и промежуточных областях, что приводит к образованию функционализированных производными (например, силанизированных) углублений и функционализированных производными (например, силанизированных) промежуточных областей. В некоторых примерах модификация открытой поверхности включает присоединение линкера (например, силана или производного силана), включающего первую химическую группу, к открытой поверхности, что приводит к образованию функционализированных производными (например, силанизированных) углублений и, необязательно, функционализированных производными (например, силанизированных) промежуточных областей. В некоторых примерах в функционализированных производными (например, силанизированных) углублениях и промежуточных областях в результате реакции образуется слой покрытия из функционализированного полимера. В некоторых примерах перед проведением прививки праймера способ дополнительно включает удаление слоя покрытия из функционализированного полимера из функционализированных производными (например, силанизированных) промежуточных областей. В некоторых примерах удаление производят удалением слоя покрытия из функционализированного полимера с промежуточных областей шлифовкой. Праймер прикрепляется к слою покрытия из функционализированного полимера в функционализированных производными (например, силанизированных) углублениях, что приводит к образованию функционализированных углублений. В некоторых таких примерах праймер присоединяют к слою покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в функционализированных производными (например, силанизированных) углублениях, с помощью прививки, получая, таким образом, функционализированные углубления. На функционализированных углублениях и по меньшей мере части промежуточных областей формируют водорастворимое защитное покрытие. В некоторых примерах при таком формировании на функционализированных углублениях и по меньшей мере некоторой части промежуточных областей получают водорастворимое защитное покрытие. В некоторых примерах после удаления слоя покрытия из функционализированного полимера способ дополнительно включает присоединение

крышки к соединительному участку структурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий силанизированные углубления, на которых имеется покрытие из функционализированного полимера.

Таким образом, в некоторых примерах способ включает присоединение силана или производного силана к поверхности структурированной подложки, включающей углубления, разделенные промежуточными областями, что приводит к образованию силанизированных углублений и силанизированных промежуточных областей; формирование слоя покрытия из функционализированного полимера в силанизированных углублениях и на силанизированных промежуточных областях; удаление слоя покрытия из функционализированного полимера шлифовкой с силанизированных промежуточных областей; прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера, находящегося в силанизированных углублениях, с образованием функционализированных углублений; и образование водорастворимого защитного покрытия на функционализированных углублениях и по меньшей мере части промежуточных областей.

Согласно некоторым аспектам способа, водорастворимое защитное покрытие формируют после закрепления праймера; водорастворимое защитное покрытие структурировано таким образом, что соединительный участок структурированной подложки остается открытым после образования водорастворимого защитного покрытия; и способ дополнительно включает присоединение крышки к соединительному участку структурированной подложки, в результате чего образуется проточный канал, который находится в селективном гидравлическом взаимодействии с по меньшей мере некоторыми функционализированными углублениями.

Согласно другим аспектам способа, после удаления слоя покрытия из функционализированного полимера (например, шлифовкой) с промежуточных областей структурированной подложки и до i) прикрепления праймера и ii) формирования водорастворимого защитного покрытия, способ дополнительно включает: нанесение начального водорастворимого защитного покрытия в виде структуры на слой покрытия из функционализированного полимера таким образом, что соединительный участок структурированной подложки остается открытым; присоединение крышки к соединительному участку структурированной подложки, в результате чего образуется проточный канал, который находится в селективном гидравлическом взаимодействии с по меньшей мере некоторыми углублениями; и удаление начального водорастворимого защитного покрытия.

В некоторых примерах модификация открытой поверхности, реакция первой химической группы с первой реакционноспособной группой, прививка праймера, и/или образование водорастворимого защитного покрытия включают соответствующие этапы элюирования. В некоторых примерах прививка праймера и образование водорастворимого защитного покрытия включают соответствующие этапы элюирования. В некоторых примерах нанесение водорастворимого защитного покрытия включает осаждение элюированием, нанесение покрытия погружением, нанесение покрытия центрифугированием, нанесение покрытия распылением, нанесение покрытия ультразвуковым распылением, нанесение покрытия ножевым устройством, аэрозольную печать или струйную печать.

В некоторых примерах способы дополнительно включают присоединение крышки к соединительному участку подложки проточной ячейки, в результате чего образуется проточный канал, и последующее добавление находящегося на поверхности химического

вещества (например, слоя покрытия из функционализированного полимера и праймера) и нанесение водорастворимого защитного покрытия.

В некоторых примерах после закрепления праймера способ дополнительно включает по меньшей мере частичное удаление водорастворимого защитного покрытия, и анализ с использованием красителя для обнаружения возможного разрушения (например, утраты или потери функции) праймера.

В некоторых примерах, после формирования слоя покрытия из функционализированного полимера и до прививки праймера и образования водорастворимого защитного покрытия, способ дополнительно включает: нанесение начального водорастворимого защитного покрытия в виде структуры на слой покрытия из функционализированного полимера таким образом, что соединительный участок подложки остается открытым; присоединение крышки к соединительному участку подложки, в результате чего образуется проточный канал, который находится в селективном гидравлическом взаимодействии с начальным водорастворимым защитным покрытием; и удаление начального водорастворимого защитного покрытия. В некоторых примерах начальное водорастворимое защитное покрытие наносят распылением или элюированием. В некоторых примерах начальное водорастворимое защитное покрытие и водорастворимое защитное покрытие образованы из одного и того же материала, и в других примерах они получены из различных материалов.

В некоторых примерах образование водорастворимого защитного покрытия включает нанесение водного раствора водорастворимого материала на открытую поверхность подложки. В некоторых примерах водный раствор водорастворимого материала затем сушат на открытой поверхности (например, посредством подогрева, нагревания, испарения, под воздействием вакуума или подобного воздействия). В некоторых примерах водный раствор включает до приблизительно 15% или приблизительно от 1 до 15%, или приблизительно от 1 до 10%, или приблизительно от 1 до 5%, или приблизительно от 2 до 5%, или приблизительно от 4 до 8%, или приблизительно от 5 до 7,5%, или приблизительно 5% или приблизительно 7,5% (масс/об.) водорастворимого материала. В некоторых примерах водный раствор включает приблизительно от 5 до приблизительно 7,5%, или приблизительно 5% или приблизительно 7,5% (масс/об.) водорастворимого материала. В некоторых примерах процентную долю водорастворимого материала в водном растворе регулируют в соответствии с плотностью праймера. В некоторых примерах водный раствор также включает сорастворитель, такой как этанол. В некоторых примерах водный раствор содержит от приблизительно 5 до приблизительно 7,5% или приблизительно 5% или приблизительно 7,5% водорастворимого материала в 10%-ном водном этаноле.

В некоторых примерах способов и проточных ячеек, рассмотренных в настоящем описании, водорастворимое защитное покрытие включает водорастворимый некатионный синтетический полимер; водорастворимый натуральный полисахарид или его производное; водорастворимый натуральный белок или его производное; водорастворимую соль; или водорастворимое низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля, глицерина и циклодекстрина; или комбинацию перечисленных веществ. В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие включает водорастворимый некатионный синтетический полимер. В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие включает:

(а) некатионный синтетический полимер, необязательно включающий полиакриламид,

полиакриловую кислоту или полиакрилат (например, полиакрилат натрия), полиметакриловую кислоту, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиметакриламид, поли-N-алкилакриламид, поли-N-диалкилакриламид, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид, сополимер простого дивинилового эфира и малеинового ангидрида, полифосфат, поли-2-алкил-2-оксазолин, полигидроксиэтилметакрилат, поли-2-гидроксиэтилакрилат, полиэтиленгликоль, полисульфобетаинметакрилат, простой полиэфир (например, простой поливиниловый эфир, полиэтиленгликоль, полиэтиленоксид и подобные вещества), сополимер простого винилового эфира и малеиновой кислоты, полимер, включающий функциональные гидроксильные группы (например, ПЭГ или ПВА), не встречающийся в природе полипептид (например, полиглутаминовую кислоту или ее соль) или кремнийорганический полимер или комбинацию перечисленных веществ, включающую, например, неупорядоченные сополимеры, блок-сополимеры и графтсополимеры, а также их разветвленные аналоги; или

(b) натуральный полисахарид или его производное, необязательно выбранное из группы, состоящей из крахмала, карбоксиметилцеллюлозы, ксантановой камеди, пектина, декстрана, каррагенана, гуаровой камеди, целлюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ, англ. аббревиатура - HPMC от hydroxypropylmethyl cellulose), гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ, англ. аббревиатура - HPC от hydroxypropyl cellulose), гидроксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ, англ. аббревиатура - HEC от hydroxyethyl cellulose), метилцеллюлозы, карбоксиметилгидроксиэтилцеллюлозы (КМГЭЦ, англ. аббревиатура - CMHEC от carboxymethylhydroxyethyl cellulose), гиалуроновой кислоты, фосфата крахмала, гидроксипропилкрахмала, гидроксиэтилкрахмала, агарозы, агара и альгината, а также комбинаций перечисленных соединений; или

(c) натуральный белок или его производное, необязательно выбранное из казеина и альбумина; или

(d) водорастворимую соль, необязательно выбранную из группы, состоящей из натриевой или калиевой соли, представляющей собой хлорид, бромид, сульфат, фосфат, карбонат, ацетат и цитрат, такой как хлорид натрия, бромид натрия, сульфат натрия, фосфат натрия, карбонат натрия, ацетат натрия, цитрат натрия, хлорид калия, бромид калия, сульфат калия, фосфат калия, карбонат калия, ацетат калия, цитрат калия или солевой раствор (т.е. раствор хлорида натрия) цитрата натрия, или комбинацию перечисленных веществ; или

(e) буфер (например, водный раствор слабой кислоты и сопряженного с ней основания), в котором слабая кислота или сопряженное с ней основание необязательно представляет собой солевой раствор цитрата натрия, трис(гидроксиметил)аминометан (например, Трис или основание Трис) необязательно с ЭДТА, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (англ. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, сокращенно HEPES), 3-[[1,3-дигидрокси-2-(гидроксиметил)пропан-2-ил]амино]-2-гидроксипропан-1-сульфоновую кислоту (англ. 3-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]-2-hydroxypropane-1-sulfonic acid, сокращенно TAPSO), N-(2-гидрокси-1,1-бис (гидроксиметил)этил)глицин (трицин), 3-(N-морфолино)пропансульфоновую кислоту (англ. 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, сокращенно MOPS) или 3-(N,N-бис([2-гидроксиэтил]амино)-2-гидроксипропансульфоновую кислоту (англ. 3-(N,N-bis([2-hydroxyethyl]amino)-2-hydroxypropanesulfonic acid, сокращенно DIPSO); или

(f) водорастворимое поверхностно-активное вещество, которое необязательно представляет собой анионное или неионное поверхностно-активное вещество или

которое необязательно представляет собой додецилсульфат натрия, алкилэтоксилат, этоксилированное масло, жир или сульфосукцинат; или

(g) сахар (например, сахарозу), антиоксидант, гликоль, глицерин или циклодекстрин; или

(h) хелатирующее соединение, которое необязательно представляет собой натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил) амин, трис(2-карбоксиэтил)фосфин или динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты; или

(i) комбинацию перечисленных веществ.

Примером подходящего некатионного синтетического полимера является графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля (один из примеров которого включает KOLLICOAT® IR, поставляемый BASF Corp.). Примером подходящего полимера, включающего функциональные гидроксильные группы, является полимер, коммерчески поставляемый BASF Corp. под торговым наименованием KOLLICOAT® IR. Любые водорастворимые некатионные синтетические полимеры, которые включают кислотные группы, могут быть использованы в виде соли щелочного металла.

В некоторых примерах, рассмотренных в настоящем описании, если защитное покрытие наносят после закрепления праймера, то защитное покрытие может состоять из графтсополимера поливинилового спирта/полиэтиленгликоля (например, KOLLICOAT® IR, поставляемый BASF Corp.), сахарозы, декстрана (например, имеющего молекулярную массу 200000 Да), полиакриламида (например, имеющего молекулярную массу 40000 Да, 200000 Да и т.д.), полиэтиленгликоля, натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (т.е. ЭДТА), трис(гидроксиметил)аминометана с этилендиаминтетрауксусной кислотой, трис(2-карбоксиэтил)фосфина, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амина, динатриевой соли батофенантролиндисульфоновой кислоты, полимеров, включающих функциональные гидроксильные группы, глицерина или солевого цитрата натрия. В некоторых других примерах, рассмотренных в настоящем описании, при нанесении защитного покрытия после или во время образования слоя покрытия из функционализированного полимера, материал защитного покрытия может представлять собой графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу, полиакриламид или полиэтиленгликоль. В случае по меньшей мере сахарозы и полиакриламида следует понимать, что слой покрытия из функционализированного полимера должен быть подвергнут отверждению перед нанесением защитного покрытия из этих материалов.

В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие включает некатионный синтетический полимер; натуральный полисахарид или его производное; натуральный белок или его производное; водорастворимую соль; низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля, глицерина или циклодекстрина; или комбинацию перечисленных веществ. В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие включает графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу, декстран, полиакриламид, гликоль, трис(гидроксиметил)аминометан или его соль, этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее соль, трис(2-карбоксиэтил)фосфин, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин или его соль, динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты, полимер, включающий функциональные гидроксильные группы, глицерин или солевой раствор цитрата натрия или смесь

перечисленных веществ. В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие включает графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу или их смесь. В некоторых примерах водорастворимое защитное покрытие включает графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля. В некоторых примерах графтсополимер включает приблизительно 75% поливинилового спирта и приблизительно 25% полиэтиленгликоля.

В некоторых примерах способов или проточных ячеек, рассмотренных в настоящем описании, слой покрытия из функционализированного полимера включает сополимер N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида и акриламида (англ. poly(N-(5-azidoacetamidylpentyl)acrylamide-co-acrylamide, сокращенно PAZAM).

В некоторых примерах способов или проточных ячеек, рассмотренных в настоящем описании, водорастворимое защитное покрытие присутствует на (или нанесено на) проточной ячейке в виде смеси со слоем покрытия из функционализированного полимера. В таких примерах проточная ячейка включает: подложку, включающую открытую поверхность; слой покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанный с открытой поверхностью подложки; праймер, прикрепленный к слою покрытия из функционализированного полимера; и водорастворимое защитное покрытие, смешанное со слоем покрытия из функционализированного полимера. Соответствующие способы включают: модификацию открытой поверхности подложки с целью введения первой химической группы; реакцию первой химической группы со смесью водорастворимого защитного покрытия и молекулой функционализированного полимера, включающей первую реакционноспособную группу, с образованием слоя покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанного с открытой поверхностью подложки и смешанного с водорастворимым защитным покрытием; и прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера посредством проведения реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера. В таких примерах слой покрытия из функционализированного полимера и водорастворимый защитный слой наносят одновременно. В таких примерах слой покрытия из функционализированного полимера подвергают отверждению после нанесения смеси молекулы функционализированного полимера и водорастворимого защитного покрытия. В некоторых примерах смесь содержит от 5% масс. до приблизительно 95% масс. водорастворимого покрытия от массы молекулы функционализированного полимера или от приблизительно 10% масс. до приблизительно 80% масс., или от приблизительно 25% масс., до приблизительно 75% масс., или приблизительно 25% масс., 50% масс., или 75% масс. Водорастворимое защитное покрытие может защищать поверхность при проведении этапа отверждения. В некоторых примерах наносят смесь, включающую предшественник водорастворимого покрытия и молекулу функционализированного полимера. В некоторых примерах смесь дополнительно включает растворитель, такой как этанол. В некоторых примерах предшественником водорастворимого покрытия является KOLLICOAT® IR, и молекула функционализированного полимера представляет собой PAZAM. В одном из примеров нанесение смеси, состоящей из 5% масс./об. KOLLICOAT® IR, 0,25% масс./об. PAZAM и 5% этанола в воде, в этапе нанесения покрытия из функционализированного полимера повышало интенсивность CFR и интенсивность прочтения 1 цикла 1 и позволяло сохранять % пропускания фильтром полученных привитых (закрепленных) праймеров, которые добавляли в концентрациях 0,8, 1,1, 1,5 и 5 мкМ, в отличие от контрольного покрытия (0,25% масс./об. PAZAM и 5% этанола в воде). В некоторых примерах смесь состоит из 5% масс./об. предшественника водорастворимого покрытия (например,

KOLLICOAT® IR), 0,25% масс./об. молекулы функционализированного полимера (например, PAZAM) и 5% этанола. В таких примерах водорастворимое покрытие может оставаться на своем месте при проведении этапа прививки праймера. В случае структурированных подложек водорастворимое покрытие может быть удалено при последующем проведении этапа удаления шлифовкой (в котором применяют водные среды) или при восстановлении влагосодержания проточной ячейки до прививки (во время отверждения покрытие из функционализированного полимера обезвоживается).

В некоторых примерах способов или проточных ячеек, рассмотренных в настоящем описании, химическая группа, закрепленная на открытой поверхности подложки, представляет собой необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный норборненил, необязательно замещенный циклооктинил, необязательно замещенный бициклононинил, необязательно замещенный алкинил, азидогруппу, необязательно замещенный тетразинил, гидразонил, необязательно замещенный тетразолил, формил или гидроксил. В некоторых примерах химическая группа представляет собой норборненил или замещенный норборненил. В некоторых примерах химическая группа ковалентно связана с открытой поверхностью подложки через линкер. Линкер может включать, например, алкилен, этиленгликоль, пропиленгликоль, ацетил, карбонил, ацетамидогруппу, амидогруппу, силан, кремний, простой силиловый эфир или другие разделительные единицы или комбинацию перечисленных единиц. В некоторых примерах линкер включает силан или производное силана, и в настоящем описании он называется силановым линкером. В некоторых примерах силановый линкер включает -$Si(X)_2$-$C_{2-6}$алкил-, где каждый X представляет собой -OH, -O-алкил или производное -O-$SiR_3$ (например, силоксан). В некоторых примерах линкер представляет собой -$Si(OR)_2$-$CH_2$-. В некоторых примерах линкер включает простой силиловый эфир и алкиленовую группу.

В некоторых примерах проточных ячеек или способов, рассмотренных в настоящем описании, первая и вторая реакционноспособные группы независимо представляют собой необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный норборненил, необязательно замещенный циклооктинил, необязательно замещенный бициклононинил, необязательно замещенный алкинил, азидогруппу, необязательно замещенный тетразинил, гидразонил, необязательно замещенный тетразолил, формил или гидроксил. В некоторых примерах первая и вторая реакционноспособные группы одинаковы. В некоторых примерах как первая, так и вторая реакционноспособная группа представляет собой азидогруппу.

В некоторых примерах проточных ячеек или способов, рассмотренных в настоящем описании, праймер модифицирован по одному из концов частицей, подходящей для реакции со второй реакционноспособной группой. Например, праймер включает алкинильную группу, подходящую для реакции со второй реакционноспособной группой.

В некоторых примерах проточных ячеек или способов, рассмотренных в настоящем описании, праймер представляет собой совокупность праймеров, которая включает две популяции функциональных праймеров. В некоторых примерах праймер представляет собой популяцию функциональных праймеров (которая может включать две субпопуляции функциональных праймеров, например, Праймер A и Праймер B) и популяцию нефункциональных праймеров. Согласно некоторым аспектам, праймер включает последовательность праймера. Если применяют две субпопуляции функциональных праймеров, то они включают различные последовательности праймера.

Целевой олигонуклеотид гибридизуется с праймером (через последовательность, комплементарную последовательности праймера), и праймер удлиняется в присутствии полимеразы с образованием комплементарной копии целевого олигонуклеотида, закрепленной на подложке.

Следует понимать, что любые признаки проточных ячеек и способов изготовления проточных ячеек, рассмотренные в настоящем описании, могут быть скомбинированы друг с другом любым желательным образом и/или в любой конфигурации. Кроме того, следует понимать, что любые комбинации признаков любых способов и/или проточных ячеек могут быть применены совместно, и/или что любые признаки любого или всех таких аспектов могут быть скомбинированы с любым из признаков примеров, рассмотренных в настоящем описании.

Примеры осуществления способа, рассмотренного в настоящем описании, включают нанесение защитного покрытия при проведении операций изготовления проточной ячейки. Защитное покрытие может быть нанесено непосредственно на химически и/или биологически активное химическое вещество, находящееся на поверхности (например, на слой покрытия из функционализированного полимера, на праймер), которое было нанесено на подложку. Защитное покрытие может защищать находящееся на поверхности химическое вещество при последующей обработке (например, при сборке, такой как закрепление крышки, при нанесении сетки на многослойную конструкцию и т.д.) и/или во время транспортировки проточной ячейки и/или во время кратковременного и/или долговременного хранения проточной ячейки. В одном из примеров период хранения может составлять до 120 суток или более. В другом примере период хранения может составлять от приблизительно 1 суток до приблизительно 75 суток. В другом примере период хранения может составлять от приблизительно 1 суток до приблизительно 2 лет или может составлять приблизительно 12 месяцев, 18 месяцев или 24 месяца. Несмотря на приведенные примеры, следует понимать, что период хранения может варьироваться от любого момента после нанесения защитного покрытия до предполагаемого момента использования проточной ячейки. Например, защитное покрытие может защищать находящееся на поверхности химическое вещество от химического или физического разрушения, например, защищать от воздействия частиц мусора и/или загрязнений, которые в противном случае могут контактировать с находящимся на поверхности химическим веществом во время присоединения крышки или при проведении сборки. В другом примере защитное покрытие может защищать находящееся на поверхности химическое вещество от царапин или других дефектов, возникающих в процессе обращения, которые могут происходить во время транспортировки. В другом примере защитное покрытие может защищать находящееся на поверхности химическое вещество от воздействия окружающей среды (например, температуры, влажности и т.д.) во время изготовления, транспортировки и/или кратковременного и/или долговременного хранения (например, при температуре, составляющей от приблизительно 4°C до приблизительно 80°C, или в некоторых случаях от более низких температур, составляющих до приблизительно -25°C). Защитное покрытие позволяет поддерживать естественную стабильность находящегося на поверхности химического вещества, что, таким образом, увеличивает срок годности проточной ячейки при хранении, ее стойкость к температурному воздействию, долговечность и стойкость при хранении в обычных условиях. Если стабилизация находящегося на поверхности химического вещества эффективна, то находящееся на поверхности химическое вещество стабильно в течение длительного времени.

Способ (способы), рассмотренный в настоящем описании, может быть полностью

осуществлен на уровне многослойной конструкции ("сэндвича), полностью на уровне заготовки (части многослойной конструкции), частично на уровне многослойной конструкции и/или частично на уровне заготовки. Примером частичного осуществления способа на уровне многослойной конструкции и заготовки является способ, который может быть начат с обработки многослойной конструкции, которую затем расщепляют с образованием нескольких заготовок, и способ может продолжаться обработкой каждой из заготовок. Возможность выполнять обработку открытой многослойной конструкции (например, этапы химической или физической обработки, выполняемые до присоединения крышки), по меньшей мере в некоторых примерах позволяет применять ряд метрологических/аналитических методик с целью контроля качества и получения характеристик. Перед соединением с образованием проточной ячейки структурированная многослойная конструкция/подложка с модифицированной поверхностью может быть исследована, например, с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), эллипсометрии, гониометрии, рефлектометрии и/или флуоресцентных методик. В альтернативном варианте с помощью таких методик может быть исследована собранная проточная ячейка. На уровне заготовки может быть проведена обработка (обработки) заготовки с открытой поверхностью или собранной проточной ячейки (с закрытым проточным каналом).

Следует понимать, что, если не указано иное, то используемые в настоящем описании термины имеют свои обычные значения, известные в соответствующей области техники. Некоторые используемые в настоящем описании термины и их значения приведены ниже.

Формы единственного числа включают множественное число, если из контекста не ясно иное.

Термины "включающий", "содержащий" и различные формы этих терминов синонимичны по отношению друг к другу и имеют одинаково широкое значение.

Термины "верх", "низ", "верхний", "нижний", "на" и т.д. используются в настоящей работе для описания проточной ячейки и/или различных компонентов проточной ячейки. Следует понимать, что такие обозначения направления не относятся к специальной ориентации, а применяются для обозначения ориентации компонентов относительно друг друга. Применение обозначений направления не должно рассматриваться как ограничение примеров, рассмотренных в настоящем описании, какой-либо конкретной ориентацией (ориентациями).

Используемый в настоящем описании термин "алкил" относится к полностью насыщенной (т.е. не содержащей двойных или тройных связей) неразветвленной или разветвленной углеводородной цепочке. Алкильная группа может содержать от 1 до 20 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают метил, этил, пропил, изопропил, бутил, изобутил, третичный бутил, пентил, гексил и подобные группы. Например, обозначение "С1-4 алкил" указывает на то, что в алкильной цепочке содержится от одного до четырех атомов углерода, т.е. алкильная цепочка выбрана из группы, состоящей из метила, этила, пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, втор-бутила и трет-бутила.

Используемый в настоящем описании термин, "алкенил" относится к неразветвленной или разветвленной углеводородной цепочке, содержащей одну или более двойных связей. Алкенильная группа может содержать от 2 до 20 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают этенил, пропенил, бутенил, пентенил, гексенил и подобные группы. Алкенильная группа может быть обозначена, например, "С2-4 алкенил", что

означает, что в алкенильной цепочке содержится от двух до четырех атомов углерода.

Используемый в настоящем описании термин, "алкинил" относится к неразветвленной или разветвленной углеводородной цепочке, содержащей одну или более тройных связей. Алкинильная группа может содержать от 2 до 20 атомов углерода. Алкинильная группа может быть обозначена, например, "C2-4 алкинил", что означает, что в алкинильной цепочке содержится от двух до четырех атомов углерода.

Термин функциональная "аминная" группа (аминогруппа) относится к группе $-NR_aR_b$, в которой каждый из $R_a$ и $R_b$ независимо выбран из водорода, $C_{1-6}$-алкила, $C_{2-6}$-алкенила, $C_{2-6}$-алкинила, $C_{3-7}$-карбоциклила, $C_{6-10}$-арила, 5-10-членного гетероарила и 5-10-членного гетероциклила, определения которых представлены в настоящем описании.

Используемый в настоящем описании термин "арил" относится к ароматическому циклу или системе циклов (т.е. двух или более сконденсированных циклов, которые имеют два общих соседних атомов углерода), которые содержат в основной цепи цикла только атомы углерода. Если арил представляет собой систему циклов, то каждый цикл в системе представляет собой ароматический цикл. Арильная группа может содержать от 6 до 18 атомов углерода, и такая группа может быть обозначена C6-18. Примеры арильных групп включают фенил, нафтил, азуленил и антраценил.

Используемый в настоящем описании термин "присоединенный" означает состояние двух предметов, которые объединены, скреплены, склеены, соединены или связаны друг с другом. Например, нуклеиновая кислота может быть присоединена к слою покрытия из функционализированного полимера ковалентной или нековалентной связью. Ковалентная связь характеризуется обобществлением пары электронов атомами. Нековалентная связь представляет собой физическую связь, которая не включает обобществление пар электронов и может включать, например, водородные связи, ионные связи, ван-дер-Ваальсовы силы, гидрофильные взаимодействия и гидрофобные взаимодействия.

Термин "азид" или функциональная "азидогруппа" означает $-N_3$.

Используемый в настоящем описании термин, "карбоциклил" означает неароматическое циклическое кольцо (цикл) или циклическую систему, содержащую в основной цепи циклической системы только атомы углерода. Если карбоциклил представляет собой систему циклов, то два или более цикла могут быть соединены друг с другом в сконденсированную систему, соединены мостиком или в виде спиро-кольцевой системы. Карбоциклилы могут иметь любую степень насыщения при условии, что по меньшей мере один цикл в системе циклов не является ароматическим. Таким образом, карбоциклилы включают циклоалкилы, циклоалкенилы и циклоалкинилы. Карбоциклильная группа может содержать от 3 до 20 атомов углерода (т.е. C3-20). Пример карбоциклильных колец включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогексенил, 2,3-дигидроинден, бицикло[2,2,2]октанил, адамантил и спиро[4,4]нонанил.

Используемый в настоящем описании термин "карбоновая кислота" или "карбоксил" означает -C(O)OH.

Используемый в настоящем описании термин "циклоалкил" означает полностью насыщенное карбоциклическое кольцо (цикл) или систему циклов. Примеры включают циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

Используемый в настоящем описании термин "циклоалкилен" означает полностью насыщенное карбоциклическое кольцо (цикл) или систему циклов, которая присоединена к остатку молекулы в двух точках присоединения.

Используемый в настоящем описании термин "циклоалкенил" или "циклоалкен" означает карбоциклическое кольцо (цикл) или систему циклов, содержащую по меньшей мере одну двойную связь, причем система циклов не содержит ароматических циклов. Примеры включают циклогексенил или циклогексен и норборнен или норборненил. Также используемый в настоящем описании термин "гетероциклоалкенил" или "гетероциклоалкен" означает карбоциклическое кольцо (цикл) или систему циклов, содержащую в основной цепи цикла по меньшей мере один гетероатом и содержащую по меньшей мере одну двойную связь, причем система циклов не содержит ароматических циклов.

Используемый в настоящем описании термин "циклоалкинил" или "циклоалкин" означает карбоциклическое кольцо (цикл) или систему циклов, содержащую по меньшей мере одну тройную связь, причем система циклов не содержит ароматических циклов. Примером является циклооктин. Другим примером является бициклононин. Также используемый в настоящем описании термин "гетероциклоалкинил" или "гетероциклоалкин" означает карбоциклическое кольцо (цикл) или систему циклов, содержащую в основной цепи цикла по меньшей мере один гетероатом и содержащую по меньшей мере одну тройную связь, причем система циклов не содержит ароматических циклов.

Используемый в настоящем описании термин "осаждение" относится к любой подходящей методике нанесения, которая может быть выполнена вручную или может быть автоматизированной, и приводит к модификации свойств поверхности. Обычно осаждение может быть выполнено с применением методик осаждения из газовой фазы, методик нанесения покрытия, методик прививки или подобных методик. Некоторые конкретные примеры включают химическое осаждение из газовой фазы (ХОГФ, англ. аббревиатура CVD - chemical vapor deposition), нанесение покрытия распылением (например, нанесение покрытия ультразвуковым распылением), нанесение покрытия центрифугированием, нанесение покрытия маканием или погружением, нанесение покрытия ножевым устройством, нанесением раствора, нанесение покрытия элюированием, аэрозольную печать, струйную печать или подобную методику. Согласно некоторым аспектам, водорастворимое защитное покрытие наносят распылением. Согласно другим аспектам, водорастворимое защитное покрытие наносят элюированием.

Используемый в настоящем описании термин "углубление" относится к дискретному (отдельному) вогнутому элементу структурированной подложки, имеющей отверстие на поверхности, которое полностью окружено промежуточной областью (областями) поверхности структурированной подложки. Углубления могут иметь множество различных форм отверстия на поверхности, примеры которых включают круглую, эллиптическую, квадратную, многоугольную, гексагональную, звездчатую форму (с любым количеством лучей) и т.д. Поперечное сечение углубления в плоскости, перпендикулярной поверхности, может быть искривленным, квадратным, многоугольным, гиперболическим, коническим, имеющим углы и т.д. Одним из примеров углубления может быть лунка. Также используемый в настоящем описании термин "функционализированное углубление" относится к дискретному вогнутому элементу, к которому присоединены слой покрытия из функционализированного полимера и праймер (праймеры).

Термин "каждый", используемый в сочетании с набором предметов, предназначен для идентификации индивидуального предмета набора, но не обязательно относится к каждому предмету в наборе. Исключениями могут быть прямые контекстные указания

или, если из контекста ясно вытекает иное.

Используемый в настоящем описании термин "проточная ячейка" означает емкость, имеющую камеру (т.е. проточный канал), в которой может быть проведена реакция, впускное отверстие для подачи в камеру реагента (реагентов) и выпускное отверстие для удаления реагента (реагентов) из камеры. В некоторых примерах реакция, протекающая в камере, может быть обнаружена. Например, камера может включать одну или более прозрачных поверхностей, которые позволяют производить в камере оптическое обнаружение матриц (биочипов), оптически меченых молекул или подобных объектов.

Используемый в настоящем описании термин "проточный канал" может представлять собой область, сформированную между двумя соединенными компонентами, в которую может селективно помещен жидкостной образец. В некоторых примерах проточный канал может быть сформирован между структурированной подложкой и крышкой, и, таким образом, он может находиться в гидравлическом взаимодействии с одним или более углублениями, сформованными в структурированной подложке. В других примерах проточный канал может быть сформирован между неструктурированной подложкой и крышкой.

В настоящем описании термин "слой покрытия из функционализированного полимера" относится к полужесткому материалу, который проницаем для жидкостей и газов. Слой покрытия из функционализированного полимера может состоять из гидрогеля, который может набухать при впитывании жидкости (например, воды) и сжиматься при удалении жидкости посредством сушки. Обычно, несмотря на то, что гидрогель может поглощать воду, он нерастворим в воде. В одном из примеров слой покрытия из функционализированного полимера состоит из сополимера N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида и акриламида (PAZAM). Слой покрытия из функционализированного полимера также может включать другие молекулы, которые включают одну или более функциональных групп, выбранных из группы, состоящей из необязательно замещенного алкенила, азида/азидогруппы, необязательно замещенной аминогруппы, карбоксила, необязательно замещенного гидразона, необязательно замещенного гидразина, гидроксила, необязательно замещенного тетразола, необязательно замещенного тетразина, нитрилоксида, нитрона или тиола. Согласно некоторым аспектам, функциональные группы представляют собой реакционноспособные группы, которые применяют для прикрепления слоя покрытия из функционализированного полимера к поверхности подложки и/или праймеру посредством образования ковалентных связей между этими компонентами.

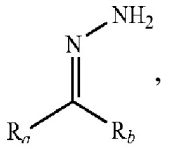
Используемый в настоящем описании термин "гетероарил" относится к ароматическому циклу или системе циклов (т.е. двум или более сконденсированным циклам, имеющим два общих соседних атома), которые содержат один или более гетероатомов, то есть элемент, отличный от углерода, и неограничивающие примеры гетероарилов включают в основной цепи цикла азот, кислород и серу. Если гетероарил представляет собой систему циклов, то каждый цикл в системе является ароматическим. Гетероарильная группа может содержать от 5 до 18 членов цикла.

Используемый в настоящем описании термин "гетероциклил" означает неароматическое циклическое кольцо (цикл) или систему циклов, содержащую по меньшей мере один гетероатом в основной цепи цикла. Гетероциклилы могут быть соединены друг с другом в сконденсированную систему, соединены мостиком или в виде спиро-кольцевой системы. Гетероциклилы могут иметь любую степень насыщения при условии, что по меньшей мере один цикл в системе циклов не является

ароматическим. В системе циклов гетероатом (гетероатомы) может присутствовать в неароматическом или ароматическом цикле. Гетероциклильная группа может содержать от 3 до 20 членов цикла (т.е. количество атомов, составляющих основную цепь цикла, включая атомы углерода и гетероатомы). Гетероциклильная группа может быть обозначена как "3-6-членный гетероциклил" или аналогичными обозначениями. В некоторых примерах гетероатом (гетероатомы) представляет собой O, N или S.

Используемый в настоящем описании термин "гидразин" или "гидразинил" относится к группе -NHNH2.

Используемый в настоящем описании термин "гидразон" или "гидразонил" относится к группе



в которой $R_a$ и $R_b$ имеют значения, приведенные в настоящем описании.

Используемый в настоящем описании термин "гидрокси" или "гидроксил" относится к группе -OH.

Используемый в настоящем описании термин "промежуточная область" относится к области в подложке или на поверхности, которая разделяет углубления. Например, промежуточная область может отделять один элемент матрицы от другого элемента матрицы. Два отделенных друг от друга элемента могут быть дискретными, т.е. не имеющими физического контакта друг с другом. В другом примере промежуточная область может отделять первую часть элемента от второй части элемента. В различных примерах промежуточная область непрерывна, в то время как элементы дискретны, например, как в случае совокупности лунок, ограниченных в остальном непрерывной поверхностью. Разделение, обеспечиваемое промежуточными областями, может быть частичным или полным разделением. Промежуточные области могут иметь поверхностный материал, который отличается от поверхностного материала элементов, сформированных в поверхности. Например, элементы матрицы (биочипа) могут включать количество или концентрацию слоя покрытия и праймера (праймеров), которая превышает их количество или концентрацию в промежуточных областях. В некоторых примерах в промежуточных областях слой покрытия и праймер (праймеры) могут отсутствовать.

Используемый в настоящем описании термин "нитрилоксид" означает группу "$R_aC{=}N^+O^-$", в которой Ra имеет определение, рассмотренное в настоящем описании. Примеры получения нитрилоксида включают генерацию in situ из альдоксимов под действием хлорамида-Т или при действии основания на имидоилхлориды [RC(Cl)=NOH].

Используемый в настоящем описании термин "нитрон" означает группу "$R_aR_bC{=}NR_c{+}O^-$", в которой $R_a$ и $R_b$ имеют значения, рассмотренные в настоящем описании, и $R_c$ выбран из $C_{1\text{-}6}$-алкила, $C_{2\text{-}6}$-алкенила, $C_{2\text{-}6}$-алкинила, $C_{3\text{-}7}$-карбоциклила, $C_{6\text{-}10}$-арила, 5-10-членного гетероарила и 5-10-членного гетероциклила, которые имеют значения, рассмотренные в настоящем описании.

Используемый в настоящем описании термин "нуклеотид" включает азотсодержащее гетероциклическое основание, сахар и одну или более фосфатных групп. Нуклеотиды представляют собой мономерные единицы последовательности нуклеиновой кислоты. В РНК сахар представляет собой рибозу, и в ДНК сахар представляет собой

дезоксирибозу, т.е. сахар, не имеющий гидроксильной группы, которая присутствует в положении 2' рибозы. Азотсодержащее гетероциклическое основание (т.е. нуклеиновое основание) может представлять собой пуриновое основание или пиримидиновое основание. Пуриновые основания включают аденин (A) и гуанин (G) и их модифицированные производные или аналоги. Пиримидиновые основания включают цитозин (C), тимин (T) и урацил (U) и их модифицированные производные или аналоги. Атом C-1 дезоксирибозы связан с N-1 пиримидна или N-9 пурина.

Используемый в настоящем описании термин "обработка открытой многослойной конструкции" относится к серии последовательных способов, применяемых для модификации поверхности подложки многослойной конструкции с использованием химического вещества, наносимого на поверхность, и защитного покрытия, до начала какой-либо операции сборки (например, соединения).

Термин "подложка проточной ячейки" или "подложка" относится к подложке, на которую может быть нанесено находящееся на поверхности химическое вещество. Термин "структурированная подложка" относится к подложке, в которой или на которой сформованы углубления. Термин "неструктурированная подложка" относится к по существу плоской подложке. Подложка может представлять собой многослойную конструкцию, панель, прямоугольный лист, заготовку или любую другую подходящую конфигурацию. Обычно подложка жесткая и нерастворима в водной жидкости. Подложка может быть инертной по отношению к химическому веществу, которое применяют для модификации углублений. Например, подложка может быть инертной по отношению к химическому веществу, применяемому для образования слоя покрытия из функционализированного полимера, для образования защитного покрытия, для закрепления праймера (праймеров) на слое покрытия из функционализированного полимера и т.д. Примеры подходящих материалов подложек включают эпоксисилоксан, комплементарные металл-оксидные полупроводники (КМОП, англ. аббревиатура - CMOS, complementary metal-oxide semiconductor), силсесквиоксан (например, многогранные силсесквиоксаны или POSS материалы (от англ. polyhedral silsesquioxanes)), стекло (такое как стекло EAGLE XG®, поставляемое Corning) и модифицированное или функционализированное стекло, полимеры (включающие акриловые полимеры, полистирол и сополимеры стирола и других материалов, полипропилен, полиэтилен, полибутилен, полиуретаны, политетрафторэтилен (такой как TEFLON®, поставляемый Chemours), циклические олефины/циклоолефиновые полимеры (англ. cycloolefin polymer, сокращенно COP) (такие как ZEONOR®, поставляемый Zeon), полиимиды и т.д.), нейлон, керамические материалы/керамические оксиды, оксид кремния, плавленый оксид кремния или материалы на основе оксида кремния, силикат алюминия, кремний и модифицированный кремний (например, легированный бором p+ кремний), нитрид кремния ($Si_3N_4$), оксид кремния ($SiO_2$), пентоксид тантала ($TaO_5$) или другой оксид (оксиды) тантала ($TaO_x$), оксид гафния ($HaO_2$), углерод, металлы, неорганические стекла или подобные материалы. Подложка также может состоять из стекла или кремния, на поверхности которого имеется слой покрытия из оксида тантала или другого керамического оксида. Подложка может быть жесткой или гибкой.

Используемый в настоящем описании термин "плазменное травление" относится к способу удаления органического вещества с подложки кислородной плазмой. Продукты, получаемые при плазменном травлении, могут быть удалены с помощью вакуумного насоса/вакуумной системы. Плазменное травление может активировать подложку посредством введения реакционноспособных гидроксильных групп. Согласно некоторым аспектам, к гидроксильным группам затем могут быть присоединены

линкерные группы.

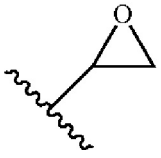
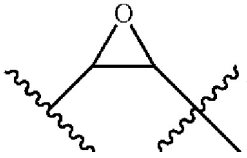
Используемый в настоящем описании термин "праймер" означает одноцепочечную последовательность нуклеиновой кислоты (например, одноцепочечную ДНК или одноцепочечную РНК), которая служит начальной точкой для синтеза ДНК или РНК. Конец 5' праймера может быть модифицирован для проведения реакции присоединения к слою покрытия из функционализированного полимера. Согласно некоторым аспектам, конец 5' праймера модифицирован алкинной группой. Длина праймера может составлять любое количество оснований, и праймер может включать различные не встречающиеся в природе нуклеотиды. В одном из примеров праймер секвенирования представляет собой короткую цепочку, включающую, например, от 20 до 40 оснований. Согласно некоторым аспектам, праймер наносят на подложку в растворе с концентрацией (далее называемой "плотностью праймера"), составляющей приблизительно от 5 до 50 мкМ или приблизительно от 10 до 40 мкМ, или приблизительно от 15 до 30 мкМ. Используемый в настоящем описании термин "плотность праймера" не является мерой количества привитых к поверхности праймеров, но является плотностью, выведенной на основании концентрации праймера в прививочной смеси. Согласно некоторым аспектам, плотность праймера составляет от приблизительно 1 до приблизительно 20 мкМ (праймеры прививают на поверхность, используя раствор праймера концентрацией 1-20 мкМ). Согласно некоторым аспектам, праймер представляет собой смесь функционального праймера (который может служить начальной точкой для синтеза олигонуклеотида) и нефункционального праймера. Нефункциональные праймеры представляют собой олигонуклеотиды, которые не функционируют как праймеры, такие как усеченные последовательности праймера или короткие олигонуклеотидные последовательности, имеющие подходящие для обнаружения, необязательно отщепляемые метки. Нефункциональные праймеры позволяют осуществлять независимый (отдельный) контроль всей плотности олигонуклеотида/праймера, а также функциональной плотности праймера на подложке, где они закреплены. В некоторых примерах плотность праймера составляет 12 мкМ праймера и 6 мкМ нефункционального праймера (например, олигонуклеотида с присоединенным к нему индикатором для контроля качества). В некоторых примерах общая плотность праймера составляет приблизительно 18 мкМ. В некоторых примерах общая плотность праймера составляет приблизительно 22 мкМ. Количество привитых к поверхности праймеров может составлять от приблизительно 10000 до приблизительно 50000 или приблизительно 25000 праймеров на квадратный микрометр.

Используемый в настоящем описании термин "защитное покрытие" относится к водорастворимому материалу в виде твердого вещества (например, тонкой пленки), жидкости или геля, нанесенного на находящееся на поверхности химическое вещество, например, в углублении структурированной подложки или в области (областях) проточного канала по меньшей мере по существу плоской подложки (т.е. неструктурированной подложки). Защитное покрытие может состоять из любого водорастворимого материала, который не оказывает негативного влияния на нижележащее находящееся на поверхности химическое вещество или подложку и служит для защиты и/или сохранности функциональности находящегося на поверхности химического вещества. Водорастворимое защитное покрытие по определению отличается от гидрогеля, поскольку защитное покрытие растворяется под действием воды и может быть смыто при таком воздействии, в то время как гидрогель нерастворим в воде. Например, защитное покрытие может набухать, закрывая функционализированный слой, и по меньшей мере по существу предотвращает

возможные негативные изменения слоя во время обработки и/или транспортировки и/или выдержки устройства. В другом примере защитное покрытие может сохранять доступность праймера и по меньшей мере по существу предотвращать разрушение функционализированного слоя.

Несмотря на то, что выше были предоставлены некоторые примеры, следует понимать, что для образования защитного покрытия могут быть применены другие водорастворимые некатионные синтетические полимеры и небольшие молекулы при условии, что выбранный материал не оказывает негативного влияния на нижележащее химическое вещество, находящееся на поверхности, или подложку. Кроме того, также может быть полезно выбирать материал, который может быть легко удален, который не мешает проведению последующей обработки (обработок) (например, присоединения праймера, промывки и т.д.) и/или не мешает последующему проведению секвенирования. В одном из примеров защитное покрытие не является аутофлуоресцентным материалом.

В одном из примеров толщина или глубина водорастворимого защитного покрытия составляет по меньшей мере приблизительно 25 нм. В одном из примеров толщина или глубина водорастворимого защитного покрытия составляет от приблизительно 50 нм до приблизительно 100 нм. В другом примере толщина или глубина водорастворимого защитного покрытия составляет от приблизительно 1 мкм до приблизительно 15 мкм. В другом примере толщина или глубина водорастворимого защитного покрытия составляет от приблизительно 1,5 мкм до приблизительно 12 мкм. Верхний предел толщины может зависеть, по меньшей мере частично, от архитектуры и размеров образующихся проточного канала и проточной ячейки. В одном из примеров верхний предел диапазона толщины может составлять от приблизительно 10 мкм до приблизительно 15 мкм.

Используемые в настоящем описании термины "силан" и "производное силана" относятся к органическому или неорганическому соединению, содержащему один или более атомов кремния. Примером неорганического силана является $SiH_4$ или галогенированный $SiH_4$, в котором водород замещен одним или более атомами галогена. Примером органического силана является $X\text{-}R^B\text{-}Si(OR^C)_3$, в котором X представляет собой негидролизуемую органическую группу, такую как аминогруппа, винил, эпокси  или , метакрилат, сера, алкил, алкенил, алкинил; $R^B$ представляет собой спейсер, например $-(CH_2)_n-$, где т составляет от 0 до 1000; $R^C$ выбран из водорода, необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного алкинила, необязательно замещенного карбоциклила, необязательно замещенного арила, необязательно замещенного 5-10-членного гетероарила и необязательно замещенного 5-10-членного гетероциклила, определения которых представлены в настоящем описании. Используемые в настоящем описании термины "силан" и "производное силана" могут включать смеси различных силанов и/или производных силана.

В некоторых примерах силан или производное силана включает ненасыщенный фрагмент, который может реагировать с функциональной группой слоя покрытия из функционализированного полимера. Используемый в настоящем описании термин "ненасыщенный фрагмент" относится к химической группе, которая включает циклоалкены, циклоалкины, гетероциклоалкены, гетероциклоалкины или их

необязательно замещенные варианты, включающие по меньшей мере одну двойную связь или одну тройную связь. Ненасыщенные фрагменты могут быть одновалентными или двухвалентными. Если ненасыщенный фрагмент одновалентен, то циклоалкены, циклоалкины, гетероциклоалкены и гетероциклоалкины применяют взаимозаменяемо с циклоалкенилами, циклоалкинилами, гетероциклоалкенилами и гетероциклоалкинилами, соответственно. Если ненасыщенный фрагмент двухвалентен, то циклоалкен, циклоалкин, гетероциклоалкен и гетероциклоалкин применяют взаимозаменяемо с циклоалкениленом, циклоалкиниленом, гетероциклоалкениленом и гетероциклоалкиниленом, соответственно.

Ненасыщенный фрагмент может быть ковалентно присоединен либо непосредственно к атомам кремния силана или производного силана, либо присоединен опосредованно через линкеры. Примеры подходящих линкеров включают необязательно замещенные алкилены (т.е. двухвалентные насыщенные алифатические радикалы (такие как этилен), которые можно рассматривать как полученные из алкена при раскрытии двойной связи или из алкана удалением двух атомов водорода у разных атомов углерода), замещенные полиэтиленгликоли или подобные соединения.

Используемый в настоящем описании термин "разделительный слой относится к материалу, который связывает друг с другом два компонента. В некоторых примерах разделительный слой может состоять из материала, способного поглощать излучение, который способствует образованию связи, или может контактировать с материалом, способным поглощать излучение, который способствует образованию связи.

Используемый в настоящем описании термин "находящееся (располагаемое) на поверхности химическое вещество" относится к химически и/или биологически активному компоненту (компонентам), который включен в камеру проточной ячейки. Примеры находящегося на поверхности химического вещества согласно настоящему изобретению включают слой покрытия из функционализированного полимера, присоединенный к по меньшей мере части поверхности подложки, и/или и праймер (праймеры), присоединенный к по меньшей мере части слоя покрытия из функционализированного полимера.

Функциональная "тиольная" группа означает -SH.

Используемые в настоящем описании термины "тетразин" и "тетразинил" означают шестичленную гетероарильную группу, включающую четыре атома азота. Тетразин может быть необязательно замещен.

Используемый в настоящем описании термин "тетразол" означает пятичленную гетероциклическую группу, включающую четыре атома азота. Тетразол может быть необязательно замещен.

Используемый в настоящем описании термин "способ YES" относится к способу химического осаждения из газовой фазы, разработанному Illumina, Inc., в котором применяют устройство для химического осаждения из газовой фазы, предоставляемое Yield Engineering Systems (сокращенно "YES"). Устройство включает три различные системы осаждения из газовой фазы. Автоматизированная система YES-VertaCoat для нанесения покрытия из паров силана предназначена для серийного выпуска и снабжена гибким модулем для манипулирования многослойными конструкциями, подходящим для работы с многослойными конструкциями размером 200 мм или 300 мм. Система YES-1224P для нанесения покрытия из паров силана с ручной загрузкой предназначена для универсального серийного выпуска и снабжена камерами большой емкости с изменяемой конфигурацией. Система Yes-LabKote представляет собой экономичную настольную версию, идеально подходящую для анализа применимости и для проведения

исследований.

Аспекты и примеры, представленные в настоящем описании и раскрытые в пунктах формулы изобретения, следует рассматривать в свете приведенных выше определений.

Примеры проточных ячеек, включающих защитное покрытие, и способов их изготовления и применения раскрыты ниже со ссылками на прилагаемые графические материалы.

Пример способа 100 представлен на Фиг. 1. Способ 100 включает добавление располагаемого на поверхности химического вещества к части подложки (как указано позицией 102) и нанесение водорастворимого защитного покрытия по меньшей мере на находящееся на поверхности химическое вещество (как указано позицией 104). В одном из примеров способ 100 включает добавление располагаемого на поверхности химического вещества к части подложки проточной ячейки, причем располагаемое на поверхности химическое вещество представляет собой праймер секвенирования, или слой покрытия из функционализированного полимера для прикрепления праймера секвенирования, или праймер секвенирования и слой покрытия из функционализированного полимера; и нанесение водорастворимого защитного покрытия на по меньшей мере находящееся на поверхности химическое вещество. Два примера способа 100 представлены на Фиг. 2, обозначенные как способы 100' и 100".

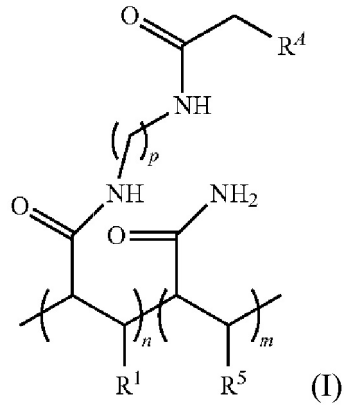
Способы 100', 100" могут включать работу со структурированной подложкой, указанной позицией 101 на Фиг. 2, или с неструктурированной подложкой. Другой пример способа 100, включающего работу с неструктурированной подложкой 12', дополнительно раскрыт со ссылками на Фиг. 6A-6E. Структурированная подложка может представлять собой структурированную многослойную конструкцию или структурированную заготовку или любую из других структурированных подложек, рассмотренных в настоящем описании. Может быть применен любой пример подложки, рассмотренный в настоящем описании. Структурированная подложка (указанная на Фиг. 3 позицией 12) включает углубления, сформированные на или в открытом слое или поверхности подложки, и промежуточные области, разделяющие соседние углубления. Углубления могут быть сформированы в или на подложке с помощью множества разнообразных методик, примеры которых включают фотолитографию, наноимпринтную литографию, методики штамповки, методики тиснения, методики формования, методики микротравления, методики печати и т.д. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что тип применяемой методики зависит от состава и формы подложки. Может быть применено множество различных методики создания углублений, как показано ниже при рассмотрении Фиг. 5A.

Несмотря на то, что это не показано на Фиг. 2, до проведения этапа добавления располагаемого на поверхности химического вещества каждый из способов 100', 100" может включать очистку структурированной подложки и/или другой способ подготовки поверхности (например, углублений и в некоторых случаях соседних промежуточных областей) структурированной подложки для последующего осаждения химического вещества на поверхность. Примеры способов очистки и подготовки поверхности дополнительно рассмотрены ниже при описании Фиг. 4 и 5A-5L.

В одном из примеров осуществления способа 100' находящееся на поверхности химическое вещество может представлять собой как слой покрытия из функционализированного полимера, так и праймер (праймеры), и может быть применено одно защитное покрытие. В этом примере добавление находящегося на поверхности химического вещества включает формирование слоя покрытия из функционализированного полимера в углублении (углублениях) (позиция 102') и

прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера (позиция 102"), и водорастворимое защитное покрытие формируют после закрепления праймера (позиция 104').

Этап способа 100', обозначенный 102', состоит в формировании слоя покрытия из функционализированного полимера. Пример слоя покрытия из функционализированного полимера включает повторяющееся звено, имеющее формулу (I):



(I)

в которой:

$R^1$ представляет собой H или необязательно замещенный алкил;

$R^A$ выбран из группы, состоящей из азидогруппы, необязательно замещенной аминогруппы, необязательно замещенного алкенила, необязательно замещенного гидразона, необязательно замещенного гидразина, карбоксила, гидрокси, необязательно замещенного тетразола, необязательно замещенного тетразина, нитрилоксида, нитрона и тиола;

$R^5$ выбран из группы, состоящей из H и необязательно замещенного алкила;

каждый из фрагментов $-(CH_2)_p-$ может быть необязательно замещен;

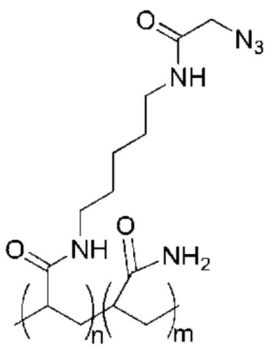
p представляет собой целое число, составляющее от 1 до 50;

n представляет собой целое число, составляющее от 1 до 50000; и

m представляет собой целое число, составляющее от 1 до 100000.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что в структуре, имеющей формулу (I), субъединицы "n" и "m" представляют собой повторяющиеся субъединицы, которые присутствуют в случайном порядке во всей структуре полимера.

Конкретным примером слоя покрытия из функционализированного полимера является слой из сополимера N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида и акриламида, PAZAM (см. например, опубликованные патентные заявки US 2014/0079923 A1 или US 2015/0005447 A1, содержание каждой из которых полностью включено в настоящую работу посредством ссылки), который включает структуру, показанную ниже:



где n представляет собой целое число, составляющее от 1 до 20000, и m представляет собой целое число, составляющее от 1 до 100000. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что, как и в формуле (I), субъединицы "n" и "m" являются повторяющимися звеньями, которые присутствуют в случайном порядке во всей структуре полимера.

Молекулярная масса полимера, имеющего формулу (I), или PAZAM может составлять от приблизительно 10 кДа до приблизительно 1500 кДа, или в одном из конкретных примеров она может составлять приблизительно 312 кДа.

В некоторых примерах полимер, имеющий формулу (I), или PAZAM представляет собой линейный (неразветвленный) полимер. В некоторых других примерах полимер, имеющий формулу (I), или PAZAM представляет собой полимер, включающий небольшое количество поперечных сшивок. В других примерах полимер, имеющий формулу (I), или PAZAM имеет разветвления.

Другие примеры подходящих полимерных материалов включают материалы, имеющие коллоидную структуру, такие как агароза; или полимерную сетчатую структуру, такие как желатин; или поперечно-сшитую полимерную структуру, такие как полиакриламидные полимеры и сополимеры, не содержащий силана акриламид (англ. silane free acrylamide, сокращенно SFA, см., например, опубликованную патентную заявку US 2011/0059865, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки) или азидолизированый вариант SFA. Примеры подходящих полиакриламидных полимеров могут быть получены из акриламида и акриловой кислоты или акриловой кислоты, содержащей винильную группу, рассмотренной, например, в документе WO 2000/031148 (содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки) или из мономеров, которые вступают в реакции [2+2] фотоциклоприсоединения, например, которые рассмотрены в документах WO 2001/001143 или WO 2003/0014392 (содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Другими подходящими полимерами являются сополимеры SFA и SFA, функционализированного бромацетамидной группой (например, BRAPA), или сополимеры SFA и SFA, функционализированного азидоацетамидной группой.

Следует понимать, что для образования слоя покрытия из функционализированного полимера могут быть использованы другие функционализированные молекулы, при условии, что их функционализация позволяет им взаимодействовать со структурированной подложкой и наносимому впоследствии праймеру (праймерам). Другие примеры подходящих молекул для формирования слоя покрытия из функционализированного полимера включают вещества, имеющие коллоидную структуру, такие как агароза, или полимерную сетчатую структуру, такие как желатин, или поперечно-сшитую полимерную структуру, такие как полиакриламидные полимеры и сополимеры, не содержащий силана акриламид (SFA) или азидолизированый вариант SFA. Примеры подходящих полиакриламидных полимеров могут быть синтезированы из акриламида и акриловой кислоты или акриловой кислоты, содержащей винильную группу, или из мономеров, способных вступать в реакции [2+2] фотоциклоприсоединения.

Молекула функционализированного полимера (например, PAZAM) может быть размещена на поверхности структурированной подложки посредством нанесения покрытия центрифугированием или нанесения покрытия погружением или маканием, или посредством пропускания потока функционализированных молекул при положительном или отрицательном давлении или с помощью других подходящих методик. Функционализированная молекула может присутствовать в растворе. В одном

из примеров раствор включает PAZAM в смеси этанола и воды. Согласно некоторым аспектам, молекулу функционализированного полимера наносят на подложку до завершения полимеризации, и на поверхности подложки выполняют полимеризацию с образованием покрытия.

После нанесения покрытия функционализированные молекулы также могут быть подвергнуты отверждению с образованием слоя покрытия из функционализированного полимера по всей структурированной подложке (т.е. на поверхности углубления (углублений) и промежуточной области (областей)). В одном из примеров отверждение функционализированных молекул может быть проведено при температуре, составляющей от комнатной температуры (например, приблизительно 25°C) до приблизительно 60°C, в течение времени, составляющего от приблизительно 5 минут до приблизительно 2 часов. В некоторых случаях слой покрытия из функционализированного полимера подвергают отверждению до нанесения защитного покрытия.

Для получения слоя покрытия из функционализированного полимера в углублении (углублениях), но не на промежуточной области (областях) структурированной подложки, слой покрытия из функционализированного полимера может быть удален шлифовкой с промежуточных областей с помощью i) щелочной водной суспензии, имеющей pH от приблизительно 7,5 до приблизительно 11 и включающей абразивные частицы, или ii) шлифовальной пластины и раствора, не содержащего абразивных частиц.

В этом примере способа 100' праймер прививают на слой покрытия из функционализированного полимера, остающийся в углублении (углублениях), в этапе присоединении праймера, имеющем позиция 102". Примеры подходящих праймеров включают праймеры прямой амплификации или праймеры обратной амплификации. Специфические примеры подходящих праймеров включают праймеры P5 или P7, которые закрепляют на поверхности коммерческих проточных ячеек, коммерчески предоставляемых Illumina Inc. для секвенирования на платформах HiSeq™, HiSeqX™, MiSeq™, MiSeqX™, NextSeq™, NovaSeq™, Genome Analyzer™ и других устройствах.

Прививка может быть произведена нанесением покрытия маканием, нанесением покрытия распылением, распределением раствора или другим подходящим способом, с помощью которого праймер (праймеры) может быть прикреплен к слою покрытия из функционализированного полимера в по меньшей мере некоторых углублениях. В каждой из этих методик могут быть использованы раствор или смесь праймера, которые могут включать праймер (праймеры), воду, буфер и катализатор.

Нанесение покрытия маканием может включать погружение структурированной подложки (имеющей слой покрытия из функционализированного полимера в углублении (углублениях)) в серию ванн с регулируемой температурой. В ваннах также может быть установлен контроль потока и/или они могут быть закрыты азотной подушкой (находиться в атмосфере азота). Ванны могут содержать раствор или смесь праймера. При прохождении различных ванн праймер (праймеры) закрепляется на слое покрытия из функционализированного полимера в по меньшей мере некотором углублении (некоторых углублениях). В одном из примеров структурированную подложку с обработанным шлифовкой покрытием вводят в первую ванну, содержащую раствор или смесь праймера, в которой протекает реакция присоединения праймера (праймеров), после чего структурированную подложку перемещают в следующие ванны для промывки. Структурированная подложка может быть перемещена от ванны к ванне механическим манипулятором или вручную. Система сушки также может быть

применена при нанесении покрытия маканием.

Нанесение покрытия распылением может быть выполнено распылением раствора или смеси праймера непосредственно на структурированную подложку с обработанным шлифовкой покрытием. Многослойная конструкция с нанесенным распылением покрытием может быть подвергнута инкубации в течение времени, составляющего от приблизительно 4 минут до приблизительно 60 минут, при температуре, составляющей от приблизительно 0°C до приблизительно 70°C. После инкубации раствор или смесь праймера могут быть разбавлены и удалены с помощью, например, устройства для нанесения растворов центрифугированием.

Распределение раствора может быть выполнено наливом и центрифугированием и, таким образом, оно может быть выполнено с помощью устройства для нанесения растворов центрифугированием. Раствор или смесь праймера может быть нанесена (вручную или автоматизированным способом) на структурированную подложку с обработанным шлифовкой покрытием. Нанесенный раствор или смесь праймера может быть нанесена на или распределена по всей поверхности структурированной подложки, имеющей покрытие, обработанное шлифовкой. Структурированная подложка с покрытием, содержащим праймер, может быть подвергнута инкубации в течение времени, составляющего от приблизительно 2 минут до приблизительно 60, минут при температуре, составляющей от приблизительно 0°C до приблизительно 80°C. После инкубации раствор или смесь праймера могут быть разбавлены и удалены с помощью, например, устройства для нанесения растворов центрифугированием.

В одном из примеров, после того, как праймер прикрепляется к слою покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в углублении (углублениях), этот пример способа 100' дополнительно включает нанесение водорастворимого защитного покрытия на находящееся на поверхности химическое вещество и на по меньшей мере часть подложки (показано как этап образования защитного покрытия, который имеет позиция 104'). В другом примере раствор или смесь праймера может включать водорастворимый пленкообразующий материал, который образует защитное покрытие, в результате чего может происходить одновременное закрепление праймера и образование защитного покрытия.

Если прививку праймера и образование защитного покрытия выполняют по отдельности, то водорастворимое защитное покрытие может быть селективно осаждено или нанесено в структурированном виде таким образом, чтобы оно закрывало находящееся на поверхности химическое вещество (в этом примере слой функционализированного покрытия и имеющийся на нем праймер (праймеры)), а соединительный участок структурированной подложки оставался открытым. Соединительный участок структурированной подложки обычно расположен на некоторой промежуточной области (областях) структурированной подложки там, где крышку соединяют со структурированной подложкой. Если структурированная подложка представляет собой многослойную конструкцию, то соединительный участок может определять границы нескольких проточных ячеек, которые образуются многослойной конструкцией. Если структурированная подложка представляет собой заготовку, то соединительный участок может определять внешние границы одной образующейся проточной ячейки. Следует понимать, что водорастворимое защитное покрытие может быть нанесено на другую часть (части) структурированной подложки, которая не является частью соединительного участка.

В этом примере способа 100' селективное осаждение или структурирование водорастворимого защитного покрытия может быть выполнено нанесением покрытия

погружением, нанесением покрытия центрифугированием, нанесением покрытия распылением, нанесением покрытия ультразвуковым распылением, нанесением покрытия ножевым устройством, аэрозольной печатью или струйной печатью. Для того, чтобы водорастворимое защитное покрытие не было нанесено на соединительный участок, соединительный участок структурированной подложки может быть закрыт экраном (маской).

В каждом из примеров методик селективного осаждения или нанесения структуры водорастворимого защитного покрытия может быть использован водный раствор, который может включать воду и до приблизительно 15% (масс./об.) водорастворимого материала. В некоторых примерах водорастворимый материал составляет 15% или менее водного раствора. В других примерах водный раствор включает от приблизительно 2% до приблизительно 13% водорастворимого материала или от приблизительно 2,5% до приблизительно 10% водорастворимого материала. Следует понимать, что, в зависимости от архитектуры проточной ячейки (например, размеров проточного канала, впускных и выпускных отверстий и т.д.), концентрация водного раствора может быть различной. Например, если применяют осаждение элюированием, то может быть выбрана такая концентрация, чтобы водный раствор мог протекать через проточную ячейку, не засоряя отверстие (отверстия), проточный канал и т.д. Тем не менее, концентрация также может превышать приблизительно 15%. Для достижения требуемой толщины нижний предел концентрации может составлять приблизительно 2% масс, (масс./об.). Водорастворимый материал (и полученное защитное покрытие) в этом примере способа 100' может представлять собой материал любого из примеров, рассмотренных в настоящем описании (т.е. водорастворимый некатионный синтетический полимер; водорастворимый натуральный полисахарид или его производное; водорастворимый натуральный белок или его производное; водорастворимую соль; водорастворимое низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля; или циклодекстрин). В одном из примеров водорастворимый материал может представлять собой графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля (его примером является коммерчески доступный KOLLICOAT® IR, поставляемый BASF Corp.), сахарозу, декстран, полиакриламид, полиэтиленгликоль, динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), трис(гидроксиметил)аминометан с этилендиаминтетрауксусной кислотой, трис(2-карбоксиэтил)фосфин, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин, динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты, глицерин или солевой раствор цитрата натрия.

Водный раствор также может включать добавки, такие как водорастворимые сорастворители, антиоксиданты, красители, стабилизаторы ультрафиолетового излучения, технологические добавки или подобные добавки. Эти добавки могут быть включены в водный раствор в количествах, которые не оказывают негативного влияния на текучесть раствора или способность водорастворимого пленкообразующего материала к пленкообразованию. Например, может присутствовать сорастворитель, такой как этанол, необязательно в количестве, составляющем от приблизительно 1% до приблизительно 10% или от приблизительно 2,5% до приблизительно 7,5%. В другом примере водный раствор может включать приблизительно 5% водорастворимого материала, приблизительно 5% сорастворителя, и дополнение до 100% (приблизительно 90%) составляет вода. В других примерах водный раствор может включать от

приблизительно 5 до приблизительно 7,5% водорастворимого материала, и от приблизительно 5 до приблизительно 10% сорастворителя, и дополнение до 100% составляет вода (например, 7,5% масс./об. KOLLICOAT® IR в 10% водном этаноле).

После нанесения водного раствора, он может быть высушен с образованием водорастворимого защитного покрытия в твердой форме или в виде геля. Сушка может быть проведена сушкой на воздухе, в атмосфере азота, в вакууме, при нагревании (например, в печи) или нанесением покрытия центрифугированием (т.е. центрифугированием досуха).

Некоторые примеры защитного покрытия, такие как хлорид натрия-цитрат натрия (англ. sodium chloride-sodium citrate, сокращенно SSC), могут оставаться в жидкой форме. Жидкая форма защитного покрытия представляет собой форму для выдержки во влажном состоянии, поскольку раствор может по меньшей мере по существу заполнять проточный канал и покрывать находящееся на поверхности химическое вещество. Жидкая форма защитного покрытия может быть применена, например, если проточный канал формируют до нанесения защитного покрытия (например, в этапе 104'", показанном на Фиг. 2 или на Фиг. 6A-6E), и, таким образом, в нем может содержаться жидкость. В одном из примеров SSC наносят в виде смеси 0,75 M NaCl и 0.075M цитрата натрия.

Таким образом, этот пример способа 100' включает этап сборки, указанный позицией 106. Защитное покрытие защищает находящееся на поверхности химическое вещество во время любых этапов сборки. В одном из примеров сборка включает присоединение крышки к соединительному участку структурированной подложки, в результате чего образуется проточный канал, который находится в селективном гидравлическом взаимодействии с углублением (углублениями). Если структурированная подложка представляет собой многослойную конструкцию, то различные области крышки могут по меньшей мере частично ограничивать соответствующие проточные каналы, которые формируются с участием многослойной конструкции. Если структурированная подложка представляет собой заготовку, то крышка может ограничивать один или более образующихся проточных каналов.

Крышка может быть получена из любого материала, который прозрачен по отношению к возбуждающему излучению, которое направляют на находящееся на поверхности углубления (углублений) химическое вещество. Например, крышка может быть изготовлена из стекла (например, боросиликатного стекла, плавленого оксида кремния и т.д.), полимера или подобного материала. Коммерчески доступным примером подходящего боросиликатного стекла является материал D 263®, поставляемый Schott North America, Inc. Коммерчески доступными примерами подходящих полимерных материалов, а именно циклоолефиновых полимеров, являются продукты ZEONOR®, поставляемые Zeon Chemicals L.P.

В некоторых примерах крышка может быть сформована в виде единого целого с боковой стенкой (стенками), которая соответствует форме соединительного участка, и соединена с соединительным участком. Например, в прозрачном блоке может быть проделан травлением паз, в результате чего образуется по существу плоская часть и боковая стенка (стенки), отходящая от по существу плоской части. После установки протравленного блока на соединительном участке структурированной подложки, паз может стать проточным каналом.

В других примерах боковая стенка (стенки) и крышка могут быть отдельными компонентами, соединенными друг с другом. Например, крышка может представлять собой по существу прямоугольный блок, имеющий по меньшей мере по существу

плоскую наружную поверхность и по меньшей мере по существу плоскую внутреннюю поверхность, которая определяет часть (например, верхнюю часть) проточного канала (после присоединения к структурированной подложке). Блок может быть установлен на (например, соединен с) боковой стенке (стенках), которая присоединена к соединительному участку структурированной подложки и образует боковую стенку (стенки) проточного канала. В этом примере боковая стенка (стенки) может включать любой из материалов, рассмотренных в настоящем описании при раскрытии разделительного слоя (описан ниже).

Крышка может быть присоединена к соединительному участку структурированной подложки с помощью любой подходящей методики, такой как лазерная сварка, диффузионное соединение, анодная сварка, пайка эвтектическим сплавом, плазмоактивируемое соединение, пайка стеклокристаллическим припоем или другие способы, известные в данной области техники. В одном из примеров для присоединения крышки к соединительному участку структурированной подложки может быть применен разделительный слой. Разделительный слой может состоять из любого материала, который будет герметично соединять по меньшей мере некоторые из промежуточных областей (например, соединительный участок) структурированной подложки и крышки.

В одном из примеров разделительный слой может состоять из материала, способного поглощать излучение с длиной волны, подходящей для проникновения через крышку и/или структурированную подложку. Поглощенная энергия, в свою очередь, расходуется на образование соединения между разделительным слоем и крышкой и между разделительным слоем и структурированной подложкой. Примером такого материала, способного поглощать излучение, является черный KAPTON® (полиимид, содержащий углеродную сажу), поставляемый DuPont (США), который поглощает излучение при приблизительно 1064 нм. Следует понимать, что может быть применен полиимид без добавления углеродной сажи, но в этом случае необходимо изменить длину волны до значений, при которых натуральный полиимидный материал в значительной степени поглощает свет (например, 480 нм). В другом примере при облучении светом с длиной волны 532 нм может быть присоединен полиимид CEN JP. Если разделительный слой изготовлен из материала, способного поглощать излучение, то разделительный слой может быть расположен на границе раздела между крышкой и структурированной подложкой так, что при этом разделительный слой контактирует с целевым соединительным участком. Одновременно с подачей лазерной энергии с подходящей длиной волны к границе раздела (т.е. при облучении материала, способного поглощать излучение) может быть приложено давление (например, давление приблизительно 100 PSI (что приблизительно составляет 689476 Па)). Для получения подходящего соединения лазерная энергия может воздействовать на границу раздела как снизу, так и сверху.

В другом примере материал, способный поглощать излучение, может находиться в контакте с разделительным слоем. Материал, способный поглощать излучение, может быть нанесен на границу раздела между разделительным слоем и крышкой, а также на границу раздела между разделительным слоем и структурированной подложкой. Например, разделительный слой может состоять из полиимида, и отдельный материал, способный поглощать излучение, может представлять собой углеродную сажу. В этом примере отдельный материал, способный поглощать излучение, поглощает лазерную энергию, которая расходуется на образование связей между разделительным слоем и крышкой и между разделительным слоем и структурированной подложкой. В этом примере одновременно с подачей лазерной энергии с подходящей длиной волны к границе раздела (т.е. при облучении материала, способного поглощать излучение) к

соответствующим границам раздела может быть приложено давление.

Если структурированная подложка представляет собой многослойную конструкцию, то разделительный слой и боковые стенки (крышки или соединенные с крышкой) могут физически отделять один проточный канал от соседнего проточного канала и могут быть расположены на периферии многослойных конструкций. Если структурированная подложка представляет собой заготовку, и проточная ячейка сформована таким образом, что она включает единственный проточный канал или дорожку, то разделительный слой и боковые стенки (крышки или соединенные с крышкой) могут быть расположены на периферии заготовки и ограничивать проточный канал, герметизируя проточную ячейку. Если структурированная подложка представляет собой заготовку, и проточная ячейка сформована таким образом, что она включает совокупность изолированных проточных каналов (например, восемь проточных каналов или четыре дорожки течения), то разделительный слой и боковые стенки (крышки или соединенные с крышкой) могут физически отделять один проточный канал/дорожку от соседнего проточного канала/дорожки и могут быть расположены на периферии заготовки. Однако следует понимать, что разделительный слой и боковые стенки могут быть расположены в любой заданной области в зависимости от типа примера осуществления.

Если структурированная подложка представляет собой заготовку, то этап 106 сборки способа 100' включает присоединение крышки, в результате чего образуется проточная ячейка. Если структурированная подложка представляет собой многослойную конструкцию, то этап 106 сборки способа 100' может включать дополнительную обработку, такую как нарезка. В одном из примеров крышка может быть присоединена к структурированной многослойной структуре, и при нарезке образуются индивидуальные проточные ячейки. Как указано в настоящем описании, боковые стенки на многослойной структуре могут физически отделять один проточный канал от соседнего проточного канала, и, таким образом, нарезка может быть проведена через по меньшей мере некоторые из боковых стенок, в результате чего каждая из индивидуальных проточных ячеек включает требуемое количество проточных каналов, каждый из которых имеет часть первоначальной боковой стенки, окружающую его периферическую область. В другом примере структурированная многослойная конструкция может быть нарезана с образованием заготовок, не имеющих крышек, к которым могут быть присоединены соответствующие крышки, образуя индивидуальные проточные ячейки.

В одном из примеров после сборки 106 образуются одна или более проточных ячеек.

Как показано на примере способа 100", представленного на Фиг. 2, находящееся на поверхности химическое вещество может являться и слоем покрытия из функционализированного полимера, и праймером (праймерами), и могут быть применены два различных защитных покрытия. Как и в способе 100', добавление на поверхность химического вещества при выполнении способа 100" включает формирование слоя покрытия из функционализированного полимера в углублении (углублениях) (позиция 102') и прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера (позиция 102'"). Однако, в отличие от способа 100', при выполнении способа 100" начальное водорастворимое защитное покрытие формируют после формирования слоя покрытия из функционализированного полимера (позиция 104"), а другое водорастворимое защитное покрытие формируют после закрепления праймера (позиция 104'").

В этапе способа 100", обозначенном позициями 102' и 104", добавление

располагаемого на поверхности химического вещества включает формирование слоя покрытия из функционализированного полимера в углублении (102'), и начальное водорастворимое защитное покрытие формируют после формирования слоя покрытия из функционализированного полимера (104''). Следует понимать, что в способе 100'' могут быть применены материалы и способы, применяемые для формирования слоя покрытия из функционализированного полимера, рассмотренного в настоящем описании. В одном из примеров может быть желательным нанесение начального водорастворимого защитного покрытия в течение приблизительно 5 часов после удаления шлифовкой слоя покрытия из функционализированного полимера. Указанный временной промежуток может снизить скорость разрушения поверхности слоя покрытия из функционализированного полимера, а также может обеспечить больший диапазон для термической обработки.

Начальное водорастворимое защитное покрытие может быть селективно осаждено или структурировано таким образом, что закрывает находящееся на поверхности химическое вещество (в этом примере слой покрытия из функционализированного полимера), и, таким образом, соединительный участок структурированной подложки остается открытым. Соединительный участок обычно расположен на некоторой части промежуточной области (областей) структурированной подложки, в которой крышка будет прикреплена к структурированной подложке.

Селективное осаждение или нанесение структуры в виде водорастворимого защитного покрытия может быть выполнено нанесением покрытия погружением, нанесением покрытия центрифугированием, нанесением покрытия распылением, нанесением покрытия ультразвуковым распылением, нанесением покрытия ножевым устройством, аэрозольной печатью или струйной печатью. Как было отмечено выше, для укрытия соединительного участка структурированной подложки так, чтобы начальное водорастворимое защитное покрытие не было нанесено на соединительный участок, может быть применен экран (маска).

В каждом из примеров методик селективного осаждения или нанесения структуры из начального водорастворимого защитного покрытия может быть использован водный раствор, который может включать воду и до приблизительно 15% (масс./об.) водорастворимого материала. Как указано в настоящем описании, для получения требуемой толщины концентрация водного раствора может быть различной в зависимости от архитектуры проточной ячейки (например, размеров проточного канала, впускных и выпускных отверстий и т.д.) и, таким образом, может превышать 15% или составлять менее 15%., и нижний предел концентрации может составлять приблизительно 2% масс. (масс./об.). В этом примере способа 100'' водорастворимый материал (и полученное защитное покрытие) может представлять собой графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу, полиакриламид или полиэтиленгликоль. В этом примере водный раствор также может включать добавки, такие как антиоксиданты, красители, стабилизаторы ультрафиолетового излучения, технологические добавки или подобные добавки.

Как показано позицией 106', способ 100'' включает сборку проточной ячейки после формирования начального защитного покрытия. В этом примере начальное защитное покрытие защищает слой покрытия из функционализированного полимера при проведении любого этапа сборки. Если структурированная подложка представляет собой многослойную конструкцию, то сборка включает присоединение крышки к соединительному участку с образованием соответствующих проточных каналов, которые находятся в селективном гидравлическом взаимодействии с соответствующими

наборами углублений, и последующее вырезание присоединенной крышки и подложки для образования соответствующих проточных ячеек. Если структурированная подложка представляет собой заготовку, то сборка включает присоединение крышки к соединительному участку с образованием единственной проточной ячейки, содержащей один или более проточных каналов. Соединение и/или вырезание могут быть выполнены способами, рассмотренными в настоящем описании.

После сборки 106' (т.е. соединения или соединения и вырезания) получают одну или более проточных ячеек. Затем способ 100' включает удаление начального водорастворимого защитного покрытия, приводящее к раскрытию слоя покрытия из функционализированного полимера и по меньшей мере части структурированной подложки (позиция 108, показано как удаление НЗП (начального защитного покрытия)); прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера (позиция 102"', показано как присоединение праймера); и образование второго водорастворимого защитного покрытия на праймере, слое покрытия из функционализированного полимера и по меньшей мере части структурированной подложки (позиция 104"', показано как образование защитного покрытия).

Способы 108, 102"' и 104"' могут быть выполнены в каждой из одной или более проточных ячеек или в любой из одной или более проточных ячеек, полученных в результате сборки 106'.

Поскольку начальное защитное покрытие растворимо в воде, его удаление может включать растворение. Вода и буфер или вода или водный буфер могут быть введены в проточный канал (каналы) проточной ячейки (ячеек) через соответствующее впускное отверстие (отверстия), образованное в крышке или структурированной подложке, могут удерживаться в проточном канале (каналах) в течение времени, достаточного для растворения начального защитного покрытия, и затем могут быть удалены из соответствующего выпускного отверстия (отверстий), образованного в крышке или структурированной подложке. Таким образом, растворение может быть проведено элюированием. После растворения защитного покрытия полученный раствор имеет относительно низкую концентрацию водорастворимого материала (в некоторых случаях, например, приблизительно 15% или менее, масс./об.), что препятствует засорению проточного канала (каналов) и отверстия (отверстий). После растворения начального защитного покрытия и удаления раствора из проточной ячейки (ячеек), слой покрытия из функционализированного полимера и структурированная подложка, которые были закрыты начальным защитным покрытием, оказываются открытыми.

Как показано позицией 102"', в этом примере способа 100" праймер прикрепляют к слою покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в углублении (углублениях). Может быть применен любой из праймеров, рассмотренных в настоящем описании. В этом примере способа 100" прикрепление (прививка) может быть выполнена элюированием. При пропускании потока раствор или смесь праймера, рассмотренная в настоящем описании, могут быть введены в проточный канал (каналы) проточной ячейки (ячеек) через соответствующее впускное отверстие (отверстия), могут удерживаться в проточном канале (каналах) в течение времени, достаточного (т.е. в течение инкубационного периода) для закрепления праймера на слое покрытия из функционализированного полимера в одном или более углублениях, и затем могут быть удалены из соответствующего выпускного отверстия (отверстий). После присоединения праймера, через проточный канал (каналы) для промывки полученных функционализированных углублений и проточного канала (каналов) может быть пропущена дополнительная текучая среда (среды).

В одном из примеров после прививки праймера к слою покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в углублении (углублениях), этот пример способа 100" дополнительно включает образование (второго) водорастворимого защитного покрытия на находящемся на поверхности химическом веществе (в этом примере - слой покрытия из функционализированного полимера с прикрепленным к нему праймером (праймерами)) и на по меньшей мере части структурированной подложки (позиция 104'").

В этом примере способа 100" (второе) водорастворимое защитное покрытие может быть нанесено элюированием. При пропускании потока водный раствор (включающий воду и в некоторых случаях до приблизительно 15% (масс./об.) водорастворимого материала) может быть введен в проточный канал (каналы) проточной ячейки (ячеек) через соответствующее впускное отверстие (отверстия) и может удерживаться в проточном канале (каналах). Может быть введено количество водного раствора, достаточное для покрытия находящегося на поверхности химического вещества и любых открытых поверхностей структурированной подложки в проточном канале. Во время нахождения раствора в проточном канале (каналах) проточная ячейка (ячейки) может быть подвергнута сушке, при которой через впускное отверстие в течение установленного периода времени пропускают воздух, азот или создают вакуум для высушивания (второго) водорастворимого защитного покрытия на находящемся на поверхности химическом веществе и открытых частях подложки. В другом примере сушка может не выполняться, и в проточном канале проточной ячейки может быть образовано жидкостное защитное покрытие.

В этом примере способа 100" (второе) водорастворимое защитное покрытие может представлять собой любой из примеров покрытия, рассмотренных в настоящем описании (т.е. состоять из водорастворимого некатионного синтетического полимера; водорастворимого натурального полисахарида или его производного; водорастворимого натурального белка или его производного; водорастворимой соли; водорастворимого низкомолекулярного соединения, выбранного из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля или циклодекстрина). В одном из примеров водорастворимый материал может представлять собой графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля (например, KOLLICOAT® IR, поставляемый BASF Corp.), сахарозу, декстран, полиакриламид, гликоли, натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трис(гидроксиметил)аминометан с этилендиаминтетрауксусной кислотой, трис(2-карбоксиэтил)фосфин, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин, динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты, полимеры, включающие функциональные гидроксильные группы, глицерин или солевой раствор цитрата натрия.

В другом примере закрепление праймера и нанесение (второго) водорастворимого защитного покрытия на находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22 могут быть произведены элюированием одновременно. В этом примере один раствор включает праймер и водорастворимый материал.

В одном из примеров после образования защитного покрытия 104'" получают одну или более проточных ячеек.

Пример проточной ячейки 10, полученной способом 100' или 100", показан на Фиг. 3. Проточная ячейка 10 включает структурированную подложку 12, которая может представлять собой заготовку, которую обрабатывали в этапах способа 100' или 100", или многослойную конструкцию, которую обрабатывали в этапах способа 100' или

100" и вырезали при проведении части этапа сборки 106 или 106'.

В общем, структурированная подложка 12 включает углубления 14, разделенные промежуточными областями 16, и находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22, расположенное в углублениях 14. Находящееся на поверхности химическое вещество включает слой 20 покрытия из функционализированного полимера и праймеры 22. Несмотря на то, что это не показано, следует понимать, что в углублениях 14 также может находиться химическое вещество для подготовки поверхности (например, силан или производное силана), расположенное между подложкой 12 и слоем покрытия из функционализированного полимера. Это химическое вещество для подготовки поверхности также может находиться в промежуточных областях 16.

Проточная ячейка 10 также включает крышку 26, присоединенную к соединительному участку (участкам) 25 структурированной подложки 12, где крышка 26 по меньшей мере частично ограничивает проточный канал 30A, 30B и т.д., который находится в селективном взаимодействии с углублениями 14. В примере, показанном на Фиг. 3, крышка 26 включает верхнюю часть 27, которая соединена с несколькими боковыми стенками 29, и эти компоненты 27, 29 ограничивают часть каждого из шести проточных каналов 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F. Соответствующие боковые стенки 29 отделяют один проточный канал 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F от каждого из соседних проточных каналов 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F, и каждый проточный канал 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F находится в селективном гидравлическом взаимодействии с соответствующим набором углублений 14.

Несмотря на то, что это не показано, крышка 26 или структурированная подложка 12 могут включать впускное отверстие и выпускное отверстие, которые соединены гидравлическим соединением с другими отверстиями (не показаны) для подачи текучей среды (сред) в соответствующие проточные каналы 30A, 30B, 30C, 30D, 30E, 30F (например, из картриджа с реагентами или другой системы выдержки текучих сред) и выпуска из проточного канала (например, в систему удаления отходов).

Водорастворимое защитное покрытие 24 покрывает находящееся на поверхности углублений 14 химическое вещество 20, 22 и по меньшей мере часть структурированной подложки 12 (например, те промежуточные области 16, которые при этом не являются соединительными участками 25). В одном из примеров осуществления проточной ячейки 10 защитное покрытие 24 получено в этапе способа 100', обозначенном позицией 104', или этапе способа 100", обозначенном позицией 104'". Таким образом, защитное покрытие 24 может представлять собой любое из примеров покрытия, рассмотренных в настоящем описании (т.е. покрытие из водорастворимого некатионного синтетического полимера; водорастворимого натурального полисахарида или его производного; водорастворимого натурального белка или его производного; водорастворимой соли; водорастворимого низкомолекулярного соединения, выбранного из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля или циклодекстрина).

При наличии защитного покрытия 24, проточную ячейку 10 можно транспортировать, хранить и т.д. Если необходимо начать эксплуатацию проточной ячейки 10 (например, провести секвенирование), то защитное покрытие может быть по меньшей мере частично удалено растворением, которое обозначено позицией 108. Удаление может составлять часть операции секвенирования. В альтернативном варианте для осуществления секвенирования удаление может не производиться.

Проточная ячейка 10, показанная на Фиг. 3, может быть получена с использованием неструктурированной подложки вместо структурированной подложки. Непрерывная

поверхность неструктурированной подложки включает то же находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22, которое находится в лунках 14', представленных на Фиг. 3. Неограничивающий пример показан на Фиг. 6A-6E и более подробно рассмотрен ниже.

Другой пример способа 200 представлен на Фиг. 4. Этот пример способа 200 представляет собой вариант способа 100, и его более подробное раскрытие может включать некоторые другие способы, которые могут быть включены, такие как способ (способы) подготовки поверхности (т.е. углублений 14 и в некоторых случаях соседних промежуточных областей 16) структурированной подложки 12 для последующего осаждения на поверхность химического вещества 20, 22.

Способ 200 включает присоединение силана или производного силана к поверхности структурированной подложки, включающей углубления, разделенные промежуточными областями, что приводит к образованию силанизированных углублений и силанизированных промежуточных областей (указано позицией 202); формирование слоя покрытия из функционализированного полимера в силанизированных углублениях и на силанизированных промежуточных областях (указано позицией 204); удаление слоя покрытия из функционализированного полимера шлифовкой с силанизированных промежуточных областей (указано позицией 206); прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера, находящегося в силанизированных углублениях, с образованием функционализированных углублений (указано позицией 208); и образование водорастворимого защитного покрытия на функционализированных углублениях и по меньшей мере части структурированной подложки (указано позицией 210).

Примеры способа 200 дополнительно рассмотрены при описании Фиг. 5A-5H (где способ аналогичен способу 100') или Фиг. 5A-5D и 5I-5L (где способ аналогичен способу 100''). Любой признак способа 200 также может быть скомбинирован с или включен в способы 100' или 100''.

На Фиг. 5A представлено поперечное сечение структурированной подложки 12. Структурированная подложка 12 может представлять собой структурированную многослойную конструкцию или структурированную заготовку или любую другую структурированную подложку (например, панель, прямоугольный лист и т.д.). Может быть применен любой пример подложки 12, рассмотренный в настоящем описании. Структурированная многослойная конструкция может быть применена для формирования нескольких проточных ячеек, и структурированная заготовка может быть применена для формирования одной проточной ячейки. В одном из примеров диаметр подложки может составлять от приблизительно 2 мм до приблизительно 300 мм, или наибольший размер прямоугольного листа или панели может составлять 10 футов приблизительно 3 метра). В одном из примеров диаметр многослойной конструкции подложки составляет от приблизительно 200 мм до приблизительно 300 мм. В другом примере ширина заготовки подложки составляет от приблизительно 0,1 мм до приблизительно 10 мм. Несмотря на то, что в настоящем описании представлены примеры размеров, следует понимать, что могут быть применены подложки любых подходящих размеров.

Структурированная подложка 12 включает углубления 14, сформированные на или в открытом слое или поверхности подложки 12, и промежуточные области 16, разделяющие соседние углубления 14. В одном из примеров, рассмотренных в настоящем описании, углубления 14 функционализируют находящимся на поверхности химическим веществом (например, 20, 22), в то время как промежуточные области 16 могут быть

применены для соединения, но не содержат праймера (праймеров) (как показано на Фиг. 5E и 5K).

Углубления 14 могут быть изготовлены в или на подложке 12 с помощью различных методик, включающих, например, фотолитографию, наноимпринтную литографию, методики штамповки, методики тиснения, методики формования, методики микротравления, методики печати и т.д. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что тип применяемой методики обусловлен составом и формой подложки 12.

Изобретение включает применение различных схем расположения углублений 14, которые включают упорядоченные, повторяющиеся и неупорядоченные схемы. В одном из примеров углубления 14 расположены в виде гексагональной сетки с целью плотной упаковки и достижения повышенной плотности. Другие схемы расположения могут включать, например, прямолинейные (т.е. прямоугольные) схемы расположения, треугольные схемы расположения и т.д. В некоторых примерах схема или шаблон расположения углублений 14 может находиться в x-y формате, то есть включать ряды и колонки. В некоторых других примерах схема или шаблон расположения углублений 14 и/или промежуточных областей 16 может представлять собой повторяющееся размещение. В других примерах схема или шаблон расположения углублений 14 и/или промежуточных областей 16 может представлять собой размещение в случайном порядке. Шаблон может включать участки, плоскости, лунки, столбики, полосы, изгибы, линии, треугольники, прямоугольники, круги, арки, шахматные схемы, перекрещивающиеся полосы, диагонали, стрелки, квадраты и/или перекрещивающиеся штрихи.

Схема или шаблон расположения углублений может быть охарактеризована плотностью углублений 14 (т.е. количеством углублений 14) в ограниченной области. Например, углубления 14 могут присутствовать с плотностью, составляющей приблизительно 2 миллиона на мм$^2$. Могут быть достигнуты различные значения плотности, включающие, например, плотность, составляющую по меньшей мере приблизительно 100 на мм$^2$, приблизительно 1000 на мм$^2$, приблизительно 0,1 миллиона на мм$^2$, приблизительно 1 миллион на мм$^2$, приблизительно 2 миллиона на мм$^2$, приблизительно 5 миллионов на мм$^2$, приблизительно 10 миллионов на мм$^2$, приблизительно 50 миллионов на мм$^2$ или более. В альтернативном варианте или дополнительно может выбрана величина плотности, не превышающая приблизительно 50 миллионов на мм$^2$, приблизительно 10 миллионов на мм$^2$, приблизительно 5 миллионов на мм$^2$, приблизительно 2 миллиона на мм$^2$, приблизительно 1 миллион на мм$^2$, приблизительно 0,1 миллиона на мм$^2$, приблизительно 1000 на мм$^2$, приблизительно 100 на мм$^2$ или менее. Также следует понимать, что плотность размещения углублений 14 на подложке 12 может составлять от одной из нижних величин до одной из верхних величин, выбранных из указанных выше диапазонов. В некоторых примерах матрица с высокой плотностью может быть охарактеризована как матрица, содержащая углубления 14, разделенные областью, составляющей менее приблизительно 100 нм, матрица со средней плотностью может быть охарактеризована как матрица, содержащая углубления 14, разделенные областью, составляющей от приблизительно 400 нм до приблизительно 1 мкм, и матрица с низкой плотностью может быть охарактеризована как матрица, содержащая углубления 14, разделенные областью, составляющей более

чем приблизительно 1 мкм. Несмотря на то, что выше приведены примеры плотностей, следует понимать, что могут быть применены подложки с любыми подходящими плотностями.

Также или в альтернативном варианте характеристикой схемы или шаблона расположения может быть средний шаг, т.е. расстояние от центра углубления 14 до центра соседней промежуточной области 16 (расстояние от центра до центра). Шаблон может быть упорядоченным, то есть с малым коэффициент отклонения среднего шага, или шаблон может быть неупорядоченным, и в этом случае коэффициент отклонения может быть относительно большим. В любом случае средний шаг может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 10 нм, приблизительно 0,1 мкм, приблизительно 0,5 мкм, приблизительно 1 мкм, приблизительно 5 мкм, приблизительно 10 мкм, приблизительно 100 мкм или более. В альтернативном варианте или дополнительно наибольшее значение среднего шага может составлять, например, приблизительно 100 мкм, приблизительно 10 мкм, приблизительно 5 мкм, приблизительно 1 мкм, приблизительно 0,5 мкм, приблизительно 0,1 мкм или менее. Величина среднего шага конкретного шаблона расположения сайтов 16 может составлять от одной из нижних величин до одной из верхних величин, выбранных из указанных выше диапазонов. В одном из примеров шаг между углублениями 14 (расстояние от центра до центра) составляет приблизительно 1,5 мкм. Несмотря на то, что выше приведены примеры величин среднего шага, следует понимать, что могут быть применены другие значения среднего шага.

В примерах, показанных на Фиг. 5A-5L, углубления 14 представляют собой лунки 14', и, таким образом, поверхность структурированной подложки 12 включает массив лунок 14'. Лунки 14' могут представлять собой микролунки или нанолунки. Характеристики каждой лунки 14' могут включать объем, площадь отверстия лунки, глубину и/или диаметр.

Каждая лунка 14' может иметь любой объем, достаточный для удержания жидкости. Минимальный или максимальный объем может быть выбран, например, для достижения требуемой производительности (например, мультиплексности) и разрешения, для соответствия составу анализируемого вещества или реакционной способности анализируемого вещества, ожидаемой при применении проточной ячейки 10 в качестве единицы последующей обработки (см. Фиг. 5G и 5K). Например, объем может составлять по меньшей мере приблизительно $1\times10^{-3}$ мкм$^3$, приблизительно $1\times10^{-2}$ мкм$^3$, приблизительно 0,1 мкм$^3$, приблизительно 1 мкм$^3$, приблизительно 10 мкм$^3$, максимальный объем может составлять приблизительно $1\times10^{4}$ мкм$^3$, приблизительно $1\times10^{3}$ мкм$^3$, приблизительно 100 мкм$^3$, приблизительно 10 мкм$^3$, приблизительно 1 мкм$^3$, приблизительно 0,1 мкм$^3$ или менее. Следует понимать, что слой покрытия из функционализированного полимера может заполнять весь объем или часть объема лунки 14'. Объем слоя покрытия в индивидуальной лунке 14' может превышать указанные выше величины, быть меньше указанных выше величин или иметь промежуточное значение.

Площадь, занимаемая каждым отверстием лунки на поверхности, может быть выбрана с учетом критериев, аналогичных указанным выше для объема лунки. Например, площадь, занимаемая каждым отверстием лунки на поверхности, может составлять по меньшей мере приблизительно $1\times10^{-3}$ мкм$^2$, приблизительно $1\times10^{-2}$ мкм$^2$, приблизительно 0,1 мкм$^2$, приблизительно 1 мкм$^2$, приблизительно 10 мкм$^2$,

приблизительно 100 мкм$^2$ или более. В альтернативном варианте или дополнительно максимальная площадь может составлять приблизительно $1\times10^3$ мкм$^2$, приблизительно 100 мкм$^2$, приблизительно 10 мкм$^2$, приблизительно 1 мкм$^2$, приблизительно 0,1 мкм$^2$, приблизительно $1\times10^{-2}$ мкм$^2$ или менее. Площадь, занимаемая каждым отверстием лунки, может превышать указанные выше величины, быть меньше указанных выше величин или иметь промежуточное значение.

Глубина каждой лунки 14' может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1 мкм, приблизительно 1 мкм, приблизительно 10 мкм, приблизительно 100 мкм или более. В альтернативном варианте или дополнительно максимальная глубина может составлять приблизительно $1\times10^3$ мкм, приблизительно 100 мкм, приблизительно 10 мкм, приблизительно 1 мкм, приблизительно 0,1 мкм или менее. Глубина каждой лунки 14' может превышать указанные выше величины, быть меньше указанных выше величин или иметь промежуточное значение.

В некоторых случаях диаметр каждой лунки 14' может составлять по меньшей мере приблизительно 50 нм, приблизительно 0,1 мкм, приблизительно 0,5 мкм, приблизительно 1 мкм, приблизительно 10 мкм, приблизительно 100 мкм или более. В альтернативном варианте или дополнительно максимальный диаметр может составлять приблизительно $1\times10^3$ мкм, приблизительно 100 мкм, приблизительно 10 мкм, приблизительно 1 мкм, приблизительно 0,5 мкм, приблизительно 0,1 мкм или менее (например, приблизительно 50 нм). Диаметр каждой лунки 14' может превышать указанные выше величины, быть меньше указанных выше величин или иметь промежуточное значение.

Для нанесения на поверхность углубления (углублений) 14 химического вещества 20, 22 и для образования водорастворимого защитного покрытия 24 на находящемся на поверхности химическом веществе 20, 22 и на по меньшей мере части структурированной подложки 12 структурированная подложка 12 может быть подвергнута серии обработок. На Фиг. 5 B-5H представлен пример, в котором химическое вещество 20, 22 наносят на поверхность до образования защитного покрытия 24; и на Фиг. 5B-5D и 5I-5L представлен пример, в котором для защиты различных находящихся на поверхности химических веществ 20, 22 формируют несколько защитных покрытий 24', 24 на различных этапах выполнения способа 200.

Несмотря на то, что это не показано, следует понимать, что для очистки и активации поверхности структурированная подложка 12 может быть подвергнута плазменному травлению. Например, с помощью плазменного травления может быть удален органический материал и введены поверхностные гидроксильные группы. Для очистки подложки 12 могут быть применены другие подходящие способы очистки, выбор которых частично зависит от типа подложки 12. Например, химическая очистка может быть выполнена с использованием окислителей или щелочных растворов.

Затем может быть проведена подготовка поверхности 12 структурированной подложки 12 (показанной на Фиг. 5A) для осаждения слоя 20 покрытия из функционализированного полимера (Фиг. 5C), который является одним из примеров находящегося на поверхности химического вещества, рассмотренного в настоящем описании. В одном из примеров структурированная подложка 12 может быть подвергнута силанизации, которая состоит в присоединении силана или производного 18 силана (Фиг. 5B) к структурированной поверхности многослойной конструкции. Силанизация позволяет вводить силан или производное 18 силана по всей площади

поверхности, включая углубления 14, 14' (например, на нижнюю поверхность и вдоль боковых стенок) и промежуточные области 16.

Для силанизации может быть применен любой силан или производное 18 силана. Выбор силана или производного 18 силана может частично зависеть от типа функционализированной молекулы, которую используют для образования слоя 20 покрытия из функционализированного полимера (показано на Фиг. 5C), поскольку может быть желательным образование ковалентной связи между силаном или производным 18 силана и слоем 20 покрытия из функционализированного полимера. Способ, применяемый для присоединения силана или производного 18 силана к подложке 12, может зависеть от типа применяемого силана или производного 18 силана. Ниже представлены некоторые примеры.

В одном из примеров силаном или производным 18 силана является (3-аминопропил) триэтоксисилан (англ. (3-aminopropyl)triethoxysilane, сокращенно APTES) или (3-аминопропил)триметоксисилан (англ. (3-aminopropyl)trimethoxysilane, сокращенно APTMS) (т.е. X-$R^B$-Si($OR^C$)$_3$, где X представляет собой аминогруппу, $R^B$ представляет собой -($CH_2$)$_3$-, и $R^C$ представляет собой этил или метил). В этом примере поверхность подложки 12 может быть предварительно обработана (3-аминопропил) триэтоксисиланом (APTES) или (3-аминопропил)триметоксисиланом (APTMS) с образованием ковалентной связи между кремнием и одним или более атомами кислорода, находящимися на поверхности (не придерживаясь какого-либо механизма, можно предположить, что каждый атом кремния может связываться с одним, двумя или тремя атомами кислорода). Такую обработанную химическим способом поверхность подвергают воздействию повышенных температур для образования монослоя из аминогрупп.Затем аминогруппы вводят в реакцию с Сульфо-HSAB (англ. N-hydroxysulfosuccinimidyl-4-azidobenzoate, т.е. N-гидроксисульфосукцинимидил-4-азидобензоат) с образованием азидопроизводного. При активации УФ излучением энергией в диапазоне от 1 Дж/см$^2$ до 30 Дж/см$^2$ при 21°C приводит к генерации активных нитреновых частиц, которые могут с легкостью вступать в различные реакции включения с PAZAM (например, с функционализированной молекулой).

Также могут быть применены другие способы силанизации. Примеры подходящих способов силанизации включают осаждение из газовой фазы, способ YES, нанесение покрытия центрифугированием или другие способы осаждения. Некоторые примеры способов и материалов, которые могут быть применены для силанизации подложки 12, рассмотрены в настоящем описании; тем не менее, следует понимать, могут быть применены другие способы и материалы.

В одном из примеров, в котором для проведения способа YES применяют печь ХОГФ, структурированную подложку 12 помещают в печь ХОГФ. Камера может быть продута, после чего начинают цикл силанизации. При проведении циклов емкость с силаном или производным силана может выдерживаться при подходящей температуре (например, приблизительно 120°C для норборненсилана), подходящая температура может поддерживаться в трубопроводах для подачи паров силана или производного силана (например, приблизительно 125°C для норборненсилана), и подходящая температура (например, приблизительно 145°C) может поддерживаться в вакуумных трубопроводах.

В другом примере силан или производное 18 силана (например, жидкий норборненсилан) может быть осаждено внутри стеклянного флакона, и флакон может быть помещен в стеклянный вакуумный эксикатор, содержащий структурированную

подложку 12. Затем из эксикатора может быть откачан воздух до достижения давления, составляющего от приблизительно 15 миллитор до приблизительно 30 миллитор (приблизительно от 2 до 4 Па), и эксикатор может быть помещен в печь, находящуюся при температуре, составляющей от приблизительно 60°C до приблизительно 125°C. По завершении силанизации эксикатор извлекают из печи, охлаждают и уравновешивают с атмосферой.

Осаждение из газовой фазы, способ YES и/или силанизация в вакуумном эксикаторе могут быть применены для обработки различными силанами или производными 18 силана, такими как силан или производные 18 силана, включающие примеры ненасыщенных фрагментов, рассмотренные в настоящем описании. Например, эти способы могут быть применены, если силан или производное 18 силана включает ненасыщенный циклоалкеновый фрагмент, такой как норборнен, производное норборнена (например, (гетеро)норборнен, включающий атом кислорода или азота вместо одного из атомов углерода), трансциклооктен, производные трансциклооктена, трансциклопентен, транс-циклогептен, транс-циклононен, бицикло[3,3,1]нон-1-ен, бицикло[4,3,1]дец-1(9)-ен, бицикло[4,2,1]нон-1(8)-ен и бицикло[4,2,1]нон-1-ен. Любой из этих циклоалкенов мог быть замещен, например, группой R, такой как водород, алкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, циклоалкенил, циклоалкинил, арил, гетероарил, гетероалициклил, аралкил или (гетероалициклил)алкил. Пример производного норборнена включает [(5-бицикло[2,2,1]гепт-2-енил)этил]триметоксисилан. В других примерах этих способов могут быть применены силан или производное 18 силана, которое включает ненасыщенный циклоалкинный фрагмент, такой как циклооктин, производное циклооктина или бициклононины (например, бицикло[6,1,0]нон-4-ин или его производные, бицикло[6,1,0]нон-2-ин или бицикло[6,1,0]нон-3-ин). Эти циклоалкины могут быть замещены любыми группами R, рассмотренными в настоящем описании.

Как показано на Фиг. 5B, присоединение силана или производного 18 силана приводит к образованию силанизированной структурированной подложки, включающей силанизированные углубления и силанизированные промежуточные области.

Затем силанизированная структурированная многослойная конструкция может быть подвергнута обработке, которая приводит к образованию слоя 20 покрытия из функционализированного полимера на силанизированных углублениях и силанизированных промежуточных областях.

Как было отмечено в настоящем описании, примеры слоя 20 покрытия из функционализированного полимера включают PAZAM или любую другую молекулу, которая была функционализирована для взаимодействия со структурированной многослойной конструкцией 12 и наносимым впоследствии праймером (праймерами) 22. Слой 20 покрытия из функционализированного полимера может быть образован на поверхности силанизированной структурированной многослойной конструкции (т.е. на силанизированных углублениях и силанизированных промежуточных областях) с помощью любой из методик, рассмотренных при описании способа 102'. Полученный слой 20 покрытия показан на Фиг. 5C.

Слой 20 покрытия из функционализированного полимера может быть присоединен к силанизированным углублениям и силанизированным промежуточным областям (т.е. 18) посредством ковалентного соединения. Ковалентное присоединение слоя 20 покрытия из функционализированного полимера к силанизированным углублениям позволяет удерживать слой 20 покрытия из функционализированного полимера в углублениях 14, 14' в течение срока службы готовой проточной ячейки при ее эксплуатации. Ниже приведены некоторые примеры реакций, которые могут протекать

между силаном или производным 18 силана и слоем 20 покрытия из функционализированного полимера.

Если силан или производное 18 силана включает в качестве ненасыщенного фрагмента норборнен или производное норборнена, то норборнен или производное норборнена может: i) вступать в реакцию 1,3-биполярного циклоприсоединения с азидом/азидогруппой PAZAM; ii) вступать в реакцию сочетания с группой тетразина, присоединенной к PAZAM; вступать в реакцию циклоприсоединения с группой гидразона, присоединенной к PAZAM; вступать в фото-клик реакцию с группой тетразола, присоединенной к PAZAM; или вступать в реакцию циклоприсоединения с группой нитрилоксида, присоединенной к PAZAM.

Если силан или производное 18 силана в качестве ненасыщенного фрагмента включает циклооктин или производное циклооктина, то циклооктин или производное циклооктина могут: i) вступать в протекающую под действием напряжения реакцию азид-алкинного 1,3-циклоприсоединения (англ. strain-promoted azide-alkyne 1,3-cycloaddition, сокращенно SPAAC) с азидом/азидогруппой PAZAM или ii) вступать в протекающую под действием напряжения реакцию алкин нитрилоксидного циклоприсоединения с нитрилоксидной группой, присоединенной к PAZAM.

Если силан или производное 18 силана в качестве ненасыщенного фрагмента включает бициклононин, то бициклононин может вступать в аналогичную реакцию циклоприсоединенияа алкина согласно механизму SPAAC с азидами или нитрилоксидами, присоединенными к PAZAM, под воздействием напряжения в бициклической кольцевой системе.

Несмотря на то, что это не показано, следует понимать, что в некоторых примерах способа структурированная подложка 12 может не подвергаться силанизации. Напротив, структурированная подложка 12 может быть подвергнута плазменному травлению, после чего слой 20 покрытия из функционализированного полимера может быть непосредственно нанесен центрифугированием (или осажден другим способом) на протравленную плазмой структурированную подложку 12. В этом примере при плазменном травлении может образовываться вещество (вещества), активирующее поверхность (например, -OH группы), с помощью которого слой 20 покрытия из функционализированного полимера может закрепляться на структурированной подложке 12. В этих примерах слой 20 покрытия из функционализированного полимера выбирают таким образом, чтобы он был способен реагировать с поверхностными группами, образующимися при плазменном травлении.

Кроме того, несмотря на то, что это не показано, следует понимать, что силанизированная структурированная подложка с покрытием (показанная на Фиг. 5C) может быть подвергнута очистке. Очистка может включать применение водяной бани и ультразвукового воздействия. Температура водяной бани может поддерживаться относительно низкой и составлять от приблизительно 22°C до приблизительно 45°C. В другом примере температура водяной бани составляет от приблизительно 25°C до приблизительно 30°C.

Затем выполняют шлифовку силанизированной структурированной подложки с покрытием для удаления части (частей) слоя 20 покрытия из функционализированного полимера с силанизированных промежуточных областей. Силанизированная структурированная подложка с частично удаленным шлифовкой покрытием показана на Фиг. 5D. В результате удаления шлифовкой могут быть удалены или оставлены части силана или производного 18 силана, находящиеся вблизи промежуточных областей 16. Так, на Фиг. 5D-5L части силана или производного 18 силана, соседствующие с

промежуточными областями 16, представлены в полуразрезе, поскольку они могут по меньшей мере частично оставаться после шлифовки, или после шлифовки они могут быть удалены. Если эти силанизированные части удалены полностью, то очевидно, что нижележащая подложка 12 оказывается открытой. Таким образом, в некоторых примерах разделительный слой 28 может непосредственно контактировать с подложкой 12 на соединительных участках 25 (например, на Фиг. 5G и 5J), и защитные покрытия 24', 24 могут непосредственно контактировать с подложкой 12 в одной или более промежуточных областях 16 (например, как показано на Фиг. 5F, 5J и 5L). Если эти силанизированные части по меньшей мере частично остаются после удаления шлифовкой, то присоединяемая впоследствии крышка и образующиеся впоследствии защитные покрытия 24, 24' непосредственно контактируют с силаном или производным 18 силана на соединительных участках 25 и в промежуточных областях 16.

Удаление шлифовкой может быть выполнено с помощью мягкой химической суспензии (включающей абразив), которая может снимать тонкий слой 20 покрытия из функционализированного полимера и в некоторых случаях по меньшей мере часть силана или производного 18 силана с промежуточных областей 16, не оказывая негативного влияния на нижележащую подложку 12 в этих областях. В альтернативном варианте удаление шлифовкой может быть выполнено с помощью раствора, который не включает абразивных частиц.

Мягкая химическая суспензия представляет собой щелочную водную суспензию с показателем pH, составляющим от приблизительно 7,5 до приблизительно 11, и включающую абразивные частицы. Примеры абразивных частиц включают карбонат кальция ($CaCO_3$), агарозу, графит, полиметилметакрилат (ПММА), оксид кремния, оксид алюминия, оксид церия, полистирол и комбинации перечисленных соединений. В некоторых примерах абразивные частицы выбраны из группы, состоящей из карбоната кальция ($CaCO_3$), агарозы и графита. Средний размер абразивных частиц может составлять от приблизительно 15 нм до приблизительно 5 мкм, и в одном из примеров он составляет приблизительно 700 нм.

Кроме абразивных частиц, щелочная водная суспензия также может включать буфер, хелатирующий агент, поверхностно-активное вещество и/или диспергатор. Пример буфера включает трис-основание (т.е. трис(гидроксиметил)аминометан), которое может присутствовать в растворе, имеющем pH, приблизительно равный 9. Примером хелатирующего агента является этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), которая может присутствовать в растворе, имеющем pH, приблизительно равный 8. Примером поверхностно-активного вещества является анионное поверхностно-активное вещество, такое как додецилсульфат натрия. Могут быть применены полиакрилатные диспергаторы, имеющие различные молекулярные массы. Примером диспергатора является натриевая соль полиакриловой кислоты. Диспергатор способствует поддержанию размера абразивных частиц и по меньшей мере по существу предотвращать осаждение абразивных частиц.

Щелочная водная суспензия может быть применена в химической системе механического удаления шлифовкой для шлифовки поверхности силанизированной структурированной подложки с покрытием, показанной на Фиг. 5C. Головка (головки) /пластина (пластины) для удаления шлифовкой или другое устройство (устройства) для удаления шлифовкой способно снимать шлифовкой слой 20 покрытия из функционализированного полимера с промежуточных областей 16, оставляя слой 20 покрытия из функционализированного полимера в углублениях 14, 14' и оставляя нижележащую подложку 12 по меньшей мере по существу неповрежденной. Например,

головка для удаления шлифовкой может представлять собой головку для удаления шлифовкой Strasbaugh ViPRR II.

Как было отмечено выше, удаление шлифовкой может быть выполнено с помощью шлифовальной пластины и раствора, не содержащего абразива. Например, шлифовальная пластина может быть применена в комбинации с раствором, не содержащим абразивных частиц (т.е. раствором, который не включает абразивных частиц).

При удалении шлифовкой удаляется часть (части) слоя 20 покрытия из функционализированного полимера (и в некоторых случаях по меньшей мере часть силана или производного 18 силана) с промежуточных областей 16, ив силанизированных углублениях остается часть (части) слоя 20 покрытия из функционализированного полимера, как показано на Фиг. 5D. Кроме того, как было отмечено выше, после завершения удаления шлифовкой промежуточная область (области) 16 может оставаться силанизированной. Другими словами, после шлифовки силанизированные промежуточные области могут оставаться неповрежденными. В альтернативном варианте (на показанных в полуразрезе частях 18) в результате шлифовки силан или производное 18 силана могут быть удалены из промежуточной области (областей) 16.

Несмотря на то, что это не показано, следует понимать, что силанизированная структурированная подложка с покрытием, частично удаленным шлифовкой (показанная на Фиг. 5D), может быть подвергнута очистке. Очистка может включать применение водяной бани и ультразвукового воздействия. Температура водяной бани может поддерживаться относительно низкой и составлять от приблизительно 22°C до приблизительно 30°C. Силанизированная структурированная подложка с покрытием, частично удаленным шлифовкой, также может быть высушена центрифугированием или с помощью любой подходящей методики.

Затем силанизированная структурированная подложка с покрытием, частично удаленным шлифовкой, показанная на Фиг. 5D, может быть подвергнута обработке, показанной на Фиг. 5E-5H, или обработке, показанной на Фиг. 5I-5L. На Фиг. 5E-5H показано образование одного водорастворимого защитного покрытия 24, и на Фиг. 5I-5L показано образование совокупности водорастворимых защитных покрытий 24', 24.

Ниже рассмотрен пример, показанный на Фиг. 5E-5H. На Фиг. 5E праймер 22 прикреплен к слою 20 покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в углублении (углублениях) 14, 14'. Может быть применен любой из праймеров, рассмотренных в настоящем описании. В этом примере прикрепление может быть выполнено нанесением покрытия маканием, нанесением покрытия распылением, распределением раствора или другим подходящим способом, который позволяет прикрепить праймер (праймеры) к слою 20 покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в по меньшей мере некоторых углублениях 14, 14'. В каждой из иллюстративных методик может быть применен раствор или смесь праймера, рассмотренная в настоящем описании, которая может включать праймер (праймеры), воду, буфер и катализатор.

Как показано на Фиг. 5F, после прививки праймера 22 к слою 20 покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в углублениях 14, 14', водорастворимое защитное покрытие 24 наносят на находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22 и на по меньшей мере часть структурированной подложки. Водорастворимое защитное покрытие 24 может быть сформировано на открытой поверхности структурированной подложки 12, которая не является частью

соединительного участка 25. В этом примере водорастворимое защитное покрытие 24 селективно осаждают или наносят в виде структуры на промежуточные области 16, расположенные между соседними углублениями 14, 14', но не на край/периферию структурированной подложки 12, где расположен соединительный участок 25. Селективное осаждение/нанесение структуры из водорастворимого защитного покрытия 24 может быть выполнено с применением водного раствора, рассмотренного в настоящем описании. В этом примере материал, содержащийся в водном растворе, может представлять собой материал любого из примеров, рассмотренных в настоящем описании (т.е. водорастворимый некатионный синтетический полимер; водорастворимый натуральный полисахарид или его производное; водорастворимый натуральный белок или его производное; водорастворимую соль; водорастворимое низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля; или циклодекстрин). В одном из примеров водорастворимый материал может представлять собой графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу, декстран, полиакриламид, гликоли, натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трис(гидроксиметил)аминометан с этилендиаминтетрауксусной кислотой, трис(2-карбоксиэтил)фосфин, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин, динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты, полимеры, включающие функциональные гидроксильные группы, глицерин или солевой раствор цитрата натрия. После осаждения водного раствора он может быть высушен с образованием водорастворимого защитного покрытия 24.

Как показано на Фиг. 5G, затем к соединительному участку 25 может быть присоединена крышка 26. Крышка 26 может состоять из любых материалов и иметь любые конфигурации, рассмотренные в настоящем описании. Крышка 26 также может быть присоединена к соединительному участку 25 с помощью любой из методик, рассмотренных в настоящем описании.

В примере, показанном на Фиг. 5G, крышка 26 включает верхнюю часть 27, сформованную в виде единого целого с боковой стенкой (стенками) 29. Боковая стенка (стенки) 29 присоединены к соединительному участку 25 структурированной подложки 12 через разделительный слой 28.

Крышка 26 вместе со структурированной подложкой 12 (с находящимся на поверхности химическим веществом 20, 22) ограничивают проточный канал 30, который находится в селективном гидравлическом взаимодействии с углублениями 14, 14'. Проточный канал 30 может служить, например, для селективного подвода текучей среды к защитному покрытию 24 с целью удаления покрытия 24 и для селективного подвода компонентов реакции или реагентов к находящемуся на поверхности химическому веществу 20, 22 (после удаления защитного покрытия 24) с целью инициирования требуемых реакций в/вблизи углублений 14, 14'.

После присоединения крышки 26 к силанизированной структурированной подложке с частично удаленным шлифовкой покрытием и привитым праймером получают пример проточной ячейки 10', показанный на Фиг. 5G. В этом примере защитное покрытие 24 остается на находящемся на поверхности химическом веществе 20, 22 и некоторой части поверхности структурированной подложки. Проточная ячейка 10', на которой имеется защитное покрытие 24, может подвергаться транспортировке, хранению и т.д.

Если необходимо начать эксплуатацию проточной ячейки 10' (например, операцию секвенирования), то защитное покрытие 24 может быть удалено растворением, которое

обозначено позицией 108. Растворимость защитного покрытия 24 в воде позволяет удалять его растворением в водном растворе, который не оказывает негативного влияния на нижележащее находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22 или структурированную подложку 12. Фиг. 5H показана проточная ячейка 10' после удаления защитного покрытия 24.

Ниже рассмотрен пример, показанный на Фиг. 5I-5L. Как показано на Фиг. 51, начальное водорастворимое защитное покрытие 24' может быть селективно осаждено или нанесено в виде структуры, таким образом, что оно закрывает слой 20 покрытия из функционализированного полимера, а соединительный участок 25 структурированной подложки 12 остается открытым. В этом примере начальное водорастворимое защитное покрытие 24' селективно осаждено или нанесено в виде структуры на промежуточные области 16, находящиеся между соседними углублениями 14, 14', но не на край/периферию структурированной подложки 12, где расположен соединительный участок 25. Селективное осаждение/нанесение в виде структуры начального водорастворимого защитного покрытия 24' может быть выполнено как указано в настоящем описании, с помощью водного раствора, рассмотренного при раскрытии этапа, обозначенного позицией 104" (где раствор включает воду и в некоторых случаях до приблизительно 15% (масс./об.) графтсополимера поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозы или полиэтиленгликоля).

Начальное защитное покрытие 24 защищает слой 20 покрытия из функционализированного полимера во время любых этапов сборки, выполняемых впоследствии. Как показано на Фиг. 5J, сборка может включать присоединение крышки 26 к соединительному участку 25. Несмотря на то, что это не показано, если применяют подложку из многослойной конструкции, то сборка может включать присоединение и нарезку. Крышка 26 может состоять из любых материалов и может иметь любую из конфигураций, рассмотренных в настоящем описании. Крышка 26 может быть присоединена к соединительному участку 25 с помощью любой из методик, рассмотренных в настоящем описании.

В примере, показанном на Фиг. 5J, крышка 26 включает верхнюю часть 27, сформованную в виде единого целого с боковой стенкой (стенками) 29. Боковая стенка (стенки) 29 присоединена к соединительному участку 25 структурированной подложки 12 через разделительный слой 28. После присоединения крышки 26 между крышкой 26 и структурированной подложкой 12 образуется проточный канал 30. Проточный канал 30 может служить для селективной подачи различных текучих сред в проточную ячейку 10'.

Как показано на Фиг. 5K, затем начальное водорастворимое защитное покрытие 24' может быть удалено. Поскольку начальное защитное покрытие растворимо в воде, его удаление может включать растворение водой, описанное при рассмотрении этапа, обозначенного 108. Растворение начального защитного покрытия 24' и удаление раствора из проточного канала 30 приводит к раскрытию слоя 20 покрытия из функционализированного полимера и структурированной подложки 12 (например, промежуточных областей 16, не соединенных с крышкой 26), которые были закрыты начальным защитным покрытием 24'.

Также, как показано на Фиг. 5K, после удаления начального защитного покрытия 24' к слою 20 покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в углублении (углублениях) 14, 14', может быть привит праймер 22. Может быть применен любой из праймеров 22, рассмотренных в настоящем описании. В этом примере прививка может быть выполнена элюированием (позиция 102'") раствора или смеси праймера,

рассмотренной в настоящем описании, которая может включать праймер (праймеры), воду, буфер и катализатор. После прикрепления праймера 22 получают проточную ячейку 10'.

Если необходимо произвести транспортировку проточной ячейки 10' или хранить ее в течение некоторого периода времени, то, как показано на Фиг. 5L, на поверхность химического вещества 20, 22 и на по меньшей мере часть структурированной подложки 12 (т.е. промежуточные области 16, открытые в канале 30) может быть нанесено (второе) водорастворимое защитное покрытие 24. Осаждение (второго) водорастворимого защитного покрытия 24 может быть выполнено элюированием водного раствора, рассмотренного при описании этапа, обозначенного 104'''. Повторно следует отметить, что в этом примере водорастворимый материал в водном растворе может представлять собой материал любого из примеров, рассмотренных в настоящем описании (т.е. может представлять собой водорастворимый некатионный синтетический полимер; водорастворимый натуральный полисахарид или его производное; водорастворимый натуральный белок или его производное; водорастворимую соль; водорастворимое низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля или циклодекстрина). В одном из примеров водорастворимый материал может представлять собой графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу, декстран, полиакриламид, гликоли, натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трис(гидроксиметил)аминометан с этилендиаминтетрауксусной кислотой, трис(2-карбоксиэтил)фосфин, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин, динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты, полимеры, включающие функциональные гидроксильные группы, глицерин или солевой раствор цитрата натрия.

Другой пример способа (например, способа 100 или 200) включает неструктурированную подложку 12', показанную на Фиг. 6A-6E.

Любые подложки, рассмотренные в настоящем описании, и неструктурированная подложка 12' не включают углубления 14 или промежуточные области 16. В этом примере способа крышку 26 присоединяют к неструктурированной подложке 12' на начальном этапе, в результате чего образуется проточный канал (каналы) 30. Крышка 26 может быть изготовлена из любого материала и иметь любую из конфигураций, рассмотренных в настоящем описании. Крышка 26 также может быть присоединена к неструктурированной подложке 12' с помощью любой методики, рассмотренной в настоящем описании.

В примере, показанном на Фиг. 6B, крышка 26 включает верхнюю часть 27, сформованную в виде единого целого с боковой стенкой (стенками) 29. Боковая стенка (стенки) 29 присоединена к соединительному участку неструктурированной подложки 12' через разделительный слой 28. Соединительный участок может находиться на периферии неструктурированной подложки 12' или в любой из областей, где необходимо сформировать границу проточного канала 30. В других примерах разделительный слой 28 может образовывать боковую стенку (стенки) и может быть присоединен к по меньшей мере по существу плоской крышке 26.

Крышка 26 (включающая боковую стенку (стенки) 29) вместе с неструктурированной подложкой 12 ограничивают проточный канал 30. Проточный канал 30 может служить, например, для селективного введения текучих сред для формования на поверхности химического вещества 20, 22 и защитного покрытия 24, для удаления покрытия 24 и для селективного подвода компонентов реакции или реагентов к находящемуся на

поверхности химическому веществу 20, 22 (после удаления защитного покрытия 24) с целью инициирования требуемых реакций в проточном канале 30.

До формирования из функционализированного полимера слоя 20 покрытия (показанного на Фиг. 6C), способ может включать очистку и/или другую обработку (например, силанизацию) неструктурированной подложки (элюированием) для подготовки открытой поверхности неструктурированной подложки к последующему осаждению функционализированной молекулы.

Силанизация неструктурированной подложки 12' показана на Фиг. 6B. В этом примере при силанизации силан или производное 18 силана присоединяется к открытым частям неструктурированной поверхности многослойной конструкции 12', находящимся в проточном канале 30.

Силанизация может быть проведена с использованием любого силана или производного 18 силана. Выбор силана или производного 18 силана может частично зависеть от типа функционализированной молекулы, которую используют для образования слоя 20 покрытия из функционализированного полимера (показанного на Фиг. 6C), поскольку может быть желательным образование ковалентной связи между силаном или производным 18 силана и слоем 20 покрытия из функционализированного полимера. Для присоединения силана или производного 18 силана к подложке 12' может быть применено элюирование.

Как показано на Фиг. 6C, в этом примере на силане или производном 18 силана или на другом химическом веществе, которое было осаждено при подготовке открытой поверхности неструктурированной подложки 12' в проточном канале 30, формируют слой 20 покрытия из функционализированного полимера.

Могут быть применены любые функционализированные молекулы, рассмотренные в настоящем описании. В этом примере слой покрытия из функционализированного полимера может быть образован элюированием. При пропускании потока функционализированные молекулы могут быть введены в проточный канал (каналы) 30 через соответствующее впускное отверстие (отверстия) и подвергнуты отверждению. Слой 20 покрытия из функционализированного полимера образуется на открытой поверхности неструктурированной подложки 12', и удаление шлифовкой не производят.

Как показано на Фиг. 6D, праймер 22 прививают на слой 20 покрытия из функционализированного полимера в проточном канале 30. Могут быть применены любые праймеры, рассмотренные в настоящем описании. В этом примере прививка может быть выполнена элюированием. При элюировании раствор или смесь праймера, рассмотренные в настоящем описании, могут быть введены в проточный канал (каналы) 30 через соответствующее впускное отверстие (отверстия), могут удерживаться в проточном канале (каналах) в течение времени, достаточного для закрепления праймера (т.е. в течение инкубационного периода) на слое 20 покрытия из функционализированного полимера, после чего они могут быть удалены из соответствующего выпускного отверстия (отверстий). После присоединения праймера, через проточный канал (каналы) может быть пропущена дополнительная текучая среда (среды) для промывки уже функционализированного проточного канала (каналов) 30.

Полученная в этом примере проточная ячейка 10" показана на Фиг. 6D. Эта проточная ячейка 10" может быть применена для проведения секвенирования, или на нее может быть нанесено защитное покрытие 24, применяемое при транспортировке и/или хранении.

Как показано на Фиг 6E, в одном из примеров после прививки праймера 22 к слою 20 покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в проточном канале

30, на находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22 наносят водорастворимое защитное покрытие 24. В этом примере водорастворимое защитное покрытие 24 может быть образовано элюированием. При проведении элюирования, в проточный канал (каналы) 30 через соответствующее впускное отверстие (отверстия) может быть введен водный раствор (включающий воду и в некоторых случаях до приблизительно 15% (масс./об.) водорастворимого пленкообразующего материала), который может удерживаться в проточном канале (каналах). Может быть введено количество водного раствора, достаточное для покрытия находящегося на поверхности проточного канала 30 химического вещества 20, 22. Во время нахождения раствора в проточном канале (каналах) 30 проточная ячейка (ячейки) может быть высушена пропусканием через впускное отверстие воздуха или азота или созданием вакуума в течение периода времени, достаточного для высушивания (второго) водорастворимого защитного покрытия на находящемся на поверхности химическом веществе 20, 22.

В этом примере водорастворимый материал в водном растворе может представлять собой любой из примеров материалов, рассмотренных в настоящем описании (т.е. водорастворимый некатионный синтетический полимер; водорастворимый натуральный полисахарид или его производное; водорастворимый натуральный белок или его производное; водорастворимую соль; водорастворимое низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля или циклодекстрина). В одном из примеров водорастворимый материал может представлять собой любой из следующих материалов: графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу, декстран, полиакриламид, гликоли, натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трис(гидроксиметил)аминометан с этилендиаминтетрауксусной кислотой, трис(2-карбоксиэтил)фосфин, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин, динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты, полимеры, включающие функциональные гидроксильные группы, глицерин или солевой раствор цитрата натрия.

Следует понимать, что в некоторых примерах прививка праймера и образование водорастворимого защитного покрытия 24 могут быть проведены одновременно.

Если необходимо начать эксплуатацию (например, секвенирование или генотипирование) проточной ячейки 10'' (имеющей защитное покрытие 24 на находящемся на поверхности химическом веществе 20, 22), то защитное покрытие 24 может быть удалено растворением, как указано при описании этапа, обозначенного 108. Растворимость защитного покрытия 24 в воде позволяет удалять его растворением в водном растворе, что не оказывает негативного влияния на нижележащее находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22.

Кроме того, способы, рассмотренные в настоящем описании, могут включать проверку качества. В одном из примеров проверка качества может представлять собой анализ CFR (анализ с веществом Cal Fluor Red) или HP-TET или другой подходящий анализ с использованием красителя. Проверка может быть проведена до введения защитного покрытия 24 (но после прививки праймера) и затем повторно после удаления защитного покрытия 24 (и повторного раскрытия праймеров). Данные проверки могут указывать на то, произошло ли разрушение праймера. В одном из примеров способ включает удаление водорастворимого защитного покрытия и выполнение анализа с использованием красителя для обнаружения возможного разрушения праймера. В одном из примеров проточная ячейка 10, 10', 10'', рассмотренная в настоящем описании, может демонстрировать менее 15% снижения удержания CFR после 2 суток выдержки

при наличии защитного покрытия, а в другом примере менее 10% снижения удержания CFR после 2 суток выдержки при наличии защитного покрытия. В другом примере проточная ячейка 10, 10', 10'' может не демонстрировать снижения удержания CFR, а, напротив, может демонстрировать повышение удержания CFR (составляющее, например, от приблизительно 1% до приблизительно 25% или в другом примере от приблизительно 5% до приблизительно 20%). В другом примере после прививки праймера, но до нанесения водорастворимого покрытия можно определить эффективность прививки праймера посредством гибридизации привитых праймеров с мечеными олигонуклеотидами контроля качества. Гибридизованные олигонуклеотиды, предназначенные для проверки качества, обнаруживают и затем производят дегибридизацию, отщепляя их от праймеров. Затем наносят водорастворимое покрытие.

Примеры, рассмотренные в настоящем описании, показывают, что на соединительных участках 25 защитное покрытие 24 не формируют. Однако в других примерах защитное покрытие 24 может быть образовано на всей поверхности подложки 12, 12' (т.е. на находящемся на поверхности химическом веществе 20, 22, в некоторых примерах на промежуточных областях 16 и на соединительных участках 25), и крышка 26 может быть присоединена к подложке 12, 12' через защитное покрытие 24.

Несмотря на то, что это не показано, следует понимать, что некоторые примеры проточной ячейки 10, 10', 10'' могут быть непосредственно присоединены к устройству обнаружения (не показано), то есть быть в физическом контакте с устройством обнаружения, осуществляемым через один или более фиксирующих механизмов (например, клей, соединение, фиксаторы и т.д.). Устройство обнаружения может включать устройство КМОП (которое включает совокупность расположенных один над другим слоев, включающих, например, слой (слои) кремния, слой (слои) диэлектрика, слой (слои) металла-диэлектрика, слой (слои) металла и т.д.) и оптические компоненты. Оптические компоненты могут быть установлены таким образом, что оптический датчик устройства обнаружения по меньшей мере по существу выровнен с и, таким образом, функционально соединен с одним оптическим волноводом устройства обнаружения и с находящимся на поверхности химическим веществом 20, 22, расположенным в одном углублении 14, 14' проточной ячейки 10, 10', 10''.

Также, несмотря на то, что это не показано, следует понимать, что функционализированная подложка (на поверхности которой или в углублении (углублениях) 14 находится химическое вещество 20, 22) может быть присоединена не к крышке 26, а к другой функционализированной подложке, в углублении (углублениях) которой расположено находящееся на поверхности химическое вещество 20, 22. Две функционализированные поверхности могут быть обращены друг к другу, и между ними может быть сформирован проточный канал. Для соединения двух функционализированных подложек друг с другом может быть применен разделительный слой и подходящий способ соединения.

Проточные ячейки 10, 10', 10'', рассмотренные в настоящем описании, могут быть применены для проведения множества различных методик или способов секвенирования, включающих методики, часто называемые секвенированием синтезом (англ. sequencing-by-synthesis, сокращенно SBS), секвенированием с циклической матрицей, секвенированием лигированием, пиросеквенированием и т.д. Применение этих методик в сочетании с примерами структурированных подложек позволяет проводить амплификацию только в функционализированных углублениях, поскольку слой 20 функционализированных молекул и присоединенного праймера (праймеров) 22 секвенирования находятся в функционализированных углублениях (т.е. 14, 14' и

находящееся на их поверхности химическое вещество 20, 22) и отсутствуют в промежуточных областях 16. В других примерах амплификация может протекать по всей дорожке проточной ячейки.

В одном из примеров в системе, такой как системы секвенирования HiSeq™, HiSeqX™, MiSeq™, NovaSeq™ или NextSeq™, поставляемые Illumina (San Diego, CA), может быть проведена реакция секвенирования синтезом (SBS). При проведении SBS для определения последовательности нуклеотидов в матрице отслеживают удлинение (рост) праймера нуклеиновой кислоты вдоль матрицы нуклеиновой кислоты. В основе этой методики может лежать химический процесс полимеризации (например, катализируемой ферментом полимеразой) или лигирования (например, катализируемой ферментом лигазой). В одном из способов SBS, включающих использование полимеразы, к праймеру 22 в соответствии с последовательностью матрицы добавляют флуоресцентно меченые нуклеотиды (что приводит к удлинению праймера 22), и порядок и тип нуклеотидов, добавляемых к праймеру 22, определяют для определения последовательности матрицы. Например, для инициирования первого цикла SBS один или более меченых нуклеотидов, ДНК-полимераза и т.д. могут быть направлены в/через проточный канал 30, 30A и т.д., в котором находится массив праймеров 22. Функционализированные углубления (т.е. 14, 14' с находящимся на поверхности химическим веществом 20, 22), где в результате удлинения праймера происходит встраивание меченого нуклеотида, могут быть обнаружены посредством визуализации. При проведении визуализации функционализированные углубления (т.е. 14, 14' с находящимися на их поверхности химическими веществами 20, 22) могут быть облучены возбуждающим излучением, испускаемым системой освещения (не показана).

В некоторых примерах нуклеотиды могут дополнительно обладать способностью к обратимой терминации, которая позволяет прекращать дальнейшее удлинение праймера после добавления к праймеру 22 такого нуклеотида. Например, к праймеру 22 может быть добавлен аналог нуклеотида, включающий обратимый терминатор, так что последующая достройка не может произойти до тех пор, пока не будет добавлен деблокирующий реагент для удаления терминирующего фрагмента. Таким образом, в тех примерах, в которых проводят обратимую терминацию, в проточные каналы 30, 30A и т.д. может быть направлен деблокирующий реагент (до или после проведения обнаружения).

Между проведением различных этапов доставки текучих сред может быть выполнена промывка (промывки). Затем цикл SBS может быть повторен n раз, в результате чего праймер 22 достраивается n нуклеотидами, что позволяет определить последовательность длины n.

Несмотря на то, что подробно был рассмотрен способ SBS, следует понимать, что рассмотренные в настоящем описании проточные ячейки 10, 10', 10" могут быть применены для проведения других протоколов секвенирования, для генотипирования или других химических и/или биологических способов.

Для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения ниже приведены примеры. Следует понимать, что эти примеры приведены для иллюстрации изобретения и не ограничивают его объем.

В некоторых из этих примеров защитные покрытия высушены, а в некоторых примерах защитные покрытия находятся во влажном состоянии. При упоминании влажных покрытий применяются термины "выдержка во влажном состоянии" или "выдержанный во влажном состоянии". Несмотря на то, что покрытия, которые подвергались сушке, визуально были сухими и твердыми, следует понимать, что в них

могут присутствовать следы влаги. Влажные покрытия имеют жидкую форму.

ОПИСАНИЕ НЕОГРАНИЧИВАЮЩИХ РАБОЧИХ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1

Проточные ячейки согласно примеру (1A и 1B) имели несколько проточных каналов/дорожек, образованных на структурированной подложке из кремния и/или оксида тантала, причем каждая дорожка находилась в гидравлическом взаимодействии с совокупностью лунок. В каждой лунке был сформирован слой PAZAM, и на слой PAZAM прививали 1 мкМ праймеров. На находящемся на поверхности химическом веществе в конечном итоге были сформированы защитные покрытия (как рассмотрено ниже). Несколько защитных покрытий высушивали, а одно защитное покрытие оставалось влажным.

Были проведены испытания сравнительной проточной ячейки. Находящееся на поверхности химическое вещество было тем же, что и в примерах проточных ячеек. На находящееся на поверхности химическое вещество сравнительной проточной ячейки не было нанесено защитное покрытие.

Первый контроль качества посредством анализа HP-TET был выполнен на каждой дорожке каждой из проточных ячеек согласно примеру и в сравнительной проточной ячейке до нанесения защитных покрытий на проточные ячейки согласно примеру. HP (от англ. hairpin) или "шпилька" определяет вторичную структурную часть молекулы ДНК, применяемой для зондирования праймеров, закрепленных на поверхности проточной ячейки, и TET (или TET + ДНК) представляет собой меченный красителем олигонуклеотид, имеющий последовательность, комплементарную используемым праймерам. TET гибридизовали с праймерами, избыток TET удаляли промывкой, и флуоресцентными способами измеряли флуоресценцию присоединенного красителя.

После проведения первого анализа с HP-TET были приготовлены несколько водных растворов графтсополимера поливинилового спирта/полиэтиленгликоля (в этом примере KOLLICOAT® IR). Концентрация сополимерной составляющей в каждом растворе была различной и составляла от 0,10% до 10% (масс./об.). Водные растворы подавали по одному элюированием в каждую дорожку каждой из проточных ячеек, где они контактировали со слоями PAZAM и праймерами, находящимися на соответствующих дорожках. Водный раствор сушили, получая защитное покрытие. Каждое из высушенных защитных покрытий содержало отличающуюся от других концентрацию сополимера. Ячейки согласно примеру и сравнительную ячейку сушили в атмосфере азота.

Высушенные проточные ячейки согласно примеру затем хранили в сухом состоянии в течение 3 суток при 60°C (эквивалентно хранению в сухих условиях в течение 1 месяца при 25°C или в обычных условиях) при наличии защитного покрытия.

Сравнительную проточную ячейку без покрытия ("без покрытия") хранили в тех же сухих условиях.

Другое защитное покрытие было получено пропусканием жидкого буфера хлорид натрия-цитрат натрия (SSC). Таким образом, этот пример проточной ячейки хранили во влажных условиях, в которых буфер хлорид натрия-цитрат натрия (SSC) при 4°C оставляли впитываться в находящееся на поверхностях проточной ячейки химическое вещество.

После выдержки защитное покрытие удаляли с дорожек соответствующих проточных ячеек согласно примерам растворением в воде во время промывки, и проточные ячейки, которые хранили во влажном состоянии, ополаскивали. Выполняли повторный контроль качества анализом с HP-TET каждой дорожки каждой из проточных ячеек согласно

примерам и сравнительной проточной ячейки.

Степени удержания HP-TET вычисляли по результатам, полученным до нанесения покрытия и после выдержки. Степени удержания представлены на Фиг. 7. Как показано, удержание HP-TET в целом повышается с повышением концентрации сополимера в обеих проточных ячейках 1A и 1B. При концентрации 1% или ниже покрытие из сополимера было не настолько эффективно, как в сравнительном примере или при хранении во влажном состоянии. Этот пример показывает, что при концентрациях сополимера, составляющих от приблизительно 2,5% до приблизительно 10%, защитное покрытие повышает стабильность находящегося на поверхности химического вещества при хранении в сухих условиях по сравнению с находящимся на поверхности химическим веществом, которое хранили без покрытия в тех же сухих условиях, и полученная стабильность приблизительно равна стабильности при хранении во влажном состоянии.

Пример 2

Проточные ячейки согласно примеру (по две каждого типа 2A-2H) включали одну дорожку, образованную на подложке из кремния с покрытием из оксида тантала. На дорожке был сформован слой PAZAM, и на слое PAZAM закреплен 1 мкМ праймеров. На находящееся на поверхности химическое вещество затем наносили защитные покрытия. Как указано ниже, каждый тип защитного покрытия был протестирован на примере двух проточных ячеек, и результаты, представленные на Фиг. 8, представляют собой среднее значение для двух проточных ячеек, имеющих защитное покрытие одного типа. Некоторые из защитных покрытий сушили (2A-2H), а одно защитное покрытие оставалось влажным.

Было проведено испытание сравнительной проточной ячейки. Находящееся на поверхности химическое вещество было тем же, что и в проточных ячейках согласно примеру. На находящееся на поверхности химическое вещество сравнительной проточной ячейки не наносили защитное покрытие.

Первый контроль качества посредством анализа с HP-TET выполняли на каждой из дорожек проточных ячеек согласно примеру и сравнительной проточной ячейки до нанесения защитных покрытий на проточные ячейки согласно примеру.

После проведения первого анализа с HP-TET были приготовлены несколько водных растворов материалов защитных покрытий, имеющих разный потенциал. Были приготовлены растворы натриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (0,1% масс.), глицерина (1% масс.), гидрохинона (0,1% масс.), KOLLICOAT® IR (1%), полиэтиленгликоля 3000 (1%), трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТКЭФ) (0,1% масс.), основания Трис (pH 7-8) (100 мм) и TWEEN® 20 (неионного эмульгатора) (1%).

Один водный раствор вводили элюированием в две проточные ячейки согласно примеру (т.е. раствор ЭДТА вводили в две проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2A), раствор глицерина вводили в две другие проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2B), раствор гидрохинона вводили в две следующие проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2C), раствор KOLLICOAT® IR вводили в две другие проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2D), раствор полиэтиленгликоля 3000 вводили в две следующие проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2E), раствор ТКЭФ вводили в две другие проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2F), раствор основания Трис вводили в две следующие проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2G), и раствор TWEEN® 20 вводили в две другие проточные ячейки (каждая из которых была обозначена как 2H)) на слои PAZAM и праймеры, находящиеся в соответствующих проточных ячейках. Водные растворы сушили, получая защитные

покрытия. Ячейки согласно примеру и сравнительную ячейку сушили в атмосфере азота.

Проточные ячейки согласно примеру затем хранили в сухом состоянии в течение 3 суток при 60°C (эквивалентно хранению в сухих условиях в течение 1 месяца при 25°C или в обычных условиях) при наличии защитного покрытия.

Сравнительную проточную ячейку без покрытия (C1) хранили в тех же сухих условиях.

Другое защитное покрытие было получено пропусканием жидкого буфера хлорид натрия-цитрат натрия (SSC). Таким образом, этот пример проточной ячейки (WC) хранили во влажных условиях, в которых буфер хлорид натрия-цитрат натрия (SSC) при 4°C оставляли впитываться в находящееся на поверхностях проточной ячейки химическое вещество.

После выдержки защитное покрытие удаляли с дорожек соответствующих примеров проточных ячеек растворением в воде во время промывки, и проточные ячейки (WC), которые хранили во влажном состоянии, ополаскивали. Выполняли повторный контроль качества анализом с HP-TET каждой дорожки каждого из примеров проточных ячеек и сравнительной проточной ячейки.

Степени удержания HP-TET вычисляли по результатам, полученным до нанесения покрытия и после выдержки. Степени удержания представлены на Фиг. 8. Как показано, величины удержания HP-TET в проточных ячейках с покрытиями, содержащими глицерин (2B), сополимер (2D), полиэтиленгликоль (2E) и ТКЭФ (2F), были сравнимы с или превышали величины удержания сравнительного примера (C1), который хранили в сухом состоянии в аналогичных условиях. Результаты, полученные при использовании покрытий 2A, 2C, 2G и 2H, указывают на то, что эти покрытия, имеющие указанные концентрации и/или нанесенные элюированием реагента, могут затруднять доступность праймеров и/или могут не предотвращать разрушение находящегося на поверхности химического вещества в той же степени, что покрытия 2B и 2D-2F. Предположительно, покрытия 2A, 2C, 2G и 2H могут функционировать лучше при других концентрациях и/или при нанесении другим способом.

Пример 3

Каждая из проточных ячеек, используемых в этом примере, включала неструктурированную стеклянную подложку с 4 дорожками. В одной из проточных ячеек две дорожки (каждая из которых была обозначена как 3A) использовали как дорожки согласно примеру, и две дорожки (каждая из которых была обозначена как C2A) использовали как сравнительные дорожки. В другой проточной ячейке две дорожки (каждая из которых была обозначена как 3B) использовали как дорожки согласно примеру, и две дорожки (каждая из которых была обозначена как C2B) использовали как сравнительные дорожки. В третьей проточной ячейке две дорожки (каждая из которых была обозначена как 3C) использовали как дорожки согласно примеру, и две дорожки (каждая из которых была обозначена как C2C) использовали как сравнительные дорожки.

На каждой дорожке был образован слой PAZAM, и на слое PAZAM были закреплены праймеры. Защитное покрытие из KOLLICOAT® IR было нанесено элюированием на химическое вещество, находящееся на поверхности дорожек согласно примеру (3A, 3B, 3C). На дорожки сравнительного примера (C2A, C2B, C2C) защитное покрытие не наносили. Сушку дорожек согласно примеру и сравнительному примеру выполняли, пропуская поток газообразного азота по каждой дорожке в течение 30 секунд.

Проточные ячейки с дорожками 3A согласно примеру и сравнительными дорожками

C2A выдерживали при 84% относительной влажности в упаковке в течение 7 суток и 14 суток. Проточные ячейки с дорожками 3B согласно примеру и сравнительными дорожками C2B выдерживали при 5% относительной влажности в упаковке в течение 7 суток и 14 суток.

Эти проточные ячейки были извлечены из хранилища, и их применяли для секвенирования. Дорожки 3A, 3B согласно примеру и дорожки C2A, C2B согласно сравнительному примеру во время секвенирования подвергали промывке. Предположительно, промывка по меньшей мере частично снимает защитное покрытие с дорожек 3A, 3B согласно примеру. Однако секвенирование также может быть выполнено без удаления защитного покрытия.

На Фиг. 9 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции дорожек (3A, 3B, C2A, C2B) после проведения первого цикла секвенирования. Данные показывают, что при наличии защитного покрытия влажность условий выдержки оказывает минимальное влияние на интенсивности цикла 1 по сравнению с секвенированием на дорожках, не имевших защитного покрытия (т.е. при сравнении 3A с C2A и сравнении 3B с C2B). Интенсивности цикла 1, полученные для дорожек C2A, C2B без покрытия, показывают, что находящееся на поверхности химическое вещество под действием влаги разлагается. Кроме того, влияние на интенсивность 5% влажности (дорожки 3B течения) намного менее выражено, чем влияние 84% влажности (дорожки 3A течения).

Проточную ячейку с дорожками 3CA согласно примеру и сравнительными дорожками C2C выдерживали при колебаниях наружной температуры в течение периодов времени, составляющих от 2 суток до 19 суток. Температура изменялась в диапазоне от приблизительно -23°C до приблизительно 60°C в течение каждых 24 часов в течение соответствующего периода времени. С момента времени 0 до приблизительно 8 часа температуру поддерживали в диапазоне приблизительно от -23°C до -25°C. Затем температуру повышали до приблизительно 60°C и выдерживали в течение приблизительно 8 часов. Затем температуру понижали до значений, составляющих от приблизительно -23°C до -25°C, и в течение времени от приблизительно часа 18 до часа 24 температуру поддерживали в диапазоне приблизительно от -23°C до -25°C.

Эту проточную ячейку извлекали из хранилища и применяли для секвенирования. При проведении секвенирования дорожки 3C согласно примеру и дорожки C2C согласно сравнительному примеру подвергали промывке, и промывка, как полагают, по меньшей мере частично удаляла защитное покрытие с дорожек 3C согласно примеру (хотя секвенирование может быть выполнено без удаления защитного покрытия).

На Фиг. 10 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции дорожек (3C, C2C) после проведения первого цикла секвенирования. Данные показывают, что при наличии защитного покрытия колебания наружной температуры минимально влияют на интенсивность цикла 1 по сравнению с тем случаем, когда защитное покрытие отсутствует (т.е. при сравнении 3C с C2C). Интенсивность цикла 1 на дорожках C2C без покрытия показывает, что находящееся на поверхности химическое вещество разлагается под действием колебаний наружной температуры.

Пример 4

В этом примере использовали две открытых проточных ячейки (т.е. без присоединенных крышек). Каждая открытая проточная ячейка включала одну дорожку (4A, 4B), сформированную на структурированной подложке из кремния, причем каждая дорожка находилась в гидравлическом взаимодействии с совокупностью лунок. На каждую лунку был нанесен слой PAZAM, и к слою PAZAM был привит 1 мкМ праймеров.

Секвенирование выполняли в двух открытых проточных ячейках до образования

защитных покрытий.

На половину химического вещества, находящегося на поверхности в каждой открытой проточной ячейке, способом нанесения покрытия погружением были сформированы защитные покрытия из KOLLICOAT® IR. Открытые проточные ячейки сушили в токе газообразного азота. В этом примере половины с покрытием названы примерами 4A и 4B, а половины без покрытия названы сравнительными примерами C3 и C4.

После образования защитных покрытий испытуемую проточную ячейку, включающую сторону 4A с покрытием и сравнительную сторону C3 без покрытия, выдерживали в открытом состоянии в течение 6 суток при 60°C. При открытой выдержке на защитное покрытие и открытое химическое вещество, находящееся на поверхности стороны без покрытия, непосредственно воздействовала температура 60°C. Испытуемую проточную ячейку, включающую сторону 4B с покрытием и сравнительную сторону C4 без покрытия, выдерживали в открытом состоянии в течение 7 суток при комнатной температуре.

Целые проточные ячейки (т.е. половины 4A и 4B с предварительно нанесенным покрытием) и половины (C3 и C4) без покрытия извлекали из хранилища и применяли для секвенирования. Полагают, что защитные покрытия были по меньшей мере частично удалены с половин 4A и 4B с покрытием растворением в воде при проведении промывки (промывок).

На Фиг. 11A представлена диаграмма интенсивности флуоресценции после проведения первого цикла секвенирования в проточной ячейке, включающей 4A и C3, в момент времени T0 (т.е. предварительное покрытие на 4A) и после выдержки, в момент времени T1. Данные показывают, что при наличии защитного покрытия выдержка в открытом виде при 60°C минимально влияет на интенсивность цикла 1 по сравнению с тем случаем, когда защитное покрытие отсутствует (т.е. при сравнении 4A с C3). Интенсивность цикла 1, полученная на половине C3 без покрытия, показывает, что находящееся на поверхности химическое вещество разлагается при выдержке в открытом виде.

На Фиг. 11B представлены две диаграммы - на верхней показана процентная доля кластеров, проходящих через фильтр (% прохождения через фильтр (ПФ)) и на нижней показана интенсивность флуоресценции после проведения первого цикла секвенирования в проточной ячейке, включающей 4B и C4, в момент времени T0 (т.е. перед нанесением покрытия на 4B), и два прогона, произведенные после выдержки в момент времени T1. Процент (%) прохождения через фильтр (ПФ) является показателем, применяемым для описания кластеров, которые проходят пороговое значения "чистоты" и которые используют для дополнительной обработки и анализа данных секвенирования. Более высокий % прохождения через фильтр соответствует повышенному выходу уникальных кластеров, используемых для обработки данных секвенирования. Данные, представленные на Фиг. 11B, показывают, что % прохождения через фильтр повышается при применении защитного покрытия (сравнить 4B с C4 в моменты времени T0 и в обеих фигуративных точках T1). Данные, представленные на Фиг. 11B, также показывают, что при наличии защитного покрытия выдержка в открытом виде при комнатной температуре минимально влияет на интенсивность цикла 1 по сравнению с тем случаем, когда защитное покрытие отсутствует (т.е. сравнить 4B с C4 в моменты времени T0 и в обеих фигуративных точках T1). Интенсивность цикла 1 на половине C4 без покрытия показывает, что находящееся на поверхности химическое вещество разлагается при выдержке в открытом виде даже при комнатной температуре.

Пример 5

В каждую из лунок открытой структурированной многослойной конструкции из

стекла наносили слой PAZAM. После удаления шлифовкой многослойная конструкция была нарезана на части, и защитное покрытие из KOLLICOAT® IR было нанесено распылением на одну из нарезанных ячеек. Сравнительная нарезанная ячейка была получена аналогичным образом (с покрытием из PAZAM), за исключением образования защитного покрытия из KOLLICOAT® IR.

Нарезанные ячейки согласно примеру и сравнительному примеру выдерживали в течение 1 часа при 20°C, 60°C и 80°C. После выдержки защитное покрытие удаляли с нарезанных ячеек согласно примеру растворением в воде при промывке. На слои PAZAM нарезанных ячеек согласно примеру и сравнительному примеру прививали 1 мкМ праймеров, получая, соответственно примеры проточной ячейки и сравнительную проточную ячейку.

Для определения возможного влияния различных условий выдержки на прививку праймеров выполняли анализ с CFR. Для проведения анализа с CFR, на поверхности, к которым были присоединены праймеры, наносили флуоресцентно меченные (с помощью Cal Fluor Red) комплементарные олигонуклеотиды, находящиеся в буферном растворе. Эти олигонуклеотиды связывались с закрепленными на поверхности праймерами, а избыток CFR удаляли промывкой. Затем поверхность сканировали с помощью флуоресцентного датчика, определяя интенсивность CFR на поверхности, которая позволяет количественно определять концентрацию и интактность праймеров, находящихся на поверхности. По завершении определений олигонуклеотиды удаляли обработкой раствором мягкого основания, и поверхности повторно сканировали для подтверждения удаления всего CFR.

Величины средней интенсивности, полученные для проточной ячейки согласно примеру, представлены на Фиг. 12A, а величины средней интенсивности, полученные для сравнительной проточной ячейки, представлены на Фиг. 12B. Очевидно, что температура 60°C или более высокие температуры оказывают негативное влияние на способность слоя PAZAM без покрытия, находящегося в сравнительной проточной ячейке, присоединять праймеры (Фиг. 12B). При всех температурах испытаний способность присоединять праймеры была выше у слоя PAZAM с покрытием, который находился в проточной ячейке согласно примеру, по сравнению со слоем PAZAM без покрытия, который находился сравнительной ячейке (сравнить Фиг. 12A и 12B). Несмотря на то, что после выдержки при 80°C средняя интенсивность понижалась как в проточной ячейке согласно примеру, так и в сравнительной проточной ячейке, как оказалось, свойства проточной ячейки согласно примеру ухудшались медленнее, чем свойства сравнительной проточной ячейки.

Пример 6

Каждая из проточных ячеек, показанных в этом примере, включала неструктурированную стеклянную подложку, на которой имелось 4 дорожки. В каждой из проточных ячеек две дорожки представляли собой дорожки примеров и имели защитное покрытие, и две дорожки представляли собой сравнительные дорожки, на которых не было защитного покрытия.

На каждую дорожку каждой ячейки был нанесен слой PAZAM, и на слой PAZAM элюированием были привиты праймеры. На каждую из двух дорожек примеров, находящихся в каждой проточной ячейке, на находящееся на поверхности химическое вещество элюированием было нанесено защитное покрытие из KOLLICOAT® IR. На каждую из двух сравнительных дорожек каждой проточной ячейки не было нанесено защитное покрытие. Дорожки примеров и сравнительные дорожки сушили пропусканием газообразного азота через каждую дорожку в течение 30 секунд.

Каждую проточную ячейку (включающую две дорожки примеров и две сравнительные дорожки) выдерживали при конкретной температуре, а именно: при 25°C, 40°C, 60°C или 80°C. Продолжительность выдержки ячеек составляла от 1 суток до 120 суток.

Проточные ячейки извлекали из хранилища и использовали для секвенирования. Дорожки примеров и дорожки сравнительных примеров подвергали промывкам при проведении секвенирования, и, как полагают, эти промывки по меньшей мере частично удаляли защитное покрытие с дорожек примеров (хотя секвенирование может быть выполнено без удаления покрытия).

На Фиг. 13 представлена диаграмма средней интенсивности флуоресценции выборки дорожек (примеров (т.е. 6) или сравнительных примеров (т.е. C5)) после проведения первого цикла секвенирования. Показаны величины интенсивности, полученные для дорожек примеров и сравнительных дорожек, и данные сгруппированы в соответствии с температурой, при которой выдерживали ячейки, и продолжительностью их выдержки, выраженной в сутках. Полученные данные ясно показывают, что при наличии защитного покрытия выдержка при повышенной температуре оказывает лишь минимальное влияние на величины интенсивности цикла 1, независимо от продолжительности выдержки, по сравнению с тем случаем, когда защитное покрытие отсутствует (сравнить: данные, обозначенные "6", и данные, обозначенные "C5"). Величины интенсивности цикла 1, полученные для сравнительных дорожек без покрытия, показывают, что находящееся на поверхности химическое вещество разлагается под действием повышенных температур.

Пример 7

Материал KOLLICOAT® IR был нанесен распылением на структурированную многослойную конструкцию КМОП, имеющую поверхность из $TaO_x$. Для создания на полученном покрытии областей с различной толщиной, количество нанесений распылением было различным на разных участках структурированной многослойной конструкции КМОП. Результаты представлены на Фиг. 14 в виде зависимости толщины защитного покрытия в мкм (ось y) от расстояния до различных участков защитного покрытия многослойной конструкции в мм (ось x). Толщина покрытия из сополимера несколько повышалась при увеличении количества нанесений на многослойную конструкцию и несколько понижалась при уменьшении количества нанесений. Полученные данные показывают, что нанесение покрытия распылением может быть применено для создания защитного покрытия с регулируемой толщиной.

Пример 8

На каждую из лунок открытой структурированной многослойной конструкции КМОП наносили слой PAZAM. После удаления шлифовкой многослойная конструкция была нарезана на ячейки размером 700 нм, и на три нарезанных ячейки было нанесено распылением защитное покрытие из KOLLICOAT® IR. Сравнительные ячейки были нарезаны аналогичным образом (с покрытием PAZAM), но на них не наносили защитное покрытие из KOLLICOAT® IR.

Одну вырезанную ячейку согласно примеру и вырезанную ячейку согласно сравнительному примеру выдерживали в течение 28 суток или 35 суток или 71 суток при комнатной температуре (т.е. приблизительно 25°C). После выдержки из вырезанной ячейки согласно примеру защитное покрытие удаляли промывкой в воде. Затем на слои PAZAM ячейки согласно примеру и ячейки согласно сравнительному примеру прививали 1 мкМ праймеров, и выдерживали примеры проточных ячеек, соответственно: 9A (28 суток выдержки), 9B (35 суток выдержки), 9C (71 сутки выдержки), и сравнительные

примеры проточных ячеек: C7A (28 суток выдержки), C7B (35 суток выдержки), C7C (71 сутки выдержки).

Затем в каждой из ячеек выполняли секвенирование. При промывке (промывках) защитное покрытие было удалено из примеров проточных ячеек.

На Фиг. 15 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции после проведения первого цикла секвенирования. После каждого из периодов выдержки сравнительные проточные ячейки C7A, C7B, C7C (которые выдерживали без защитного покрытия) демонстрировали понижение интенсивности по сравнению с примерами проточных ячеек 9A, 9B, 9C (которые выдерживали с защитным покрытием). Величины интенсивности цикла 1, полученные в проточных ячейках C7A, C7B, C7C без покрытия, показывают, что находящееся на поверхности химическое вещество разлагается при выдержке даже при комнатной температуре.

Пример 9

На каждую лунку открытой структурированной многослойной конструкции из кремния наносили слой PAZAM. После шлифовки многослойная конструкция была нарезана на ячейки, и начальное защитное покрытие из KOLLICOAT® IR было селективно нанесено распылением на две вырезанные ячейки так, чтобы соединительные участки оставались открытыми. Сравнительные вырезанные ячейки были получены аналогичным образом (с покрытием из PAZAM), но на них не наносили защитное покрытие из KOLLICOAT® IR. Крышки были присоединены к соответствующим соединительным участкам вырезанных ячеек примеров и сравнительного примера, в результате чего получали проточные ячейки. Затем начальное защитное покрытие KOLLICOAT® IR было удалено со слоев PAZAM примеров проточных ячеек растворением элюированием.

Затем на каждый из слоев PAZAM каждой из проточных ячеек примеров и сравнительных примеров элюированием прививали праймеры.

После прививки праймеров, на праймеры и слои PAZAM, находящиеся в проточных ячейках примеров, элюированием с последующей сушкой было нанесено другое защитное покрытие из KOLLICOAT® IR.

После этого проточные ячейки (10A и 10B) примеров с защитным покрытием выдерживали в сухом состоянии в течение 2 недель или 6 недель при 30°C. В тех же самых условиях в сухом состоянии выдерживали две сравнительные проточные ячейки (C8A, C8B) без покрытия (2 недели или 6 недель выдержки при 30°C); другой пример проточной ячейки (WC2) выдерживали во влажных условиях в течение 6 недель, то есть в течение этого времени находящееся на поверхности проточной ячейки химическое вещество было погружено в буфер хлорид натрия-цитрат натрия (SSC), и ячейка находилась при 4°C.

После выдержки в каждой из ячеек проводили секвенирование. Полагают, что при проведении промывки (промывок), защитное покрытие по меньшей мере частично удалялось из примеров проточных ячеек 10A, 10B, и буфер SSC удаляли из выдерживаемой во влажном состоянии проточной ячейки WC2 ополаскиванием.

На Фиг. 16 представлена диаграмма интенсивности флуоресценции после проведения первого цикла секвенирования. В результате воздействия каждого периода выдержки интенсивность в сравнительных проточных ячейках C8A, C8B (которые выдерживали в сухом состоянии без защитного покрытия) была снижена по сравнению с примерами проточных ячеек 10A, 10B (которые выдерживали с защитным покрытием). При выдержке, составляющей 6 недель, сухое защитное покрытие обеспечивает такую же защиту находящегося на поверхности химического вещества, что и защитное покрытие

для влажного выдержки (сравнить 10B с WC2).

Пример 10

На каждую из лунок подложек, имеющих открытую поверхность из покрытия из структурированного оксида тантала, наносили слой PAZAM, и на слои PAZAM элюированием были привиты праймеры. Также проводили анализ сравнительных проточных ячеек. Находящиеся на поверхности химические вещества были теми же, что и в проточных ячейках согласно примеру. На химическое вещество, находящееся на поверхности сравнительных проточных ячеек, защитные покрытия не наносили.

Первый анализ CFR проводили до нанесения любых защитных покрытий на проточные ячейки согласно примеру.

После проведения первого анализа с CFR, были приготовлены несколько водных растворов различных потенциальных материалов защитных покрытий. Были приготовлены растворы, содержащие натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), полиэтиленгликоль, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТКЭФ), трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин (ТГПТА), трис(гидроксиметил)аминометан с ЭДТА (буфер TE) и динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты (Bath). Концентрация каждого раствора указана в Таблице 1. Водные растворы были нанесены распределением растворов по поверхности проточных ячеек согласно примеру, после чего растворы оставляли испаряться для образования покрытий. Проточные ячейки согласно примеру затем выдерживали в сухом состоянии в течение 11 суток при 4°C или при комнатной температуре. Другой пример проточной ячейки выдерживали во влажном состоянии. В приведенной ниже Таблице 1 указаны различные параметры испытуемых ячеек и условия проведения испытания.

Таблица 1

| Идентификатор | Защитное покрытие | Условия выдержки | |
|---|---|---|---|
| | | 4°C | Комн. темп. (КТ) |
| WC3 | Хранение во влажных условиях | да | нет |
| C11 (сравнительный пример) | нет | да | нет |
| 11A | 0,5M ЭДТА | да | нет |
| 11B | 4,4% масс. ПЭГ | да | нет |
| 11C | 0,8% масс. ТКЭФ | да | нет |
| 11D | 1,0% масс. ТГПТА | да | нет |
| 11E | 1x буфер TE | да | нет |
| C12 (сравнительный пример) | нет | нет | да |
| 11F | 1x буфер TE | нет | да |
| 11G | 1,6% масс. Bath | нет | да |
| 11H | 0,5M ЭДТА | нет | да |
| 11I | 4,4% масс. ПЭГ | нет | да |
| 11J | 0,8% масс. ТКЭФ | нет | да |
| 11K | 1,0% масс. ТГПТА | нет | да |

Сравнительные проточные ячейки C11 и C12 без покрытия выдерживали в тех же в сухих условиях, соответственно, что и примеры ячеек, которые выдерживали в сухом состоянии при 4°C и в сухом состоянии при комнатной температуре. Другую проточную ячейку WC3 выдерживали во влажном состоянии, так что находящееся на поверхности проточной ячейки химическое вещество находилось в среде буфера хлорид натрия-цитрат натрия (SSC) при 4°C.

После выдержки в соответствующих условиях, защитное покрытие удаляли из каждого примера проточных ячеек (11A-11K) растворением при промывке водой, а выдерживаемую во влажном состоянии проточную ячейку WC3 ополаскивали. Затем с помощью анализа CFR проверяли качество каждой проточной ячейки согласно примеру и согласно сравнительному примеру.

На Фиг. 17 представлено отношение результатов анализа с CFR, полученных на 11 сутки, к результатам, полученным в момент времени T0 для каждого из примеров и сравнительных примеров. Как показано, удержание CFR в проточных ячейках, имеющих сухое защитное покрытие, было выше, чем в ячейках сравнительных примеров, которые выдерживали в сухом состоянии в аналогичных условиях, было сравнимо с удержанием, полученным в ячейках, выдерживаемых во влажных условиях.

Пример 11

На каждую из лунок структурированных подложек из кремния с открытой поверхностью наносили слой PAZAM. После шлифовки на слои PAZAM прививали 1 мкМ праймеров. Сравнительный пример был получен аналогичным образом.

Первый CFR анализ выполняли перед нанесением любого защитного покрытия на проточные ячейки согласно примеру с открытой поверхностью. Полученные данные представлены на Фиг. 18 в виде полосы T0.

После проведения первого анализа с CFR был приготовлен водный раствор KOLLICOAT® IR, который применяли для нанесения защитных покрытий распылением на примеры ячеек с открытой поверхностью.

Проточные ячейки согласно примеру с открытой поверхностью затем выдерживали в сухом состоянии в течение 1 суток или 2 суток при 60°C.

После соответствующих периодов выдержки каждую из ячеек с открытой поверхностью использовали для секвенирования, и защитные покрытия удалялись при проведении промывки (промывок).

На Фиг. 18 представлена гистограмма удержания CFR (% отношение сигнала CFR в сутки X (X=1 или 2) к сигналу в сутки 0) после проведения первого цикла секвенирования, который выполняли после выдержки в течение 1 суток и 2 суток. После выдержки в течение обоих периодов, удержание CFR в сравнительных проточных ячейках C13 (которые хранили без защитного покрытия) было значительно ниже, чем в примерах проточных ячеек 12 (которые хранили с защитным покрытием). Так, после выдержки в течение одних суток удержание CFR в сравнительной проточной ячейке снизилось на 40%.

Пример 12

На каждую из лунок структурированной многослойной конструкции КМОП наносили слой PAZAM. После шлифовки на структурированную многослойную конструкцию КМОП и на соответствующие лунки (на которых имелся слой PAZAM) структурированной многослойной конструкции КМОП наносили распылением покрытия из KOLLICOAT® IR различной толщины. Раствор, который применяли для селективного распыления покрытий из KOLLICOAT® IR, включал приблизительно 5% KOLLICOAT® IR, приблизительно 5% этанола и приблизительно 90% воды. Толщина различных покрытий составляла от 1,708 мкм до 11,73 мкм. Другая часть многослойной конструкции оставалась без покрытия, и ее использовали в качестве сравнительного примера.

Затем многослойную конструкцию (включающую части согласно примерам и части согласно сравнительным примерам) выдерживали в сухом состоянии при 40°C в течение 2 суток.

Соответствующие покрытия удаляли с многослойной конструкции растворением в воде, и на слои PAZAM, находящиеся в лунках, маканием наносили праймеры. Затем проводили анализ с помощью CFR.

Было показано, что на всех частях многослойной конструкции, имеющих покрытие из KOLLICOAT® IR, процентная интенсивность была выше, чем на частях сравнительных примеров. Результаты представлены на Фиг. 19 в зависимости от толщины нанесенного покрытия из KOLLICOAT® IR. Результаты показывают, что, по-видимому, толщина защитного покрытия не влияет на его способность сохранять функциональность слоя PAZAM, позволяющую закреплять на нем праймеры, после удаления защитного покрытия.

Пример 13

Пример проточной ячейки включал восемь дорожек, сформированных на структурированной подложке из кремния, причем каждая дорожка находилась в гидравлическом взаимодействии с совокупностью лунок. На каждую лунку был нанесен слой PAZAM, и к слою PAZAM был привит 1 мкМ праймеров.

Защитные покрытия наносили на находящееся на поверхности химическое вещество, расположенное на четырех из восьми дорожек. В частности, на четыре из восьми дорожек наносили раствор, включающий приблизительно 5% KOLLICOAT® IR, приблизительно 5% этанола и приблизительно 90% воды. Ячейку сушили в вакууме, после чего в течение 30 секунд продували газообразным азотом. Проточную ячейку выдерживали в течение 2 суток при 60°C.

Оставшиеся четыре дорожки были дорожками сравнения. Находящееся на поверхности дорожек сравнения химическое вещество было тем же веществом, что и на дорожках примеров, за исключением того, что на находящееся на поверхности дорожек сравнения химическое вещество не наносили защитного покрытия.

После выдержки, на каждой дорожке примеров (каждая из которых была обозначена как 13) и на каждой дорожке сравнительных примеров (каждая из которых была обозначена как C14) выполняли секвенирование. Защитное покрытие было удалено в результате промывок водой, которые были включены в способ секвенирования.

На Фиг. 20 представлена диаграмма средней интенсивности флуоресценции на дорожках (13) согласно примеру и дорожках (C14) согласно сравнительному примеру для двух прочтений после проведения первого цикла секвенирования. Как показано, защитное покрытие предотвращает значительное снижение интенсивности C1 на дорожках примеров проточной ячейки.

Пример 14

Пример проточной ячейки включал восемь дорожек, сформированных на структурированной подложке из кремния, где каждая дорожка находилась в гидравлическом взаимодействии с совокупностью лунок. На каждую лунку был нанесен слой PAZAM, и к слою PAZAM был привит 1 мкМ праймеров.

Были приготовлены смеси праймеров для прививки, включающие различные количества KOLLICOAT® IR, которые составляли от 5% до 0,1%, и они были распределены по восьми дорожкам проточной ячейки. Смеси праймеров для прививки инкубировали, после чего ячейку сушили в вакууме и затем в течение 30 секунд продували газообразным азотом через каждое отверстие.

Защитные покрытия удаляли растворением в воде, и выполняли анализ с CFR.

На Фиг. 21 представлена диаграмма относительной интенсивности сигнала CFR в зависимости от процентного содержания KOLLICOAT® IR. Относительно согласующиеся данные анализа с CFR показывают, что праймеры могут быть привиты одновременно с нанесением защитного покрытия. Этот пример свидетельствует о том, что покрытие не оказывает негативного влияния на механизм осаждения праймера, применяемого в этом примере.

Пример 15

В этом примере три проточных ячейки включали восемь дорожек, сформированных на структурированной подложке из кремния, где каждая дорожка находилась в гидравлическом взаимодействии с совокупностью лунок. На каждую лунку был нанесен слой PAZAM, и к слою PAZAM был привит 1 мкМ праймеров.

На находящееся на поверхности одной из восьми дорожек химическое вещество наносили защитное покрытие из полиакриламида. На химические вещества, находящиеся на поверхности пяти из восьми дорожек, наносили сравнительные покрытия (различные водорастворимые катионные полимеры), и одну из восьми дорожек оставляли без покрытия. Сравнительные покрытия состояли из различных катионных полимеров. В приведенной ниже Таблице 2 указаны параметры различных испытуемых ячеек и применяемые концентрации реагентов.

Таблица 2

| | | Концентрация (%) | | |
|---|---|---|---|---|
| Идентификатор | Защитное покрытие | FC1 | FC2 | FC3 |
| Без покрытия (сравнительный пример) | Нет | н.а. | н.а. | н.а. |
| 14 | Полиакриламид | 0,01 | 0,1 | 1 |
| C15A (сравнительный пример) | Luviquat® HOLD | 0,01 | 0,1 | 1 |
| C15B (сравнительный пример) | Luviquat® FC 370 | 0,01 | 0,1 | 1 |
| C15C (сравнительный пример) | Luviquat® FC 550 | 0,01 | 0,1 | 1 |
| C15D (сравнительный пример) | Поликватериниум-10 | 0,01 | 0,1 | 1 |
| C15E (сравнительный пример) | Полиэтиленимин (ПЭИ) | 0,01 | 0,1 | 1 |

н.а. – не анализировали

Покрытия получали пропусканием реагента и сушили в течение 30 секунд в потоке газообразного азота. Ячейки промывали.

На каждой дорожке проточной ячейки проводили образование кластеров. На каждую дорожку течения загружали библиотеку секвенирования, и фрагменты захватывались комплементарными праймерами. Каждый фрагмент был амплифицирован с образованием отдельных клональных кластеров. Определяли интенсивность, и результаты, выраженные в произвольных единицах флуоресценции, которые отражают количество двухцепочечных ДНК, присутствующих на поверхности дорожки проточной ячейки, представлены на Фиг. 22. Как показано, защитное покрытие защищает дорожку примера, в то время как катионные полимеры затрудняют образование кластеров (сравнить 14 с каждым из вариантов C15A-C15E). Вероятно, что катионные полимеры связываются с PAZAM и/или находящимися на поверхности праймерами.

Дополнительные замечания

Следует понимать, что все комбинации приведенных выше признаков и дополнительных признаков, более подробно раскрытых ниже (при условии, что эти признаки не являются взаимоисключающими) составляют часть предмета изобретения, рассмотренного в настоящем описании. В частности, все комбинации раскрытых предметов изобретения, очевидные после прочтения предлагаемого описания, составляют часть предмета изобретения, рассмотренного в настоящем описании. Также следует понимать, что применяемая в настоящем описании терминология, которая также может употребляться в любом документе, включенном в настоящее описание посредством ссылки, должна иметь значение, в наибольшей мере соответствующее конкретным признакам, рассмотренным в настоящем описании.

Упоминание в настоящем описании "одного примера", "другого примера", "примера" и т.д. означает, что конкретный элемент (например, элемент, структура и/или характеристика), раскрытый при описании этого примера, включен в по меньшей мере

один пример, рассмотренный в настоящем описании, и может присутствовать или может отсутствовать в других примерах. Кроме того, следует понимать, что, если из контекста не ясно иное, то рассмотренные элементы любого примера могут быть скомбинированы в различных примерах любым подходящим образом.

Следует понимать, что приведенные в настоящем описании диапазоны включают указанные диапазоны и любые величины или поддиапазоны, находящиеся в пределах указанного диапазона, как если бы величина (величины) или поддиапазоны (поддиапазоны), находящиеся пределах указанного диапазона, были явным образом упомянуты. Например, следует понимать, что диапазон, составляющий от приблизительно 200 мм до приблизительно 300 мм, включает не только явным образом упомянутые пределы от приблизительно 200 мм до приблизительно 300 мм, но также включает индивидуальные величины, такие как приблизительно 208 мм, приблизительно 245 мм, приблизительно 275,5 мм и т.д., и поддиапазоны, такие как от приблизительно 225 мм до приблизительно 290 мм, от приблизительно 235 мм до приблизительно 280 мм и т.д. Кроме того, если для описания величины используют модификаторы "приблизительно" и/или "по существу", то они составляют небольшие вариации (до +/- 10%) от означенной величины.

Несмотря на то, что некоторые примеры были описаны подробно, следует понимать, что рассмотренные примеры могут быть модифицированы. Таким образом, приведенное выше описание не является ограничивающим.

## (57) Формула изобретения

1. Проточная ячейка, включающая:

подложку, включающую открытую поверхность;

слой покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанный с открытой поверхностью подложки через химическую группу, имеющуюся на открытой поверхности;

праймер, прикрепленный к слою покрытия из функционализированного полимера; и

водорастворимое защитное покрытие на праймере и слое покрытия из функционализированного полимера.

2. Проточная ячейка по п. 1, в которой слой покрытия из функционализированного полимера ковалентно связан с открытой поверхностью посредством реакции химической группы, находящейся на открытой поверхности, с первой реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера.

3. Проточная ячейка по п. 1 или 2, в которой праймер прикреплен к слою покрытия из функционализированного полимера посредством реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера.

4. Проточная ячейка по любому из пп. 1-3, дополнительно включающая крышку, присоединенную к соединительному участку подложки, где крышка и подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал.

5. Проточная ячейка по п. 4, в которой подложка представляет собой структурированную подложку, включающую углубления, разделенные промежуточными областями, и в которой проточный канал находится в селективном взаимодействии с углублениями.

6. Проточная ячейка по любому из пп. 1-4, в которой подложка представляет собой структурированную подложку, включающую углубления, разделенные промежуточными

областями.

7. Проточная ячейка по любому из пп. 5 или 6, в которой водорастворимое защитное покрытие находится в углублениях и на по меньшей мере части промежуточных областей.

8. Проточная ячейка по любому из пп. 1-4, в которой подложка не является структурированной подложкой.

9. Способ нанесения защитного покрытия на проточную ячейку, включающий:

обеспечение подложки проточной ячейки с открытой поверхностью, включающей первую химическую группу, где обеспечение необязательно включает модификацию открытой поверхности подложки с целью введения первой химической группы;

реакцию первой химической группы с первой реакционноспособной группой молекулы функционализированного полимера с образованием слоя покрытия из функционализированного полимера, ковалентно связанного с открытой поверхностью подложки;

прививку праймера к слою покрытия из функционализированного полимера посредством проведения реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера; и образование водорастворимого защитного покрытия на праймере и слое покрытия из функционализированного полимера.

10. Способ по п. 9, в котором подложка не является структурированной подложкой, и способ дополнительно включает присоединение крышки к соединительному участку неструктурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий открытую поверхность.

11. Способ по п. 10, в котором модификация открытой поверхности, реакция первой химической группы с первой реакционноспособной группой, прививка праймера и образование водорастворимого защитного покрытия включают соответствующее элюирование реагентов.

12. Способ по п. 9, в котором:

подложка не является структурированной подложкой;

модификация открытой поверхности включает плазменное травление; и после проведения модификации открытой поверхности способ дополнительно включает присоединение крышки к соединительному участку неструктурированной подложки, причем крышка и неструктурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий некоторую часть открытой поверхности.

13. Способ по п. 9, в котором:

подложка представляет собой структурированную подложку, включающую углубления, разделенные промежуточными областями;

модификация открытой поверхности включает присоединение силана или производного силана, включающего первую химическую группу, к открытой поверхности, что приводит к образованию силанизированных углублений и силанизированных промежуточных областей; в результате реакции в силанизированных углублениях и на силанизированных промежуточных областях образуется слой покрытия из функционализированного полимера; и перед прививанием праймера способ дополнительно включает удаление

слоя покрытия из функционализированного полимера с силанизированных промежуточных областей.

14. Способ по п. 13, в котором:

праймер прикреплен к слою покрытия из функционализированного полимера, находящемуся в силанизированных углублениях, с помощью прививки, что приводит к образованию функционализированных углублений; и

это образование приводит к получению водорастворимого защитного покрытия на функционализированных углублениях и по меньшей мере некоторых промежуточных областях.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что после удаления слоя покрытия из функционализированного полимера способ дополнительно включает присоединение крышки к соединительному участку структурированной подложки, и при этом крышка и структурированная подложка по меньшей мере частично ограничивают проточный канал, включающий силанизированные углубления, на которые нанесено покрытие из функционализированного полимера.

16. Способ по п. 15, в котором прививку праймера и образование водорастворимого защитного покрытия производят элюированием соответствующих реагентов.

17. Способ по п. 9, в котором после формирования слоя покрытия из функционализированного полимера, но до прививки праймера и образования водорастворимого защитного покрытия способ дополнительно включает: нанесение начального водорастворимого защитного покрытия в виде структуры на слой покрытия из функционализированного полимера таким образом, что соединительный участок подложки остается открытым; присоединение крышки к соединительному участку подложки, в результате чего образуется проточный канал, который находится в селективном гидравлическом взаимодействии с начальным водорастворимым защитным покрытием; и удаление начального водорастворимого защитного покрытия.

18. Способ по п. 9, в котором образование водорастворимого защитного покрытия включает нанесение водного раствора, включающего до приблизительно 15%, или приблизительно от 1 до 15%, или приблизительно от 1 до 10%, или приблизительно от 1 до 5%, или приблизительно от 2 до 5%, или приблизительно от 4 до 8%, или приблизительно от 5 до 7,5% (масс./об.) водорастворимого материала.

19. Способ по п. 18, в котором процентную долю водорастворимого материала в водном растворе регулируют в соответствии с плотностью праймера.

20. Проточная ячейка по любому из п 1-8 или способ по любому из пп. 9-19, в которых водорастворимое защитное покрытие включает некатионный синтетический полимер; натуральный полисахарид или его производное; натуральный белок или его производное; водорастворимую соль или низкомолекулярное соединение, выбранное из группы, состоящей из водорастворимого поверхностно-активного вещества, сахара, антиоксиданта, хелатирующего соединения, буфера, гликоля, глицерина и циклодекстрина; или комбинацию перечисленных веществ.

21. Проточная ячейка или способ по п. 20, в которых водорастворимое защитное покрытие включает:

(а) некатионный синтетический полимер, включающий полиакриламид, полиакриловую кислоту, полиакрилат, полиметакриловую кислоту, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиметакриламид, 5 поли-N-алкилакриламид, поли-N-диалкилакриламид, поли-N-(2-гидроксипропил)метакриламид, сополимер простого дивиниловго эфира и малеинового ангидрида, полифосфат, поли-2-алкил-2-оксазолин, полигидроксиэтилметакрилат, поли-2-гидроксиэтилакрилат, полиэтиленгликоль, простой полиэфир, полисульфобетаинметакрилат, сополимер простого винилового эфира малеиновой кислоты, полимер, включающий функциональные гидроксильные группы, не встречающийся в природе полипептид или

кремнийорганический полимер или комбинацию перечисленных веществ;

(b) натуральный полисахарид или его производное, включающее крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, ксантановую камедь, пектин, декстран, каррагенан, гуаровую камедь, целлюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ), гидроксипропилцеллюлозу (ГПЦ), гидроксиэтилцеллюлозу (ГЭЦ), метилцеллюлозу, карбоксиметилгидроксиэтилцеллюлозу (КМГЭЦ), гиалуроновую кислоту, фосфат крахмала, гидроксипропилкрахмал, гидроксиэтилкрахмал, агарозу, агар или альгинат или комбинацию перечисленных веществ;

(c) натуральный белок или его производное, включающее казеин или альбумин;

(d) водорастворимую соль, включающую хлорид натрия, бромид натрия, сульфат натрия, фосфат натрия, карбонат натрия, ацетат натрия, натрия цитрат, хлорид калия, бромид калия, сульфат калия, фосфат калия, карбонат калия, ацетат калия или цитрат калия, или солевой раствор цитрата натрия или комбинацию перечисленных веществ;

(e) буфер, включающий водный солевой раствор цитрата натрия, трис(гидроксиметил) аминометан (Трис), необязательно с этилендиаминтетрауксусной кислотой, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), 3-[[1,3-дигидрокси-2-(гидроксиметил)пропан-2-ил]амино]-2-гидроксипропан-1-сульфоновую кислоту (TAPSO), N-(2-гидрокси-1,1-бис(гидроксиметил)этил)глицин (трицин), 3-(N105 морфолино)пропансульфоновую кислоту (MOPS) или 3-(N,N-бис([2-гидроксиэтил] амино)-2-гидроксипропансульфоновую кислоту (DIPSO); (f) водорастворимое поверхностно-активное вещество, включающее анионное или неионное поверхностно-активное вещество или включающее додецилсульфат натрия, алкилэтоксилат, этоксилированное масло, жир или сульфосукцинат; или (g) сахар, антиоксидант, гликоль, глицерин или циклодекстрин; (h) хелатирующее соединение, включающее натриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил) амин, трис(2-карбоксиэтил)фосфин или динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты; или (i) комбинацию перечисленных веществ.

22. Проточная ячейка или способ по п. 20, в которых водорастворимое защитное покрытие включает графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу, декстран, полиакриламид, гликоль, трис(гидроксиметил)аминометан или его соль, этилендиаминтетрауксусную кислоту или ее соль, трис(2-карбоксиэтил)фосфин, трис(3-гидроксипропилтриазолилметил)амин или его соль, динатриевую соль батофенантролиндисульфоновой кислоты, полимер, включающий функциональные гидроксильные группы, глицерин, или солевой раствор цитрата натрия, или смесь перечисленных веществ.

23. Проточная ячейка или способ по п. 20, в которых водорастворимое защитное покрытие включает графтсополимер поливинилового спирта/полиэтиленгликоля, сахарозу или смесь перечисленных веществ.

24. Проточная ячейка или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых слой покрытия из функционализированного полимера состоит из сополимера N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида и акриламида (PAZAM).

25. Проточная ячейка по любому из предшествующих пунктов, в которой водорастворимое защитное покрытие нанесено на проточную ячейку в виде смеси со слоем покрытия из функционализированного полимера.

26. Проточная ячейка или способ по любому из предшествующих пунктов, в которой химическая группа или первая химическая группа представляет собой необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный норборненил, необязательно замещенный циклооктинил, необязательно

замещенный бициклононинил, необязательно замещенный алкинил, азидогруппу, необязательно замещенный тетразинил, гидразонил, необязательно замещенный тетразолил, формил или гидроксил.

27. Проточная ячейка или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых химическая группа или первая химическая группа ковалентно связана с открытой поверхностью подложки через силановый линкер.

28. Проточная ячейка или способ по п. 27, в которых химическая группа или первая химическая группа представляет собой норборненил или замещенный норборненил.

29. Проточная ячейка или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых как первая реакционноспособная группа, так и вторая реакционноспособная группа, в тех случаях, в которых их упоминают, независимо необязательно представляют собой замещенный алкенил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный норборненил, необязательно замещенный циклооктинил, необязательно замещенный бициклононинил, необязательно замещенный алкинил, азидогруппу, необязательно замещенный тетразинил, гидразонил, необязательно замещенный тетразолил, формил или гидроксил.

30. Проточная ячейка или способ по п. 29, в которых как первая, так и вторая реакционноспособные группы представляют собой азидогруппу.

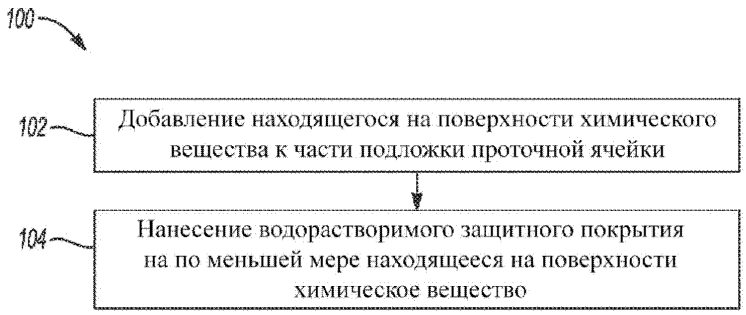
31. Проточная ячейка или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых праймер прикреплен к слою покрытия из функционализированного полимера посредством реакции праймера со второй реакционноспособной группой, принадлежащей слою покрытия из функционализированного полимера, и праймер включает алкинильную группу, подходящую для реакции со второй реакционноспособной группой.

32. Проточная ячейка или способ по любому из предшествующих пунктов, в которых праймер представляет собой совокупность праймеров, которая включает популяцию функциональных праймеров и популяцию нефункциональных праймеров.

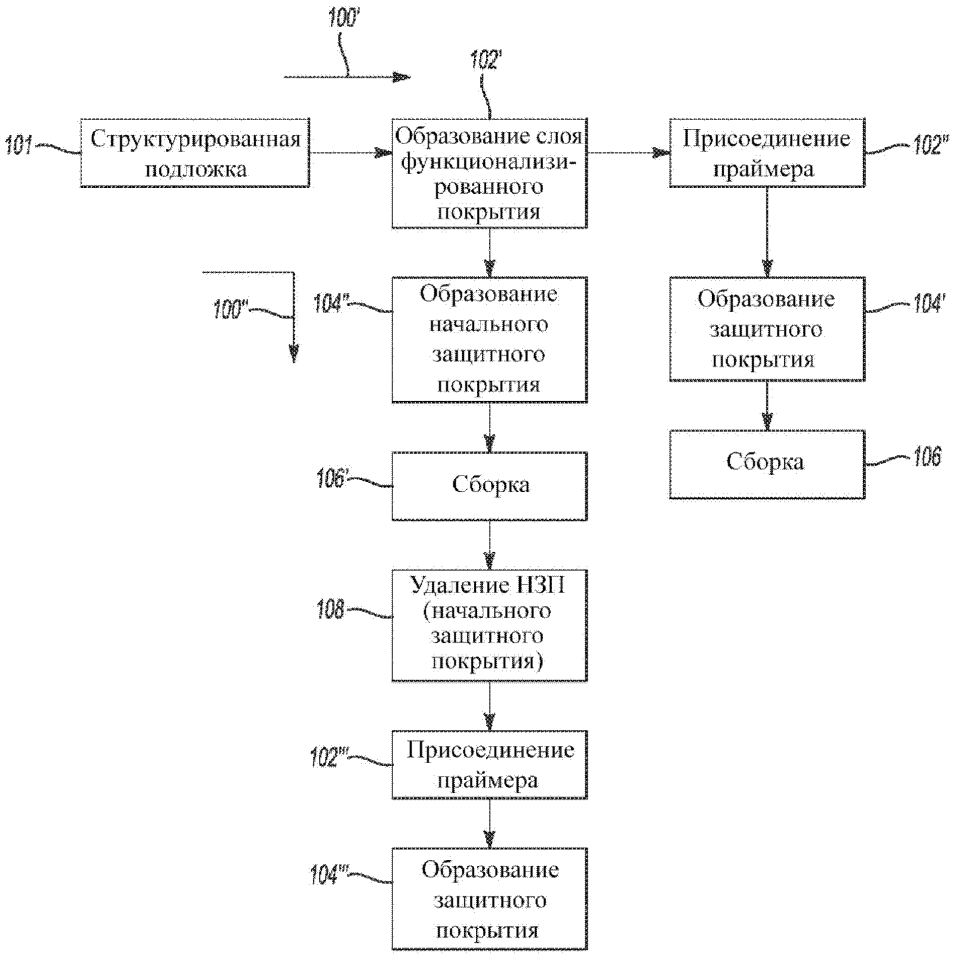
33. Способ применения проточной ячейки по любому из пп. 1-8 или 20-32, включающий: размещение проточной ячейки в устройстве для 5 секвенирования и удаление водорастворимого защитного покрытия воздействием воды на водорастворимое защитное покрытие проточной ячейки.

34. Способ по п. 33, в котором удаление выполняют элюированием, удаляющим водорастворимое защитное покрытие.

1

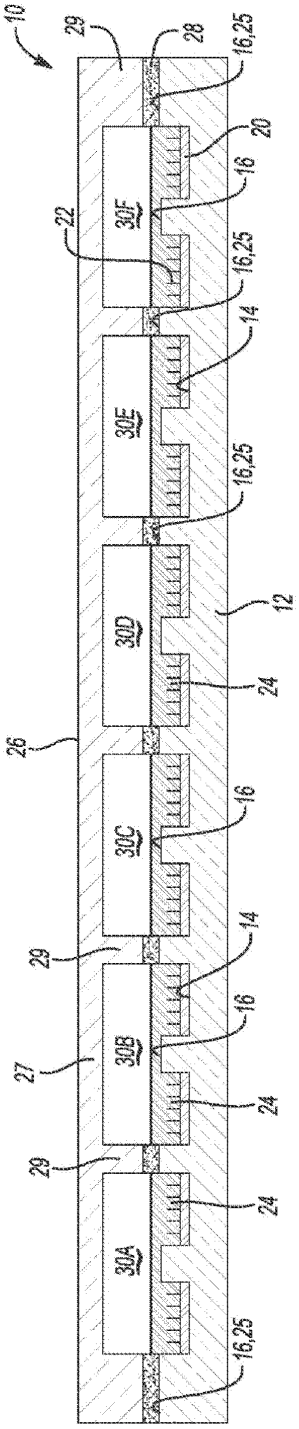

100
102
Добавление находящегося на поверхности химического вещества к части подложки проточной ячейки
104
Нанесение водорастворимого защитного покрытия на по меньшей мере находящееся на поверхности химическое вещество

***ФИГ. 1***


100'
102'
101
Структурированная подложка
Образование слоя функционализированного покрытия
Присоединение праймера
102''
100''
104''
Образование начального защитного покрытия
Образование защитного покрытия
104'
106'
Сборка
Сборка
106
108
Удаление НЗП (начального защитного покрытия)
102'''
Присоединение праймера
104'''
Образование защитного покрытия

***ФИГ. 2***

2


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

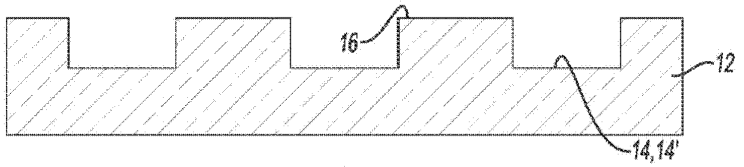
*ФИГ. 3*

3

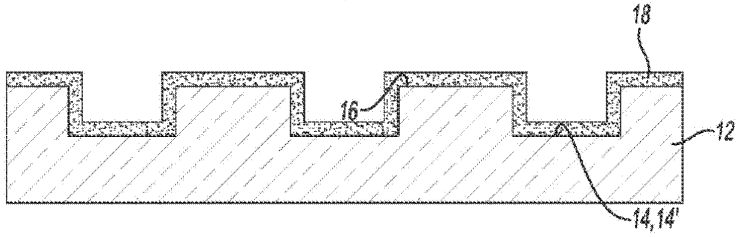

200
202
Присоединение силана или производного силана к поверхности структурированной подложки, включающей углубления, разделенные промежуточными областями, что приводит к образованию силанизированных углублений и силанизированных промежуточных областей
204
Формирование слоя покрытия из функционализированного полимера в силанизированных углублениях и на силанизированных промежуточных областях
206
Удаление слоя покрытия из функционализированного полимера шлифовкой с силанизированных промежуточных областей
208
Прививка праймера к слою покрытия из функционализированного полимера, находящегося в силанизированных углублениях, с образованием функционализированных углублений
210
Образование водорастворимого защитного покрытия на функционализированных углублениях и по меньшей мере части промежуточных областей

***ФИГ. 4***

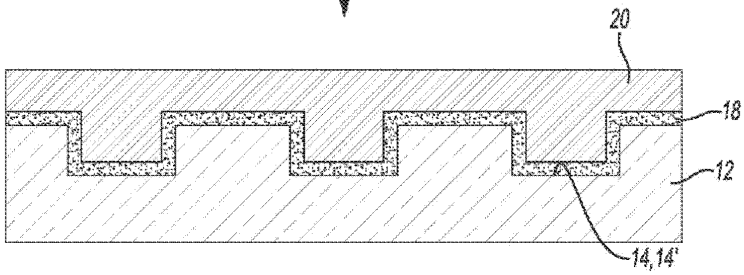
4



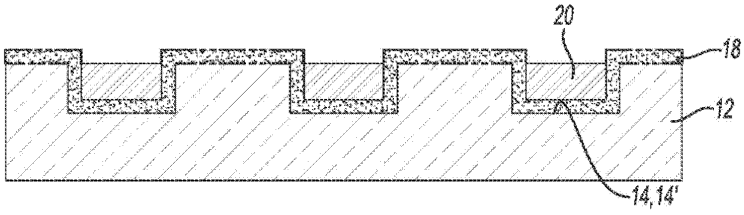

ФИГ. 5A




ФИГ. 5B

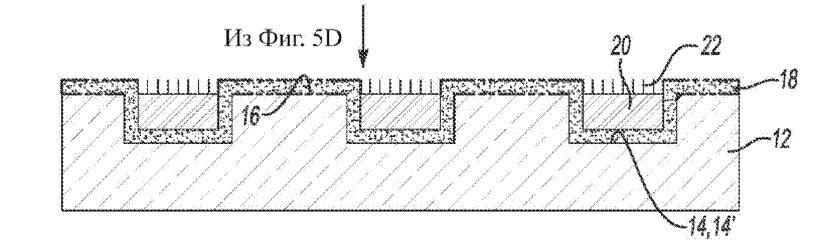



ФИГ. 5C

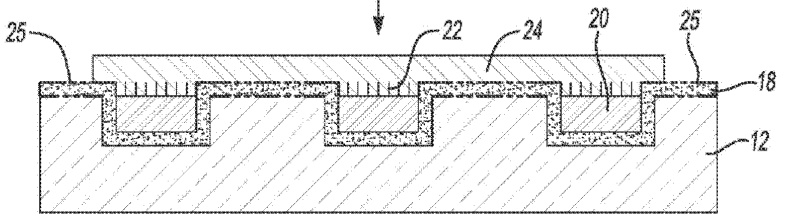



К Фиг. 5E К Фиг. 5I

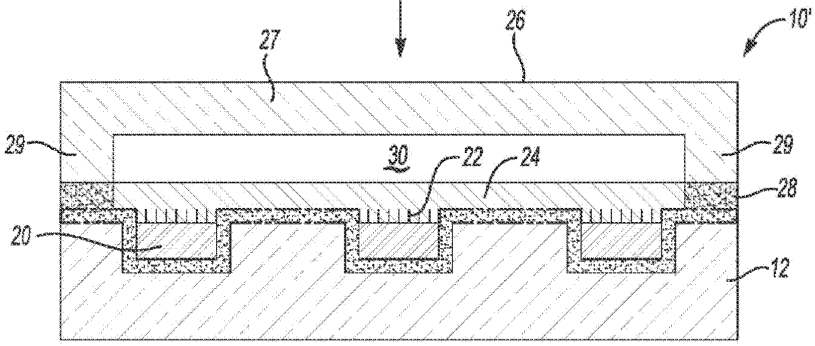
ФИГ. 5D



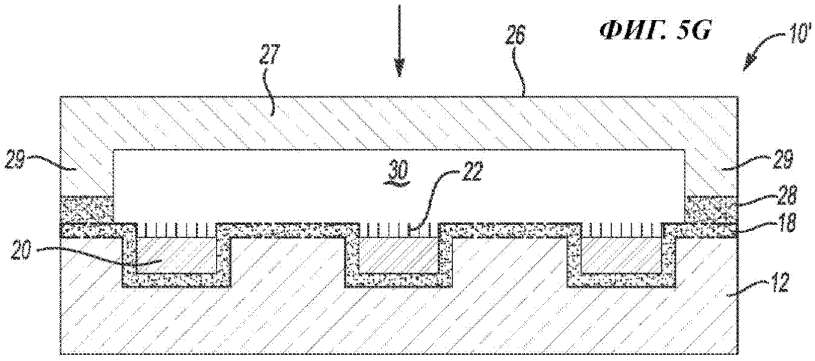

ФИГ. 5E




ФИГ. 5F

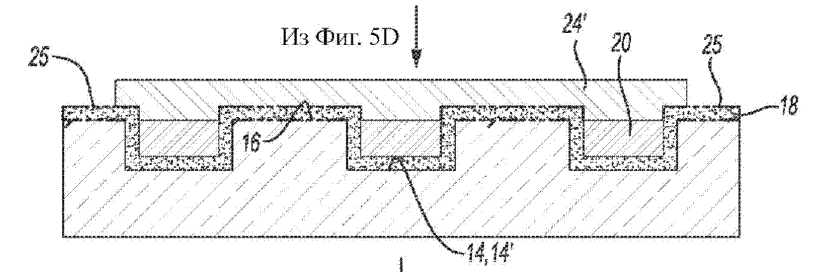



ФИГ. 5G

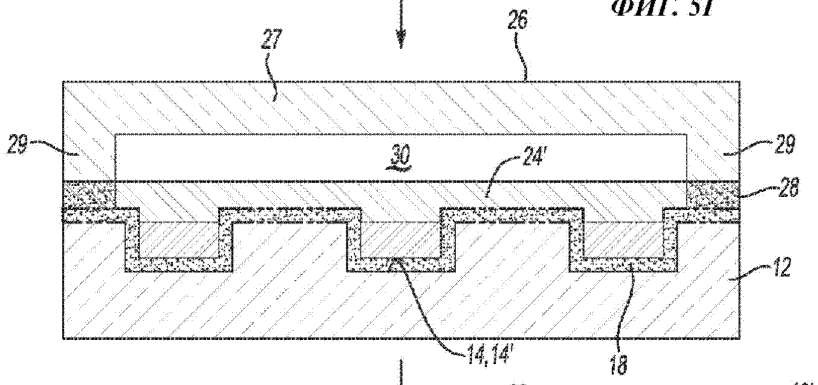



ФИГ. 5H

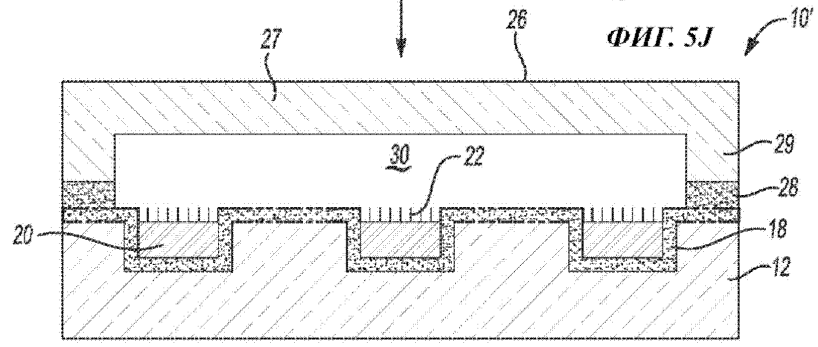
6



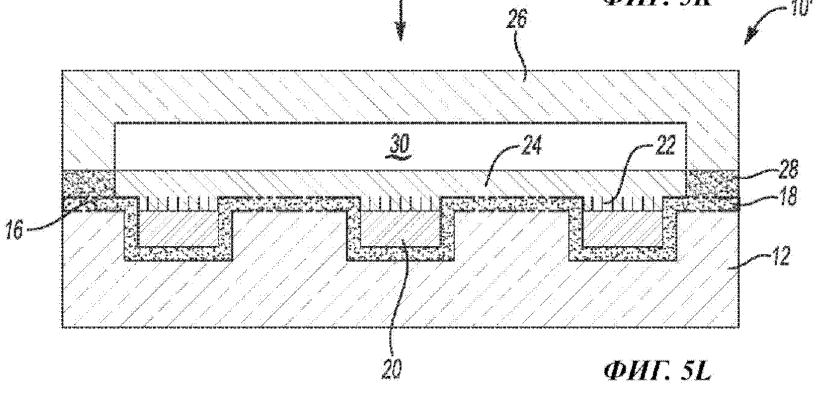

ФИГ. 5I




ФИГ. 5J

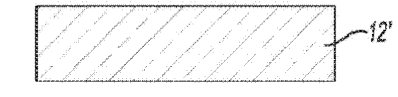



ФИГ. 5K

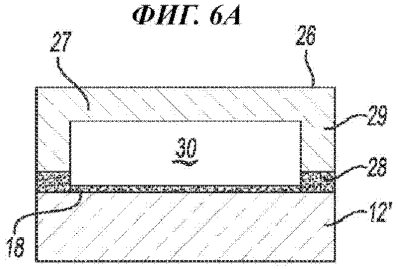



ФИГ. 5L

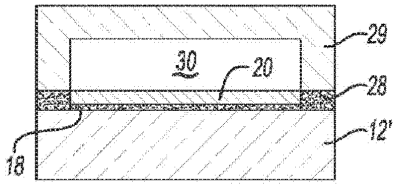
7



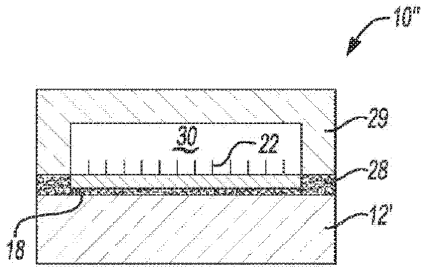

ФИГ. 6A



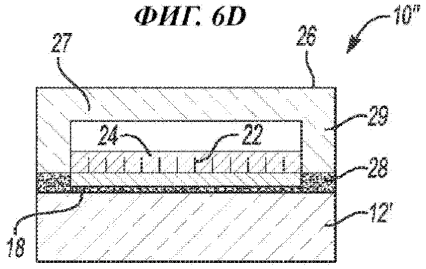

ФИГ. 6B



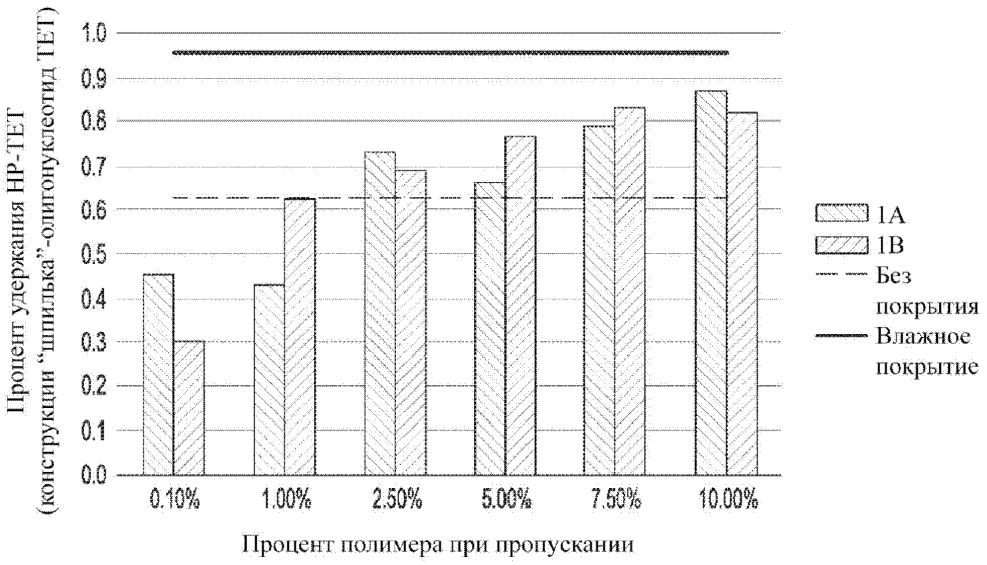

ФИГ. 6C



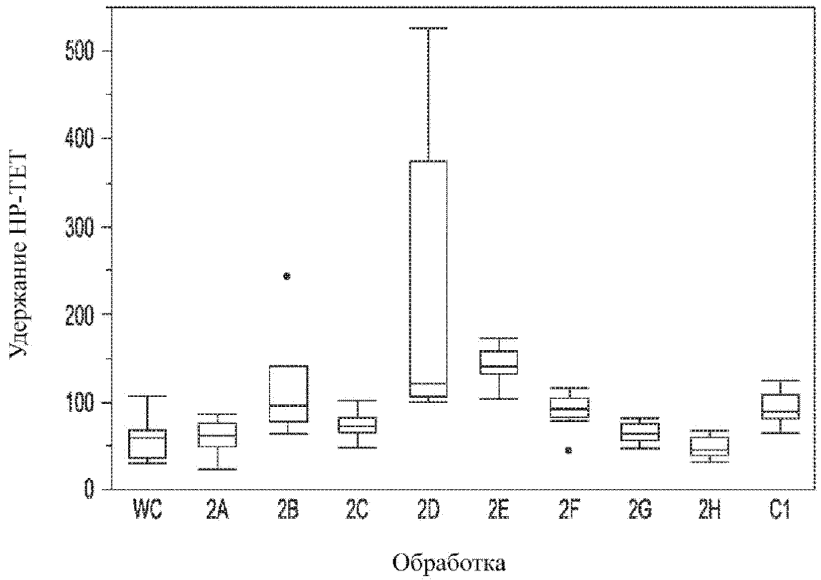

ФИГ. 6D



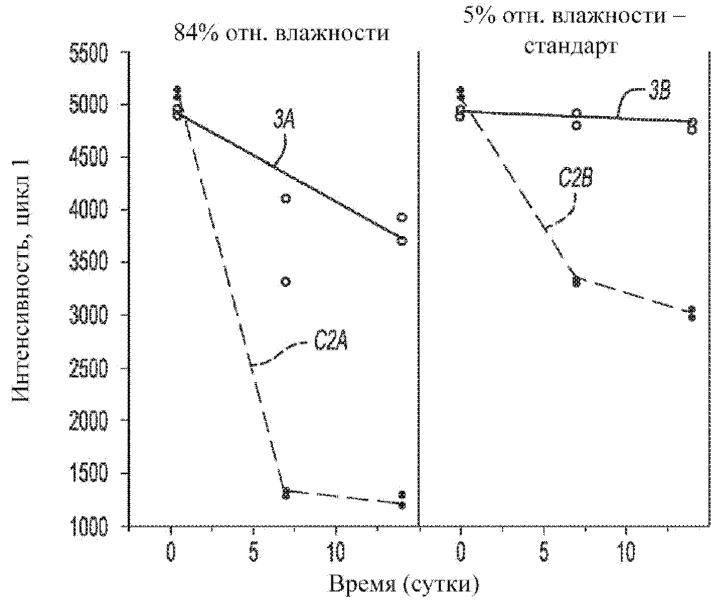

ФИГ. 6E




ФИГ. 7

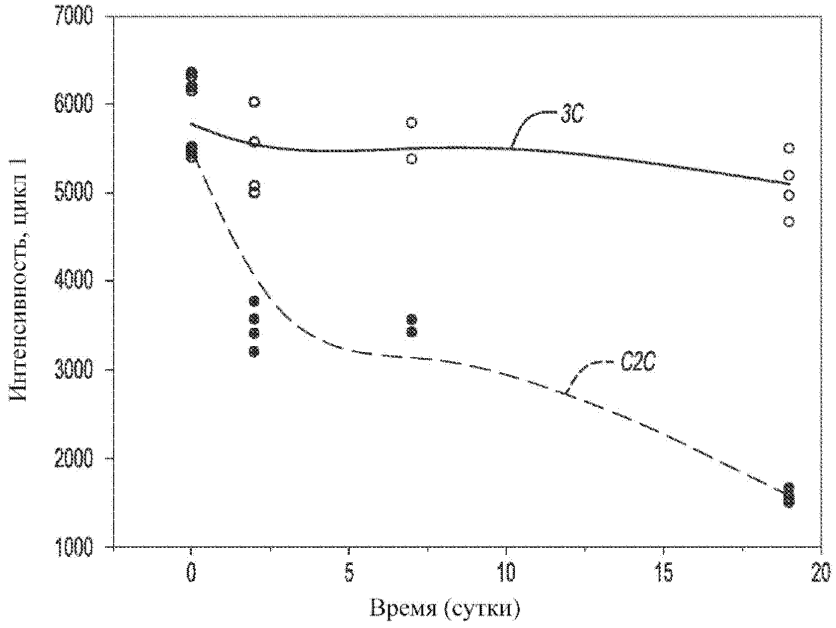

Удержание HP-TET
500
400
300
200
100
0
WC
2A
2B
2C
2D
2E
2F
2G
2H
C1
Обработка

***ФИГ. 8***

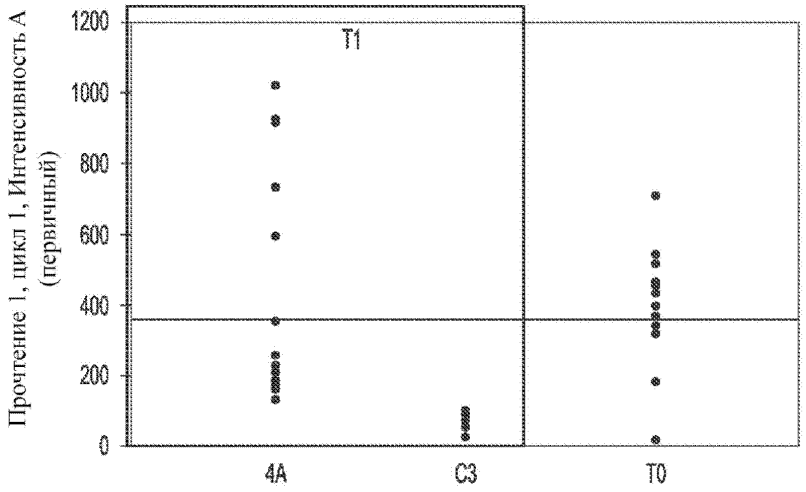

84% отн. влажности
5% отн. влажности – стандарт
Интенсивность, цикл 1
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
3A
C2A
3B
C2B
0
5
10
0
5
10
Время (сутки)

***ФИГ. 9***

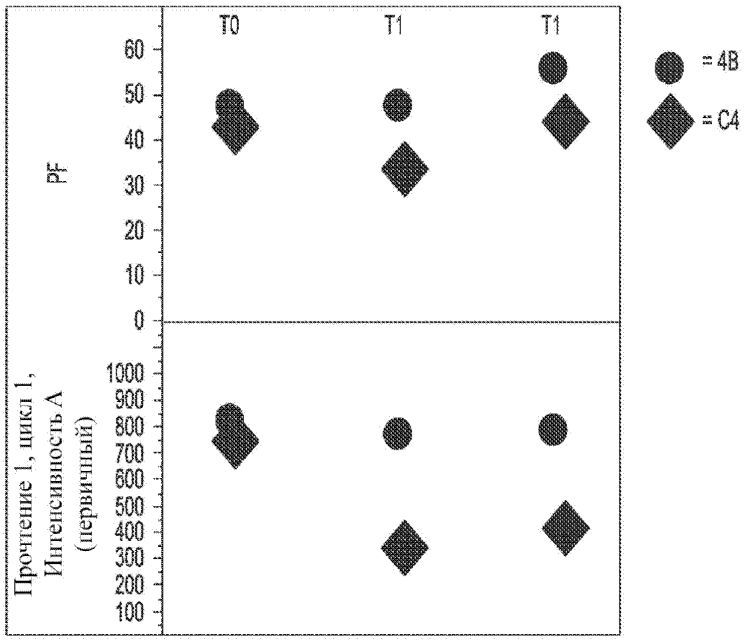
9



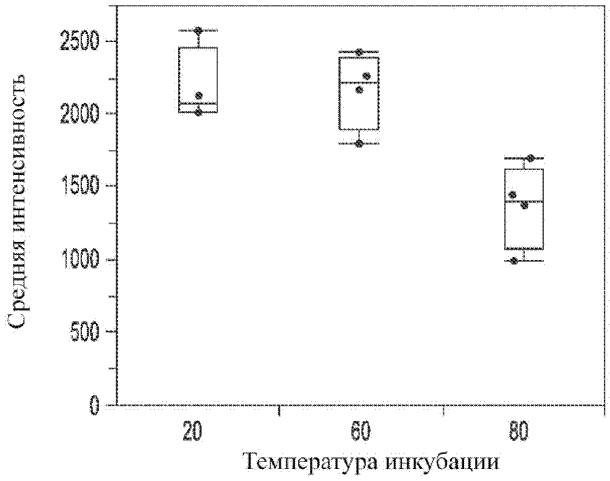

*ФИГ. 10*




*ФИГ. 11A*

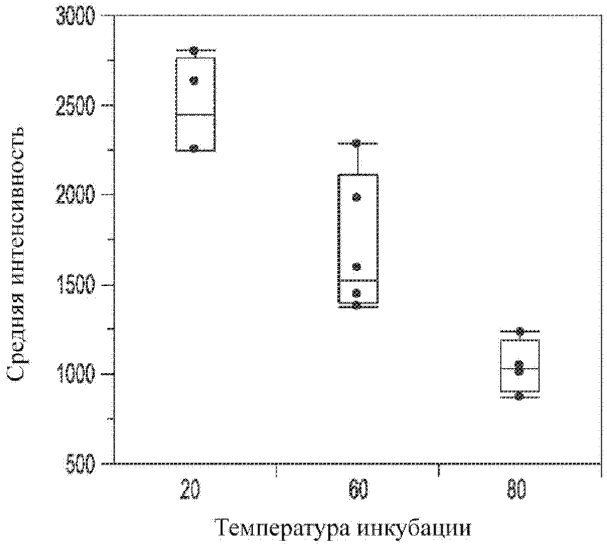



*ФИГ. 11B*

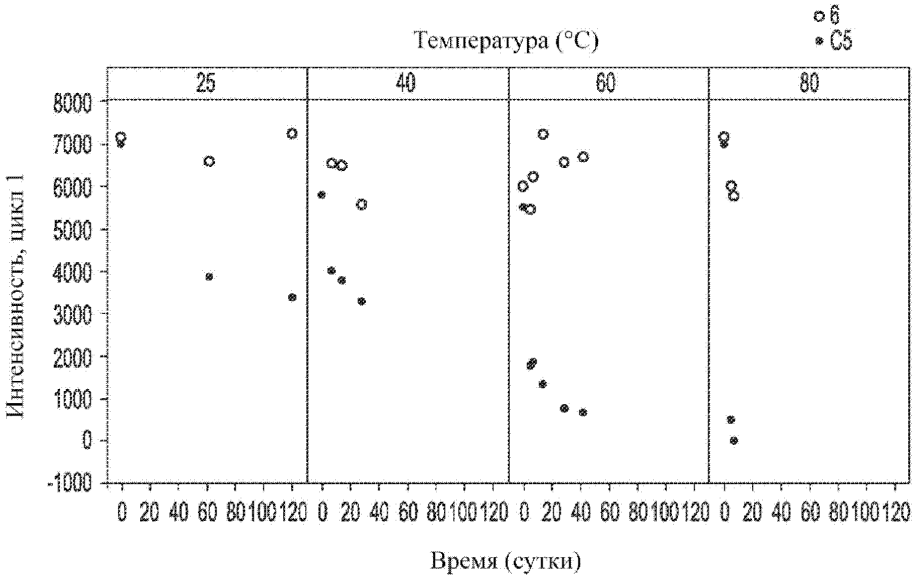



*ФИГ. 12A*

11

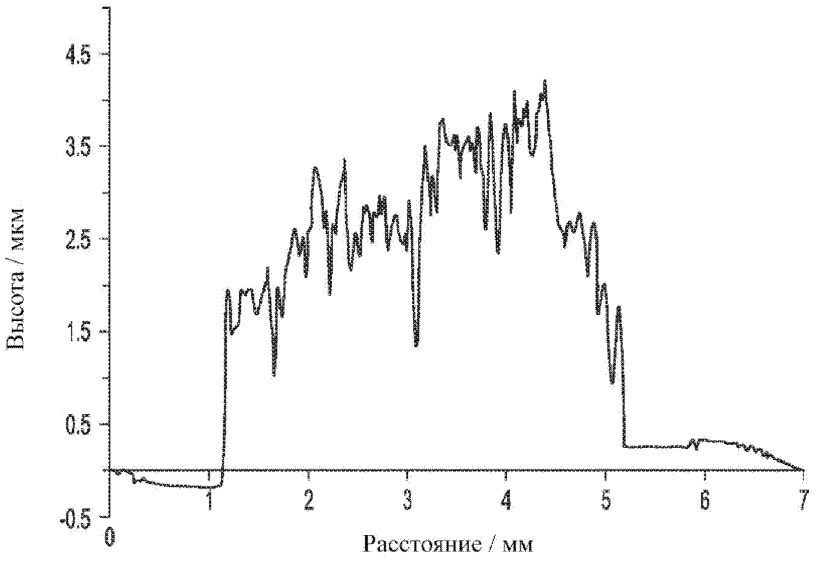



*ФИГ. 12В*

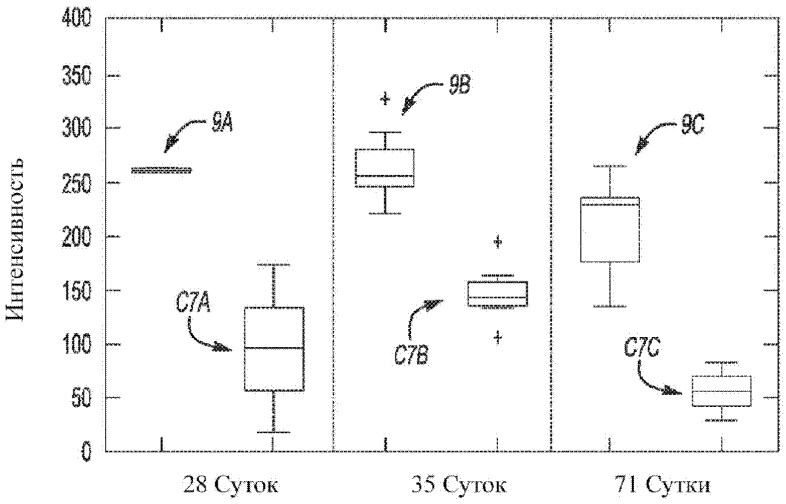



*ФИГ. 13*

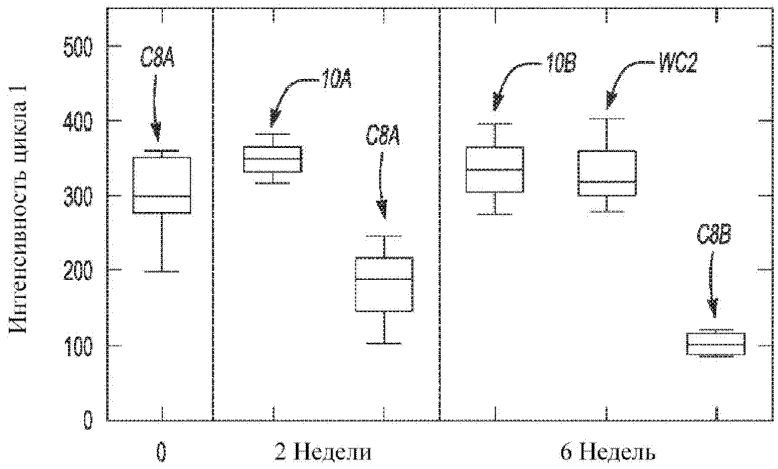
12


Высота / мкм
4.5
3.5
2.5
1.5
0.5
-0.5
0
1
2
3
4
5
6
7
Расстояние / мм

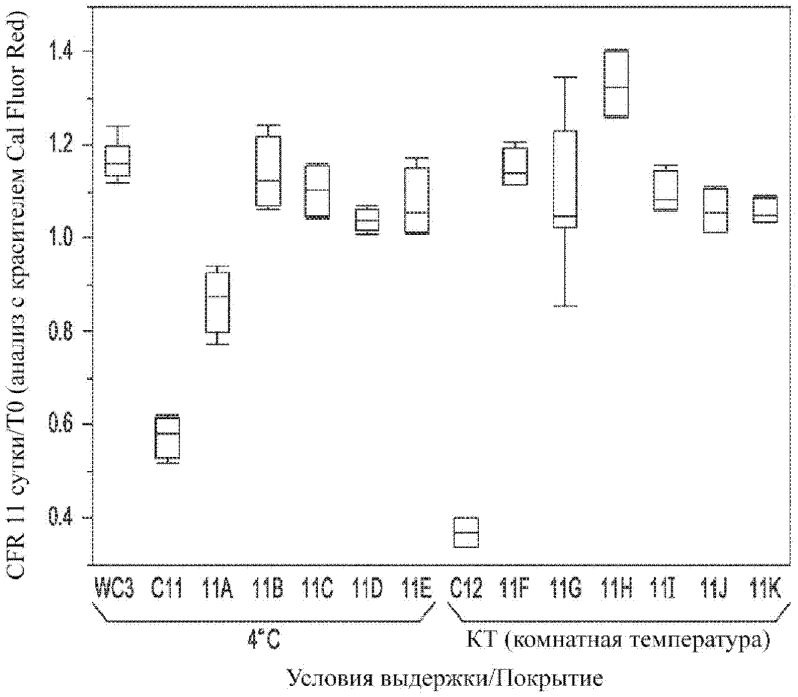
*ФИГ. 14*


Интенсивность
400
350
300
250
200
150
100
50
0
9A
9B
9C
C7A
C7B
C7C
28 Суток
35 Суток
71 Сутки

*ФИГ. 15*

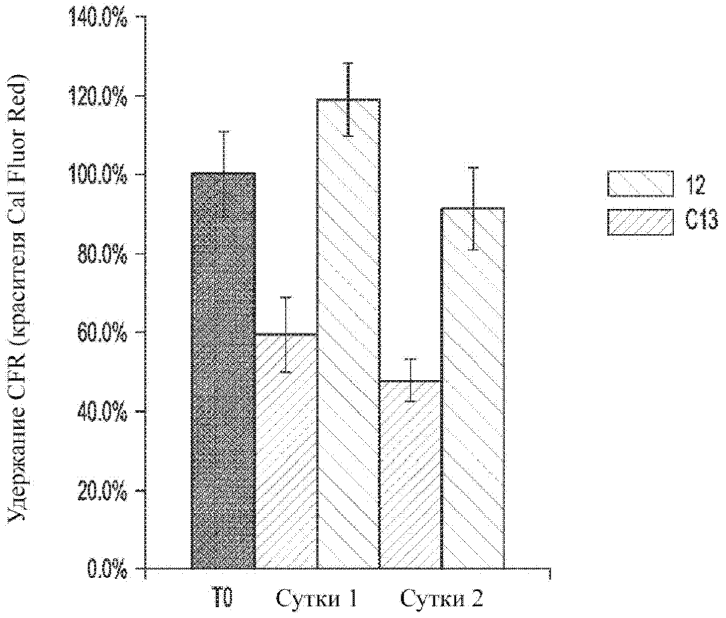



*ФИГ. 16*

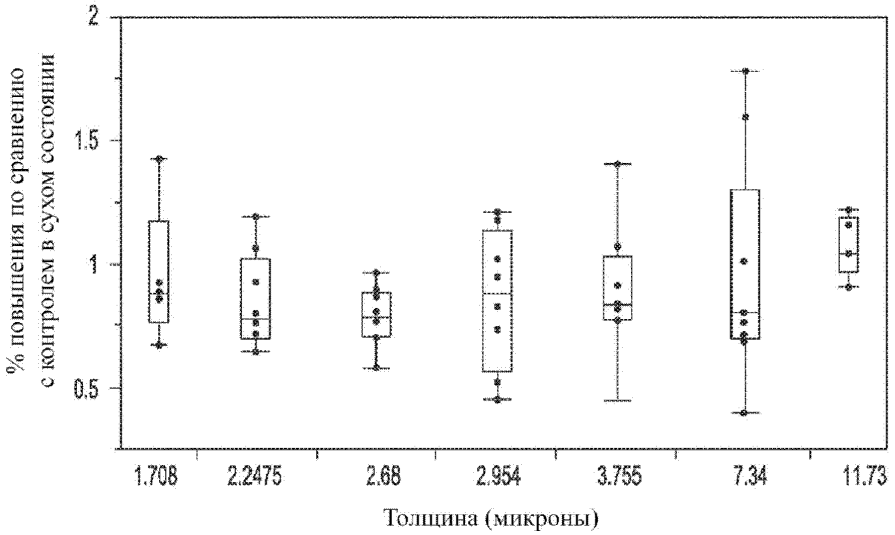



*ФИГ. 17*

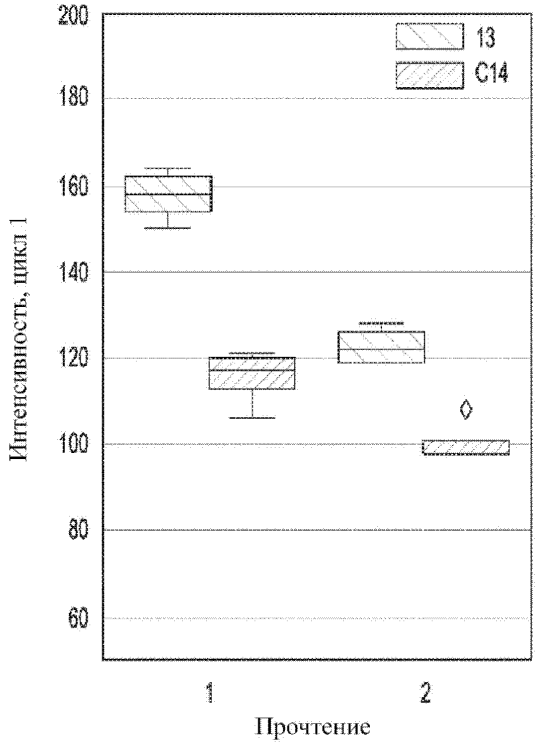
14


140.0%
120.0%
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
Удержание CFR (красителя Cal Fluor Red)
12
C13
T0
Сутки 1
Сутки 2

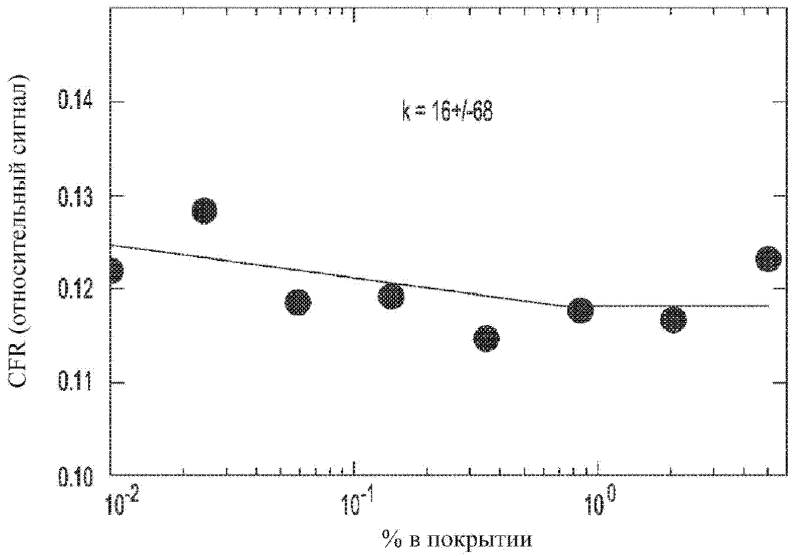
*ФИГ. 18*


2
1.5
1
0.5
% повышения по сравнению с контролем в сухом состоянии
1.708
2.2475
2.68
2.954
3.755
7.34
11.73
Толщина (микроны)

*ФИГ. 19*

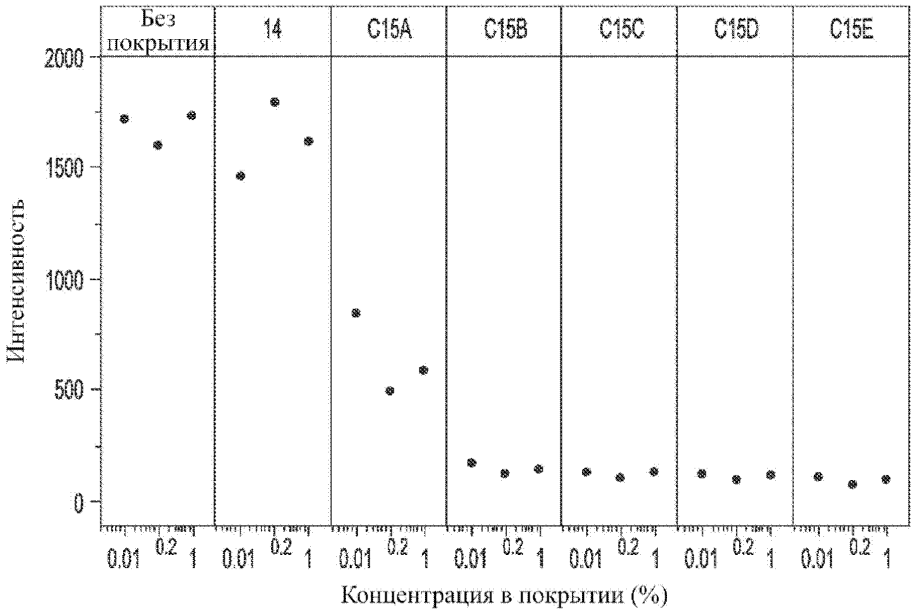



*ФИГ. 20*




*ФИГ. 21*

16


Без покрытия
14
C15A
C15B
C15C
C15D
C15E
2000
1500
1000
500
0
Интенсивность
0.01
0.2
1
Концентрация в покрытии (%)

*ФИГ. 22*